



HAL
open science

Design et synthèse de sondes fluorogéniques excitables à deux photons pour la chimie bioorthogonale

Marie Auvray

► **To cite this version:**

Marie Auvray. Design et synthèse de sondes fluorogéniques excitables à deux photons pour la chimie bioorthogonale. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASF043 . tel-04271153

HAL Id: tel-04271153

<https://theses.hal.science/tel-04271153v1>

Submitted on 6 Nov 2023

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.

Design et synthèse de sondes fluorogéniques
excitables à deux photons pour la chimie
bioorthogonale

*Design and synthesis of two-photon excitable
fluorogenic probes for bioorthogonal chemistry*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°571 : sciences chimiques : molécules, matériaux,
instrumentation et biosystèmes (2MIB)

Spécialité de doctorat : Chimie

Unité de recherche : Université Paris Saclay, CNRS, Inserm, Chimie et Modélisation
pour la Biologie du Cancer (CMBC), 91405 Orsay, France

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,

le 05/11/2021, par

Marie AUVRAY

Composition du Jury

May MORRIS

Directrice de recherche CNRS, Institut des
Biomolécules Max Mousseron, Montpellier

Présidente du jury

Alain BURGER

Professeur des universités, Université Côte d'Azur

Rapporteur & Examineur

Anthony ROMIEU

Professeur des universités, Université de Bourgogne

Rapporteur & Examineur

Frédéric TARAN

Directeur de recherche CEA, Université Paris-Saclay

Examineur

Direction de la thèse

Florence MAHUTEAU-BETZER

Directrice de recherche CNRS, Institut Curie,
Université Paris-Saclay

Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Bien qu'une thèse soit un projet qui demande un fort investissement personnel, il s'agit bien d'une œuvre collective, et je n'aurais pas réussi à la mener à bien sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes que je voudrais remercier ici.

Tout d'abord, je tiens bien évidemment à te remercier, Florence, pour la liberté que tu m'as laissée et la confiance que tu m'as accordée pour mener à bien cette thèse, tout en restant très disponible et réactive lorsque j'en avais besoin. Ce mode de fonctionnement a été extrêmement formateur. Par ailleurs, je tiens à te remercier très sincèrement pour tes encouragements à l'occasion des nombreux échanges que nous avons eus sur « l'après thèse ». Pour terminer, je voudrais bien sûr te remercier pour la bonne humeur communicative qui te caractérise !

Je souhaite également remercier les membres de mon jury de thèse, d'avoir accepté de prendre un peu de leur temps pour juger mon travail et pour les discussions très intéressantes durant ma soutenance de thèse : Alain Burger en tant que rapporteur, ainsi que May Morris et Frédéric Taran en tant qu'examineurs. Je tiens à remercier plus particulièrement Anthony Romieu, qui a fait partie de mon comité de suivi pendant ces trois années, pour les échanges que nous avons eus à cette occasion ; mais également pour l'aide très précieuse qu'il m'a apportée dans la recherche de mon premier post-doctorat.

Ces travaux étant interdisciplinaires, je voudrais remercier toutes les personnes qui ont contribué au projet : Florent Poyer de m'avoir initiée à la culture cellulaire et aidée à faire mes « premiers pas » en microscopie, Marie-Noëlle Soler et Laetitia Besse de m'avoir formée à la microscopie confocale, Frédéric Bolze d'avoir réalisé les spectres d'excitation biphotonique et de m'avoir accueillie à Strasbourg lorsque la situation sanitaire l'a permis ; et enfin Gilles Clavier pour son partage de connaissances et son aide pour la modélisation moléculaire.

Je remercie par ailleurs Lisa-Marie, Margaux et Matthieu pour leur aide pendant ma thèse. Vous encadrer a été très enrichissant d'un point de vue scientifique mais aussi d'un point de vue humain.

Je souhaite aussi remercier le département de chimie de l'Université Paris-Saclay qui m'a permis d'y effectuer mon monitorat. J'ai pris beaucoup de plaisir à encadrer des étudiants lors de séances de TD et TP de chimie organique pendant mes trois années de thèse. Merci aux enseignants avec qui j'ai pu échanger à cette occasion.

J'ai également une pensée émue pour les quelques professeurs qui, tout au long de mon parcours, ont su me transmettre leur passion pour les sciences et en particulier pour la chimie, ce qui a indéniablement contribué à mon arrivée jusqu'ici.

Il me paraît ensuite essentiel de remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées au quotidien, pour les nombreux moments de convivialité, les repas partagés au CESFO, ou les discussions au détour d'un couloir, mais plus particulièrement :

- L'équipe Teulade-Fichou : Daniela et son accent chantant qui nous fait voyager, Thibaut ou El Dictator, le dictateur le plus « chill » de la planète (et sûrement aussi un des seuls à utiliser la trottinette électrique comme principal moyen de déplacement), Corinne pour sa gentillesse, Rahima pour ses délicieux gâteaux, et enfin Charles-Henri.

- L'équipe Granzhan : tout d'abord Anton pour ses conseils avisés en photophysique, Jaime pour sa bienveillance et aussi d'avoir supporté nos conversations avec Chloé dans le grand bureau, Rainbow pour sa bonne humeur (très !) communicative et Pedro pour son enthousiasme à parler de sondes fluorescentes avec moi.

- Et bien sûr l'équipe Mahuteau : tout d'abord merci pour votre accueil bienveillant et chaleureux lorsque je suis arrivée en M2. Et plus particulièrement, un très grand merci à toi Delphine qui m'a encadrée lors de mon stage de M2, pour ta gentillesse, ton écoute et ton aide tout au long de ma thèse. Merci aussi à Pauline qui est toujours prête à donner un coup de main, Romain pour son calme légendaire, Sandrine de m'avoir permis d'avoir plein de super enseignements, Claire pour sa transmission de savoir sur l'HPLC prep et sa gestion de la « bobologie » au labo, et enfin Sibylle à qui je souhaite le meilleur pour la suite de sa thèse.

Sans oublier, Nathalie, pour sa sympathie et son aide administrative qui nous facilite énormément la vie au quotidien.

Un grand merci à Julie (partie depuis déjà plusieurs mois, que le temps passe vite !) et Chloé. Ma thèse aurait été beaucoup moins agréable sans notre trio. Merci à vous deux pour les très bons moments passés au laboratoire et en dehors, nos nombreuses discussions, nos appels et nos longues parties de Skribbl pendant le confinement, nos pauses Twix/Lion/KitKat (rayer la mention inutile). Merci aussi pour votre animation musicale du grand labo (même si je continuerai à clamer qu'RTL2 est une bien meilleure station de radio que Chante France ou NRJ !). Les casteurs de « N'oubliez pas les paroles » ne savent pas ce qu'ils ratent ;) Chloé, bon courage pour la fin de ta thèse et j'espère de tout cœur que tu pourras trouver une oreille attentive (autre que BuLi) pour partager tes déboires avec ta ménagerie :)

Merci également à tous ceux qui ont déjà quitté le laboratoire mais que je n'oublie pas.

Un immense merci à tous mes amis en dehors du laboratoire, et en particulier à toute la bande du magistère (Nathy, Nico, Antho, Emilie, mais aussi Gab, Ju, Lucie, Meije & JB). Merci à tous pour les très bons moments passés ensemble. Vous soutien a été très précieux tout au long de cette aventure.

Je souhaite également remercier ma famille pour le soutien qu'elle m'a apporté pendant mes (longues !) études.

Et pour terminer, Blaise, je te remercie évidemment pour ta relecture attentive de ce manuscrit mais avant tout pour ton enthousiasme, ton humour inimitable, ton soutien inconditionnel et ta gentillesse au quotidien. Tout simplement merci d'être là.

PRÉAMBULE

Ces travaux de thèse ont été effectués entre le 1^{er} septembre 2018 et le 31 octobre 2021 à l'Institut Curie (site d'Orsay) au sein de l'équipe « Chimie, Modélisation pour la reconnaissance des protéines » de l'UMR9187-U1196 « Chimie et Modélisation pour la Biologie du Cancer » sous la direction du Dr. Florence Mahuteau-Betzer.

Le but initial de cette thèse était de développer des marqueurs d'organelles excitables à deux photons. Différents dérivés ont été synthétisés à partir de fluorophores excitables à deux photons précédemment développés au laboratoire. Malheureusement, ces travaux, qui ne seront pas détaillés dans ce manuscrit, ont mis en évidence les difficultés à rationaliser les résultats obtenus par rapport aux travaux déjà publiés dans la littérature. Par conséquent, une réorientation du sujet, vers des thématiques permettant de travailler davantage à la fois sur le design et également la rationalisation des propriétés des objets étudiés, a été envisagée. Une première partie a donc été consacrée au développement de nouvelles sondes aux propriétés photophysiques et physico-chimiques optimisées pour la microscopie biphotonique en cellules vivantes.

En accord avec les thématiques de chimie médicinale développées au sein de l'équipe, il a été envisagé dans un second temps d'utiliser le fluorophore le plus prometteur pour concevoir des sondes fluorogéniques pour la chimie bioorthogonale. Ce type de sonde pouvant, par exemple, être utilisé pour identifier la localisation subcellulaire d'un composé d'intérêt.

Ces travaux de thèse ont ainsi été consacrés principalement à la synthèse organique de ces différentes sondes, l'évaluation à la fois de leurs propriétés physiques (linéaires et non linéaires) et de leur capacité à être utilisées comme fluorophores pour la microscopie biphotonique en cellules vivantes. Différentes études de modélisation moléculaire ont également été entreprises afin de comprendre les propriétés des composés obtenus.

Ce travail interdisciplinaire est par conséquent le fruit de nombreuses interactions avec des personnes internes et externes à l'Institut Curie. Tout d'abord, le Dr. Florent Poyer (Institut Curie, UMR9187-U1196) m'a initiée à la culture cellulaire, et en particulier à la préparation d'échantillons pour la microscopie de fluorescence. Après une formation initiale par le Dr. Marie-Noëlle Soler et Laetitia Besse de la plateforme de microscopie de l'Institut Curie (UMS2016), il m'a également accompagnée pour mes premières expériences au microscope confocal. Cela m'a ensuite permis d'être autonome pour ce type d'expériences lors du reste de ma thèse, tout en ayant des interlocuteurs privilégiés en cas de besoin. Le Dr. Gilles Clavier (ENS Paris Saclay) m'a formée pour les calculs de TD-DFT et donné accès au supercalculateur Occigen (CINES) afin de réaliser les études de modélisation moléculaire. Nous avons également échangé à plusieurs reprises sur les résultats obtenus. Enfin, les mesures de sections efficaces d'absorption biphotonique ont été réalisées par le Dr. Frédéric Bolze (Université de Strasbourg), qui m'a par ailleurs accueillie pour une série de mesures afin que je découvre ce type d'expériences.

Enfin, trois stagiaires ont également contribué au projet initial ou aux projets décrits dans ce manuscrit (dans ce cas, leur contribution est précisée en note de bas de page et dans la partie expérimentale) : Lisa-Marie Montagnat (stage de 3^{ème} année de licence, année 2018-2019), Margaux Bossuat (stage de 2^{ème} année de master, année 2019-2020) et Matthieu Poulain (stage de 2^{ème} année de master, année 2020-2021).

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A :	Groupement accepteur d'électrons
Abs :	Absorption
ACN :	Acétonitrile
AIE :	Émission de fluorescence causée par l'agrégation (<i>Aggregation-induced emission</i>)
APPI :	Photo-ionisation à pression atmosphérique
ACQ :	Inhibition de fluorescence causée par l'agrégation (<i>Aggregation-caused quenching</i>)
B_{2P} :	Brillance biphotonique
BARAC :	Biarylazacyclooctynone
BCN :	Bicyclo[6.1.0]nonyne
BOC :	Tert-butoxycarbone
BODIPY :	Bore-dipyrrrométhène
Calc. :	Calculé(e)
Cbz :	Carbazole
CLSM :	Microscopie confocale (<i>Confocal laser scanning microscopy</i>)
COMBO :	Carboxyméthylmonobenzocyclooctyne
CuTC :	Thiophène-2-carboxylate de cuivre
D :	Groupement donneur d'électrons
dba :	Dibenzylidèneacétone
DBU :	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCM :	Dichlorométhane
DCMA :	<i>N,N</i> -Dicyclohexylméthylamine
DDQ :	2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DFT :	Théorie de la fonctionnelle de la densité (<i>Density Functionnal Theory</i>)
DIBAC :	Dibenzoazacyclooctyne
DIBO :	Dibenzocyclooctyne
DIFBO :	Difluorobenzocyclooctyne
DIFO :	Cyclooctyne difluoré (<i>Difluorinated cyclooctyne</i>)
DMF :	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
Dppf :	1,1'-Bis(diphénylphosphino)ferrocène
Em :	Émission
Eq. :	Équivalent
Ex :	Excitation
Exp. :	Expérimental(e)
ESI :	Ionisation par électrospray

FRET :	Transfert d'énergie par résonance de type Förster (<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>)
GP :	Groupe partant
Het :	Hétéroatome
Hb :	Hémoglobine
HbO₂ :	Oxyhémoglobine
HOMO :	Orbitale moléculaire la plus haute occupée (<i>Highest occupied molecular orbital</i>)
HPLC :	Chromatographie en phase liquide à haute performance (<i>High performance liquid chromatography</i>)
HRMS :	Spectrométrie de masse haute résolution (<i>High resolution mass spectrometry</i>)
ICT :	Transfert de charge intramoléculaire (<i>Intramolecular Charge Transfer</i>)
IRM :	Imagerie par résonance magnétique
LC/MS :	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (<i>Liquid chromatography/Mass spectrometry</i>)
LUMO :	Orbitale moléculaire la plus basse vacante (<i>Lowest unoccupied molecular orbital</i>)
MTT :	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium
MOFO :	Cyclooctyne monofluoré (<i>Monofluorinated cyclooctyne</i>)
μ_e :	Moment dipolaire à l'état excité
μ_f :	Moment dipolaire à l'état fondamental
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBS :	<i>N</i> -Bromosuccinimide
n.d. :	Non déterminé(e)
NIS :	<i>N</i> -Iodosuccinimide
NMR :	Résonance Magnétique Nucléaire
PBS :	Tampon phosphate salin (<i>Phosphate buffer saline</i>)
PeT :	Transfert d'électron photoinduit
PMB :	<i>para</i> -méthoxybenzyle
PSF :	Fonction d'étalement du point (<i>Point Spread Function</i>)
PyBOP :	Benzotriazol-1-yl-oxytrypyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
Qphos :	1,2,3,4,5-Pentaphényl-1'-(di- <i>tert</i> -butylphosphino)ferrocène
RX :	Rayons X
R_f :	Rapport frontal
Rnase :	Ribonucléase
RuPhos :	2-Dicyclohexylphosphino-2',6'-diisopropoxybiphényle
SDS :	Dodécylsulfate de sodium
SiR :	<i>Silicon-Rhodamine</i>
S_N2 :	Substitution nucléophile d'ordre 2
t.a./ r.t. :	Température ambiante
TBET :	Transfert d'énergie à travers les liaisons (<i>Through-Bond Energy Transfer</i>)

TCO :	<i>trans</i> -cyclooctène
TD-DFT :	Théorie de la fonctionnelle de la densité dépendante du temps (Time-Dependent <i>Density Functionnal Theory</i>)
TEP :	Tomographie par émission de positrons
TFA :	Acide trifluoroacétique
Th. :	Théorique
THF :	Tétrahydrofurane
TICT :	Transfert de charge intramoléculaire via une rotation (<i>Twisted Intramolecular Charge Transfer</i>)
TLC :	Chromatographie sur couche mince (<i>Thin layer chromatography</i>)
TMTH :	3,3,6,6-tétraméthylthiaheptyne
TP :	Triphénylamine
Ts :	Tosyle
u.a. :	Unité arbitraire
XantPhos :	4,5-Bis(diphénylphosphino)-9,9-diméthylxanthène
XPhos :	2-Dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphényle

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	1
PRÉAMBULE.....	3
LISTE DES ABRÉVIATIONS	5
INTRODUCTION GÉNÉRALE	15
I. Généralités sur la fluorescence	16
1) Diagramme de Perrin-Jablonski	16
2) Grandeurs caractéristiques de la fluorescence	17
3) Facteurs qui influencent la fluorescence	18
a) Structure moléculaire.....	18
b) Facteurs environnementaux	18
c) Transfert de charge intramoléculaire (ICT)	18
d) Transferts d'énergie	19
e) Transfert d'électron photoinduit.....	23
f) Agrégation	24
g) Autres	25
II. Sondes fluorogéniques pour la microscopie de fluorescence.....	25
1) Définition.....	25
2) « Cahier des charges ».....	27
III. Absorption à deux photons	28
1) Principe et caractéristiques.....	28
2) Mesure des sections efficaces d'absorption biphotonique	29
IV. Microscopie de fluorescence	30
1) Généralités	30
2) Microscopie confocale	31
3) Microscopie biphotonique	33
V. La chimie bioorthogonale.....	35
OBJECTIFS DE LA THÈSE.....	39
PARTIE N°1 : Développement de fluorophores excitables à deux photons	
INTRODUCTION PARTIE N°1	43
I. Design d'absorbeurs à deux photons	43
II. Sondes biphotoniques pour la bioimagerie	48
III. Travaux antérieurs et objectifs.....	50

1) Travaux antérieurs.....	50
2) Objectifs.....	51
CHAPITRE 1-1 : Première génération de sondes excitables à deux photons	53
I. Synthèse	53
1) Synthèse de SiFluo-V	53
a) 1 ^{ère} voie de synthèse.....	53
b) 2 ^{ème} voie de synthèse.....	54
2) Synthèse de SiFluo-L	55
II. Propriétés photophysiques de SiFluo-V et SiFluo-L	56
1) Propriétés linéaires.....	56
2) Propriétés d'absorption biphotoniques	58
III. Rationalisation des propriétés photophysiques.....	61
1) Choix de la méthode de calculs	61
2) Résultats	62
IV. Microscopie en cellules vivantes	64
1) Cytotoxicité.....	64
2) Imagerie à un et à deux photons.....	65
a) Comparaison entre SiFluo-V et SiFluo-L	65
b) Colocalisation.....	67
3) Photostabilité	72
4) Imagerie complémentaire pour SiFluo-L	73
V. Conclusion	75
CHAPITRE 2-1 : Deuxième génération de composés.....	77
I. Synthèse	78
1) Synthèse de la phénazasiline Phenaz-Py	78
2) Synthèse du dérivé phénophosphazine Phospha-Py	82
3) Synthèse des autres dérivés	83
a) Obtention du composé Acri-Py	83
b) Obtention du composé Pheno-Py	84
c) Obtention des composés Sulfox-Py et Sulfon-Py	85
II. Propriétés spectroscopiques	86
1) Propriétés linéaires.....	86
2) Propriétés d'absorption biphotonique.....	88
III. Modélisation moléculaire.....	91
IV. Microscopie en cellules vivantes	93
1) Cytotoxicité.....	93

2)	Imagerie à un et à deux photons.....	93
3)	Photostabilité	96
V.	Conclusion	97
PARTIE N°2 : Développement d'une sonde fluorogénique excitable à deux photons pour la chimie bioorthogonale		
INTRODUCTION	PARTIE N°2	101
I.	Réactions de chimie bioorthogonale fluorogéniques	101
1)	État de l'art sur les sondes bioorthogonales fluorogéniques.....	101
2)	Cycloadditions de type IEDDA (<i>Inverse electron demand Diels-Alder</i>).....	106
3)	Diels-Alder à demande électronique inverse fluorogénique : état de l'art	108
4)	Sondes fluorogéniques de type IEDDA excitables à deux photons.....	114
II.	Design des sondes	116
1)	Généralités	116
2)	Substitution du motif tétrazine	117
3)	Position du motif tétrazine.....	118
CHAPITRE 1-2 :	Synthèse des sondes fluorogéniques.....	121
I.	Stratégie de synthèse	121
1)	Etat de l'art sur la synthèse des tétrazines	121
2)	Synthèses de sondes fluorogéniques comportant des tétrazines	123
II.	Première voie de synthèse	123
1)	Éssais préliminaires	124
2)	Synthèse du synthon « vinylpyridine ».....	125
3)	Synthèse des différents synthons tétrazines et essais de couplage	126
a)	Stratégie TBET	126
b)	Stratégie PeT	127
III.	Deuxième voie de synthèse.....	128
1)	Cas de la stratégie TBET1 (lien vinyle).....	128
2)	Cas de la stratégie PeT.....	137
3)	Cas de la stratégie TBET2 (Lien direct)	139
IV.	Conclusion	142
CHAPITRE 2-2 :	Études <i>in vitro</i>	143
I.	Généralités	143
1)	Choix du partenaire réactionnel.....	143
2)	Synthèse d'une cyclooctyne, le BCN	144
II.	Réactions <i>in vitro</i>	146

1) Généralités	146
2) Mise en solution des sondes fluorogéniques	146
3) Détermination des exaltations de fluorescence.....	148
III. Conclusion	150
CONCLUSION GÉNÉRALE	153
PERSPECTIVES.....	157
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	163
I. Synthesis.....	163
II. Photophysical experiments	207
III. Two-photon excitation spectra	207
IV. Molecular Modeling	207
V. MTT Assay.....	207
VI. Confocal Microscopy	207
VII. Preparative HPLC.....	208
VIII. LC/MS of purified compounds before and after IEDDA with BCN	209
BIBLIOGRAPHIE.....	217
ANNEXES.....	233

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Plus d'un siècle après la synthèse des premières fluorophores organiques (fluorescéine en 1871, coumarine en 1884, rhodamine en 1887), la microscopie de fluorescence s'est imposée comme un outil essentiel pour l'observation de phénomènes biologiques, depuis l'imagerie de cellules fixées à l'imagerie *in vivo*, notamment grâce au développement conjoint de sondes et de microscopes de plus en plus performants. L'imagerie optique de fluorescence est ainsi devenue un incontournable en imagerie médicale, du fait de sa rapidité, de sa sensibilité et sa résolution élevées.¹

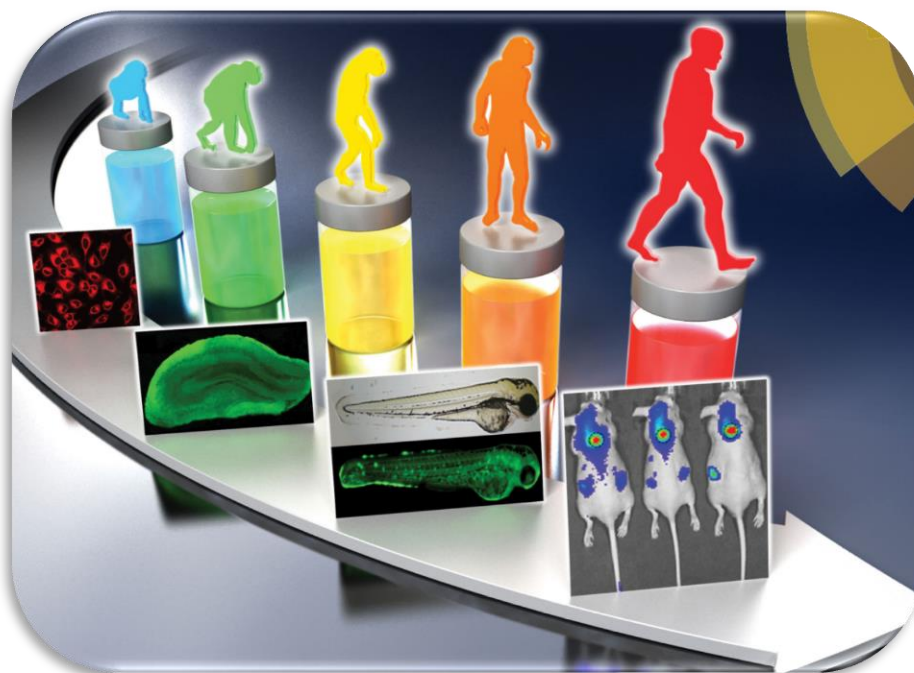


Figure 1 : Évolution des techniques d'imagerie de fluorescence. Illustration extraite de [D. Wu et al., 2017]²

Bien que l'utilisation des protéines de fusion soit très largement répandue en microscopie de fluorescence, l'utilisation de petites molécules reste une méthode de choix ; notamment car les fluorophores organiques présentent l'avantage d'être photostable et d'être d'une taille suffisamment faible pour ne pas altérer le fonctionnement du système à étudier, contrairement aux protéines de fusion.³

Ce chapitre introductif se découpe en cinq parties qui permettent de présenter les notions clés nécessaires afin d'appréhender l'utilisation de fluorophores organiques comme outil pour l'imagerie, et plus particulièrement pour la microscopie biphotonique ; et une cinquième partie présente quant à elle le concept de la chimie bioorthogonale. Des introductions présentant l'état de l'art sur le développement de sondes fluorescentes excitables à deux photons et sur les sondes fluorogéniques pour la chimie bioorthogonale sont proposées respectivement en début de la première partie et début de la seconde partie de ce manuscrit.

¹ R. Weissleder and M. J. Pittet, *Nature* **2008**, 452 (7187), 580-589. DOI : [10.1038/nature06917](https://doi.org/10.1038/nature06917)

² D. Wu et al., *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46 (23), 7105-7123. DOI : [10.1039/C7CS00240H](https://doi.org/10.1039/C7CS00240H)

³ J. Zhang et al., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2002**, 3 (12), 906-918. DOI : [10.1038/nrm976](https://doi.org/10.1038/nrm976)

I. Généralités sur la fluorescence^{4,5,6}

1) Diagramme de Perrin-Jablonski

Les différents processus qui peuvent survenir après l'absorption d'un photon par une molécule sont récapitulés en Figure 2 ci-dessous.

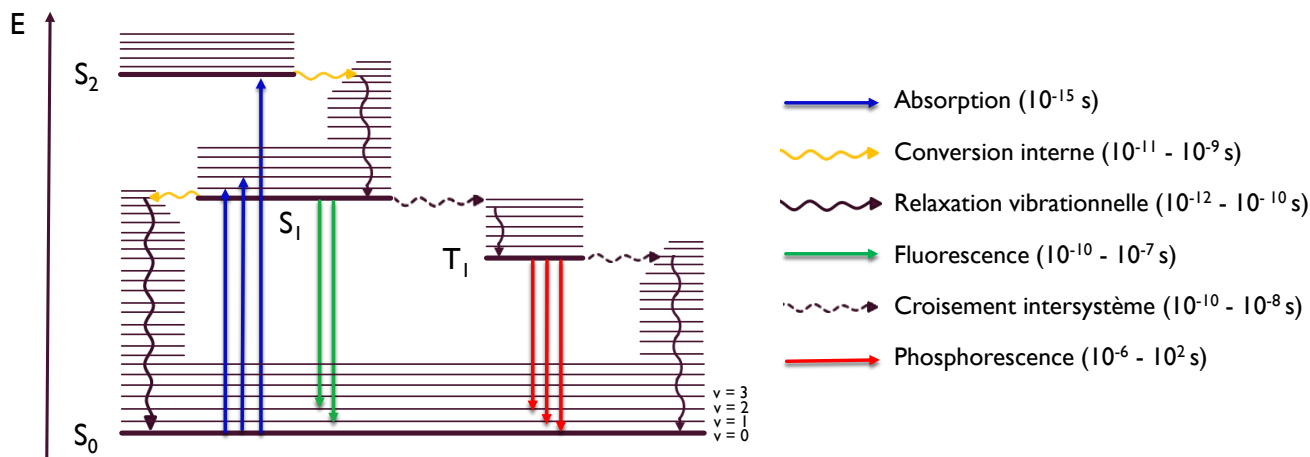


Figure 2 : Diagramme de Perrin-Jablonski

Lorsqu'une molécule dans son état fondamental S₀ absorbe un photon dans le domaine UV-visible, cette dernière va passer dans un état électronique excité S_n (n ≥ 1). Dans la majorité des cas, elle se retrouve alors très vite (10⁻¹² à 10⁻⁹ s) dans l'état vibrationnel le plus bas en énergie de l'état S₁ par conversion interne (si n > 1) et relaxation vibrationnelle, quelle que soit la transition initiale. L'énergie correspondante est alors dissipée sous forme de chaleur. L'ensemble des transitions de S₀ vers S_{1,v} vont correspondre au spectre d'absorption de la molécule.

Une fois l'état S_{1,v=0} atteint, la durée de vie de l'état excité est de l'ordre de la nanoseconde, plusieurs voies de désexcitation (radiatives ou non) sont alors envisageables pour retourner à l'état fondamental. Une première voie de désexcitation possible est la conversion interne, qui consiste en une transition non radiative entre deux états électroniques de même spin. La molécule peut également retourner à l'état fondamental sans changer de spin et en émettant un photon, ce processus radiatif est alors appelé fluorescence. La règle de Kasha stipule que la fluorescence peut avoir lieu seulement à partir de l'état électronique S₁.⁷ Néanmoins, il existe des exceptions à cette règle, comme l'azulène (Figure 3) ou encore certaines tétrazines, notamment à cause de l'écart énergétique conséquent entre S₂ et S₁ qui ralentit le processus de conversion interne.^{8,9} L'ensemble des transitions S_n → S₀ vont constituer le spectre d'émission de la molécule.

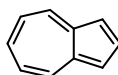


Figure 3 : Structure de l'azulène

⁴ J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third edition **2006**, Springer, Boston, MA .

⁵ B. Valeur and M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence - Principles and Applications*. Second Edition **2013**, Wiley

⁶ J. Delaire et al., *Photophysique et photochimie - Des fondements aux applications*. **2016**, edpsciences

⁷ M. Kasha, *Discussions of the Faraday Society* **1950**, 9 (0), 14-19. DOI : [10.1039/DF9500900014](https://doi.org/10.1039/DF9500900014)

⁸ G. Binsch et al., *Chem. Phys. Lett.* **1967**, 1 (4), 135-138. DOI : [10.1016/0009-2614\(67\)85008-5](https://doi.org/10.1016/0009-2614(67)85008-5)

⁹ T. He et al., *Chem. Sci.* **2019**, 10 (15), 4163-4168. DOI : [10.1039/C9SC00264B](https://doi.org/10.1039/C9SC00264B)

Le retour à l'état fondamental peut aussi se faire en passant par un état triplet. La transition $S_1 \rightarrow T_1$ résulte d'un croisement intersystème. Ces transitions $S_n \rightarrow T_n$ sont peu probables car interdites de spin, elles sont par conséquent favorisées quand le temps de vie de l'état S_1 est élevé. De même, la présence d'atomes lourds (tels que Br ou I) favorise le croisement intersystème. La molécule peut alors retourner à l'état fondamental en émettant un photon à partir de T_1 , c'est la phosphorescence. Comme la transition $T_1 \rightarrow S_0$ est elle aussi interdite de spin, la phosphorescence est un processus beaucoup plus lent que la fluorescence (entre 10^{-6} et 10^2 s). Le retour à l'état excité peut également se faire par des voies non radiatives comme c'était le cas à partir de S_1 .

2) Grandeurs caractéristiques de la fluorescence

Les propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence d'une molécule peuvent être caractérisées à partir de quelques grandeurs clés.

- **Rendement quantique :**

Le rendement quantique est le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés, il quantifie donc la fraction de molécules qui retournent à l'état fondamental *via* un processus de fluorescence. Il est compris entre 0 et 1.

$$\phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

Avec k_r : constante de vitesse pour la désexcitation radiative $S_1 \rightarrow S_0$ et k_{nr} : constante de vitesse pour la désexcitation non radiative.

- **Coefficient d'absorption molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) :**

Ce coefficient, noté ϵ , caractérise la capacité d'une molécule à absorber des photons. Pour des solutions peu concentrées, ce coefficient permet de relier l'absorbance (notée A , sans unité) d'une solution à la concentration c de l'espèce chimique qui absorbe via la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Avec l la longueur du trajet parcouru par la lumière dans le milieu considéré.

- **Brillance ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) :**

La brillance est le produit du coefficient d'absorption molaire par le rendement quantique d'une molécule. C'est un paramètre clé en imagerie car il permet de prendre en compte à la fois la capacité d'une molécule donnée à absorber des photons et à en réémettre.

- **Déplacement de Stokes (cm^{-1} ou nm) :**

Le déplacement de Stokes représente la différence entre la longueur d'onde à laquelle l'émission est maximale et la longueur d'onde à laquelle l'absorption est maximale.

- **Temps de vie (s) :**

Il s'agit de la durée pendant laquelle l'électron va rester dans l'état excité avant de redescendre à l'état fondamental.

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

La dépopulation des niveaux excités suit une loi de décroissance exponentielle dont τ est le temps caractéristique.

3) Facteurs qui influencent la fluorescence

Les paramètres qui influencent les propriétés émissives d'un composé sont nombreux. Cette partie présente les principaux facteurs qui peuvent conduire à une modulation des propriétés de fluorescence d'une molécule.

a) Structure moléculaire

Les propriétés optiques d'un composé sont intimement liées à sa structure moléculaire. Il est par conséquent possible d'optimiser finement les propriétés de fluorescence d'une sonde organique en modifiant sa structure.^{10,11} Par exemple, la plupart des chromophores organiques sont des molécules aromatiques conjuguées, et une augmentation de la conjugaison aura tendance à décaler l'absorption et l'émission du composé vers des longueurs d'onde plus élevées.

b) Facteurs environnementaux

Les propriétés de fluorescence d'une molécule sont extrêmement dépendantes de l'environnement dans lequel la molécule se trouve. Quelques paramètres ayant une influence sur les propriétés optiques d'une molécule sont présentés en Figure 4 ci-dessous.

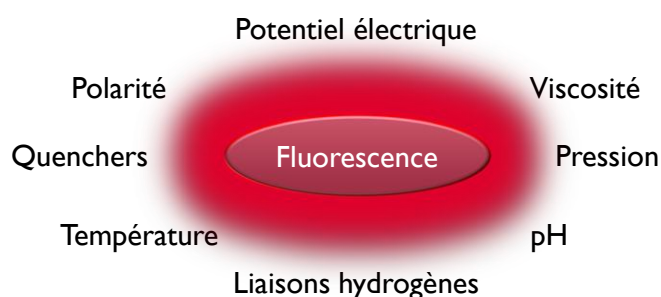


Figure 4 : Facteurs environnementaux qui influent sur la fluorescence

Parmi eux, le solvant joue par exemple un rôle clé car il peut modifier les niveaux d'énergie d'une molécule, en stabilisant plus ou moins les états excités. C'est le cas dans le transfert de charge intramoléculaire présenté ci-après.

c) Transfert de charge intramoléculaire (ICT)

Lorsqu'une molécule absorbe un photon, le passage de l'état fondamental S_0 à un état électronique excité S_n induit un changement de son moment dipolaire μ en raison d'une modification de la répartition de la densité électronique au sein de la molécule. Plus la forme des orbitales moléculaires mises en jeu dans la transition est différente, et plus la modification de moment dipolaire est importante. C'est particulièrement le cas lorsque la molécule est composée de groupements donneurs conjugués à un ou plusieurs accepteurs (ou *vice-versa*). Après absorption du photon, un état appelé état localement excité (LE) est atteint. Cet état n'est pas à l'équilibre avec les molécules de solvant car l'absorption est bien plus rapide que la réorganisation du solvant. Les molécules de solvant vont ensuite tourner pour atteindre un état d'équilibre appelé ICT (Figure 5). Lorsque la relaxation s'accompagne d'une rotation au sein de la molécule, on parle de TICT (pour *Twisted intramolecular charge transfer*).

¹⁰ L. D. Lavis, *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86* (1), 825-843. DOI : [10.1146/annurev-biochem-061516-044839](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044839)

¹¹ J. B. Grimm *et al.*, *Nat. Methods* **2017**, *14*, 987-994. DOI : [10.1038/nmeth.4403](https://doi.org/10.1038/nmeth.4403)

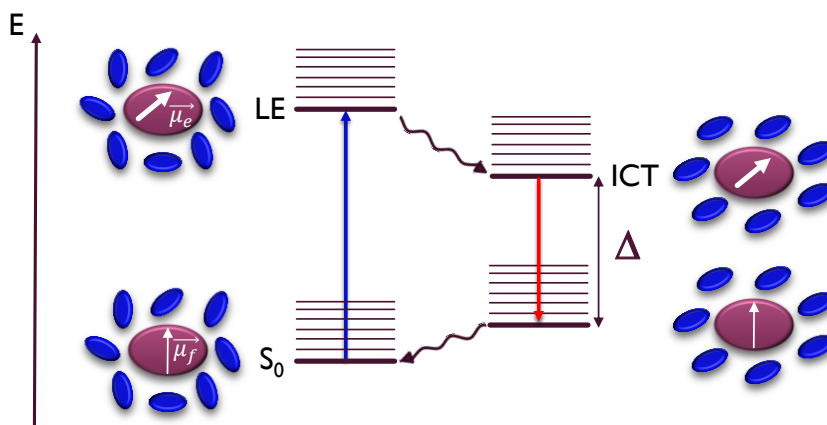


Figure 5 : Diagramme d'énergie dans le cas d'un transfert de charge intramoléculaire (cas où $\mu_f < \mu_e$)

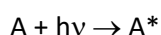
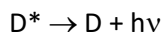
L'écart d'énergie noté Δ est fortement dépendant de la polarité du solvant. Lorsque le moment dipolaire à l'état fondamental μ_f est supérieur au moment dipolaire à l'état excité μ_e , un déplacement bathochrome est observé quand la polarité du solvant augmente, on parle alors de solvatochromisme positif. En effet, une augmentation de la polarité du solvant permet d'abaisser l'énergie du niveau ICT. Dans le cas contraire ($\mu_f > \mu_e$), un déplacement hypsochrome est observé, c'est le solvatochromisme négatif.

d) Transferts d'énergie

Ce sont toutes les réactions qui peuvent être représentées par : $D^* + A \rightarrow D + A^*$. Ces transferts d'énergie peuvent être radiatifs ou non.

- Transfert d'énergie radiatif

Le transfert d'énergie radiatif, aussi appelé « mécanisme trivial » est le plus intuitif. La lumière émise par un donneur D est réabsorbée par un accepteur A.



Ce type de transfert est bien évidemment possible uniquement si l'accepteur absorbe sur une plage de longueurs d'onde à laquelle le donneur émet. Ce transfert peut par exemple être observé en réalisant le spectre d'émission de fluorescence d'une solution très concentrée d'un composé donné. Il s'agit de l'effet de filtre interne.

- Le FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*)

Le FRET est un transfert d'énergie non radiatif *via* une interaction dipôle-dipôle entre un donneur D et un accepteur A (Figure 6).

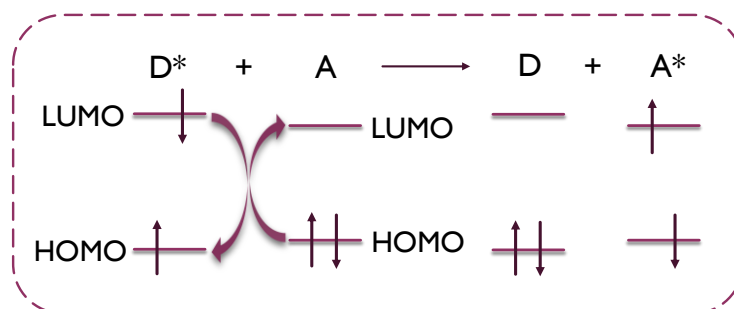


Figure 6 : Principe du FRET d'un point de vue orbitalaire

Il repose sur le recouvrement spectral entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur, ainsi que la proximité spatiale entre le donneur et l'accepteur. Lorsque cette condition de recouvrement spectral est respectée, il peut, si les deux molécules sont à une distance voisine de la distance R_0 (≈ 5 nm) appelée distance de Förster, se produire un transfert d'énergie entre les deux molécules à travers l'espace. Un facteur d'orientation se rajoute aux deux conditions précédentes : il est également nécessaire que les moments dipolaires du donneur et de l'accepteur ne soient pas à 90° l'un de l'autre pour que le transfert puisse avoir lieu. Cette condition n'est néanmoins que rarement limitante car ce mécanisme est exploité le plus souvent dans des conditions dans lesquelles les molécules sont en libre rotation l'une par rapport à l'autre.

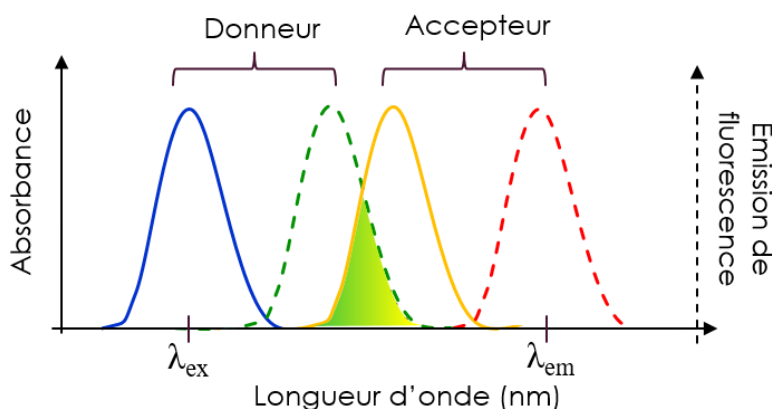


Figure 7 : Recouvrement du spectre d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur dans le cas d'un mécanisme de type FRET

Le rendement quantique du processus de transfert d'énergie est quantifié par :

$$\phi_T(r) = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$

Avec r la distance entre le donneur et l'accepteur, et R_0 la distance de Förster.

L'accepteur peut ensuite revenir à l'état fondamental via un processus non radiatif (conversion interne), il jouera dans ce cas le rôle de quencher de fluorescence. Il peut également retourner à l'état fondamental en émettant un photon. Dans ce cas, le déplacement de Stokes est artificiellement augmenté. Cette stratégie est utilisée pour le développement de nombreuses sondes.¹²

- Le transfert d'énergie à travers les liaisons : TBET (*Through-bond energy transfer*)

Si dans le cas du FRET il est indispensable qu'il y ait un recouvrement spectral entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur, ce n'est pas le cas avec le TBET.¹³ Par opposition au FRET qui est un transfert d'énergie à travers l'espace, le TBET est un transfert d'énergie qui se fait à travers les liaisons (Figure 8).

¹² L. Wu et al., *Chem. Soc. Rev.* **2020**, 49 (15), 5110-5139. DOI : [10.1039/C9CS00318E](https://doi.org/10.1039/C9CS00318E)

¹³ G.-S. Jiao et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (48), 14668-14669. DOI : [10.1021/ja037193l](https://doi.org/10.1021/ja037193l)

Introduction générale

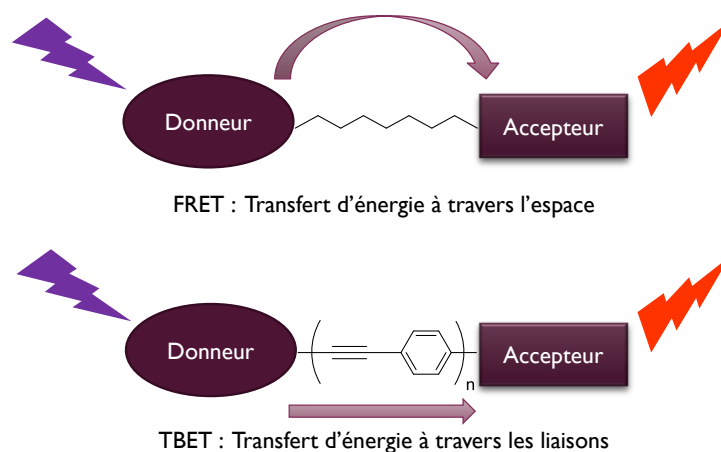


Figure 8 : Principes du FRET et du TBET

Une des conditions nécessaires pour que ce type de quenching puisse se produire est que les deux fluorophores soient liés par un espaceur insaturé qui leur permette de se comporter électriquement indépendamment l'un de l'autre à l'état fondamental. Ils doivent ainsi, dans le cas optimal, être à 90° l'un de l'autre. Il faut par conséquent que les deux fluorophores soient liés par un motif insaturé mais qui ne leur permet pas d'être coplanaire (Figure 8).^{14,15}

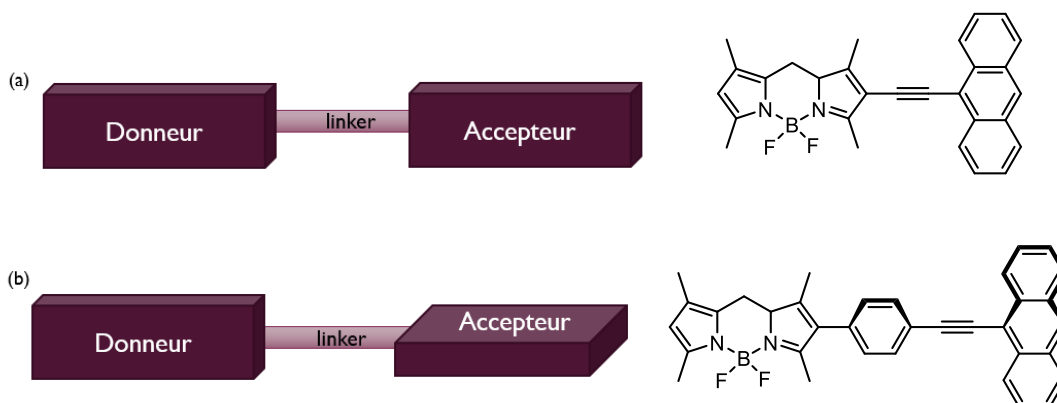


Figure 9 : (a) Donneur et accepteur coplanaire : TBET impossible (b) Donneur et accepteur twisté de 90° : TBET possible

Un exemple est présenté en Figure 9 ci-dessus. Dans le cas (a) les deux entités sont coplanaires, la conjugaison s'étend sur toute la molécule qui se comporte comme un « unique » fluorophore : le transfert d'énergie de type TBET est impossible. Dans le second cas, l'introduction d'un groupement phényle sur l'espaceur permet, grâce à l'encombrement stérique généré par les méthyles du BODIPY, de rompre cette conjugaison. Les deux parties se comportent donc comme deux fluorophores distincts, et le transfert de type TBET peut avoir lieu.

Par ailleurs, diverses études ont mis en évidence que pour que ce transfert soit le plus performant possible, les moments de transition associés à l'absorption de l'accepteur et l'émission du donneur doivent être alignés.¹⁶ Cette condition permet d'améliorer le transfert, mais n'est pas nécessaire. En 2014, R. Weissleder et son équipe se sont intéressés à des dérivés de coumarine couplés à des tétrazines (Figure 10).¹⁷ Ils ont mis en évidence qu'un transfert de type TBET se produisait au sein de ces molécules. La tétrazine permet d'inhiber la fluorescence de la coumarine. Elle peut être restaurée en faisant réagir la tétrazine avec un alcène contraint, le *trans*-cyclooctène (TCO).

¹⁴ G.-S. Jiao *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12* (30), 7816-7826. DOI : [10.1002/chem.200600197](https://doi.org/10.1002/chem.200600197)

¹⁵ S. Speiser, *Chem. Rev.* **1996**, *96* (6), 1953-1976. DOI : [10.1021/cr941193+](https://doi.org/10.1021/cr941193+)

¹⁶ T. G. Kim *et al.*, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110* (1), 20-27. DOI : [10.1021/jp053388z](https://doi.org/10.1021/jp053388z)

¹⁷ L. G. Meimetis *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (29), 7531-7534. DOI : [10.1002/anie.201403890](https://doi.org/10.1002/anie.201403890)

Introduction générale

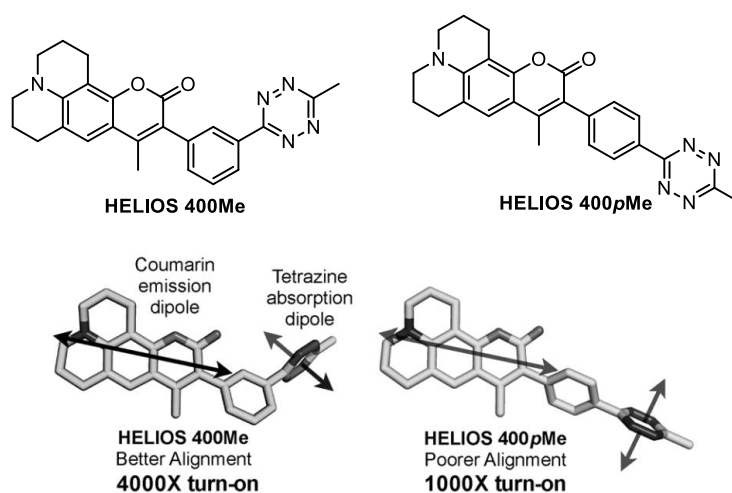


Figure 10 : Régioisomères HELIOS 400Me et HELIOS 400pMe

Après avoir mesuré la fluorescence après réaction entre le TCO et la tétrazine, l'inhibition de fluorescence a pu être quantifiée. Cette dernière dépend du régioisomère considéré, et le cas le plus favorable est celui pour lequel les moments dipolaires de transition sont presque alignés (HELIOS 400Me) : la fluorescence est 4 000 fois supérieure après réaction. Néanmoins, elle est tout de même 1 000 fois supérieure pour le régioisomère *para* (HELIOS 400pMe) alors que les deux moments dipolaires sont quasiment perpendiculaires. L'alignement des moments dipolaires de transition est donc bénéfique mais non nécessaire.

Ce mécanisme de quenching est particulièrement intéressant car il permet d'être utilisé pour un donneur et un accepteur dont les spectres d'absorption et d'émission ne se recouvrent pas. Un nombre croissant de sondes fluorescentes se basant sur ce principe a été développé ces dernières années.¹⁸ Le TBET reste néanmoins un phénomène dont le mécanisme n'est pas clairement décrit.

- Echange d'électrons de type Dexter

L'échange d'électrons de type Dexter est un échange d'électrons simultané décrit pour la première fois en 1959.¹⁹ Un électron de la LUMO du donneur à l'état excité est transféré dans la LUMO de l'accepteur, et simultanément un électron de la HOMO de l'accepteur est transféré dans la HOMO du donneur. Une représentation d'un point de vue orbitalaire est présentée en Figure 11 ci-dessous. Il s'agit néanmoins d'une représentation purement formelle car les électrons sont indiscernables. Seul un modèle quantique permet de décrire ce phénomène.

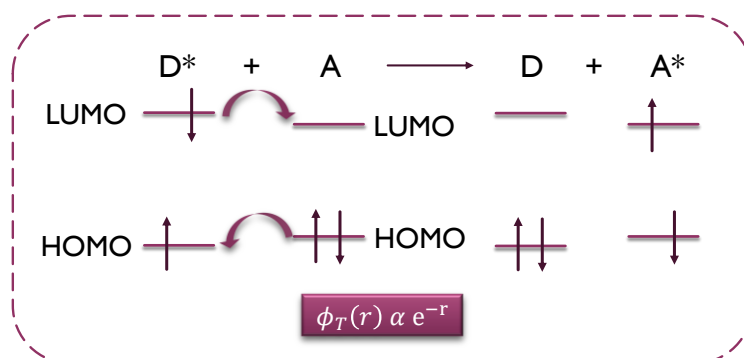


Figure 11 : Principe d'un échange d'électrons de type Dexter

¹⁸ D. Cao *et al.*, *J. Photochem. Photobiol. C* **2020**, *44*, 100371. DOI : [10.1016/j.jphotochemrev.2020.100371](https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2020.100371)

¹⁹ D. L. Dexter, *J. Chem. Phys.* **1953**, *21* (5), 836-850. DOI : [10.1063/1.1699044](https://doi.org/10.1063/1.1699044)

Contrairement au FRET, ce transfert d'énergie ne requiert pas de recouvrement spectral entre le donneur et l'accepteur. En revanche, un recouvrement des fonctions d'onde est nécessaire, ce qui signifie que ce type de transfert ne peut se produire qu'à très petite distance (typiquement $< 10 \text{ \AA}$). En effet, l'efficacité du transfert décroît exponentiellement avec la distance entre le donneur et l'accepteur (Formule Figure 11).

e) Transfert d'électron photoinduit

Le PeT (*Photo-induced electron transfer*) repose quant à lui sur la modification des propriétés d'oxydo-réduction des molécules lorsque celles-ci passent dans un état excité suite à l'absorption d'un photon. Comme l'illustre le schéma présenté en Figure 12, l'absorption d'un photon par le donneur va augmenter son caractère réducteur (ou par l'accepteur va augmenter son caractère oxydant) et donc permettre une réaction d'oxydoréduction entre le donneur et l'accepteur qui n'était pas possible à l'état fondamental.

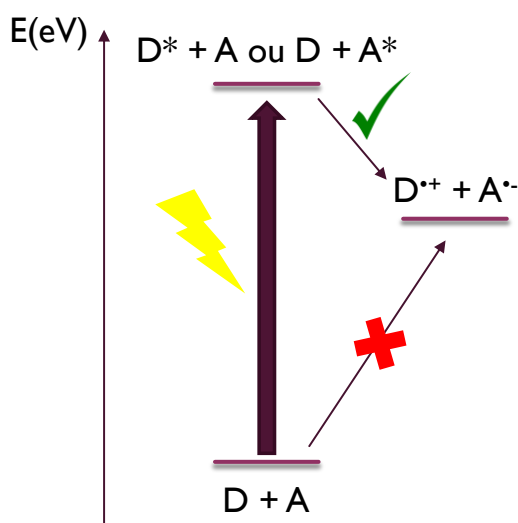


Figure 12 : Principe du transfert d'électron photoinduit (PeT)

Le transfert d'électron photoinduit peut être qualifié d'oxydant ou de réducteur, selon si le fluorophore d'intérêt est réduit ou oxydé (Figure 13).

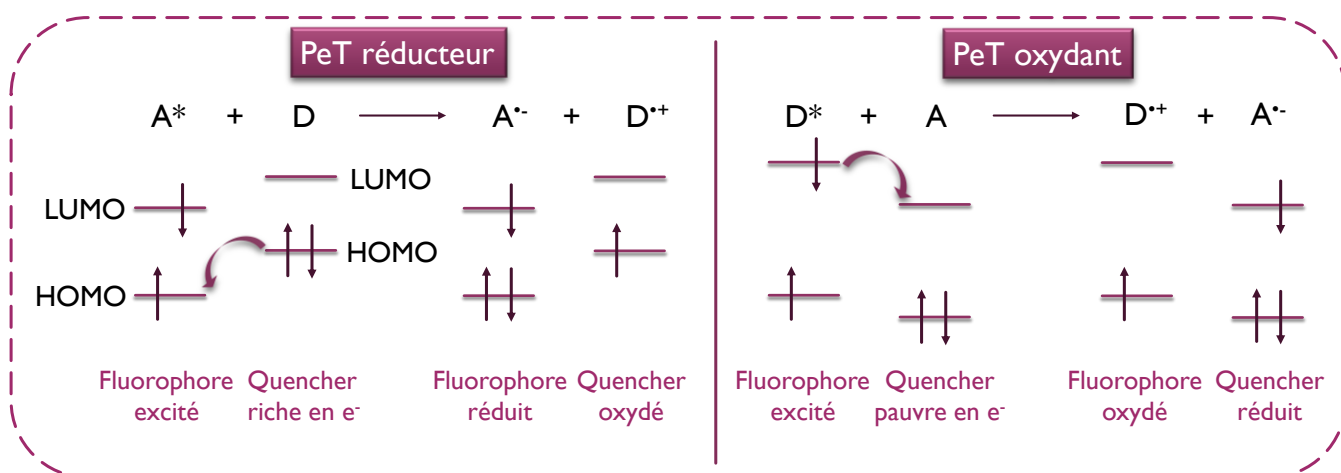


Figure 13 : Principe du transfert d'électron photoinduit réducteur et du transfert d'électron photoinduit oxydant

Ce transfert d'électron de l'espèce excitée va empêcher le fluorophore de revenir à l'état fondamental en émettant un photon, c'est pourquoi le PeT constitue un mécanisme d'inhibition de fluorescence.

f) Agrégation

Lorsque des fluorophores se trouvent en solution concentrée, ils ont naturellement tendance à s'agréger en raison des interactions π qui peuvent se créer entre les systèmes conjugués de deux molécules différentes. L'agrégation entraîne chez la majorité des molécules une inhibition de leur fluorescence, c'est l'ACQ (Aggregation-Caused Quenching). Cependant, chez certains chromophores pas ou peu émissifs en solution, l'agrégation va au contraire entraîner une nette augmentation de la fluorescence, c'est l'AIE (Aggregation-Induced Emission). Ce phénomène a été décrit pour la première fois en 2001 pour des composés autre que des polymères et il est depuis couramment utilisé pour diverses applications depuis la conception de matériaux à la bioimagerie.^{20,21} Ces deux phénomènes sont présentés en Figure 14 ci-dessous.

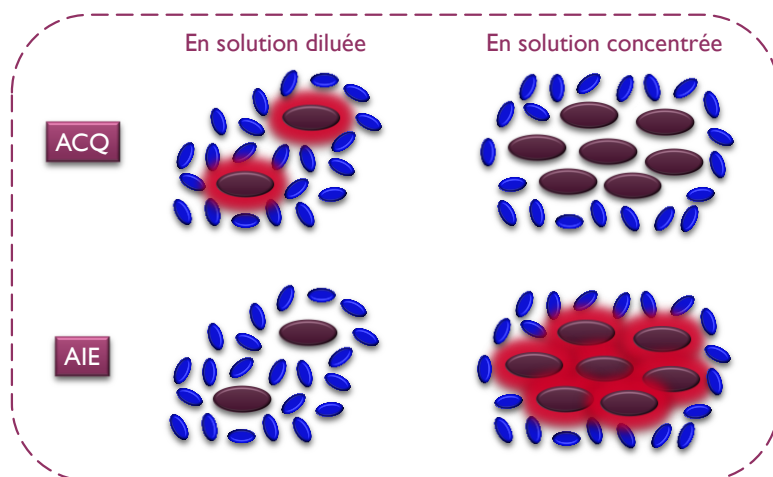


Figure 14 : Principe de l'ACQ (Aggregation-caused quenching) et de l'AIE (Aggregation-induced emission). Molécules de solvant en bleu et sondes fluorescentes en marron

L'AIE est un phénomène observé plus particulièrement pour les molécules composées de plusieurs sous unités pouvant tourner l'une autour de l'autre. Après absorption d'un photon, ce type de molécules va principalement se relaxer par conversion interne *via* des rotations. Sous forme d'agrégats, les rotations ne sont plus possibles et l'émission d'un photon devient la voie de désexcitation préférentielle.²² En effet, il a été mis en évidence que le blocage de la rotation dans une molécule présentant un comportement de type AIE pouvait conduire à une perte de cette propriété.²³ Les molécules synthétisées pour cette étude sont présentées en Figure 15 ci-dessous.

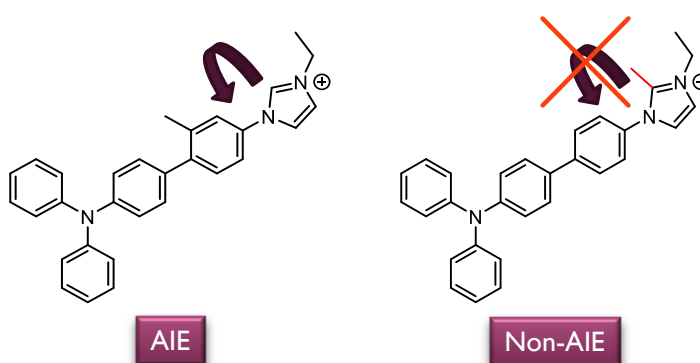


Figure 15 : Molécules synthétisées par G. Lao et al. pour comprendre le phénomène d'AIE

²⁰ J. Mei et al., *Chem. Rev.* **2015**, *115* (21), 11718-11940. DOI : [10.1021/acs.chemrev.5b00263](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00263)

²¹ X. Cai and B. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (25), 9868-9886. DOI : [10.1002/anie.202000845](https://doi.org/10.1002/anie.202000845)

²² Y. Chen et al., *Mater. Horiz.* **2019**, *6* (3), 428-433. DOI : [10.1039/C8MH01331D](https://doi.org/10.1039/C8MH01331D)

²³ C. Gao et al., *Dyes Pigm.* **2019**, *160*, 909-914. DOI : [10.1016/j.dyepig.2018.08.032](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.032)

Des calculs de modélisation moléculaire ont au préalable été effectués afin de d'identifier les voies de désexcitation de la molécule AIE. Les auteurs ont pu mettre en évidence qu'en solution diluée, la désexcitation de cette molécule avait principalement lieu par une voie non radiative *via* la rotation autour du motif imidazolium. Lorsqu'un méthyle (en rouge) est introduit pour bloquer cette rotation, la molécule perd ses propriétés d'AIE et devient fluorescente en solution diluée.

g) Autres

De nombreux autres processus non détaillés dans ce manuscrit peuvent également conduire à des modifications des propriétés émissives d'une sonde. C'est par exemple le cas de la formation d'excimères, d'exciplexes, ou encore du transfert de proton photo-induit.

Tous ces processus de modulation de fluorescence sont à la base de la conception de sondes dites « intelligentes » qui sont présentées ci-après.

II. Sondes fluorogéniques pour la microscopie de fluorescence

1) Définition

La plupart des fluorophores couramment utilisés présente l'inconvénient d'être toujours fluorescent. Par conséquent, leur utilisation en microscopie peut entraîner un piètre rapport signal sur bruit malgré plusieurs étapes de lavages. Une des stratégies permettant de contourner cette limitation consiste à utiliser des sondes dites fluorogéniques.²⁴

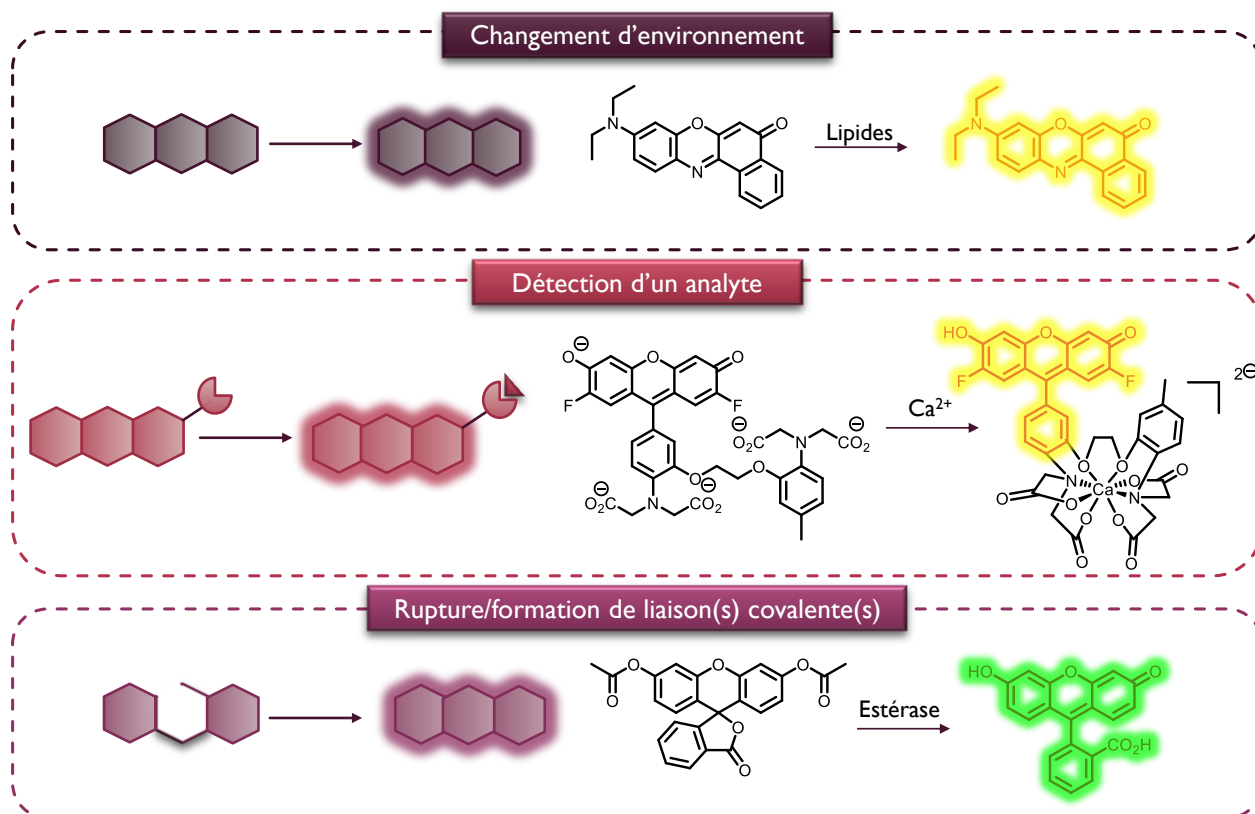


Figure 16 : Principes des sondes fluorogéniques. Figure inspirée de [J. B. Grimm et al., 2013]²⁵

Une sonde est qualifiée de fluorogénique si elle n'est pas ou peu fluorescente, mais qu'elle le devient après rencontre avec sa cible, *via* un stimulus spécifique. Cela peut être la formation ou la rupture d'une liaison, un changement d'environnement ou encore la détection d'un analyte comme l'illustre la Figure

²⁴ X. Li et al., *Chem. Rev.* **2014**, *114* (1), 590-659. DOI : [10.1021/cr300508p](https://doi.org/10.1021/cr300508p)

16.²⁵ Ces sondes sont également qualifiées de pro-fluorescentes, intelligentes, OFF-ON ou encore turn-on.

Dès 1989, la première sonde fluorogénique utilisable dans un contexte biologique a été développée, et il s'agit d'une sonde permettant la détection de l'ion calcium.²⁶ L'un des atouts majeurs de ces sondes est leur excellent rapport signal sur bruit. Le ratio de turn-on, c'est-à-dire le ratio du nombre de photons émis entre la forme fluorescente et la forme éteinte, peut en effet atteindre 10 000. Dans le cadre d'une utilisation en microscopie de fluorescence, cela permet d'obtenir des images avec un excellent contraste sans étapes de lavages. Un exemple est présenté en Figure 17 ci-dessous.²⁷ Le but de ces travaux est d'étudier des processus d'endocytose dans des cellules HeLa à l'aide d'un conjugué RNase-fluorophore. Ces images ont été réalisées dans des conditions identiques avec un fluorophore dit « classique », c'est-à-dire toujours fluorescent, et une sonde fluorogénique.

Les images obtenues avec le conjugué non fluorogénique (Figure 17, a) mettent en évidence la présence d'un bruit de fond très élevé qui résulte d'un marquage non spécifique. C'est seulement après plusieurs étapes de lavages vigoureux que cette fluorescence résiduelle peut être éliminée pour laisser apparaître le marquage d'intérêt (Figure 17, b).

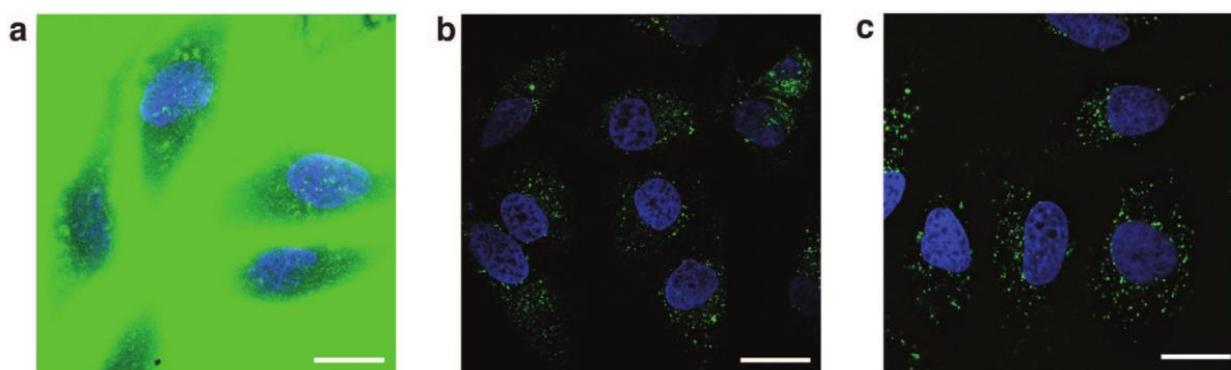


Figure 17 : Cellules HeLa vivantes incubées avec du Hoechst 33342 et (a) Oregon Green-RNase (10 μ M – 1h) – sans lavages (b) Oregon Green-RNase (10 μ M – 1h) – avec lavages (c) Conjugué sonde fluorogénique-RNase (10 μ M – 1h) – sans lavages. Images extraites de [L. D. Lavis et al., 2006]²⁷

En utilisant la sonde fluorogénique présentée en Figure 18, le rapport signal sur bruit est excellent, même sans étapes de lavages. En effet, cette sonde n'est pas fluorescente. Elle le devient uniquement après réaction avec l'enzyme d'intérêt, ici une estérase.

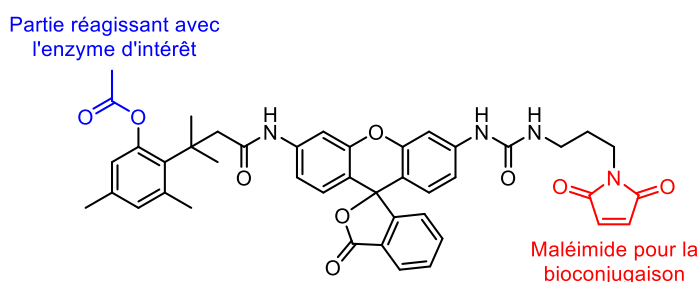


Figure 18 : Sonde fluorogénique développée par L. Lavis²⁷

²⁵J. B. Grimm et al., Chapter One - The Chemistry of Small-Molecule Fluorogenic Probes. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Morris, Ed. Academic Press: 2013; Vol. 113, pp 1-34. DOI : [10.1016/B978-0-12-386932-6.00001-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386932-6.00001-6)

²⁶A. Minta et al., *J. Biol. Chem.* 1989, 264 (14), 8171-8178. DOI : [10.1016/S0021-9258\(18\)83165-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83165-9)

²⁷L. D. Lavis et al., *ACS Chem. Biol.* 2006, 1 (4), 252-260. DOI : [10.1021/cb600132m](https://doi.org/10.1021/cb600132m)

Cet exemple permet de mettre en évidence l'utilité des sondes fluorogéniques en microscopie de fluorescence : un bon ratio de turn-on permet d'obtenir un bon rapport signal sur bruit. Les sondes fluorescentes utilisées en microscopie doivent cependant respecter de nombreux autres critères. La partie suivante permet d'établir un « cahier des charges » qu'une molécule doit respecter pour pouvoir être utilisée pour l'imagerie en cellules vivantes voire *in vivo*.

2) « Cahier des charges »

Les sondes fluorogéniques développées pour la bioimagerie doivent remplir de nombreux critères photophysiques, mais aussi physico-chimiques et biologiques. Les principaux sont présentés dans le Tableau 1 ci-dessous.

Critères physico-chimiques et biologiques	Critères photophysiques
Hydrosolubilité	Brillance élevée
Absence de toxicité	Absorption et émission dans l'infrarouge
Pénétration en cellules sans perméabilisation	Photostabilité
Sélectif	Turn-on élevé (>10)

Tableau 1 : Critères qu'un composé fluorogénique doit respecter pour être utilisé pour la microscopie de fluorescence *in cellulo* ou *in vivo*

D'un point de vue physico-chimique, il est nécessaire que le composé ne soit pas cytotoxique, qu'il rentre en cellules sans perméabilisation des membranes et qu'il soit soluble dans l'eau. Pour cela, il pourra être judicieux d'utiliser des molécules chargées ayant un faible poids moléculaire. La sonde devra également être sélective pour sa cible afin de limiter le bruit de fond.²⁸

D'un point de vue photophysique, il est nécessaire que le composé soit photostable, possède une brillance et un ratio de turn-on élevés pour obtenir un contraste maximal. Un turn-on supérieur à 10 semble être un objectif raisonnable pour obtenir un contraste élevé. Il est également préférable que le fluorophore soit excitable et émette à des longueurs d'onde comprises entre 670 nm et 910 nm ce qui correspond à une fenêtre appelée « fenêtre thérapeutique » (Figure 19).²⁹

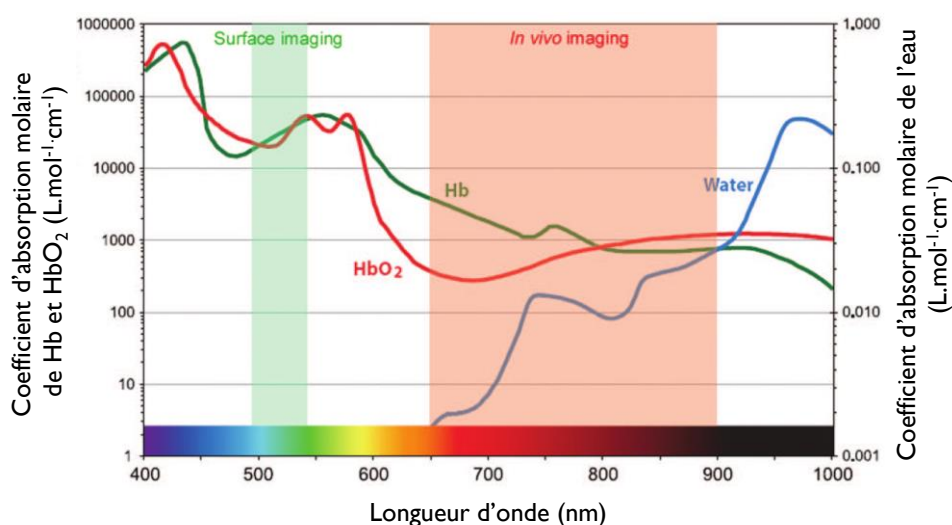


Figure 19 : Fenêtre thérapeutique. Figure extraite de [H. Kobayashi et al., 2010]²⁹

²⁸ H. Zhu et al., *Acc. Chem. Res.* **2016**, 49 (10), 2115-2126. DOI : [10.1021/acs.accounts.6b00292](https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00292)

²⁹ H. Kobayashi et al., *Chem. Rev.* **2010**, 110 (5), 2620-2640. DOI : [10.1021/cr900263j](https://doi.org/10.1021/cr900263j)

En effet, la pénétration de la lumière dans les tissus biologiques est maximale dans cette zone grâce à la faible absorption de l'hémoglobine et de l'eau. Ainsi, pour les rayonnements visibles, plus la longueur d'onde du rayonnement est élevée et plus ce dernier pénètre dans les tissus (Figure 20).

Par ailleurs, l'excitation dans cette fenêtre de longueurs d'onde permet de s'affranchir en grande partie de l'autofluorescence des tissus, qui est non négligeable pour des longueurs d'onde d'excitation plus faibles.³⁰

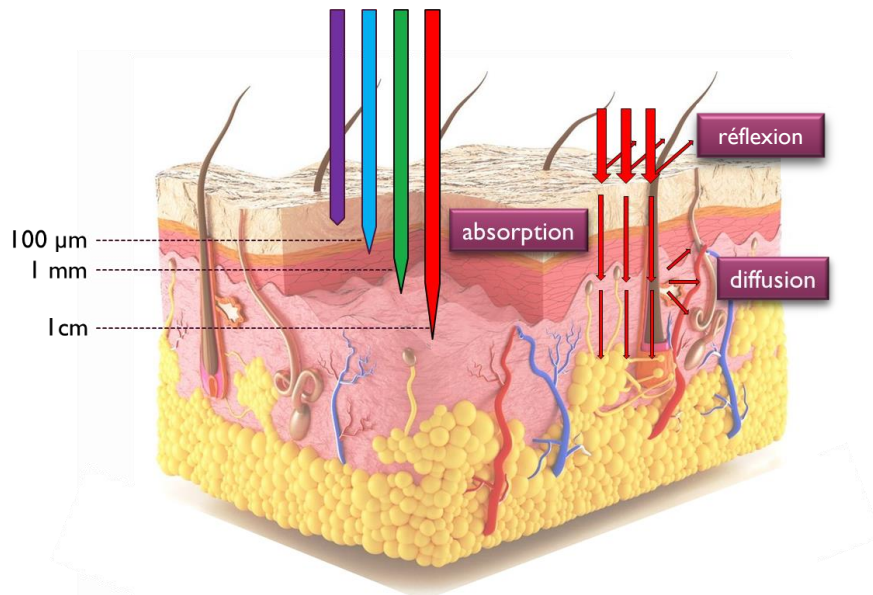


Figure 20 : Propagation de la lumière dans les tissus en fonction de la longueur d'onde du laser.
Adapté de [P. Agostinis et al., 2011]³¹

Plus récemment, une seconde fenêtre thérapeutique (NIR-II, au-dessus de 1000 nm) a également été identifiée comme étant prometteuse.³² Un moyen de parvenir à atteindre des longueurs d'onde d'excitation dans le rouge ou le proche infrarouge est d'utiliser un processus d'absorption à deux photons, qui est présenté dans la partie suivante.

III. Absorption à deux photons

1) Principe et caractéristiques

Le concept d'absorption à deux photons a été proposé par Maria Goeppert-Mayer en 1931 et a été mis en évidence expérimentalement trente ans plus tard par W. Kaiser et C. Garrett avec l'invention des premiers lasers pulsés.^{33,34} L'absorption à deux photons est l'absorption simultanée (10^{-18} s) de deux photons permettant d'amener une molécule dans un état excité de plus haute énergie (Figure 21).

L'avantage de cette technique réside dans le fait qu'il est possible de faire passer une molécule de son état fondamental à un état excité avec un rayonnement dont l'énergie est environ deux fois inférieure à celui utilisé dans le cas d'une excitation à un seul photon ($h\nu_2 \ll h\nu_1$). Ce type d'absorption est qualifiée d'absorption non linéaire car le nombre d'excitations n'est pas proportionnel à l'intensité du faisceau incident.

³⁰ J. V. Frangioni, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7 (5), 626-634. DOI : [10.1016/j.cbpa.2003.08.007](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.08.007)

³¹ P. Agostinis et al., *CA: Cancer J. Clin.* **2011**, 61 (4), 250-281. DOI : [10.3322/caac.20114](https://doi.org/10.3322/caac.20114)

Image de la couche de peau : www.futura-sciences.com

³² L. Li et al., *Dyes Pigm.* **2020**, 183, 108756. DOI : [10.1016/j.dyepig.2020.108756](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108756)

³³ M. Göppert-Mayer, *Annalen der Physik* **1931**, 401 (3), 273-294. DOI : [10.1002/andp.19314010303](https://doi.org/10.1002/andp.19314010303)

³⁴ W. Kaiser and C. G. B. Garrett, *Phys. Rev. Lett.* **1961**, 7 (6), 229-231. DOI : [10.1103/PhysRevLett.7.229](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.7.229)

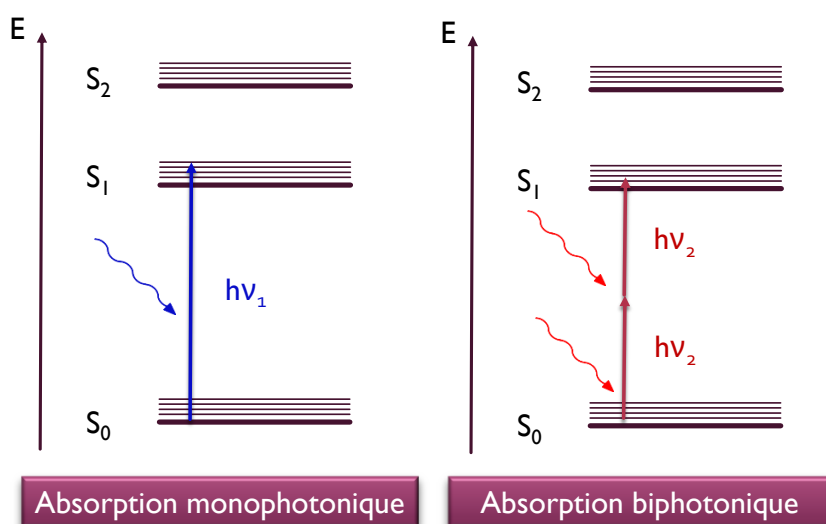


Figure 21 : Principe de l'absorption à deux photons

La capacité d'un fluorophore à absorber à deux photons est quantifiée *via* sa section efficace d'absorption noté δ , qui s'exprime en Goepfert-Mayer ($1 \text{ GM} = 10^{-50} \cdot \text{cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1}$). Diverses techniques permettent d'obtenir cette donnée, et deux d'entre elles sont présentées dans le paragraphe suivant.

2) Mesure des sections efficaces d'absorption biphotonique

Deux méthodes sont principalement utilisées pour déterminer la section efficace d'absorption biphotonique d'un composé : le Z-Scan et le TPEF (*Two-photon excited fluorescence*).

- Z-Scan

Cette technique consiste à mesurer la transmittance en sortie d'un échantillon lorsque celui-ci se déplace le long d'un axe, le point de référence étant l'endroit où le laser est focalisé.

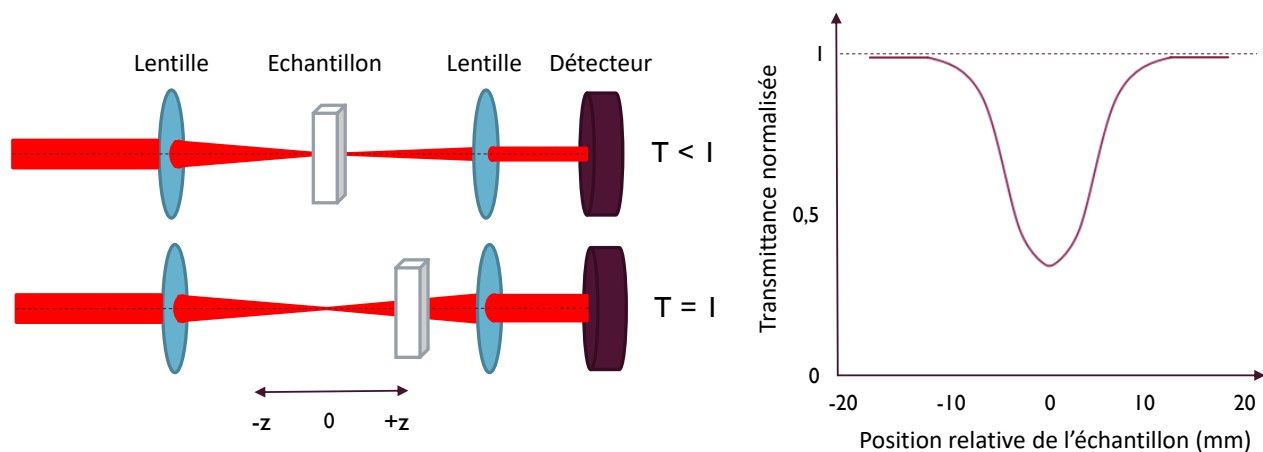


Figure 22 : Principe du Z-scan

En utilisant un modèle mathématique adéquat, la section efficace peut être obtenue à partir du type de courbe présenté en Figure 22.

La technique du Z-Scan permet ainsi d'obtenir la section efficace d'absorption d'un composé que ce dernier soit fluorescent ou non.

- TPEF (*Two-photon excited fluorescence*)

Introduit en 1996, cette technique consiste à mesurer l'émission de fluorescence d'un composé après une excitation biphotonique.³⁵ Contrairement au Z-scan, il est par conséquent indispensable que le composé soit fluorescent pour mesurer sa section efficace d'absorption *via* la méthode TPEF. Cette technique peut être utilisée de manière absolue si les paramètres du laser et du détecteur sont connus avec précision. Cependant, elle est le plus souvent utilisée d'une manière relative. Dans ce cas, une référence pour laquelle la dépendance de la section efficace en fonction de la longueur d'onde est connue est utilisée. Tout comme pour la détermination d'un rendement quantique de fluorescence par comparaison, il existe quelques références pour lesquelles les valeurs sont tabulées.³⁶

IV. Microscopie de fluorescence

1) Généralités

La microscopie de fluorescence est une technique non invasive à la fois sensible, rapide et qui possède une très bonne résolution de l'ordre de 200 nm (Tableau 2).

Méthode	Résolution
TEP	1 cm
IRM	100 μm
Microscopie de fluorescence	200 nm
Microscopie RX	30 nm
Microscopie électronique	0.08 nm

Tableau 2 : Comparatif de différents types d'imagerie

La résolution d'une technique dépend directement du type de rayonnement utilisé et plus particulièrement de sa longueur d'onde. En effet, les travaux d'Abbe ont permis de mettre en évidence que la résolution spatiale était intrinsèquement limitée par la diffraction de la lumière.³⁷ L'image d'un point lumineux infiniment petit à travers un système optique donné va être une figure de diffraction appelée tache d'Airy (Figure 23).

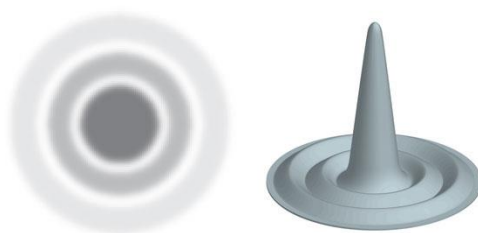


Figure 23 : Tache d'Airy³⁸

En imagerie, cette figure est souvent appelée « fonction d'étalement du point » ou PSF, qui correspond à la description mathématique du disque d'Airy. L'un des principaux critères utilisés pour relier la résolution avec la longueur d'onde du rayonnement est le critère de Rayleigh : la limite de résolution est considérée comme atteinte quand le maximum principal d'une des taches coïncide avec le

³⁵ C. Xu and W. W. Webb, *J. Opt. Soc. Am. B* **1996**, *13*, 481-491. DOI : [10.1364/JOSAB.13.000481](https://doi.org/10.1364/JOSAB.13.000481)

³⁶ N. S. Makarov *et al.*, *Opt. Express* **2008**, *16* (6), 4029-4047. DOI : [10.1364/OE.16.004029](https://doi.org/10.1364/OE.16.004029)

³⁷ E. Abbe, *Archiv für Mikroskopische Anatomie* **1873**, *9* (1), 413-468. DOI : [10.1007/BF02956173](https://doi.org/10.1007/BF02956173)

³⁸ <https://www.leica-microsystems.com/>

premier minimum d'intensité de l'autre tache. Les taches sont distinctes si la distance qui les sépare est égale à au moins la demi-largeur de la tache d'Airy (Figure 24).³⁹ La résolution latérale d s'exprime ainsi :

$$d = \frac{0,61\lambda}{NA}$$

Avec λ la longueur d'onde du rayonnement et NA l'ouverture numérique de l'objectif utilisé. Cette formule explique pourquoi *a priori* plus la longueur d'onde du rayonnement est faible et plus la résolution de l'image obtenue est élevée.



Figure 24 : Illustration du critère de Rayleigh³⁸

En réalité, la résolution d'une image est très largement multifactorielle. Avec le développement de différentes techniques de super-résolution, il est par exemple possible de contourner la limite de diffraction et d'atteindre des résolutions très légèrement inférieures à celles obtenues avec la microscopie RX.^{40,41}

2) Microscopie confocale

La microscopie confocale ou CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscopy*) a été développée à partir de l'année 1978.⁴² Le schéma d'un principe d'un microscope confocal est présenté en Figure 25 page suivante. En microscopie d'épifluorescence, tout l'échantillon est irradié, puis la lumière émise est récoltée en étant séparée de la lumière incidente *via* un miroir dichroïque.

³⁹ R. S. Rayleigh, *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1896**, 42 (255), 167-195. DOI : [10.1080/14786449608620902](https://doi.org/10.1080/14786449608620902)

⁴⁰ S. W. Hell and J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, 19 (11), 780-782. DOI : [10.1364/OL.19.000780](https://doi.org/10.1364/OL.19.000780)

⁴¹ L. Schermelleh *et al.*, *J. Cell. Biol.* **2010**, 190 (2), 165-175. DOI : [10.1083/jcb.201002018](https://doi.org/10.1083/jcb.201002018)

⁴² C. J. R. Sheppard and T. Wilson, *Optica Acta: International Journal of Optics* **1978**, 25 (4), 315-325. DOI : [10.1080/713819784](https://doi.org/10.1080/713819784)

Introduction générale

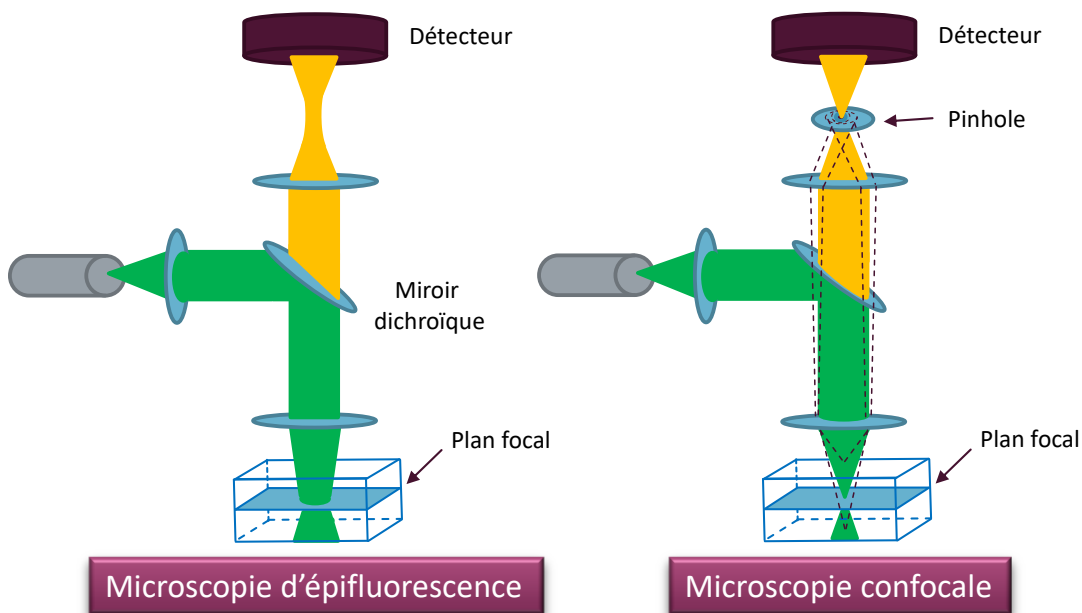


Figure 25 : Schéma d'un microscope à épifluorescence et d'un microscope confocal.
Figure inspirée de [L. Schermelleh et al., 2019]⁴³

En microscopie confocale, l'excitation est réalisée *via* un laser focalisé en un point du plan focal, et ce dernier va balayer l'échantillon. Toute l'épaisseur de l'échantillon est néanmoins excitée. Un pinhole permet ensuite de récolter la fluorescence provenant uniquement du plan focal. La résolution en profondeur de la microscopie confocale à balayage laser est par conséquent de l'ordre de 600 nm. Cela permet d'obtenir des images bien mieux résolues qu'en microscopie d'épifluorescence (Figure 26).⁴⁴

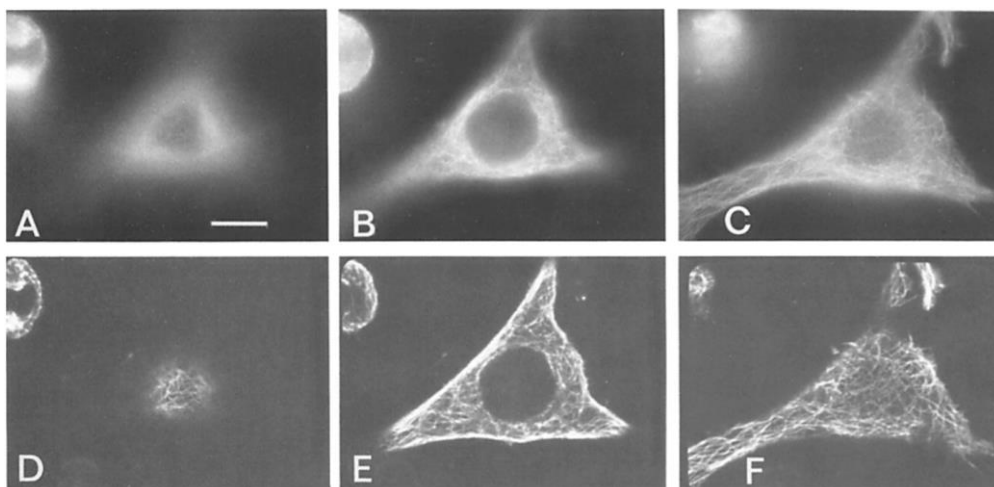


Figure 26 : Images de cellules HeLa obtenue en microscopie confocale (A-C) et en microscopie biphotonique (D-F).
Images extraites de [J. G. White et al., 1987]⁴⁴

L'imagerie à un photon est cependant limitée à des tissus dont l'épaisseur est d'environ 100 μm au maximum.⁴⁵ Un moyen d'imager davantage en profondeur est d'avoir recours à la microscopie biphotonique, présentée dans le paragraphe suivant.

⁴³ L. Schermelleh et al., *Nat. Cell. Biol.* **2019**, 21 (1), 72-84. DOI : [10.1038/s41556-018-0251-8](https://doi.org/10.1038/s41556-018-0251-8)

⁴⁴ J. G. White et al., *J. Cell Biol.* **1987**, 105 (1), 41-48. DOI : [10.1083/jcb.105.1.41](https://doi.org/10.1083/jcb.105.1.41)

⁴⁵ F. Helmchen and W. Denk, *Nat Methods* **2005**, 2 (12), 932-940. DOI : [10.1038/nmeth818](https://doi.org/10.1038/nmeth818)

3) Microscopie biphotonique

La microscopie biphotonique a été développée à partir des années 1990.⁴⁶ Moins de 10 ans plus tard, elle a été utilisée pour l'imagerie *in vivo*.⁴⁷

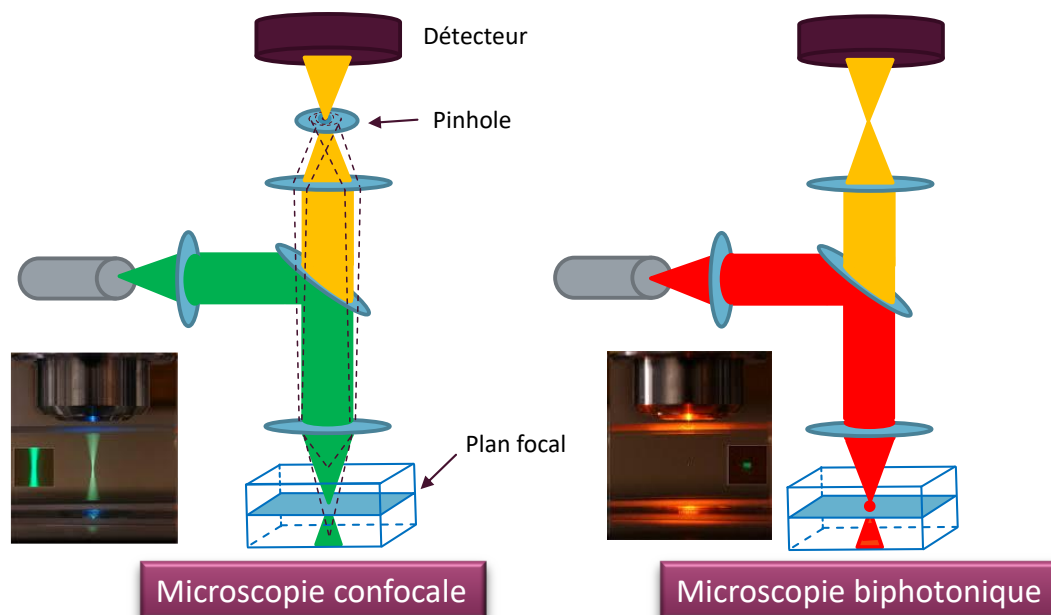


Figure 27 : Schéma de principe d'un microscope confocal et d'un microscope à excitation biphotonique.⁴⁸
Figure inspirée de [L. Schermelleh et al., 2019]⁴³

Contrairement à l'imagerie avec un microscope confocal, l'excitation ne se produit que dans un très petit volume autour du point focal (environ $1 \mu\text{m}^3$). Il n'y a donc pas d'absorption et ni d'émission de fluorescence en dehors du plan focal, c'est-à-dire pas photoblanchiment ni de phototoxicité en dehors du plan focal (Figure 27). Cela permet également d'avoir une haute résolution spatiale.

Par ailleurs, peu de chromophores biologiques sont de bons absorbeurs biphotoniques. Par exemple, la flavine mononucléotide et la NADPH qui sont des sources d'autofluorescence ont des sections efficaces très faibles, de l'ordre de quelques GM.^{47,49,50} Les longueurs d'onde utilisées (au-delà de 800 nm le plus souvent), font que même l'absorption à un photon de molécules endogènes est très peu probable. L'autofluorescence des tissus en microscopie biphotonique est par conséquent très souvent limitée.

Un autre avantage majeur de cette technique est qu'elle permet d'imager des tissus en profondeur, jusqu'à quelques millimètres.⁵¹ En l'utilisant pour de l'imagerie *in vivo*, la microscopie biphotonique a par exemple permis d'imager un cerveau de souris jusqu'à une profondeur de 1,4 mm (Figure 28).⁵²

⁴⁶ W. Denk et al., *Science* **1990**, 248 (4951), 73-76. DOI : [10.1126/science.2321027](https://doi.org/10.1126/science.2321027)

⁴⁷ B. R. Masters et al., *Biophys. J.* **1997**, 72 (6), 2405-2412. DOI : [10.1016/S0006-3495\(97\)78886-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78886-6)

⁴⁸ Photos prises par S. Ruzin (issues du site : <http://mcb.berkeley.edu/labs2/robey/content/2-photon-imaging>)

⁴⁹ G. A. Blab et al., *Chem. Phys. Lett.* **2001**, 350 (1), 71-77. DOI : [10.1016/S0009-2614\(01\)01282-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(01)01282-9)

⁵⁰ S. Huang et al., *Biophys. J.* **2002**, 82 (5), 2811-2825. DOI : [10.1016/S0006-3495\(02\)75621-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75621-X)

⁵¹ Y. Aoyagi et al., *PLoS One* **2015**, 10 (1), e0116280. DOI : [10.1371/journal.pone.0116280](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116280)

⁵² R. Kawakami et al., *Sci. Rep.* **2013**, 3, 1014. DOI : [10.1038/srep01014](https://doi.org/10.1038/srep01014)

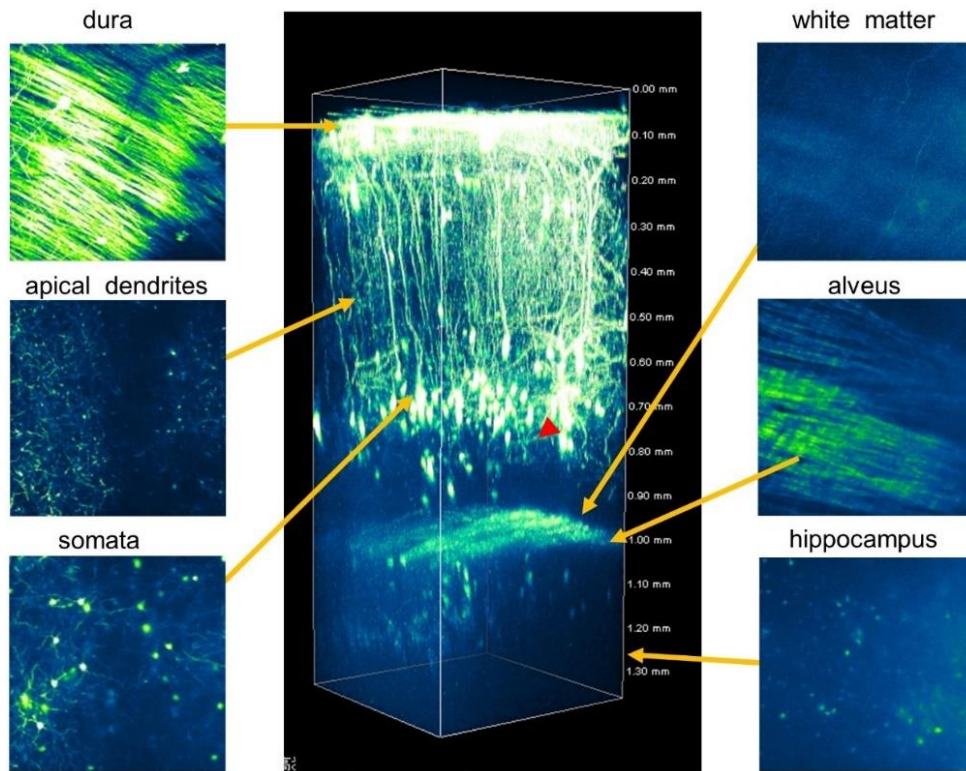


Figure 28 : Imagerie *in vivo* d'un cerveau de souris sous excitation biphotonique ($\lambda_{ex} = 1030 \text{ nm}$).
Illustration extraite de [R. Kawakami et al., 2013]

Un comparatif technique entre la microscopie confocale et la microscopie biphotonique est présenté dans le Tableau 3 ci-dessous.⁵³

	Excitation à un photon	Excitation à deux photons
Nombre d'excitations N_{Ex}	σI	δI^2
Section efficace d'absorption	$\sigma \sim 10^{-16} \text{ cm}^2$	$\delta \sim 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s}/\text{photon}$
Intensité de l'excitation I_{Ex}	$1 \text{ MW} \cdot \text{cm}^{-2}$	$10^6 \text{ MW} \cdot \text{cm}^{-2}$
Type de laser	Continue	Pulsé $t \sim 10^{-13} \text{ s}$ à 100 MHz
Puissance du laser	1 mW	10 mW

Tableau 3 : Ordres de grandeur des différents paramètres pour les microscopies confocale et biphotonique

Pour toutes les expériences de fluorescence, le nombre d'excitations dépend à la fois de la capacité d'absorption du composé et de l'intensité de la lumière incidente. Pour l'absorption linéaire utilisée dans le cadre de la microscopie confocale, le nombre d'excitations (N_{Ex}) dépend linéairement de l'intensité de la lumière incidente. La section efficace d'absorption à un photon (σ) est directement liée au coefficient d'absorption molaire. Elle est d'environ 10^{-16} cm^2 pour les fluorophores usuels. Ainsi, pour une image de 512×512 pixels avec un fluorophore incubé à une concentration inférieure au millimolaire, l'intensité d'excitation doit être de l'ordre de $1 \text{ MW} \cdot \text{cm}^{-2}$. Même si cette intensité peut sembler élevée *a priori*, cela signifie que pour la focalisation sur un point dont le diamètre est de l'ordre du micromètre, cette intensité peut être atteinte à l'aide d'un laser continu ayant une puissance inférieure à 1 mW . Cela correspond à l'intensité d'un pointeur laser standard.

⁵³ U. Kubitscheck, *Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications*. Second Edition 2017, Wiley

Dans le cadre de l'absorption biphotonique, la dépendance entre le nombre d'excitations et l'intensité de la lumière incidente est quadratique. Les deux photons doivent interagir « en même temps » avec le fluorophore, la section efficace d'absorption biphotonique (δ) possède à la fois une composante spatiale (comme σ) et une composante temporelle. Si on considère que la composante spatiale est voisine des 10^{-16} cm² comme c'est le cas pour l'absorption linéaire, et que l'on prend en compte ce facteur pour chacun des photons ; alors la composante temporelle est de l'ordre de 10^{-18} s. « En même temps » signifie donc que le second photon doit arriver au maximum 10^{-18} s après le premier. Si on prend en compte la vitesse de la lumière, les deux photons doivent se trouver à une distance maximum de 3 Å l'un de l'autre. Cela est cohérent si on considère que la taille typique d'un fluorophore est de l'ordre de 10 Å.

L'intensité de l'excitation nécessaire pour l'imagerie biphotonique devrait être environ un million de fois plus élevée que celle utilisée pour l'absorption linéaire. En utilisant un laser continu, cela nécessiterait une puissance de plusieurs kilowatts, ce qui est voisin de la puissance utilisée pour faire de la soudure laser. Afin de réduire la puissance totale, un laser pulsé est utilisé. Ces pulses lasers durent environ 10^{-13} s et sont répétés à une fréquence de 100 MHz, ce qui signifie que le laser est 100 000 fois plus souvent éteint qu'il n'est allumé. Au lieu d'utiliser un laser d'une puissance de plusieurs kW, la saturation des fluorophores peut ainsi être atteinte pour une puissance moyenne d'environ 10 mW, soit seulement dix fois plus que pour l'absorption linéaire. Comme l'absorption biphotonique doit survenir en 10^{-18} s, cela signifie que le pulse est suffisamment long pour cette dernière survienne.

Ce comparatif met avant tout en évidence que ces deux techniques sont complémentaires selon l'application biologique souhaitée, et ne sont en aucun cas à opposer l'une à l'autre.

En conclusion, les avantages de la microscopie biphotonique sont les suivants :⁵⁴

- Profondeur de pénétration environ 10 fois supérieure à la microscopie confocale : 1 mm contre 100 μ m⁵⁵
- Photodommages et photoblanchiment uniquement dans le plan focal
- Faisceau incident non atténué par absorption hors du plan focal
- Autofluorescence très faible ou nulle

Ces différentes avantages en font une technique de choix pour l'imagerie en intravitalité.⁵⁶ Il est également possible d'avoir recours à l'absorption à trois photons, qui permet d'atteindre des longueurs d'onde d'excitation encore plus élevées.⁵⁷

V. La chimie bioorthogonale

Pour mieux comprendre le vivant, la modification des protéines est devenue un outil précieux, notamment afin de sonder leur activité et de la moduler. Étudier les biomolécules dans leur environnement natif constitue par ailleurs un enjeu crucial. Dans cette démarche, la chimie bioorthogonale, c'est-à-dire le développement de réactions compatibles avec les milieux biologiques, est actuellement en plein essor.^{58,59,60}

⁵⁴ W. R. Zipfel *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (11), 1369-1377. DOI : [10.1038/nbt899](https://doi.org/10.1038/nbt899)

⁵⁵ V. E. Centonze and J. G. White, *Biophys. J.* **1998**, *75* (4), 2015-2024. DOI : [10.1016/S0006-3495\(98\)77643-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77643-X)

⁵⁶ B. G. Wang *et al.*, *J. Microsc.* **2010**, *238* (1), 1-20. DOI : [10.1111/j.1365-2818.2009.03330.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03330.x)

⁵⁷ D. Li *et al.*, *Mater. Chem. Front.* **2021**, *5* (7), 3201-3208. DOI : [10.1039/D1QM00243K](https://doi.org/10.1039/D1QM00243K)

⁵⁸ M. Smeenk *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2021**, *60*, 79-88. DOI : [10.1016/j.cbpa.2020.09.002](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.09.002)

⁵⁹ S. L. Scinto *et al.*, *Nat. Rev. Met. Primers* **2021**, *1* (1), 30. DOI : [10.1038/s43586-021-00028-z](https://doi.org/10.1038/s43586-021-00028-z)

⁶⁰ V. Rigolot *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 2-24. DOI : [10.1002/anie.202101502](https://doi.org/10.1002/anie.202101502)

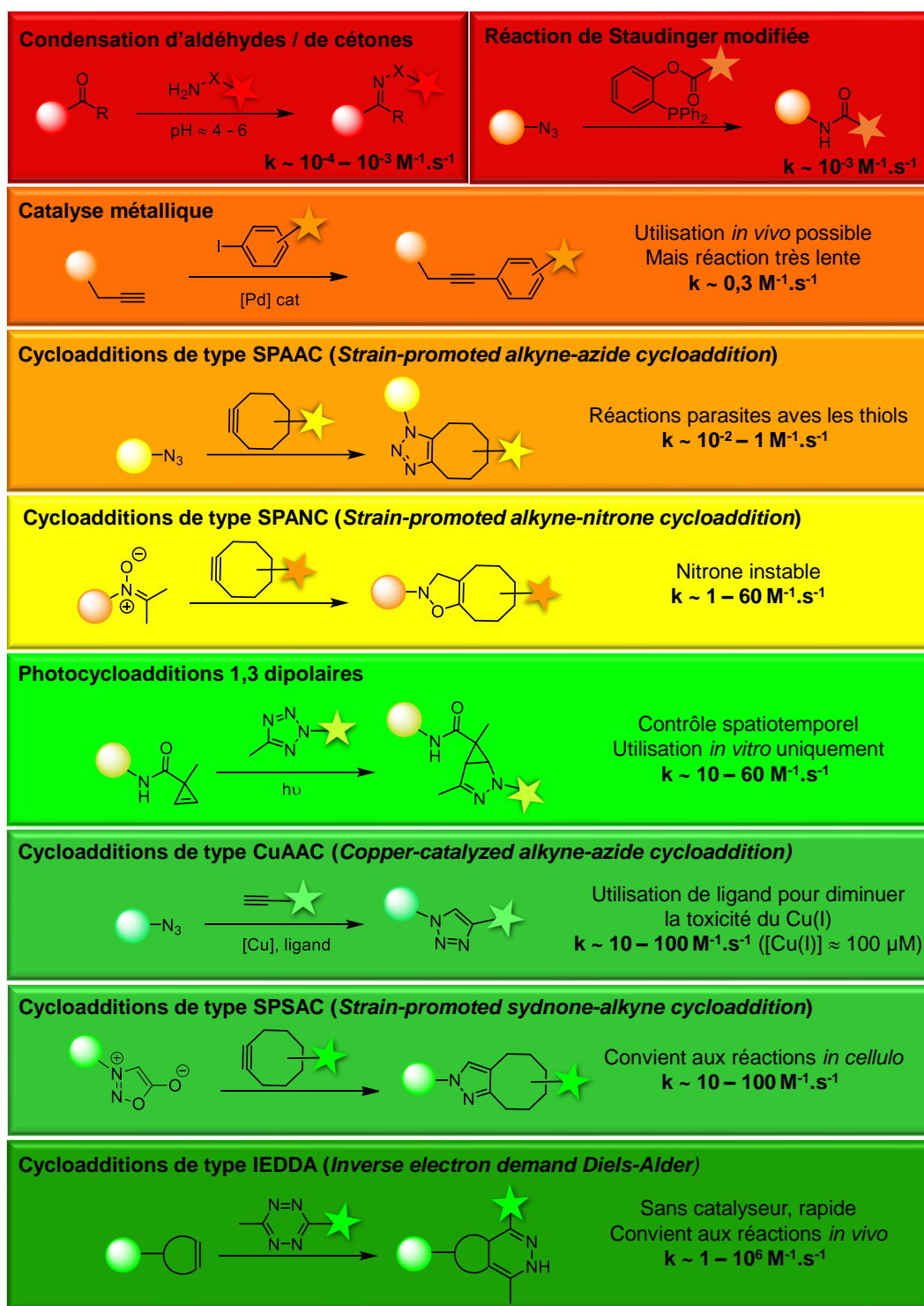


Figure 29 : Exemples de réactions bioorthogonales ainsi que leurs avantages et inconvénients.
Inspirée de [B.L. Oliveira et al., 2017]⁶¹

Il est nécessaire que ces réactions soient sélectives vis-à-vis des groupes fonctionnels portés par les biomolécules, puissent se dérouler dans l'eau et à un pH proche du pH physiologique et aient une constante de vitesse élevée à température ambiante pour être réalisée sans catalyseur.⁶² Les principes de la chimie bioorthogonale se recoupent partiellement avec ceux de la chimie click établis en 2001 par Sharpless.⁶³

⁶¹ B. L. Oliveira et al., *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46 (16), 4895-4950. DOI : [10.1039/C7CS00184C](https://doi.org/10.1039/C7CS00184C)

⁶² J. A. Prescher and C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1 (1), 13-21. DOI : [10.1038/nchembio0605-13](https://doi.org/10.1038/nchembio0605-13)

⁶³ H. C. Kolb et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40 (11), 2004-2021. DOI : [10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5)

La première réaction à avoir été utilisée pour une application de chimie bioorthogonale est la réaction de Staudinger modifiée par C. Bertozzi en 2003.⁶⁴ Depuis, de nombreuses autres réactions ont été adaptées ou développées pour répondre aux critères de la chimie bioorthogonale. Le rapide développement de ce domaine a déjà permis l'émergence de multiples applications *in vivo*.^{65,66,67} Une partie des réactions de chimie bioorthogonale est détaillée en Figure 29.

Ces réactions sont classées selon leur constante de vitesse : il existe un écart considérable entre la vitesse de la réaction la plus rapide, la IEDDA, et celle de réaction la plus la plus lente, la condensation d'aldéhydes. En effet, 10 ordres de grandeur séparent leur constante de vitesse respective. Il s'agit d'un paramètre clé pour effectuer des réactions en milieu biologique, car les concentrations utilisées sont le plus souvent de l'ordre du micromolaire ou moins. Une simulation d'une réaction du second ordre avec des concentrations en réactifs de 100 μM est présentée en Figure 30. Seules les réactions avec des constantes de vitesse supérieures à 10 $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ permettent d'atteindre au moins 80 % de conversion en moins d'une heure, ce qui paraît une échelle de temps maximum pour effectuer une réaction en milieu biologique.

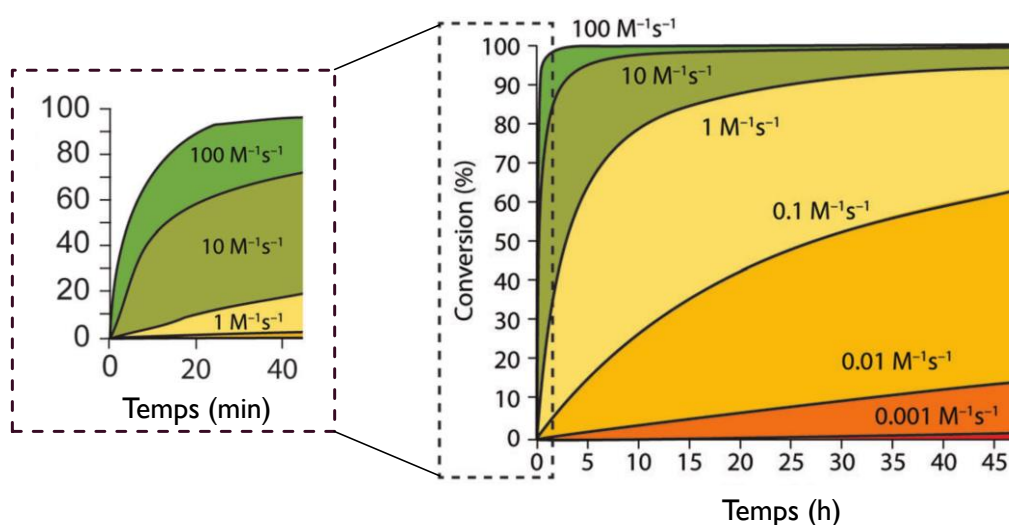


Figure 30 : Simulation d'une réaction du second ordre avec 100 μM de réactifs. Adaptée de [B.L. Oliveira et al., 2017]

La recherche de nouvelles réactions biocompatibles est encore d'actualité pour tenter d'améliorer encore davantage le caractère biocompatible ou bien les cinétiques des réactions de chimie bioorthogonale.^{68,69}

En 2019, H. Wennemers *et al.* ont par exemple développé une réaction bioorthogonale entre un isonitrile et une chloroxime (Figure 31).⁷⁰ Un des avantages majeurs de cette réaction est que le motif introduit sur la biomolécule, un isonitrile, est de très petite taille (environ 1 Å) ce qui permet de ne pas perturber le système étudié. Les auteurs ont également mis en évidence que cette réaction était orthogonale à une autre réaction bioorthogonale, la SPAAC.

La constante de vitesse de cette réaction est en revanche de l'ordre de 1 $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, ce qui peut sembler modeste par rapport à d'autres réactions développées précédemment.

⁶⁴ H. C. Hang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100* (25), 14846-14851. DOI : [10.1073/pnas.2335201100](https://doi.org/10.1073/pnas.2335201100)

⁶⁵ Kenry and B. Liu, *Trends Chem.* **2019**, *1* (8), 763-778. DOI : [10.1016/j.trechm.2019.08.003](https://doi.org/10.1016/j.trechm.2019.08.003)

⁶⁶ K. Porte *et al.*, *ChemBioChem* **2021**, *22* (1), 100-113. DOI : [10.1002/cbic.202000525](https://doi.org/10.1002/cbic.202000525)

⁶⁷ J. B. Rebelein and T. R. Ward, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *53*, 106-114. DOI : [10.1016/j.copbio.2017.12.008](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.12.008)

⁶⁸ N. K. Devaraj, *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4* (8), 952-959. DOI : [10.1021/acscentsci.8b00251](https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00251)

⁶⁹ R. D. Row and J. A. Prescher, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51* (5), 1073-1081. DOI : [10.1021/acs.accounts.7b00606](https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00606)

⁷⁰ R. J. B. Schafer *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (47), 18644-18648. DOI : [10.1021/jacs.9b07632](https://doi.org/10.1021/jacs.9b07632)

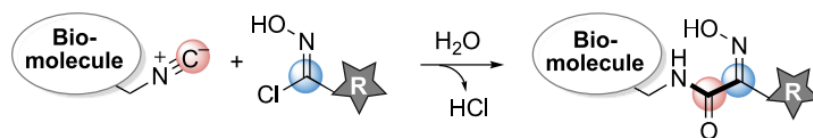


Figure 31 : Réaction bioorthogonale entre un isonitrile et une chlorooxime. Illustration extraite de [H. Wennemers et al., 2019]

Plus récemment, J. Kim et son équipe ont développé une réaction bioorthogonale de type rétro-Cope, faisant intervenir une cyclooctyne et une hydroxylamine selon le schéma présenté ci-dessous (Figure 32).⁷¹ Cette réaction possède une constante de vitesse de l'ordre de $80 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

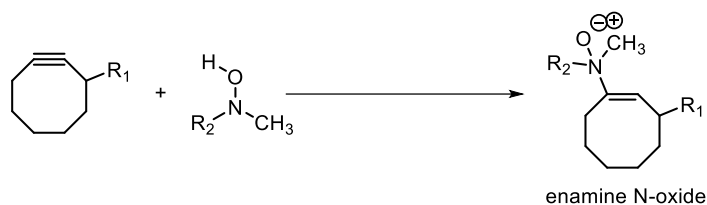


Figure 32 : Réaction bioorthogonale de type rétro-Cope

Un état de l'art sur les différentes versions fluorogéniques de ces réactions sera présenté en introduction de la deuxième partie de ce manuscrit.

⁷¹ D. Kang and J. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (15), 5616-5621. DOI : [10.1021/jacs.1c00885](https://doi.org/10.1021/jacs.1c00885)

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Ce manuscrit est découpé en deux parties qui permettent de répondre aux deux objectifs de cette thèse.

Le premier objectif de ce projet est de développer un fluorophore excitable à deux photons aux propriétés photophysiques et physico-chimiques optimisées pour la microscopie biphotonique en cellules vivantes, notamment en s'appuyant sur les travaux effectués précédemment au laboratoire. Ces derniers seront présentés dans l'introduction de la première partie de ce manuscrit. Le premier chapitre de cette partie sera consacré à la synthèse de sondes excitables à deux photons, à l'évaluation de leurs propriétés photophysiques (linéaires et non linéaires) et de leur application pour l'imagerie en cellules vivantes. Les propriétés photophysiques de ces sondes seront rationalisées *via* une étude de modélisation moléculaire. Une fois la méthode de calcul optimisée, cette dernière sera utilisée pour prédire les propriétés de nouvelles structures afin de proposer une deuxième génération de sondes à synthétiser. Cette deuxième famille de composés sera étudiée dans le deuxième chapitre.

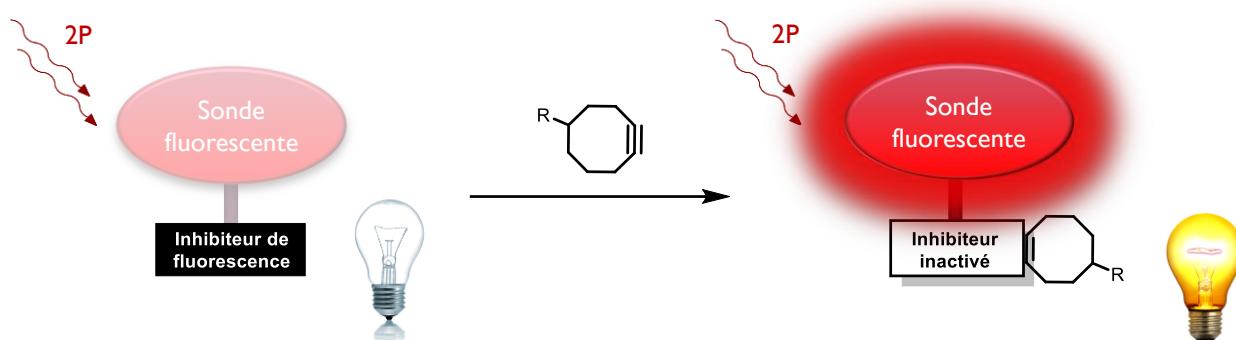


Figure 33 : Conception d'une sonde fluorogénique excitable à deux photons

Le second objectif sera d'utiliser le fluorophore développé dans la première partie afin de concevoir une sonde fluorogénique (ou OFF-ON) excitable à deux photons pour la chimie bioorthogonale (Figure 33). Après un bref état de l'art sur les sondes fluorogéniques pour la chimie bioorthogonale, le premier chapitre de cette deuxième partie permettra de discuter de la synthèse de différentes sondes fluorogéniques excitables à deux photons. Le deuxième chapitre sera quant à lui consacré à l'évaluation de leurs propriétés photophysiques.

PREMIÈRE PARTIE :
Développement de fluorophores
excitables à deux photons

INTRODUCTION PARTIE N°1

Ce chapitre introductif permet dans un premier temps de présenter les travaux majeurs de ces vingt dernières années sur le développement de sondes excitables à deux photons. Une seconde partie s'intéresse plus particulièrement à l'utilisation de ce type de fluorophores en bioimagerie. Sans se montrer exhaustive, cette introduction a pour but d'exposer les avancés dans ce domaine, mais également de mettre en exergue les enjeux qui persistent à l'heure actuelle.

I. Design d'absorbeurs à deux photons

De nombreux fluorophores biocompatibles aux propriétés photophysiques linéaires optimisées ont été développés ces 20 dernières années.^{72,73,74} Malheureusement, la plupart de ces fluorophores sont de piètres absorbeurs à deux photons. En effet, les fluorophores couramment utilisés possèdent des sections efficaces entre 1 et 100 GM en général, comme le montre la Figure 34 ci-dessous. Par exemple la fluoresceine a une section efficace d'absorption de 57 GM tandis que la coumarine a une section efficace de 32 GM.^{35,36} Quant aux BODIPY et cyanines, leurs sections efficaces sont de l'ordre de 50 à 100 GM.^{75,76}

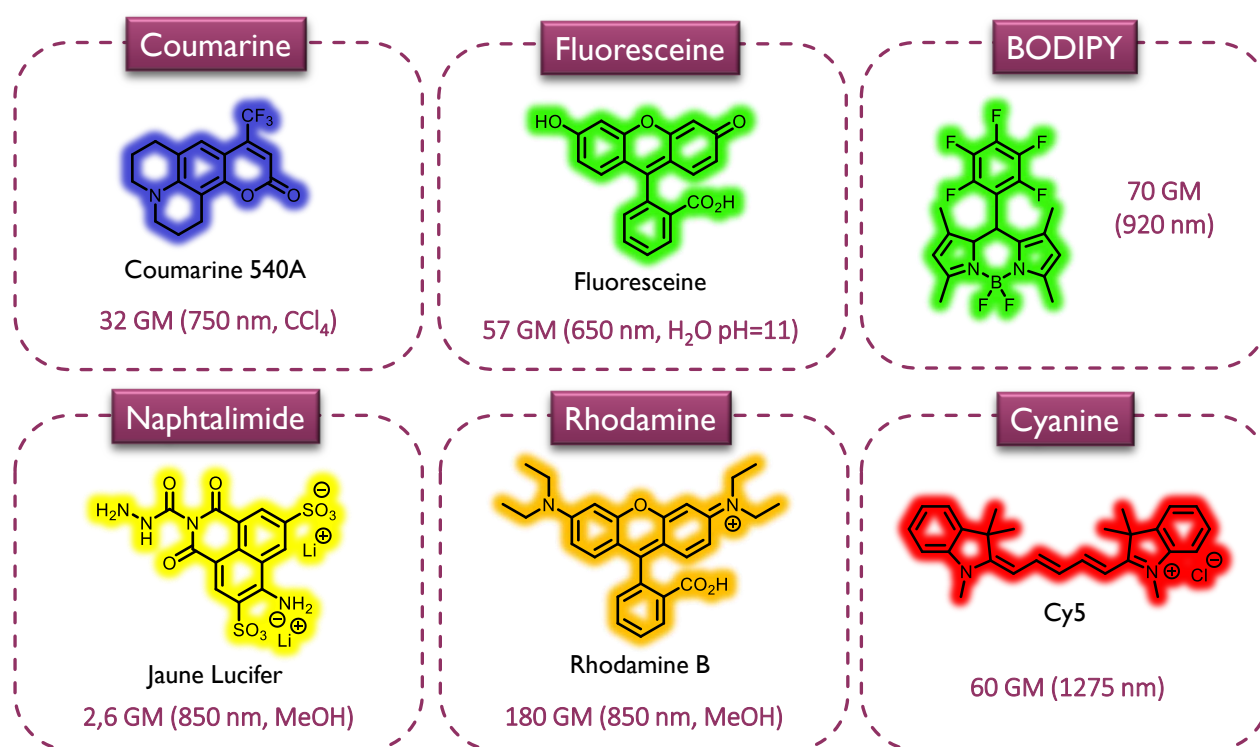


Figure 34 : Sections efficaces d'absorption biphotonique de quelques fluorophores couramment utilisés en bioimagerie

La microscopie biphotonique requiert l'utilisation de laser dont la puissance moyenne est environ dix fois supérieure aux puissances utilisées en microscopie confocale (cf. Introduction générale).

Si la puissance utilisée est trop élevée, de nombreux processus de photodégradation qui sont impossibles à un photon deviennent possibles à deux photons, comme des ruptures de liaisons par exemple.⁷⁷ Par conséquent, ces

⁷² L. D. Lavis and R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (4), 855-866. DOI : [10.1021/cb500078u](https://doi.org/10.1021/cb500078u)

⁷³ K. Colas *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, *2021* (15), 2133-2144. DOI : [10.1002/ejoc.202001658](https://doi.org/10.1002/ejoc.202001658)

⁷⁴ X. Tian *et al.*, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 3406-3426. DOI : [10.1039/D0SC06928K](https://doi.org/10.1039/D0SC06928K)

⁷⁵ L. W. T. Barros *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19* (32), 21683-21690. DOI : [10.1039/C6CP07849D](https://doi.org/10.1039/C6CP07849D)

⁷⁶ K. Demirhan *et al.*, *Proc.SPIE*, **2009**, *7183*. DOI : [10.1117/12.810506](https://doi.org/10.1117/12.810506)

⁷⁷ A. P. Demchenko, *Methods Appl. Fluoresc.* **2020**, *8* (2), 022001. DOI : [10.1088/2050-6120/ab7365](https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab7365)

puissances élevées peuvent entraîner très facilement le photoblanchiment de sondes couramment utilisées en microscopie confocale. Par exemple, le Mitotracker® Deep Red est dégradé en l'espace de quelques secondes sous excitation biphotonique.⁷⁸ C'est pourquoi il est absolument indispensable d'utiliser des fluorophores spécialement conçus pour cette application, notamment afin de limiter la puissance d'excitation. Une brillance biphotonique ($B_{2P} = \delta\Phi$) supérieur à 100 GM semble être un objectif raisonnable pour obtenir des images qualitatives tout en préservant l'échantillon.

Depuis les années 1990, plusieurs groupes ont travaillé sur le développement de sondes fluorescentes excitables à deux photons. C'est notamment le cas des groupes de W. Webb, K. Belfield, P. Prasad et M. Blanchard-Desce. Ces différents travaux ont permis d'établir une relation entre la structure des composés et leurs propriétés d'absorption biphotonique.

La Figure 35 ci-dessous présente quelques structures étudiées pour établir cette relation structure-propriétés.^{79,80}

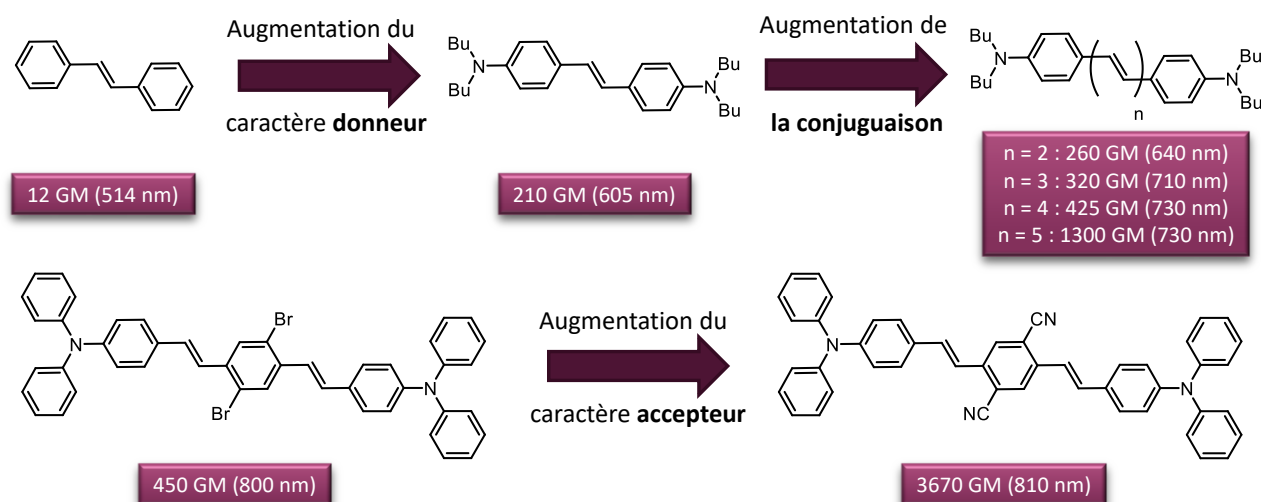


Figure 35 : Relation structure-propriétés d'absorption biphotonique de quelques composés

Les premières optimisations ont été faites sur des composés présentant une structure D- π -D. À partir de l'isomère E du stilbène (12 GM à 514 nm), différentes modifications structurales ont été réalisées. Dans un premier temps, l'augmentation du caractère donneur *via* l'introduction d'anilines aux extrémités a permis d'augmenter la section efficace de près de 200 GM. Ensuite, l'extension de la conjugaison *via* l'ajout de vinyles a également engendré une augmentation de la section efficace d'absorption, jusqu'à 1300 GM dans le cas n = 5. Deux dérivés de triphénylamine avec un design D- π -A- π -D ont par la suite permis de mettre en évidence une corrélation entre la force de l'accepteur et la section efficace d'absorption : plus l'accepteur attire les électrons et plus la section efficace d'absorption biphotonique est élevée.

En parallèle, le groupe de Prasad a étudié l'influence des ramifications sur les propriétés d'absorption biphotonique des composés.⁸¹ Ils ont pour cela analysé trois structures présentées en Figure 36 : une structure dipolaire A- π -D et ses équivalents quadrupolaire et octupolaire. L'ajout d'une branche à la structure permet de multiplier par trois environ la section efficace d'absorption biphotonique (208 GM contre 60 GM). L'ajout d'une troisième branche permet de la multiplier encore par deux (587 GM contre 208 GM). Cette étude met en évidence un effet coopératif entre les branches : l'augmentation de la section efficace

⁷⁸ Dégradation observée lors d'expériences réalisées au laboratoire ($\lambda_{ex} = 750$ nm).

⁷⁹ M. Rumi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (39), 9500-9510. DOI : [10.1021/ja994497s](https://doi.org/10.1021/ja994497s)

⁸⁰ M. Albota *et al.*, *Science* **1998**, *281* (5383), 1653-1656. DOI : [10.1126/science.281.5383.1653](https://doi.org/10.1126/science.281.5383.1653)

⁸¹ S.-J. Chung *et al.*, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (49), 10741-10745. DOI : [10.1021/jp992846z](https://doi.org/10.1021/jp992846z)

d'absorption est bien supérieure à celle attendue par rapport au nombre d'électrons π ajoutés au système.

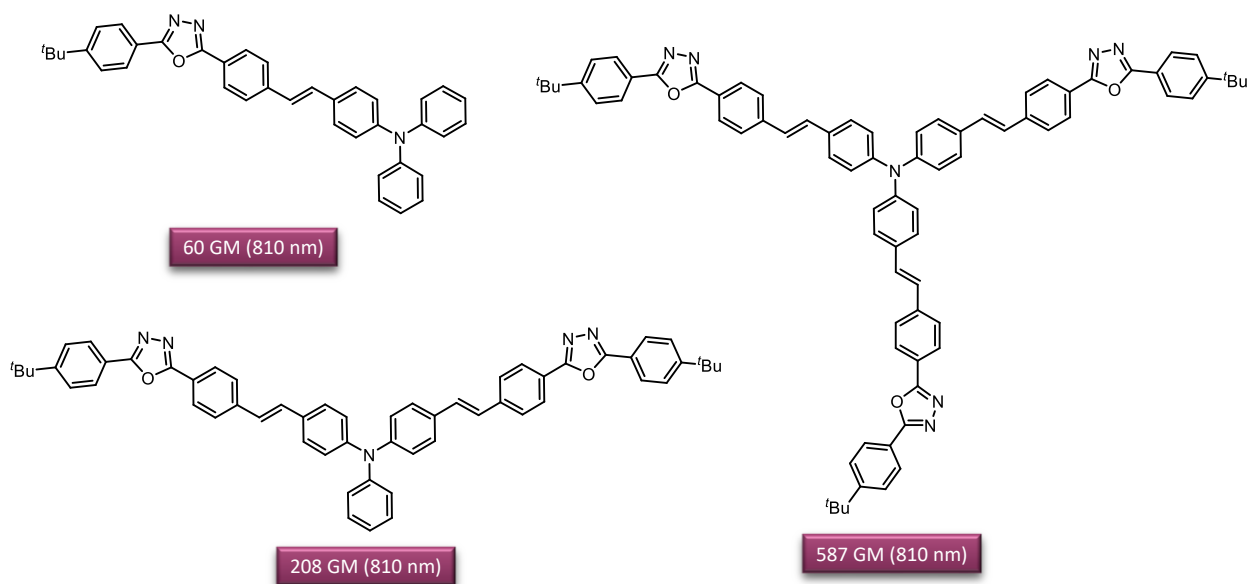


Figure 36 : Structures des composés développées par le groupe de P. Prasad

Ces études de relation structure-propriétés ont permis d'aboutir à trois types de structures possibles pour avoir une section efficace d'absorption biphotonique élevée (Figure 37).^{82,83} Sur ce schéma, les groupements donneurs et accepteurs sont interchangeables : une structure quadrupolaire peut par exemple être établie à partir d'un accepteur central conjugué à deux groupements donneurs.

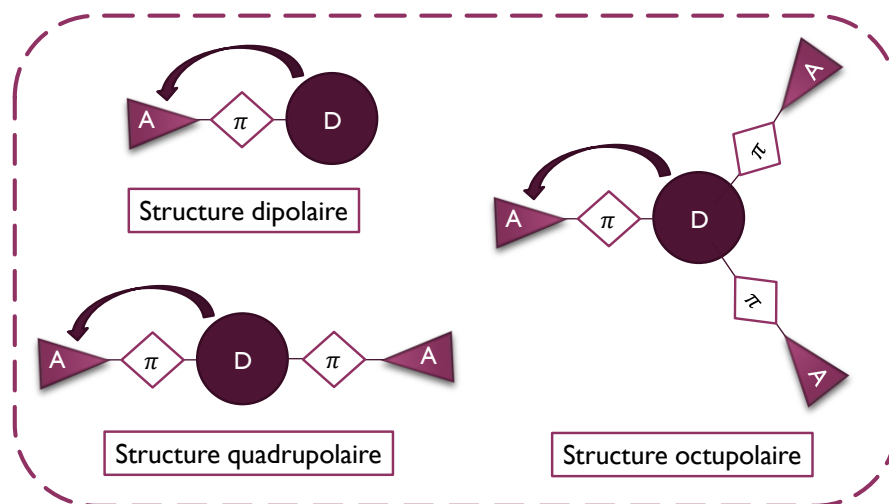


Figure 37 : Structures de type dipolaire, quadrupolaire et octupolaire

Cela a également permis de mettre en évidence que l'augmentation de la section efficace d'absorption est intimement corrélée à l'augmentation du transfert de charge de la périphérie vers le centre de la molécule ou inversement. Cette dépendance a depuis été établie *via* des calculs théoriques, en démontrant une relation présentée ci-après entre la section efficace d'absorption biphotonique et les moments dipolaires de transition.⁸⁴ Selon les éléments de symétrie d'un composé, les transitions permises

⁸² C. Katan *et al.*, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109* (13), 3024-3037. DOI : [10.1021/jp044193e](https://doi.org/10.1021/jp044193e)

⁸³ G. S. He *et al.*, *Chem. Rev.* **2008**, *108* (4), 1245-1330. DOI : [10.1021/cr050054x](https://doi.org/10.1021/cr050054x)

⁸⁴ M. Pawlicki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (18), 3244-66. DOI : [10.1002/anie.200805257](https://doi.org/10.1002/anie.200805257)

et interdites ne sont pas les mêmes, ce qui conduit à différents types de transitions selon la structure. Les diagrammes de Perrin-Jablonski simplifiés qui en résultent sont présentés ci-dessous (Figure 38). Les règles de sélection de l'absorption à deux photons sont par ailleurs différentes de celles pour l'absorption monophotonique. L'émission de fluorescence reste néanmoins identique que l'absorption soit mono ou biphotonique, car elle a toujours lieu depuis le premier état électronique excité S_1 d'après la règle de Kasha.

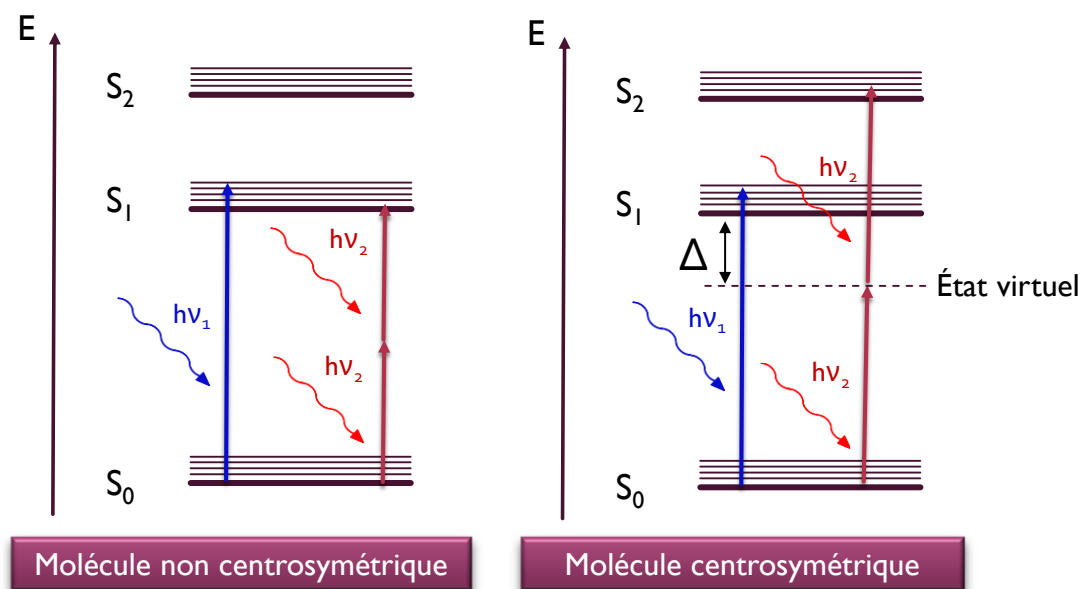


Figure 38 : Diagrammes de Perrin-Jablonski simplifiés dans le cas de molécules non centrosymétrique (à gauche) et centrosymétrique (à droite)

Dans le cas d'une molécule centrosymétrique, la transition $S_0 \rightarrow S_1$ est par exemple interdite pour des raisons de symétrie. Dans ce cas, la section efficace d'absorption maximale peut s'exprimer par :

$$\delta_{MAX} = C * \frac{\mu_{S_0 \rightarrow S_1}^2 \times \mu_{S_1 \rightarrow S_2}^2}{\Delta^2}$$

Où C est une constante, Δ est l'écart énergétique entre S_1 et l'état virtuel situé à $\frac{E(S_2)}{2}$, $\mu_{S_n \rightarrow S_{n+1}}$ est le moment dipolaire de transition entre les états électroniques S_n et S_{n+1} .

Toutes ces optimisations ont permis de développer des fluorophores excitables à deux photons particulièrement efficaces. Plusieurs revues permettent de recenser les différentes avancées dans le domaine et soulignent notamment l'émergence de (macro)molécules avec des sections efficaces de plusieurs milliers de GM, et pour certaines à des longueurs d'onde supérieures à 1 000 nm.^{85,86}

Parmi elles, les squaraines font figure d'exemples car ces molécules possèdent des sections efficaces jusqu'à plusieurs dizaines de milliers de GM. Deux exemples sont présentés en Figure 39.^{87,88}

⁸⁵ H. Myung Kim and B. Rae Cho, *Chem. Commun.* **2009**, (2), 153-164. DOI : [10.1039/B813280A](https://doi.org/10.1039/B813280A)

⁸⁶ S. Pascal et al., *Chemical Society Reviews* **2021**, 50 (11), 6613-6658. DOI : [10.1039/DOCS01221A](https://doi.org/10.1039/DOCS01221A)

⁸⁷ H.-Y. Ahn et al., *ACS. Appl. Mater. Interfaces* **2012**, 4 (6), 2847-2854. DOI : [10.1021/am300467w](https://doi.org/10.1021/am300467w)

⁸⁸ C.-L. Sun et al., *J. Mater. Chem. C* **2017**, 5 (5), 1224-1230. DOI : [10.1039/C6TC04129A](https://doi.org/10.1039/C6TC04129A)

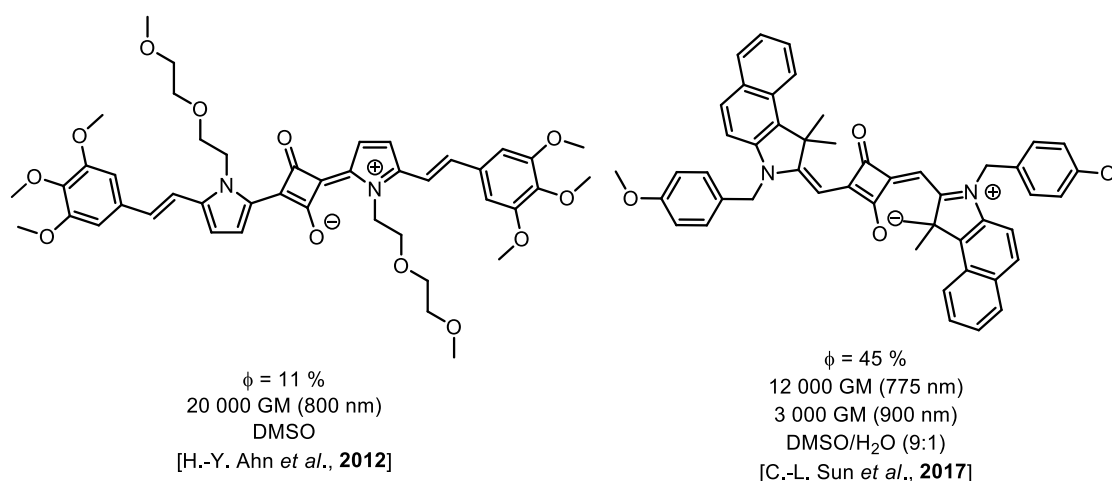


Figure 39 : Squaraines possédant des sections efficaces d'absorption biphotonique de l'ordre de 10 000 GM

En 2017, Sun *et al.* ont développé une squaraine possédant une section efficace d'absorption de 12 000 GM à 775 nm. Cette valeur est cependant à nuancer car elle a été obtenue *via* la méthode TPEF et les spectres de la publication montrent que ce composé absorbe entre 750 et 800 nm dans le mélange DMSO/H₂O utilisé pour réaliser les spectres d'excitation biphotonique. Par conséquent, la fluorescence observée dans cette zone pourrait être majoritairement due à une excitation monophotonique et non biphotonique. Cela surestimerait nettement la valeur de section efficace d'absorption. Dans cette publication, le potentiel de cette squaraine à être utilisée comme outil pour l'imagerie en cellules a également été évalué.

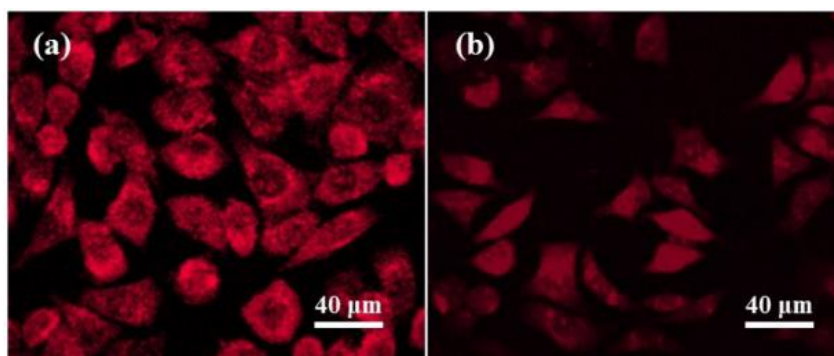


Figure 40 : Images de fibroblastes fixées obtenues en microscopie biphotonique ($\lambda_{ex} = 800$ nm), incubées avec de la squaraine développée par Sun à gauche et de la Rhodamine B à droite. Images extraites de [Sun *et al.*, 2017]

Les auteurs ont cherché à comparer leur sonde avec la Rhodamine B. Ils ont pour cela réalisé des images après excitation biphotonique de cellules incubées avec leur composé ou avec cette dernière. Les images obtenues sont présentées en Figure 40 ci-dessus. Ces études ont été réalisées en cellules fixées, ce qui laisse supposer que le composé ne pénètre pas en cellules vivantes. Par ailleurs, bien que la squaraine soit environ 40 fois plus brillante que la Rhodamine B ($\delta\Phi \approx 5\,400$ GM pour la squaraine contre 125 GM pour la Rhodamine B), les images obtenues pour la squaraine sont seulement légèrement plus brillantes. Les auteurs l'expliquent par une très faible solubilité de la squaraine en milieu aqueux.

Ces images mettent en évidence que pour une utilisation en cellules vivantes, l'optimisation de nombreux paramètres est nécessaire, et qu'avoir une section efficace d'absorption biphotonique très élevée est loin d'être suffisant.

II. Sondes biphotoniques pour la bioimagerie

Tout comme pour l'imagerie à un photon, de nombreux critères doivent être respectés pour qu'une sonde puisse être utilisée en microscopie biphotonique, en cellules vivantes ou *in vivo*. En effet, la sonde doit être soluble dans l'eau, capable de franchir les membranes cellulaires, photostable et ne pas être cytotoxique.

Les problèmes de solubilité rencontrés précédemment peuvent cependant être mis à profit pour utiliser les propriétés d'AIE de certains fluorophores.⁸⁹ Il est également possible d'encapsuler les composés dans des micelles.⁹⁰ Cependant, cette encapsulation est rarement sans conséquence sur les propriétés photophysiques de la sonde encapsulée. La sonde développée par Ahn & Belfield (Figure 39) possède un rendement quantique de 11 % dans le DMSO, et celui-ci chute à 0,5 % une fois encapsulée dans les micelles. De plus, ces stratégies ne sont pas forcément applicables à toutes les sondes développées jusqu'à présent.

Quelques fluorophores utilisés pour des applications biologiques publiés entre 2010 et 2020 sont présentés en Figure 41 ci-dessous.^{91,92,93}

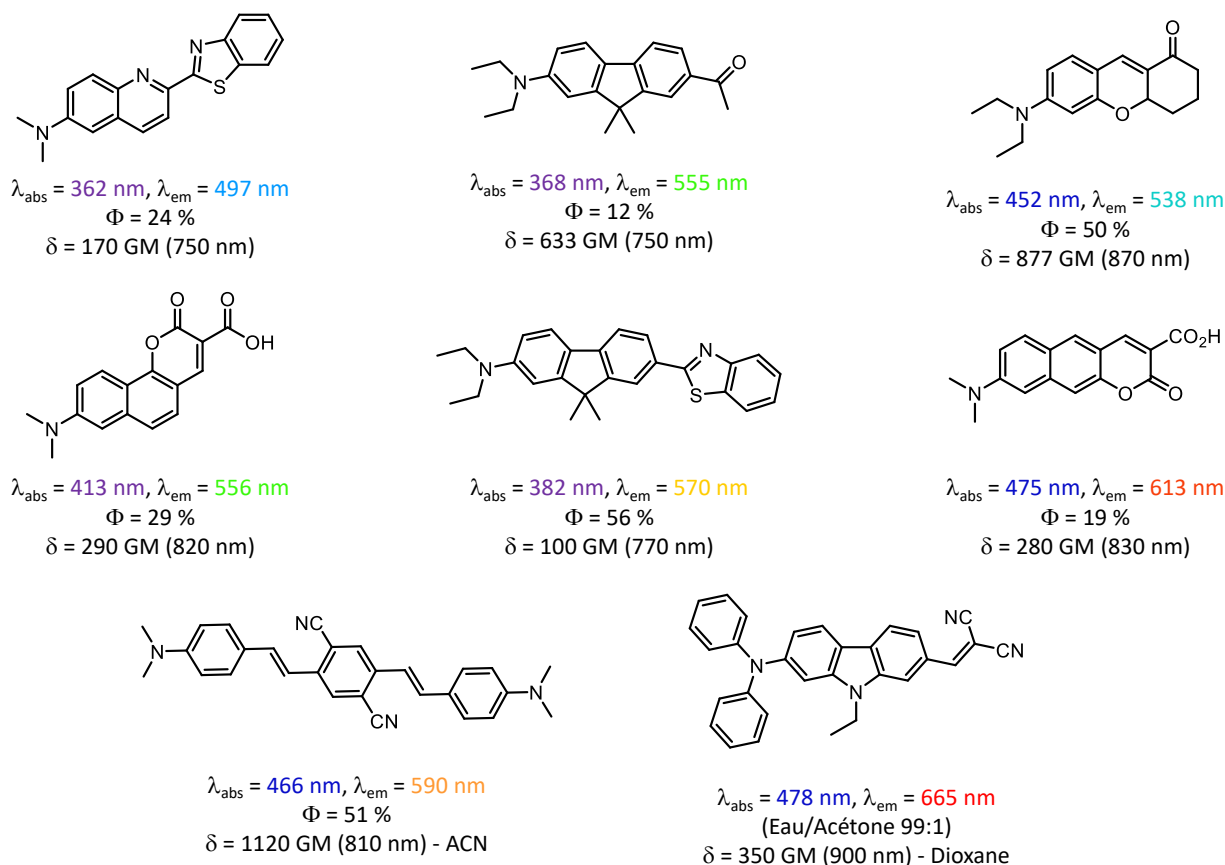


Figure 41 : Exemples de fluorophores utilisés pour développées des sondes excitables à deux photons pour la bioimagerie et leurs propriétés photophysiques en tampon aqueux^{92,93}

Ces sondes présentent des brillances biphotoniques comprises entre 41 et 570 GM, ce qui représentent des brillances faibles à très bonnes. Cela reste néanmoins bien inférieures à celles des

⁸⁹ Y. Dou *et al.*, *ChemBioChem* **2021**, 22 (11), 1871-1883. DOI : [10.1002/cbic.202000709](https://doi.org/10.1002/cbic.202000709)

⁹⁰ S. Yao and K. D. Belfield, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012 (17), 3199-3217. DOI : [10.1002/ejoc.201200281](https://doi.org/10.1002/ejoc.201200281)

⁹¹ L. Xu *et al.*, *J. Mater. Chem. C* **2020**, 8 (19), 6342-6349. DOI : [10.1039/D0TC00563K](https://doi.org/10.1039/D0TC00563K)

⁹² H. M. Kim and B. R. Cho, *Chem. Rev.* **2015**, 115 (11), 5014-5055. DOI : [10.1021/cr5004425](https://doi.org/10.1021/cr5004425)

⁹³ L. Wu *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, 50 (2), 702-734. DOI : [10.1039/D0CS00861C](https://doi.org/10.1039/D0CS00861C)

composés biphotoniques présentés précédemment (jusqu'à 5 400 GM). Par ailleurs, il s'agit majoritairement de structures ayant un faible poids moléculaire afin qu'elles restent hydrosolubles. Grâce à l'absorption biphotonique, elles présentent des maxima d'absorption entre 750 nm et 870 nm, mais la plupart émette bien en deçà de la fenêtre thérapeutique.

Par exemple, en 2019, B. Tang et son équipe ont développé une sonde fluorogénique excitable à deux photons pour détecter l'acétylcholinestérase chez des souris *in vivo*.⁹⁴

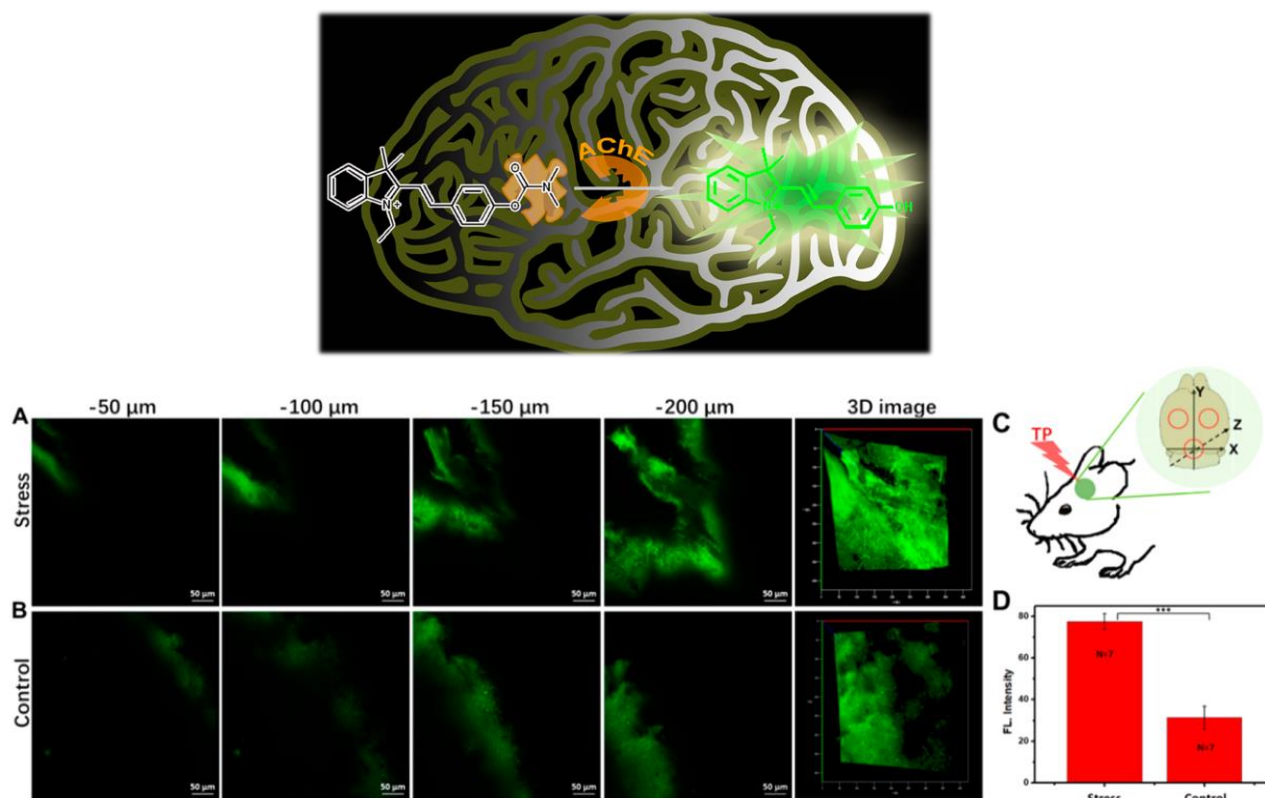


Figure 42 : Sonde excitable à deux photons utilisée pour détecter l'acétylcholinestérase *in vivo* chez la souris. A : souris exposée à un stress pendant 14 jours. B : groupe contrôle. $\lambda_{ex} = 800 \text{ nm}$ Détection : 480-650 nm.

Illustration extraite de [X. Wang et al., 2019]⁹⁴

La sonde libérée possède une émission possédant un maximum à 570 nm, ce qui correspond à une émission dans le jaune-vert, et sa section efficace n'est que d'une vingtaine de GM. Cela laisse penser qu'une puissance de laser très élevée a été utilisée pour l'obtention des images présentées en Figure 42 ci-dessus, ce qui n'est pas sans conséquence sur l'échantillon.

Pour conclure, les très bons absorbeurs à deux photons sont souvent des molécules ayant un poids moléculaire élevé et peu biocompatibles car très hydrophobes. En effet, la section efficace d'absorption d'un composé dépend très fortement de l'extension du système π sur ce dernier car elle est liée à la distance sur laquelle la charge est déplacée au cours de la transition. Un réel décalage apparaît ainsi entre les sondes présentant des sections efficaces de plusieurs milliers de GM et celles qui peuvent effectivement être utilisées pour des applications biologiques. Le développement de nouveaux fluorophores excitables à deux photons adaptés à l'imagerie en cellules vivantes, c'est-à-dire "efficaces et compacts", et qui sont donc biocompatibles, reste ainsi un enjeu majeur.

⁹⁴ X. Wang et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (5), 2061-2068. DOI : [10.1021/jacs.8b11414](https://doi.org/10.1021/jacs.8b11414)

III. Travaux antérieurs et objectifs

1) Travaux antérieurs

Ces dernières années, le laboratoire a contribué au développement de plusieurs sondes excitables à deux photons de type vinyltriphénylamine.

La première structure à avoir été identifiée comme prometteuse est la **TP-2Py** dont la structure et quelques propriétés sont présentées en Figure 43 ci-dessous.⁹⁵ Cette sonde possède un maximum d'émission dans le rouge et de bonnes propriétés d'absorption biphotonique (450 GM à 820 nm dans l'ADN duplexe).

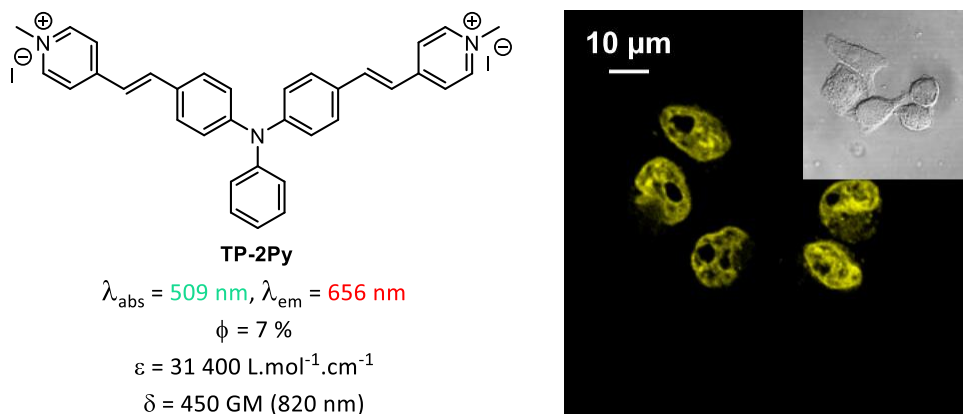


Figure 43 : Structure et propriétés photophysiques de la **TP-2Py** dans l'ADN duplexe. Cellules HeLa incubées en cellules vivantes avec $2 \mu\text{M}$ de **TP-2Py** pendant 2h puis fixées. Excitation à 496 nm. Détection : 560-720 nm.

À partir de ce squelette, différentes modifications ont été effectuées à la fois sur le cœur (remplacement de la triphénylamine par un carbazole ou une trinaphtylamine), l'espaceur ou bien les accepteurs.^{96,97}

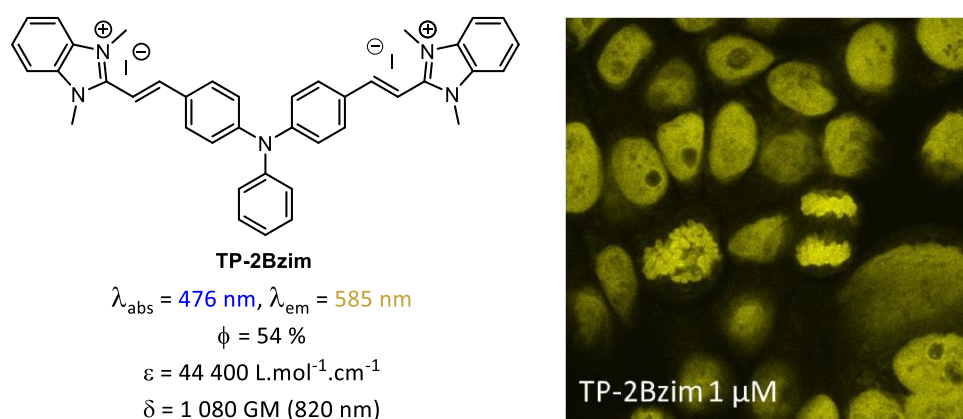


Figure 44 : Structure et propriétés photophysiques de la **TP-2Bzim** dans l'ADN duplexe. Cellules HT29 incubées en cellules vivantes avec $1 \mu\text{M}$ de **TP-2Bzim** pendant 2h puis fixées. Excitation à 800 nm. Détection : 500-750 nm.

⁹⁵ C. Allain *et al.*, *ChemBioChem* **2007**, *8* (4), 424-433. DOI : [10.1002/cbic.200600483](https://doi.org/10.1002/cbic.200600483)

⁹⁶ B. Dumat *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (30), 6054-6061. DOI : [10.1039/C2OB25515D](https://doi.org/10.1039/C2OB25515D)

⁹⁷ B. Dumat. *Sondes fluorescentes vinyl-triphénylamines optimisées pour la microscopie biphotonique : Etude des interactions non covalentes avec l'ADN et la HSA et application à l'imagerie cellulaire.* **2012** Université Paris Sud - Paris XI, NNT : 2012PA112319.

Ces études ont notamment permis d'identifier la **TP-2Bzim** comme un marqueur très brillant (brillance biphotonique de 583 GM), photostable et sélectif de l'ADN nucléaire en cellules fixées (Figure 44).⁹⁸ Tous ces composés cationiques sont biocompatibles et peuvent également être utilisés en cellules vivantes. Dans ce cas, ils marquent les mitochondries.^{99,100} Bien que ces modifications aient été effectuées principalement dans le but d'avoir une meilleure section efficace d'absorption spécifiquement dans l'ADN duplexe, ces travaux pourront constituer un point de départ intéressant pour la conception de nouvelles sondes excitables à deux photons utilisables dans un contexte de bioimagerie.

2) Objectifs

L'objectif de cette partie sera de synthétiser une sonde excitable à deux photons pour l'imagerie en cellules vivantes, en cherchant à améliorer les propriétés photophysiques des sondes biocompatibles développées jusqu'à présent. Cela consistera notamment à maximiser les propriétés d'absorption biphotonique tout en minimisant la taille du fluorophore. Pour cela, il sera judicieux de veiller à obtenir le ratio section efficace sur masse molaire le plus grand possible, afin d'obtenir une structure à la fois « efficace et compact » pour s'assurer de sa biocompatibilité. Le design quadrupolaire semble par conséquent être le plus approprié pour avoir de bonnes propriétés d'absorption biphotonique, tout en conservant un poids moléculaire *raisonnable* ($< 1\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Deux critères devront ainsi guider le design de cette sonde :

- Biocompatibilité et donc premièrement hydrosolubilité
- Ratio section efficace d'absorption biphotonique sur masse molaire le plus élevé possible

Les quelques exemples présentés dans l'introduction ont permis de mettre en évidence que le squelette fluorène est largement utilisé comme donneur pour la conception de sondes excitables à deux photons. Par ailleurs, en remplaçant le carbone par un atome de silicium, un effet bathochrome pourrait être attendu grâce à un effet d'hyperconjugaison, comme c'est par exemple le cas entre un cyclopentadiène et son analogue silylé.¹⁰¹ Par analogie avec les structures précédemment synthétisées au laboratoire, l'étude de deux fluorophores a dans un premier temps été envisagée : **SiFluo-V** et **SiFluo-L** dont les structures sont présentées en Figure 45 ci-dessous.

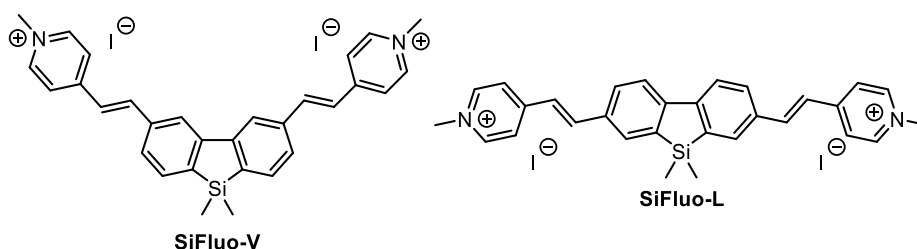


Figure 45 : Structures des composés **SiFluo-V** et **SiFluo-L**

La synthèse, l'étude des propriétés photophysiques (linéaires et non linéaires) de ces composés, ainsi que des expériences de microscopie en cellules vivantes avec ces derniers sont présentées dans le premier chapitre de cette partie.

⁹⁸ B. Dumat *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (34), 12697-12706. DOI : [10.1021/ja404422z](https://doi.org/10.1021/ja404422z)

⁹⁹ R. Chennoufi *et al.*, *Chem. Commun.* **2015**, *51* (80), 14881-14884. DOI : [10.1039/C5CC05970D](https://doi.org/10.1039/C5CC05970D)

¹⁰⁰ L. Fourmois *et al.*, *ChemBioChem* **2021**, *22* (14), 2457-2467. DOI : [10.1002/cbic.202100168](https://doi.org/10.1002/cbic.202100168)

¹⁰¹ S. Yamaguchi and K. Tamao, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, (22), 3693-3702. DOI : [10.1039/A804491K](https://doi.org/10.1039/A804491K)

CHAPITRE 1-1 : Première génération de sondes excitables à deux photons

I. Synthèse

1) Synthèse de SiFluo-V

a) 1^{ère} voie de synthèse

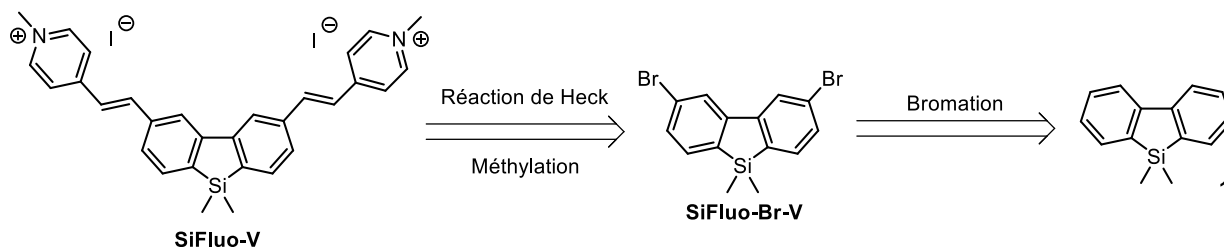
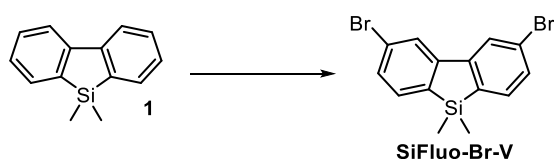


Figure 46 : Première voie de synthèse envisagée pour le composé SiFluo-V

Le fluorophore **SiFluo-V** pourrait être obtenu à partir du composé dibromé **SiFluo-Br-V** via une réaction de Heck avec la 4-vinylpyridine, suivie d'une réaction de méthylation. Le cœur silylé dibromé peut quant à lui être obtenu en dibromant le composé commercial **1**.

Des conditions décrites dans la littérature pour la monobromation du composé **1** en présence de NBS dans du chloroforme n'ont pas permis d'obtenir le produit souhaité (ni même la monobromation). En effet, avec ces conditions, le produit de départ n'a pas du tout réagi. Différents essais de bromation présentés dans le Tableau 4 ci-dessous ont donc été effectués.



Réactif	Solvant	T	Durée	Résultats
NBS ¹⁰²	CHCl ₃	Reflux	24h	Pas de conversion
Br ₂	CHCl ₃	Reflux	12h	3 produits ayant la masse attendue
NBS	DMF anhydre	0 °C puis t.a.	24h	Pas de conversion

Tableau 4 : Essais de bromation réalisés sur le cœur silafluorène **1**

La réaction du dibrome dans le chloroforme sur le silafluorène **1** a conduit à la formation de 3 composés possédant la même masse, et qui n'ont pas pu être séparés par chromatographie sur gel de silice. Pour pallier ce problème, des conditions de bromation connues pour mener à une forte *para*-sélectivité (NBS dans DMF) ont été testées.¹⁰³ Malheureusement, ces conditions n'ont pas permis l'obtention de **SiFluo-Br-V**, une autre voie de synthèse a ainsi dû être envisagée.

¹⁰² KR20120120906, 2012.

¹⁰³ R. H. Mitchell et al., *J. Org. Chem.* **1979**, 44 (25), 4733-4735. DOI : [10.1021/jo00393a066](https://doi.org/10.1021/jo00393a066)

b) 2^{ème} voie de synthèse

Afin de contourner le manque de régiosélectivité de la bromation directe du composé **1**, il a été envisagé de réaliser une réaction de cyclisation sur un composé possédant déjà les bromes sur les deux positions désirées. L'iodation du dérivé bromé **2** permettrait d'obtenir le composé **3**, qui, par réaction avec du *n*-butyllithium puis du dichlorodiméthylsilane pourrait conduire au cœur silylé dibromé désiré.¹⁰⁴

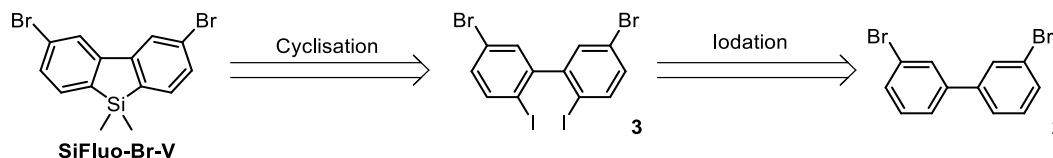
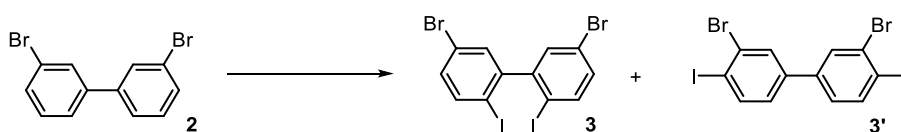


Figure 47 : Deuxième voie de synthèse envisagée

Différents essais d'iodation en présence de NIS ont été réalisés à partir de diverses méthodes décrites dans la littérature, et sont présentés dans le Tableau 5 ci-dessous.



Réactif	Solvant	T	Durée	η	Résultat
NIS ¹⁰⁵	AcOH	t.a.	12h	0 %	Pas de conversion
NIS	AcOH	70 °C	6h	0 %	Pas de conversion
NIS ¹⁰⁶	Eau	50 °C	24h	40 % (3')	-

Tableau 5 : Essais d'iodation réalisés

Seul le composé **3'** qui ne possède pas la régiosélectivité souhaitée a été obtenu lors de ces différents essais. Il semble par conséquent très difficile d'obtenir le 5,5'-dibromo-2,2'-diiodo-1,1'-biphényle **3** en une seule étape à partir du 3,3'-dibromo-1,1'-biphényle **2**.

Ainsi, une autre voie de synthèse décrite dans la littérature a été utilisée pour obtenir le composé souhaité (Figure 48).¹⁰⁷

¹⁰⁴ H. Toyama *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (13), 2982-2988. DOI : [10.1016/j.bmc.2015.05.004](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.05.004)

¹⁰⁵ Y. Mita *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (5), 1712-1717. DOI : [10.1016/j.bmcl.2010.01.079](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.01.079)

¹⁰⁶ M. Bergström *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017* (22), 3234-3239. DOI : [10.1002/ejoc.201700173](https://doi.org/10.1002/ejoc.201700173)

¹⁰⁷ K. L. Chan *et al.*, *Chem. Commun.* **2005**, (46), 5766-5768. DOI : [10.1039/B511208G](https://doi.org/10.1039/B511208G)

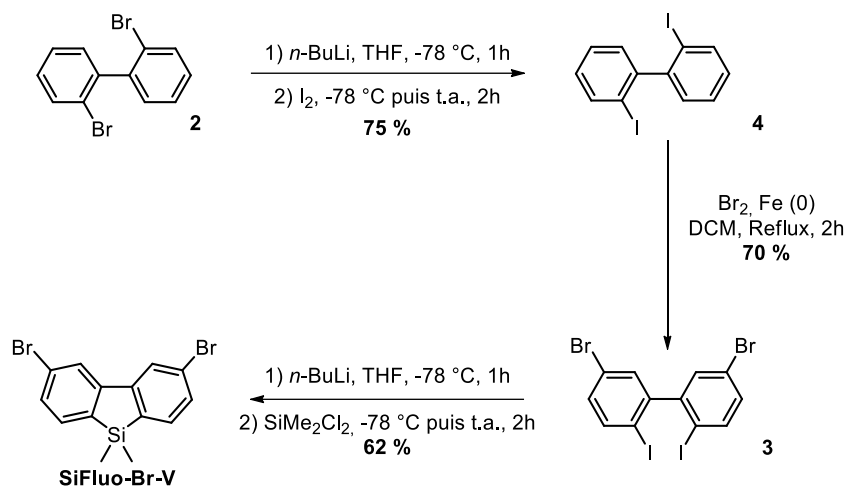


Figure 48 : Synthèse du cœur bromé **SiFluo-Br-V** en 3 étapes à partir du 2,2'-dibromobiphényle **2**

Le diiodobiphényle **4** a été obtenu par réaction entre le diiode et le lithien formé par l'échange halogène-métal entre le dibromobiphényle **2** et du *n*-butyllithium. Une bromation du composé **4** en présence de dibrome et de fer a ensuite conduit au dérivé **3** avec un rendement de 70 %. La régiosélectivité de cette substitution électrophile aromatique va à l'encontre des règles de Holleman : c'est l'iode et non le phényle qui impose ici la régiosélectivité. Cela peut s'expliquer par le fait que les deux phényles sont à 90° l'un de l'autre en raison de la gêne stérique. Le dérivé halogéné **3** a par la suite été engagé dans une réaction de cyclisation pour donner **SiFluo-Br-V** avec un bon rendement de 62 %.

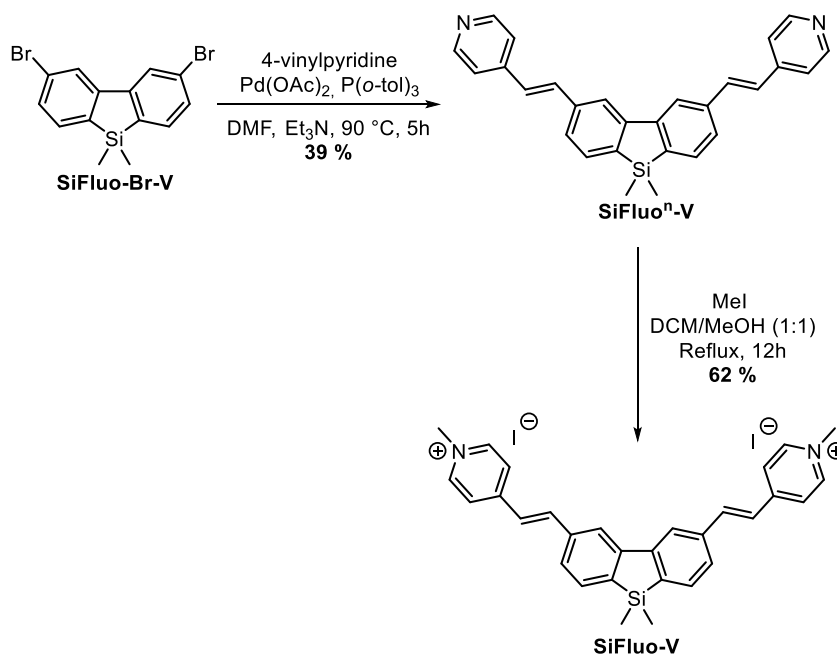


Figure 49 : Synthèse de **SiFluo-V**

Le composé **SiFluo-V** a ensuite été synthétisé en deux étapes à partir de **SiFluo-Br-V** (Figure 49). Une réaction de Heck en présence de 4-vinylpyridine a permis d'accéder au dérivé **SiFluoⁿ-V**, qui a ensuite été méthylé avec de l'iodométhane pour conduire au composé souhaité **SiFluo-V** avec un rendement de 24 % sur deux étapes.

2) Synthèse de **SiFluo-L**

Le composé **SiFluo-L** a été obtenu en 3 étapes à partir du 4,4'-dibromo-2,2'-diiodo-1,1'-biphényle **5** commercialement disponible.

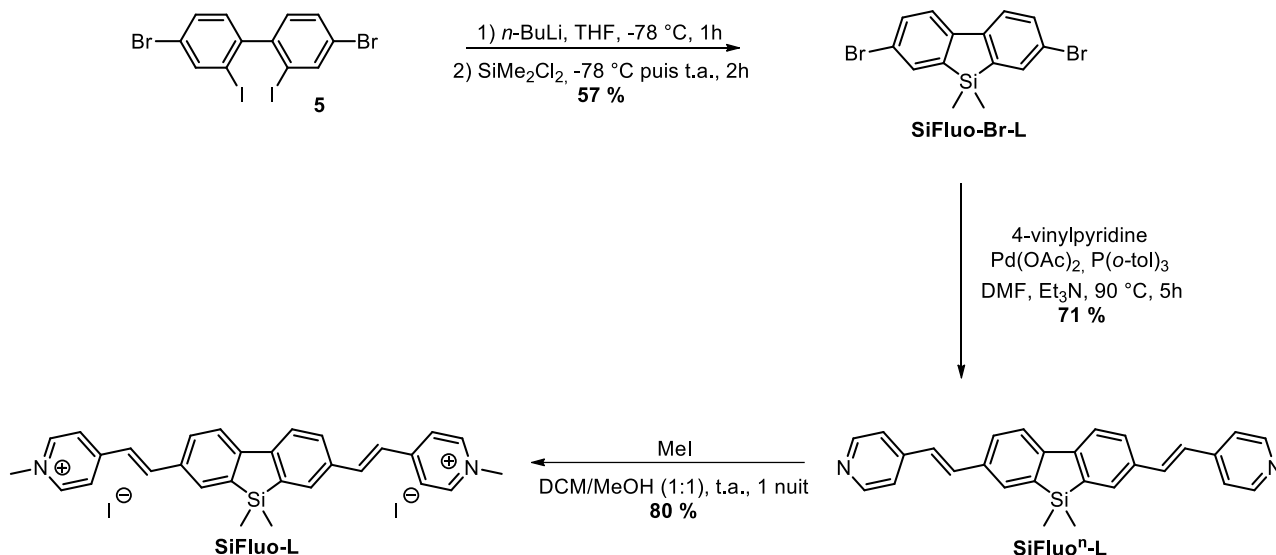


Figure 50 : Synthèse de **SiFluo-L**

La synthèse, très similaire à celle de **SiFluo-V**, consiste premièrement à effectuer une réaction de cyclisation en réalisant un échange halogène-métal chimiosélectif sur les atomes d'iode. Puis, grâce à une réaction de Heck en présence de 4-vinylpyridine, l'intermédiaire **SiFluoⁿ-L** a été obtenu. Ce dernier a ensuite été engagé dans une réaction de méthylation en présence d'iodométhane pour conduire au composé souhaité **SiFluo-L** avec un rendement global de 32 % sur trois étapes.

II. Propriétés photophysiques de SiFluo-V et SiFluo-L

1) Propriétés linéaires

Les propriétés d'absorption (à un photon) et d'émission des deux sondes **SiFluo-V** et **SiFluo-L** ont été étudiées. Les mesures ont été effectuées dans l'eau ($\mu = 1,01 \cdot 10^{-3}$ Pa.s à 20 °C) ainsi que dans le glycérol ($\mu = 1.49$ Pa.s à 20 °C). Ce dernier permet de mimer l'immobilisation de la sonde une fois sa cible biologique atteinte. En effet, dans l'eau, après passage à l'état excité S_1 , la désexcitation se fait très majoritairement par voie non radiative *via* des rotations autour des vinylpyridiniums (Figure 51).

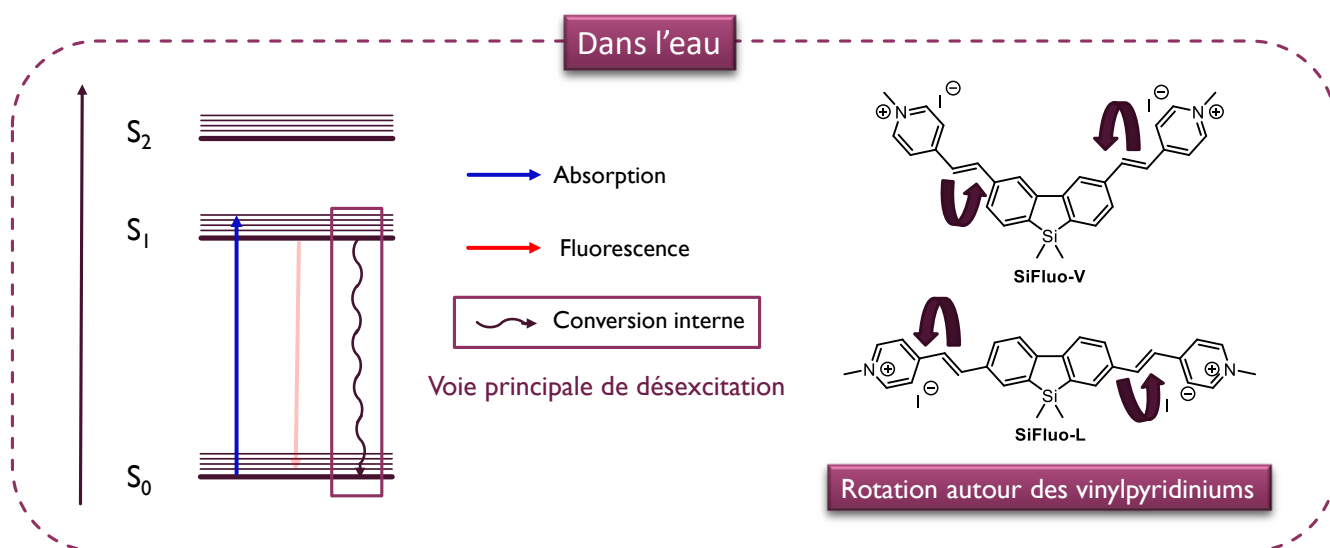


Figure 51 : Désexcitation non radiative des dérivés **SiFluo-V** et **SiFluo-L** par rotation autour des vinylpyridiniums

Ainsi, la viscosité particulièrement élevée du glycérol permet de limiter la désexcitation de la sonde par des processus non radiatifs.

Les spectres d'absorption et d'émission dans le glycérol et dans l'eau sont présentés en Figure 52 pour **SiFluo-V** et en Figure 53 pour **SiFluo-L**. Par ailleurs, les spectres d'excitation dans le glycérol ont été réalisés pour les deux sondes et sont disponibles en annexe. Dans chacun des cas, le spectre d'excitation est superposable au spectre d'absorption ce qui permet de conclure sur la présence d'une unique espèce en solution.

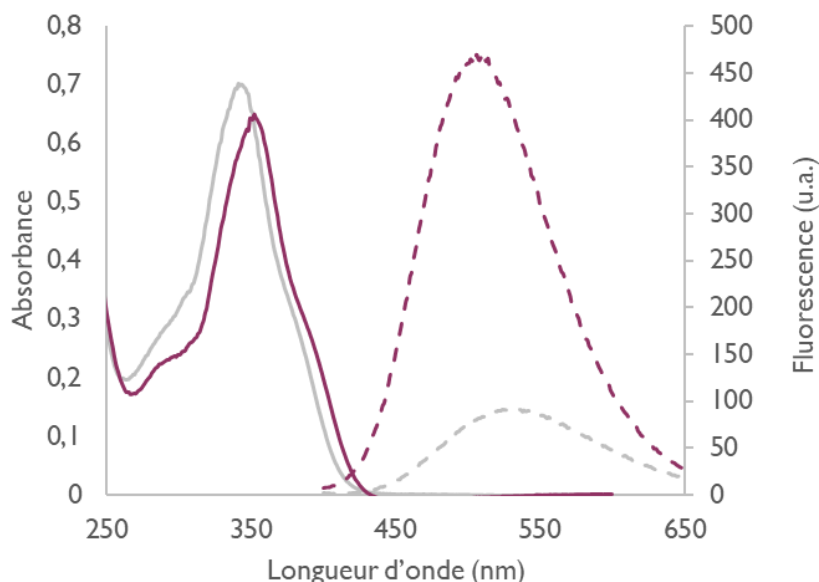


Figure 52 : Spectres d'absorption (en trait plein) et d'émission de fluorescence (trait pointillé) de **SiFluo-V** dans l'eau (gris) et dans le glycérol (violet) – Solution à 12 μM pour les spectres d'absorption et 2 μM pour les spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{max}}$)

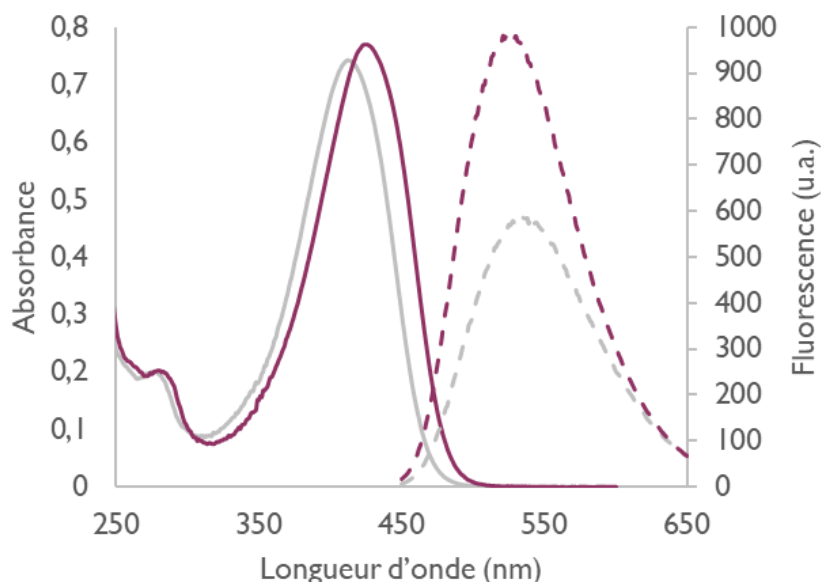
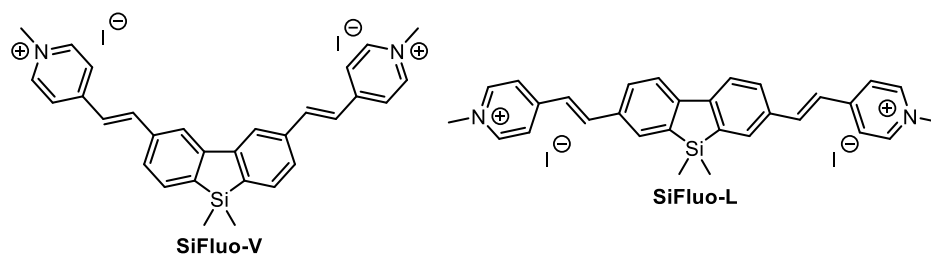


Figure 53 : Spectres d'absorption (en trait plein) et d'émission de fluorescence (trait pointillé) de **SiFluo-L** dans l'eau (gris) et dans le glycérol (violet) – Solution à 12 μM pour les spectres d'absorption et 2 μM pour les spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{max}}$)

Les propriétés photophysiques des deux sondes sont récapitulées dans le Tableau 6 page suivante.



Composé	Solvant	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	λ_{\max} (abs)	λ_{\max} (em)	Déplacement de Stokes (cm ⁻¹)	Φ	$\epsilon\Phi$ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
SiFluo-V	Eau	58 600	345 nm	530 nm	10 100	3 %	1 760
	Glycérol	54 100	350 nm	510 nm	9 000	31 %	16 770
SiFluo-L	Eau	62 900	416 nm	535 nm	5 300	13 %	8 180
	Glycérol	64 200	425 nm	530 nm	4 700	29 %	18 610

Tableau 6 : Comparaison des propriétés spectroscopiques de **SiFluo-V** et **SiFluo-L**

SiFluo-V absorbe dans l'UV autour de 350 nm, tandis que **SiFluo-L** absorbe dans le violet entre 416 et 425 nm selon le solvant. Cette différence entre les deux régioisomères met en évidence une meilleure conjugaison dans la structure de type linéaire par rapport à la structure en V. Par ailleurs, **SiFluo-L** possède des coefficients d'absorption molaire légèrement plus élevés que **SiFluo-V**, ce qui peut également s'expliquer par une plus grande rigidité. Le solvatochromisme observé pour l'absorption et l'émission selon le solvant est cohérent avec une transition de type transfert de charge.

De plus, ces sondes présentent des déplacements de Stokes très élevés (autour de 5 000 cm⁻¹ pour le L et 10 000 cm⁻¹ pour le V), ce qui est environ 10 fois supérieur à la plupart des sondes fluorescentes comme les rhodamines, les BODIPY ou encore les cyanines, utilisées habituellement dans un contexte biologique. Un large déplacement de Stokes représente un avantage en imagerie. Cela permet notamment d'éviter les problèmes de réabsorption. Malgré leurs longueurs d'onde d'absorption très différentes, les deux sondes émettent dans le vert autour de 530 nm et possèdent des rendements quantiques comparables dans le glycérol (29 % pour le L et 31 % pour le V). En revanche, **SiFluo-L** émet davantage dans l'eau que **SiFluo-V** (rendement quantique de 13 % contre 3 %). Cette différence de comportement entre le glycérol et l'eau indique que les deux sondes fluorescent davantage dans un environnement contraint et devraient ainsi exhiber une fluorescence similaire en cellules, une fois leur cible biologique atteinte. Ces résultats semblent indiquer que ces deux sondes ont des propriétés photophysiques adaptées à l'imagerie cellulaire. **SiFluo-L** semble cependant plus prometteuse grâce à ses longueurs d'onde d'absorption plus élevées.

Malgré tout, une absorption dans l'UV ou le proche UV comme c'est le cas pour ces sondes peut représenter une limitation majeure pour leur utilisation en cellules, il est donc particulièrement intéressant de porter notre attention sur leurs propriétés d'absorption biphotonique.

2) Propriétés d'absorption biphotoniques

Les sections efficaces d'absorption de **SiFluo-V** et **SiFluo-L** ont été évaluées par le Dr. Frédéric Bolze (Faculté de pharmacie – Strasbourg). Les différentes mesures ont été effectuées (en duplicat) de 680 nm à 950 nm dans l'eau et dans le glycérol, tout comme pour les propriétés d'absorption linéaire. Toutefois, ces dernières ont également été réalisées dans le DMSO dans le but de pouvoir comparer les données obtenues avec celles de la littérature. Les spectres d'excitation obtenus sont présentés en Figure 54.

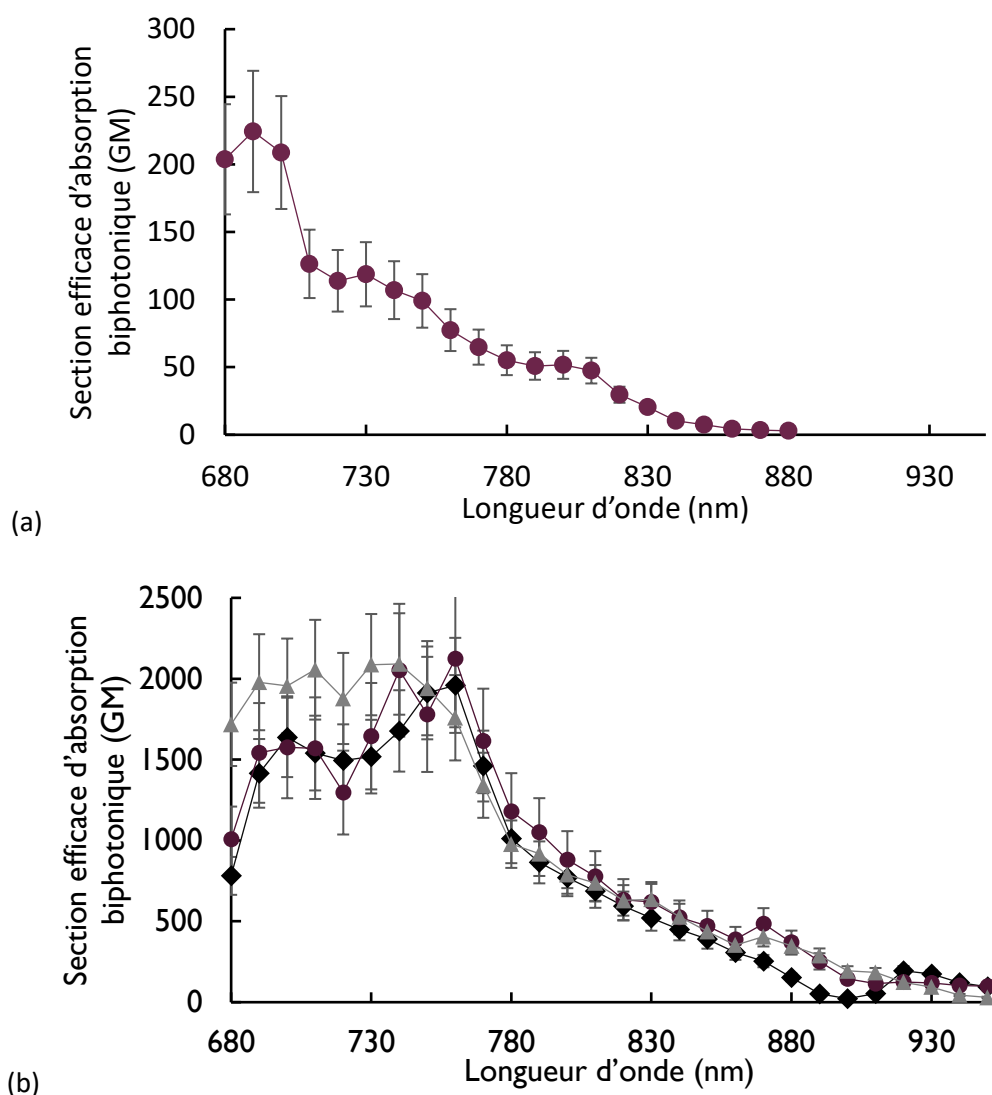


Figure 54 : Spectres d'excitation biphotonique de **SiFluo-V** (a) et **SiFluo-L** (b) dans le glycérol (rond), l'eau (triangle) et le DMSO (carré)

Dans l'eau et dans le DMSO, le signal de fluorescence induit par l'absorption à deux photons de **SiFluo-V** est malheureusement trop faible pour être quantifié. Il est donc impossible d'en tirer une valeur de section efficace d'absorption biphotonique. Cela est tout à fait cohérent avec les faibles rendements quantiques mesurés dans ces deux solvants (respectivement 1 % et 3 %, dans le DMSO et dans l'eau). Dans le glycérol, ce dernier présente des sections efficaces d'absorption de l'ordre de 200 GM.

Composé	Solvant	$\lambda_{\max,2PA}$ abs (nm)	δ_{\max} (GM)	Φ	$\delta_{\max} \cdot \Phi$ (GM)
SiFluo-V	Eau	-	n.d.	3 %	-
	Glycérol	680	210	31 %	65
	DMSO	-	n.d.	1 %	-
SiFluo-L	Eau	740	2 100	13 %	270
	Glycérol	760	2 150	29 %	620
	DMSO	760	2 000	25 %	500

Tableau 7 : Propriétés d'absorption biphotonique de **SiFluo-V** et **SiFluo-L** dans l'eau, le glycérol et le DMSO

Bien que **SiFluo-V** puisse être considéré comme un « bon absorbeur » à deux photons, cette sonde possède des sections efficaces environ 10 fois inférieures à celles mesurées pour son analogue linéaire **SiFluo-L**. En effet, cette sonde présente des sections efficaces d'absorption de l'ordre de 10^3 GM avec un maximum à 2 150 GM autour de 750 nm (dans le DMSO). C'est environ trois fois plus que le fluorène correspondant, qui possède une section efficace d'absorption maximum de 810 GM à 770 nm (Figure 55).¹⁰⁸

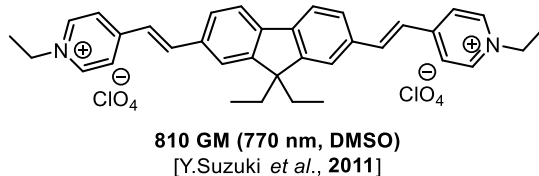


Figure 55 : Structure et section efficace d'absorption biphotonique de l'analogue fluorène de **SiFluo-L**

Comme pour les propriétés d'absorption à un photon, la brillance est le paramètre le plus adapté pour comparer deux fluorophores entre eux. Dans le glycérol, la brillance à deux photons de **SiFluo-L** (620 GM à 760 nm) est bien plus élevée que celle du carbazole correspondant (63 GM à 820 nm).¹⁰⁹

Il est cependant indispensable de vérifier que les spectres obtenus résultent bien d'un processus d'absorption biphotonique et non monophotonique. Lorsque le processus d'absorption est biphotonique, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la puissance du laser au carré. Pour vérifier que la fluorescence observée est bien la conséquence d'un phénomène d'absorption biphotonique, l'intensité de fluorescence obtenue pour chaque composé a donc été mesurée pour différentes puissances de laser à une longueur d'onde donnée. Les résultats obtenus pour **SiFluo-L** dans le glycérol à 730 nm sont présentés en Figure 56 ci-dessous.

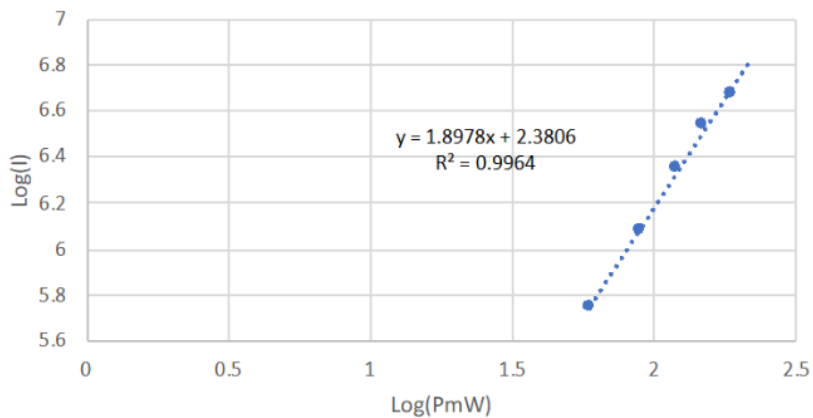


Figure 56 : Logarithme de l'intensité de fluorescence en fonction du logarithme de la puissance du laser pour **SiFluo-L** à 730 nm dans le glycérol

Le coefficient directeur de la droite est différent de 1, ce qui met en évidence que le phénomène observé est bien un phénomène d'absorption non linéaire. Par ailleurs, la valeur obtenue est proche de 2, ce qui permet de mettre en évidence la dépendance quadratique de l'intensité de fluorescence par rapport à la puissance du laser, ce qui est caractéristique de l'absorption biphotonique.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence les excellentes capacités d'absorption biphotonique du composé linéaire **SiFluo-L**, qui semble ainsi être tout à fait adapté à la microscopie biphotonique. Une nette différence entre les propriétés photophysiques (linéaires et non linéaires) des

¹⁰⁸ Y. Suzuki *et al.*, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115* (42), 20653-20661. DOI : [10.1021/jp203809b](https://doi.org/10.1021/jp203809b)

¹⁰⁹ B. Dumat *et al.*, *Biochimie* **2011**, *93* (8), 1209-1218. DOI : [10.1016/j.biochi.2011.05.035](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.05.035)

deux régioisomères **SiFluo-V** et **SiFluo-L** a cependant été observée. Le prochain paragraphe sera consacré à la rationalisation des propriétés photophysiques de ces deux composés *via* une étude de modélisation moléculaire.

III. Rationalisation des propriétés photophysiques

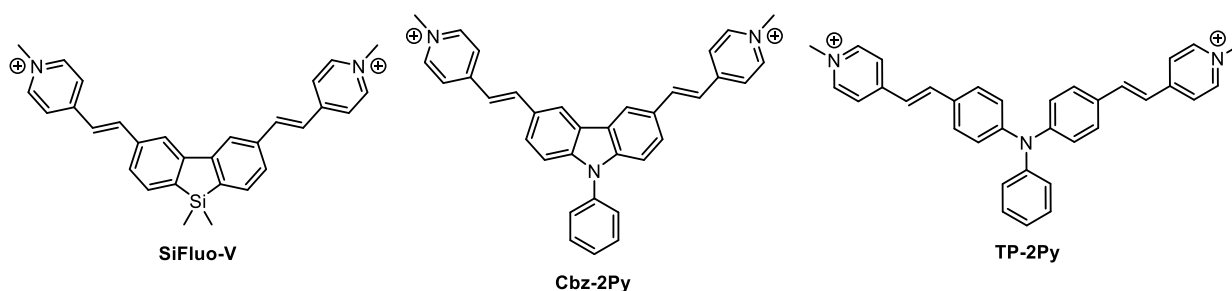
1) Choix de la méthode de calculs

Plusieurs bases et plusieurs méthodes ont été testées dans le but d'évaluer leur compatibilité avec les structures étudiées.

Dans tous les calculs effectués, la base et la méthode utilisées pour l'optimisation de géométrie sont 6-31G(d) et B3LYP. Pour les calculs de TD-DFT, il est nécessaire d'utiliser une autre méthode de calcul car B3LYP est une fonctionnelle qui stabilise trop les états de transfert de charges et ne convient par conséquent pas pour l'étude d'états excités. De même, il est nécessaire de modifier la base pour « autoriser » les électrons à s'éloigner de la molécule, ce qui est indispensable pour les états excités.

En 2009, D. Jacquemin *et al.* ont mis en évidence que la fonctionnelle PBE01 était celle présentant les résultats les plus probants pour le calcul de spectre d'absorption UV-visible, c'est cette méthode qui a dans un premier temps été utilisée pour les calculs.^{110,111} Afin de s'assurer de la pertinence d'utiliser la base 6-311+G(d,p) et cette méthode pour effectuer des prédictions, des calculs ont préalablement été réalisés sur des molécules synthétisées au laboratoire qui présentent une structure similaire aux composés étudiés et dont les propriétés photophysiques sont connues.

Pour les premiers essais, les calculs ont été réalisés sans prendre en compte les effets du solvant. Les résultats obtenus sont présentés dans Tableau 8 ci-dessous.



Composé	λ_{abs} (exp)	λ_{abs} (calc) - vide	Écart	Écart relatif
SiFluo-V	345 nm	390 nm	+45 nm	13 %
Cbz-2Py	440 nm	515 nm	+75 nm	17 %
TP-2Py	500 nm	600 nm	+100 nm	20 %

Tableau 8 : Résultats obtenus avec la base de calcul 6-311+G(d,p) et la méthode PBE01 dans le vide

Ces premiers résultats mettent en évidence des écarts conséquents (de 45 à 100 nm) entre les valeurs observées expérimentalement et celles obtenues par le calcul. Ces résultats modestes sont néanmoins à nuancer car ils ont été obtenus à partir de calculs dans le vide, alors que le solvant possède une forte influence sur les transitions des composés à transfert de charges.

¹¹⁰ D. Jacquemin *et al.*, *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42 (2), 326-334. DOI : [10.1021/ar800163d](https://doi.org/10.1021/ar800163d)

¹¹¹ A. D. Laurent *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, 16 (28), 14334-14356. DOI : [10.1039/C3CP55336A](https://doi.org/10.1039/C3CP55336A)

Dans le but d'obtenir des résultats permettant de mieux rendre compte des observations expérimentales, une deuxième série de calculs en prenant compte les effets du solvant a été réalisée (Tableau 9).

Composé	λ_{abs} (exp)	λ_{abs} (calc) - eau	Écart	Écart relatif
SiFluo-V	345 nm	365 nm	+20 nm	6 %
SiFluo-L	416 nm	483 nm	+67 nm	16 %
Cbz-2Py	440 nm	475 nm	+35 nm	8 %
TP-2Py	500 nm	550 nm	+50 nm	10 %

Tableau 9 : Résultats obtenus avec la base de calcul 6-311+G(d,p) et la méthode PBE01 dans l'eau

Une nette amélioration est constatée puisque les écarts relatifs entre la valeur expérimentale et la valeur calculée sont cette fois-ci compris entre 4 et 10 %, pour les dérivés carbazole, triphénylamine et **SiFluo-V**. Malheureusement, pour le calcul dans le cas du régioisomère **SiFluo-L**, la valeur obtenue est 67 nm plus élevée que la valeur expérimentale. Ces résultats ont conduit à tester une autre fonctionnelle : M06-2X.¹¹² Les résultats obtenus sont récapitulés dans le Tableau 10 ci-dessous.

Composé	λ_{abs} (exp)	λ_{abs} (calc) - eau	Écart	Écart relatif
SiFluo-V	345 nm	367 nm	+ 22 nm	5 %
SiFluo-L	416 nm	424 nm	+ 8 nm	2 %
Cbz-2Py	440 nm	414 nm	- 26 nm	6 %
TP-2Py	500 nm	464 nm	- 36 nm	7 %

Tableau 10 : Résultats obtenus avec la base de calcul 6-311+G(d,p) et la méthode M06-2X dans l'eau

Pour chacune des quatre molécules étudiées, l'écart relatif entre la valeur calculée et la valeur obtenue expérimentalement est inférieur à 10 %, c'est donc cette méthode qui sera utilisée pour les différents calculs réalisés par la suite.

2) Résultats

Des calculs de TD-DFT (M06-2X/6-311+G(d,p)) ont été réalisés pour tenter de rationaliser les propriétés photophysiques des deux sondes **SiFluo-V** et **SiFluo-L**.

	E(eV)	λ_{max} abs (nm)	Contributions majeures (> 5 %)
SiFluo-V	3.37	367	HOMO → LUMO (70 %) HOMO-1 → LUMO+1 (23 %)
SiFluo-L	2.92	424	HOMO → LUMO (90 %) HOMO-1 → LUMO+1 (8 %)

Tableau 11 : Contributions à la transition $S_0 \rightarrow S_1$

Pour les deux composés, les longueurs d'onde d'absorption maximum calculées sont proches des valeurs expérimentales : 424 nm contre 416 nm pour **SiFluo-L** et 367 nm contre 345 nm pour **SiFluo-V**

¹¹² Y. Zhao and D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **2007**, 120 (1-3), 215-241. DOI : [10.1007/s00214-007-0310-x](https://doi.org/10.1007/s00214-007-0310-x)

(Tableau 11). Cette concordance entre les données expérimentales et les calculs permet de valider le choix de la méthode computationnelle.

La nature de la transition peut être déterminée en regardant la forme des orbitales frontières. Dans le cas de la HOMO, la densité électronique est située majoritairement sur le cœur silafluorène, tandis qu'elle est située sur toute structure dans le cas de la LUMO (Figure 57).

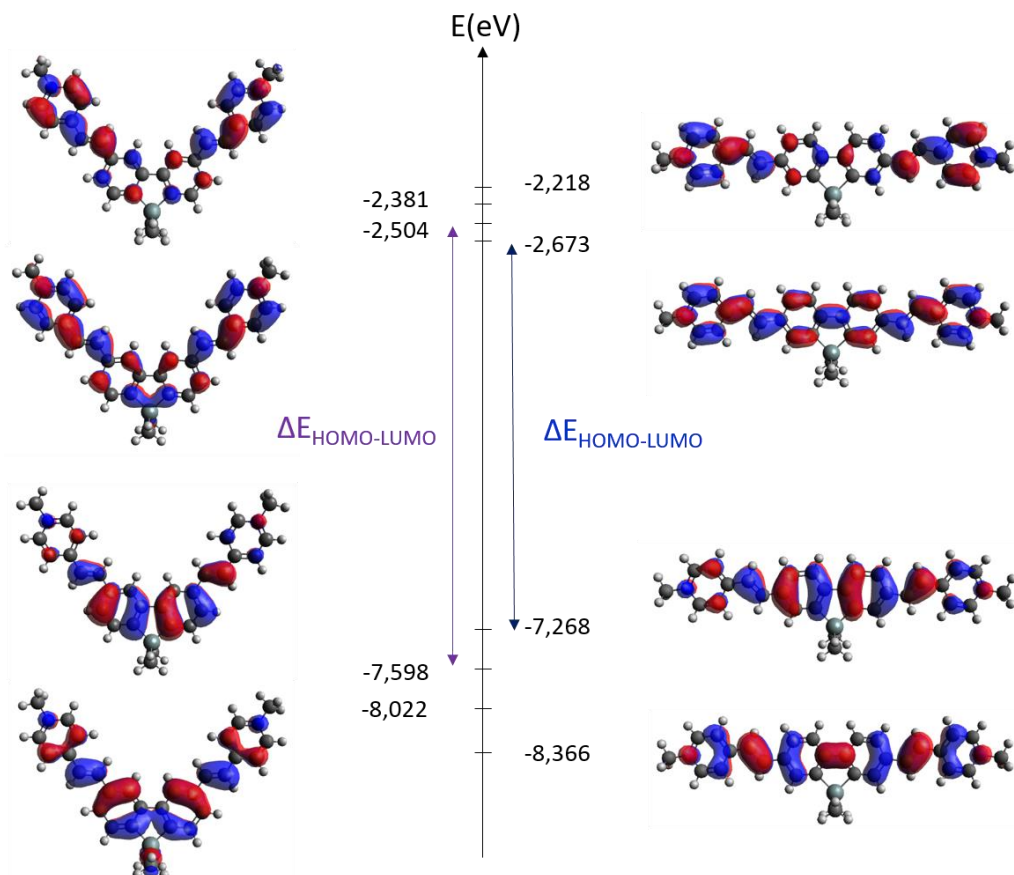


Figure 57 : Orbitales frontières de **SiFluo-V** (à gauche) et **SiFluo-L** (à droite)

Dans les deux cas, la contribution majoritaire à la transition $S_0 \rightarrow S_1$ est issue de la paire électron-trou HOMO-LUMO. Cependant, les orbitales HOMO-1 et LUMO+1 jouent également un rôle dans la transition $S_0 \rightarrow S_1$. Ainsi, pour mieux comprendre cette transition, un calcul de type NTO (*Natural transition orbitals*) dont les résultats sont présentés en Figure 58 a été réalisé.



Figure 58 : Augmentation (en bleu) et diminution (en jaune) de la densité électronique au cours de la transition $S_0 \rightarrow S_1$

Cette figure permet sans ambiguïté de confirmer que la transition $S_0 \rightarrow S_1$ est bien de type transfert de charge, ce qui est cohérent avec le design A- π -D- π -A des sondes.

Les propriétés d'absorption à deux photons d'un composé dépendent principalement de l'intensité du transfert de charge et de l'étendue de la conjugaison au sein de la molécule. La section efficace

d'absorption maximum δ_{MAX} peut donc être corrélée avec les moments de transition associés aux transitions $S_0 \rightarrow S_1$ et $S_1 \rightarrow S_2$, selon la formule présentée ci-dessous (Figure 59).⁸⁴

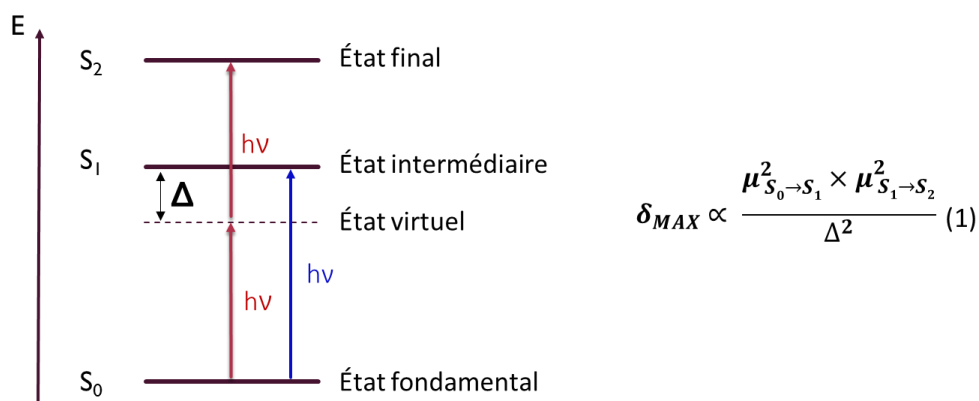


Figure 59 : Diagramme de Perrin-Jablonski dans le cas d'une molécule centrosymétrique et relation entre la section efficace d'absorption biphotonique maximum et les moments de transition

Les moments de transition associées aux transitions $S_0 \rightarrow S_1$ et $S_1 \rightarrow S_2$ ont été calculés pour **SiFluo-V** et **SiFluo-L** (Tableau 12).

Composé	$\mu_{S_0 \rightarrow S_1}$	$\mu_{S_1 \rightarrow S_2}$	Δ (eV)	$\frac{\mu_{S_0 \rightarrow S_1}^2 \times \mu_{S_1 \rightarrow S_2}^2}{\Delta^2}$
SiFluo-V	3.47	3.02	2.09	25
SiFluo-L	6.05	5.54	1.66	408

Tableau 12 : Moments de transition associés aux transitions $S_0 \rightarrow S_1$ et $S_1 \rightarrow S_2$ pour **SiFluo-V** et **SiFluo-L**

Pour chacun des deux transitions $S_0 \rightarrow S_1$ et $S_1 \rightarrow S_2$, la norme associée au moment de transition est environ deux fois supérieure pour **SiFluo-L** que pour **SiFluo-V**. Par conséquent, la δ_{MAX} calculée est environ 16 fois supérieure pour **SiFluo-L** que pour **SiFluo-V**. Ceci est en accord avec les sections efficaces d'absorption biphotonique mesurées. En conclusion, les calculs théoriques confirment que **SiFluo-L** présente de bien meilleures propriétés d'absorption biphotonique que **SiFluo-V**.

IV. Microscopie en cellules vivantes

1) Cytotoxicité

Avant de réaliser des expériences en cellules vivantes, il est indispensable de vérifier que les composés utilisés ne sont pas cytotoxiques.

La cytotoxicité des différents composés a été évaluée sur des cellules A549 (cancéreuses du poumon), qui seront par la suite utilisées pour réaliser l'imagerie.

Ces cellules ont été incubées avec des concentrations croissantes de composé testé. Après 24h, le pourcentage de survie a été évalué à l'aide d'un test MTT. Ce test repose sur la réduction du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényle tétrazolium en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale (Figure 60). Le formazan, qui est un dérivé non hydrosuble de couleur violette, précipite dans les mitochondries. La quantité de précipité formée est proportionnelle à l'activité mitochondriale qui est elle-même proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

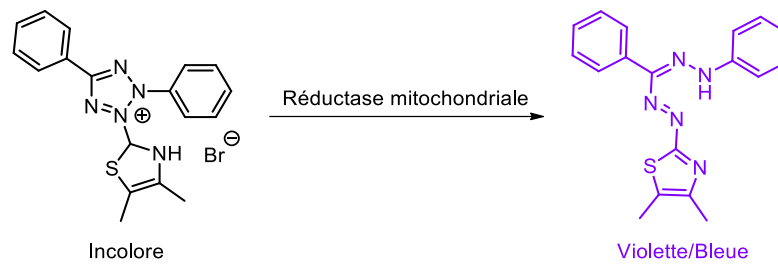


Figure 60 : Réduction du sel de tétrazolium MTT par une réductase mitochondriale

Les résultats de ce test pour les composés **SiFluo-L** et **SiFluo-V**, réalisé en triplicata, sont présentés en Figure 61 ci-dessous.

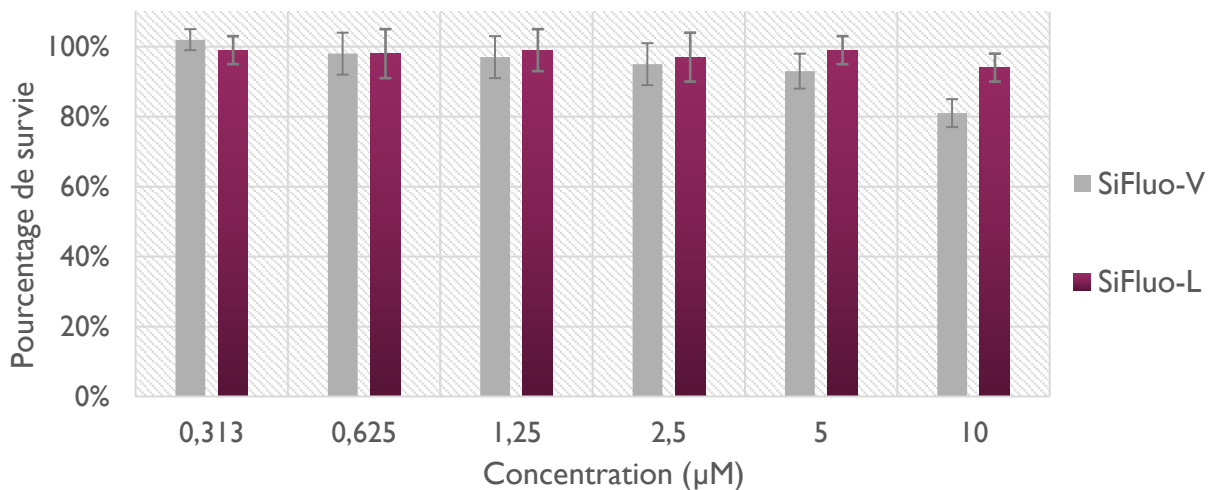


Figure 61 : Pourcentage de survie à 24h de cellules A549 en fonction de la concentration en composé **SiFluo-V** ou **SiFluo-L**

Pour des concentrations inférieures ou égales à 5 µM, aucun des deux composés n'est cytotoxique. Une légère toxicité apparaît à partir de 10 µM. Néanmoins, comme les expériences de microscopie confocale et biphotonique seront réalisées à des concentrations inférieures ou égales à 2 µM, aucun problème de cytotoxicité ne devrait être rencontré.

2) Imagerie à un et à deux photons

a) Comparaison entre **SiFluo-V** et **SiFluo-L**

Des cellules A549 (cellules cancéreuses- poumons) ont été incubées pendant 2h avec 2 µM de chaque sonde. Ces dernières ont ensuite été excitées à un photon (405 nm, le laser possédant la plus petite longueur d'onde sur le microscope utilisé) ou deux photons (705 nm ou 750 nm selon le composé). Les images concernant **SiFluo-L** se trouvent en Figure 62, tandis que celles concernant le composé **SiFluo-V** se trouvent en Figure 63.

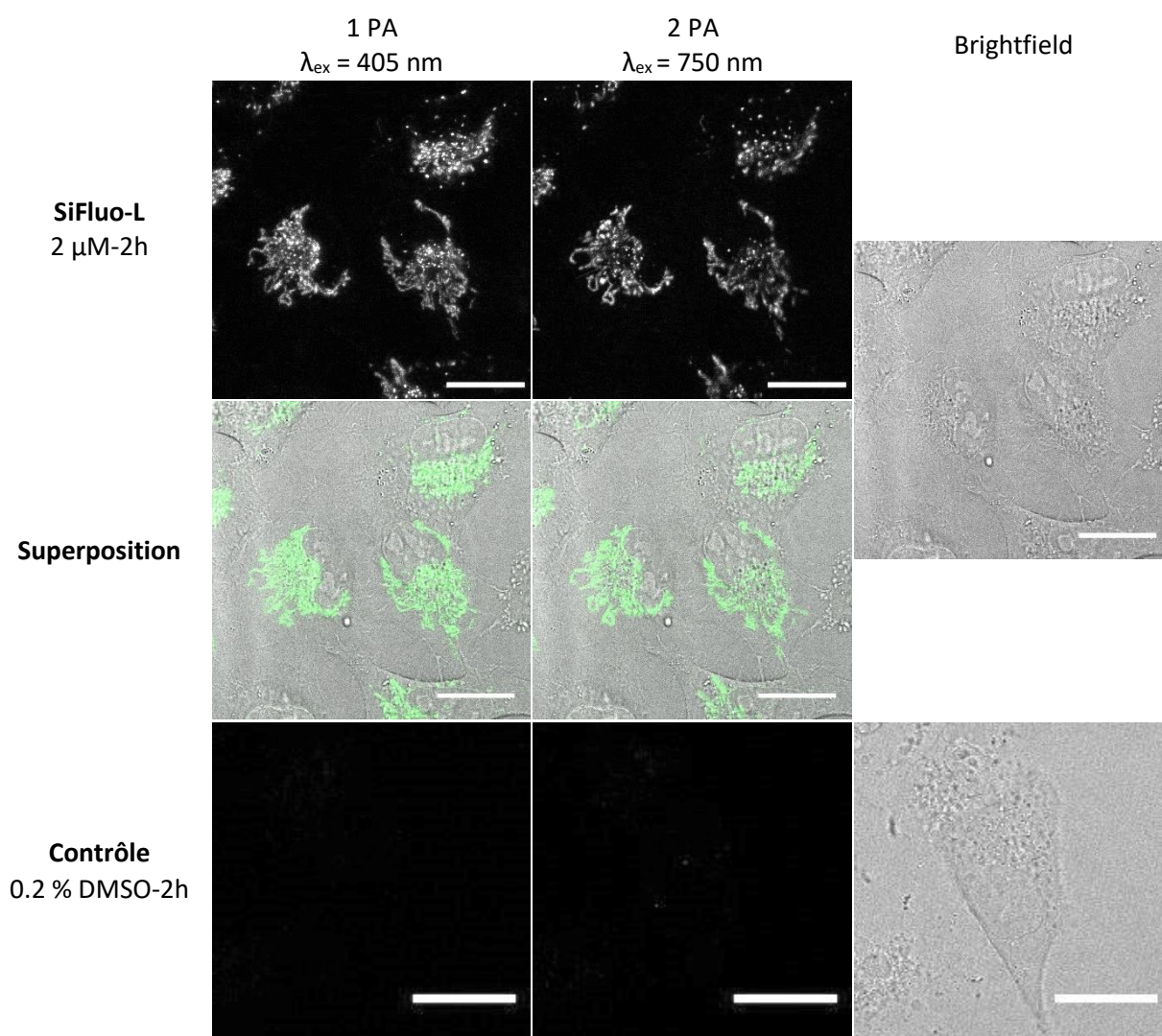


Figure 62 : Cellules A549 incubées vivantes avec **SiFluo-L** à 2 μM pendant 2h après excitation à un (405 nm) ou deux photons (750 nm). Détection : 500-650 nm. Barre d'échelle : 20 μm

Les images obtenues pour **SiFluo-L** présentent un contraste élevé, aussi bien lors d'une excitation à un photon que lors d'une excitation à deux photons. Ces images ont par ailleurs été acquises avec un laser réglé à faible puissance. En effet, la puissance mesurée en sortie d'objectif est de 3,35 mW ce qui est à minima 5 fois plus faible que la puissance mesurée pour les lasers utilisés pour ce type d'expériences.¹¹³ Cela permet de s'affranchir de tout problème de dommage pour l'échantillon. Aucune autofluorescence n'est par ailleurs détectée sur les images contrôles. **SiFluo-L** est donc particulièrement brillante.

Les images obtenues pour **SiFluo-L** permettent également de mettre en évidence que la bonne sélectivité d'une sonde pour sa cible biologique peut compenser son piètre ratio de turn-on ($\phi_{\text{gly}}/\phi_{\text{eau}}$) : Bien que cette dernière fluoresce de manière non négligeable dans l'eau (13 %), le rapport signal/bruit est ici tout à fait satisfaisant car le composé s'accumule efficacement dans un sous compartiment cellulaire. En effet, grâce à ces deux branches cationiques et lipophiles cette sonde marque les mitochondries. Ce marquage a par ailleurs pu être confirmé en effectuant une colocalisation avec un marqueur commercial (Figure 67).

A l'opposé, les images obtenues pour **SiFluo-V** sont peu contrastées, ce qui met en évidence la faible brillance de cette sonde. Pour l'excitation à un photon, cela est notamment dû au fait que la molécule absorbe très peu à 405 nm, qui est la longueur d'onde la plus petite disponible pour l'excitation sur le

¹¹³ L. Sacconi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103* (9), 3124-3129. DOI : [10.1073/pnas.0511338103](https://doi.org/10.1073/pnas.0511338103)

microscope utilisé. De même, 705 nm est la plus petite longueur d'onde disponible pour l'excitation à deux photons. Pour obtenir ces images, il a par ailleurs été nécessaire d'utiliser les lasers à une puissance plus élevée que dans le cas de **SiFluo-L**, comme en témoigne l'autofluorescence observée sur les images contrôles.

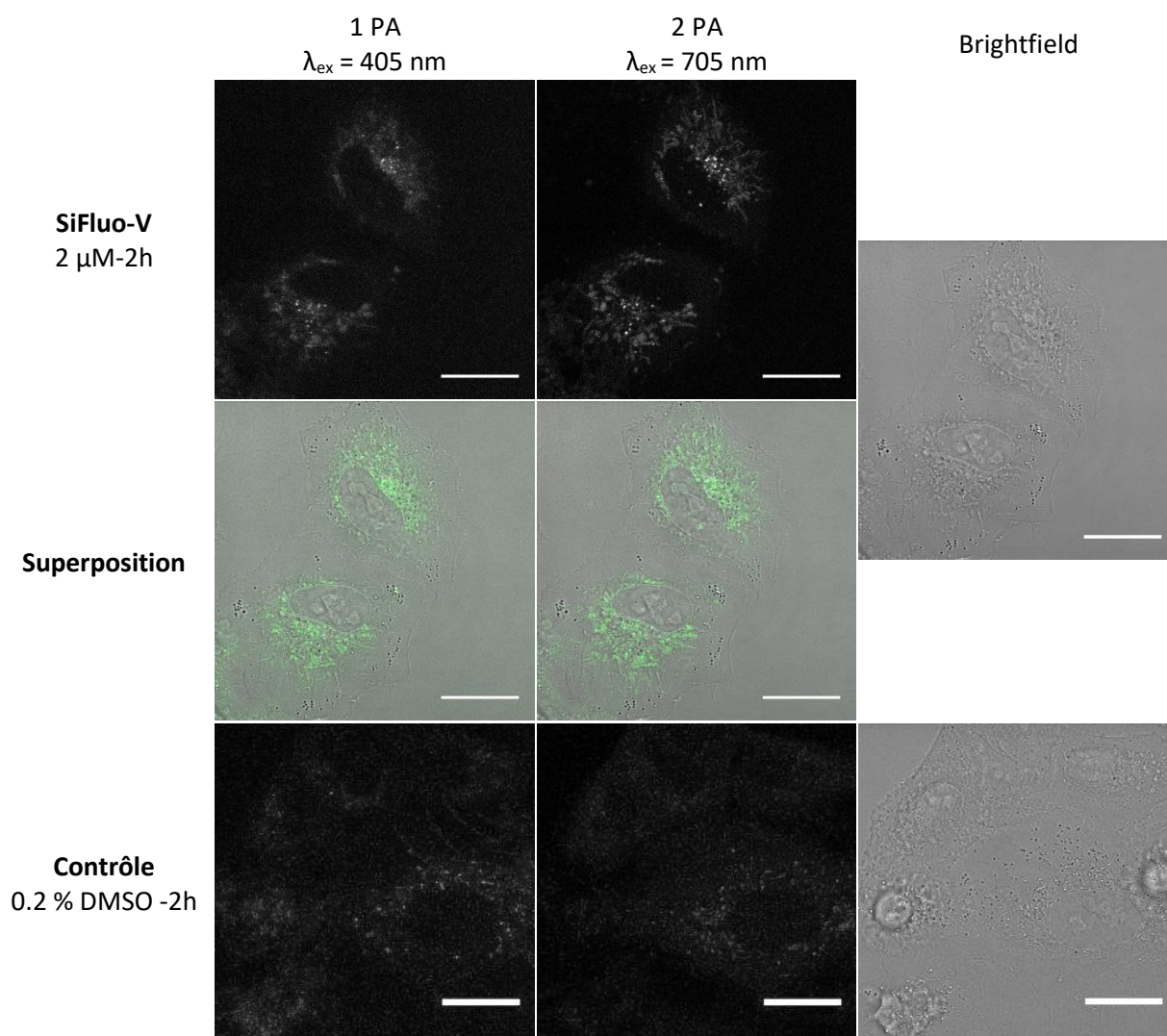


Figure 63 : Cellules A549 incubées vivantes avec **SiFluo-V** à 2 μM pendant 2h après excitation à un (405 nm) ou deux photons (705 nm). Détection : 500-650 nm. Barre d'échelle : 20 μm

b) Colocalisation

Après avoir constaté la capacité de **SiFluo-L** à être utilisé pour l'imagerie en cellules vivantes, il apparaît pertinent de s'intéresser à sa localisation intra-cellulaire. Pour cela, un comarquage avec différents marqueurs commerciaux dont la localisation est connue peut être réalisé. Une analyse des images permet ensuite d'évaluer s'il y a colocalisation ou non entre les deux marqueurs.

Parmi les différentes méthodes qui existent pour quantifier une colocalisation, trois sont principalement utilisées :¹¹⁴

- Approche de Pearson

Cette approche consiste à tracer un graphique de type nuage de points, pour lequel l'intensité d'un pixel de la première image va donner la coordonnée x, tandis que l'intensité du pixel correspondant de la

¹¹⁴ K. W. Dunn *et al.*, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2011**, *300* (4), C723-C742. DOI : [10.1152/ajpcell.00462.2010](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00462.2010)

seconde image va donner la coordonnée y. Le coefficient de Pearson (PC) quantifie ensuite la dispersion des points autour de la valeur moyenne, et est donné par l'équation suivante :

$$PC = \frac{\sum_i (R_i - \bar{R})x(G_i - \bar{G})}{\sqrt{\sum_i (R_i - \bar{R})^2 x \sum_i (G_i - \bar{G})^2}}$$

Où R_i et G_i correspondent aux intensités d'un pixel donné dans l'image rouge et l'image verte
Et \bar{R} et \bar{G} correspondent aux intensités moyennes dans l'image rouge et dans l'image verte

Équation 1 : Formule permettant de calculer les coefficients de Pearson

Le coefficient de Pearson est ainsi compris entre -1 et 1, 1 correspondant à une colocalisation parfaite. Différents exemples sont présentés ci-dessous (Figure 64).

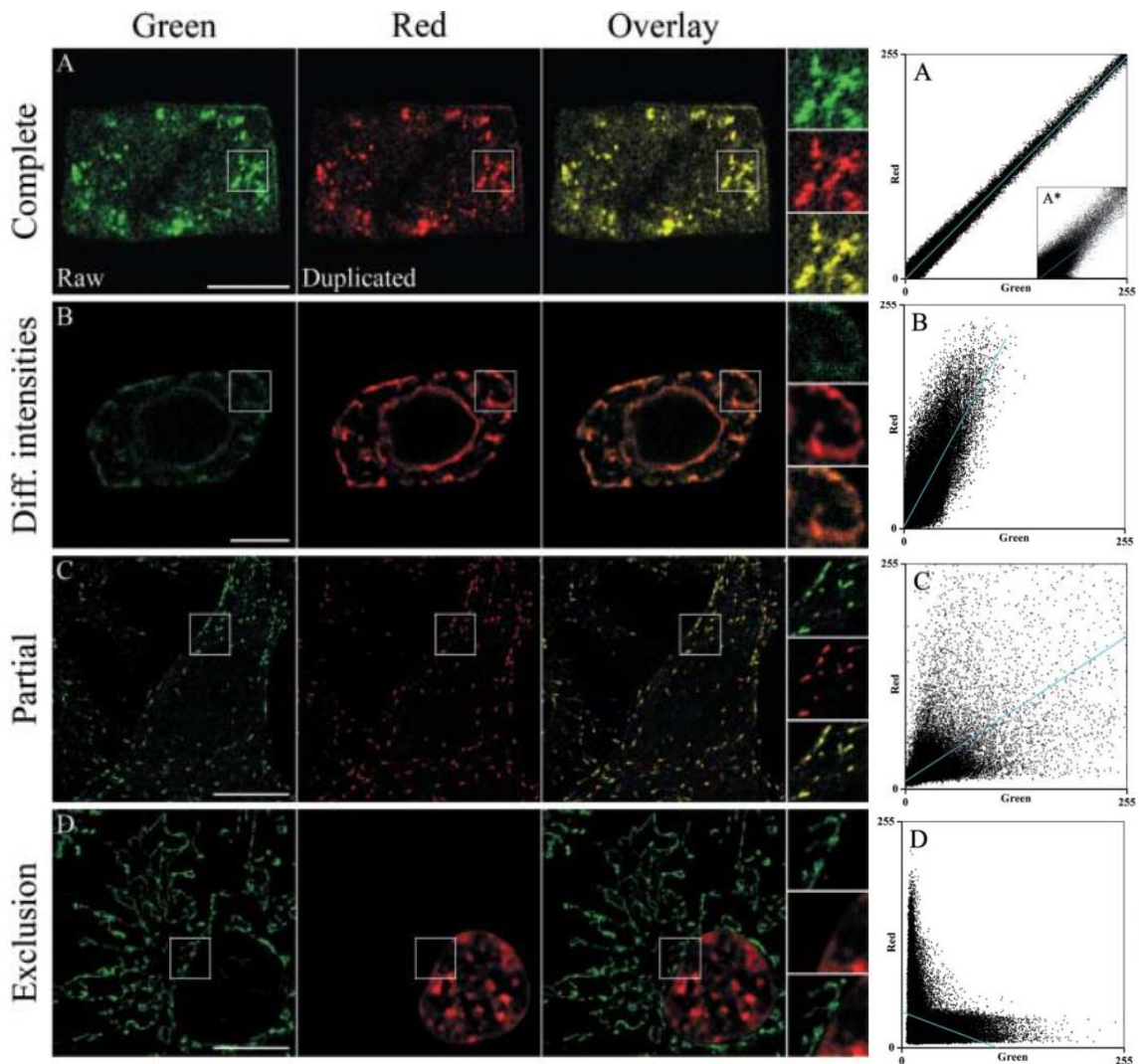


Figure 64 : Différents cas de colocalisation ou d'absence de colocalisation avec le nuage de points correspondant.

Illustration extraite de [S. Bolte et F.P. Cordelières, 2006]¹¹⁵

Dans le cas A, le coefficient de Pearson est supérieur à 0.95, ce qui va bien dans le sens d'une colocalisation. En revanche, dans le cas B, bien que la colocalisation soit « parfaite », le coefficient de Pearson ne sera que de 0.8 environ. Cette méthode comporte donc un biais notable lorsqu'elle est utilisée

¹¹⁵S. Bolte and F. P. Cordelières, *J. Microsc.* **2006**, 224 (3), 213-232. DOI : [10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x)

pour quantifier la colocalisation entre deux marqueurs dont les intensités de fluorescence sont différentes.

Par conséquent, cette approche est pertinente uniquement lorsqu'il n'y a pas de différences d'intensité significatives. Elle ne permet pas à elle seule d'attester ou non d'une colocalisation.

- Approche de Van Steensel

Il s'agit de « l'extension » de l'approche de Pearson et consiste à calculer le coefficient de Pearson pour plusieurs positions relatives des deux images, en décalant pixel par pixel sur un axe l'image verte sur l'image rouge. Un graphique avec en abscisse le déplacement en pixel δx en fonction du coefficient de Pearson est ainsi obtenu (Figure 65).

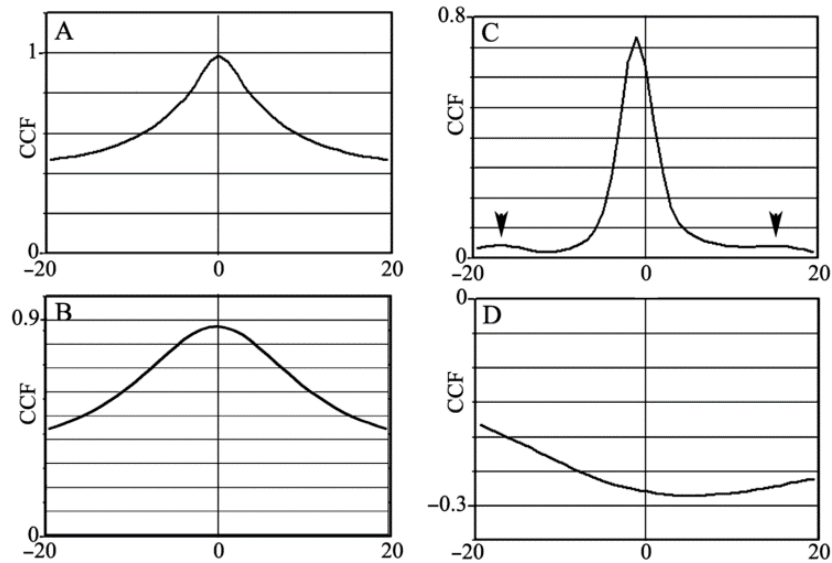


Figure 65 : Fonction de corrélation de type Van Steensel pour les 4 images de la figure précédente.
Illustration extraite de [S. Bolte et F.P. Cordelières, 2006]

Le cas A représente la fonction obtenue dans le cas d'une colocalisation complète (cloche centrée sur 0), le cas B d'une colocalisation complète avec des différences d'intensité, le cas C une colocalisation partielle et le cas D une totale exclusion.

Des différences dans les intensités ont pour conséquence une réduction de la hauteur de la cloche, comme on peut le voir en passant du cas A au cas B. Le maximum est néanmoins atteint pour $\delta x=0$.

- Approche de Manders¹¹⁶

Pour s'affranchir des différences d'intensité entre les deux sondes, il est possible de calculer les coefficients de Manders M_1 et M_2 .

$$M_1 = \frac{\sum_i R_{i,colocal}}{\sum_i R_i} \text{ où } R_{i,colocal} = R_i \text{ si } G_i > 0 \text{ et } R_{i,colocal} = 0 \text{ si } G_i = 0$$

$$M_2 = \frac{\sum_i G_{i,colocal}}{\sum_i G_i} \text{ où } G_{i,colocal} = G_i \text{ si } R_i > 0 \text{ et } G_{i,colocal} = 0 \text{ si } R_i = 0$$

Équation 2 : Formules permettant de calculer les coefficients de Manders

¹¹⁶ E. M. M. Manders et al., *J. Microsc.* **1993**, 169, 375-382. DOI : [10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x)

Ainsi, M_1 est défini comme le ratio entre la somme des intensités de l'image rouge pour lesquels l'intensité de l'image verte est au-dessus de 0 sur l'intensité totale de l'image rouge. Par exemple, si les coefficients de Manders sont de 1.0 et 0.2 cela signifie que 100 % des pixels rouge coïncident avec les pixels verts, mais que seulement 20 % des pixels verts coïncident avec les pixels rouges. Cette méthode néanmoins est très sensible au « bruit de fond ». L'utilisation d'un seuil pour chaque image est nécessaire, et cela contribue parfois à une perte d'informations dans le cas de sondes peu brillantes.

En conclusion, l'approche de Van Steensel semble la plus pertinente pour évaluer une colocalisation entre deux marqueurs dont l'intensité est différente.

SiFluo-L est un composé dicationique et lipophile, par conséquent, il devrait s'accumuler dans les mitochondries, car cet organite possède un potentiel de membrane négatif.¹⁰⁰ Un premier comarquage avec du DRAQ5, un composé commercial marquant le noyau, a été effectué. Ce dernier a été choisi car il absorbe à 633 nm, longueur d'onde à laquelle **SiFluo-L** n'absorbe pas. Il est donc possible de récolter indépendamment le signal venant des deux composés. La structure de ce composé est présentée en Figure 66 ci-dessous.

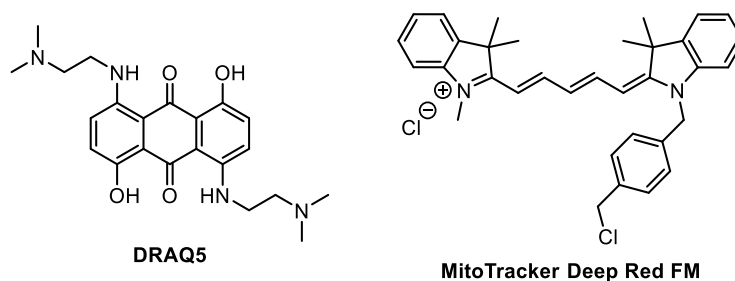
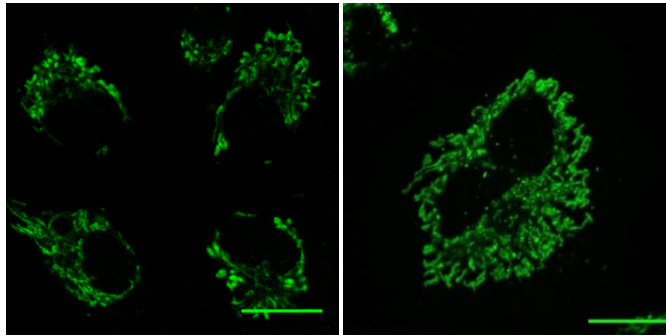


Figure 66 : Structures du DRAQ5 (marqueur de noyau) et du MitoTracker® Deep Red FM (marqueur des mitochondries)

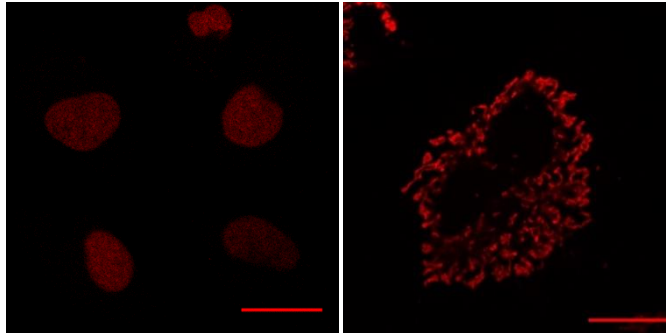
Des cellules A549 ont donc été incubées en présence de **SiFluo-L** pendant 2h, puis en présence de DRAQ5 pendant 25 min. Les images obtenues sont présentées dans la partie gauche de la Figure 67. Ce premier comarquage permet de mettre en évidence que **SiFluo-L** se trouve dans le cytoplasme. Un deuxième comarquage avec du MitoTracker® Deep Red, un composé commercial marquant les mitochondries, a été effectué. Ce dernier a également été choisi car il absorbe à 633 nm, il est ainsi possible de l'exciter sans exciter **SiFluo-L**. Les images obtenues sont présentées dans la partie droite de la Figure 67. La présence de jaune sur la superposition semble indiquer une colocalisation entre ces deux composés.

SiFluo-L
2 μ M-2h
 λ_{ex} = 405 nm



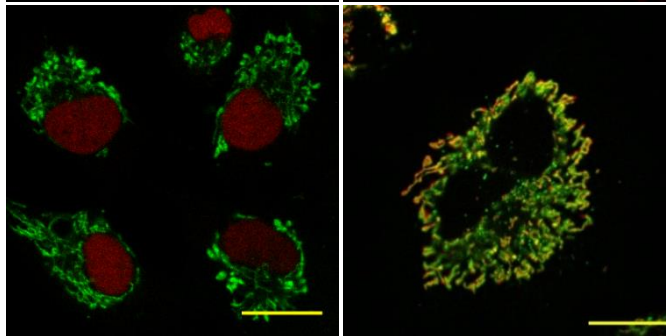
SiFluo-L
2 μ M-2h
 λ_{ex} = 750 nm

DRAQ5
5 μ M-25 min
 λ_{ex} = 633 nm



MitoTracker® Deep Red
100 nM-15 min
 λ_{ex} = 633 nm

Superposition



Superposition

Figure 67 : Colocalisation entre **SiFluo-L** (2 μ M, 2h, détection : 500-700 nm) et **DRAQ5** (5 μ M, 25 min, détection : 500-795 nm) à gauche et **SiFluo-L** (2 μ M, 2h, détection : 500-700 nm) et **MitoTracker Deep Red** (100 nM, 15 min, détection : 500-700 nm) à droite. Barre d'échelle : 20 μ m

Cette colocalisation a été mise en évidence de manière quantitative en réalisant l'analyse des images *via* le plugin JACoP sur le logiciel Image J. La fonction de corrélation de Van Steensel's est présentée en Figure 68 ci-dessous.

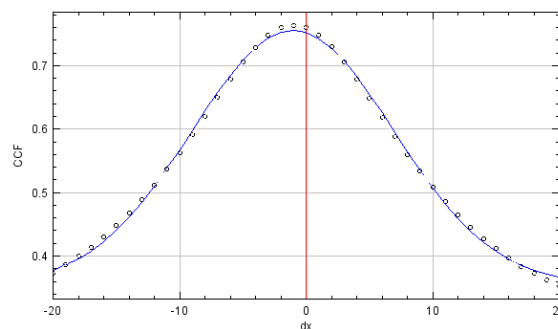


Figure 68 : Colocalisation entre **SiFluo-L** et **MitoTracker® Deep Red** – Fonction de corrélation de Van Steensel's (Plugin JACoP - ImageJ)

Cette analyse permet bien de confirmer que **SiFluo-L** s'accumule dans les mitochondries car la cloche est centrée sur 0. Ce comarquage met également en évidence que le coefficient de Pearson est souvent peu pertinent car il est ici de 0.78 (ordonnée à l'origine de la représentation de Van Steensel) alors que la fonction de corrélation de Van Steensel permet de mettre en évidence une colocalisation entre les deux composés.

3) Photostabilité

Dans le but de confirmer leur capacité à être utilisées en imagerie cellulaire, la photostabilité des sondes **SiFluo-V** et **SiFluo-L** a été évaluée (Figure 69).

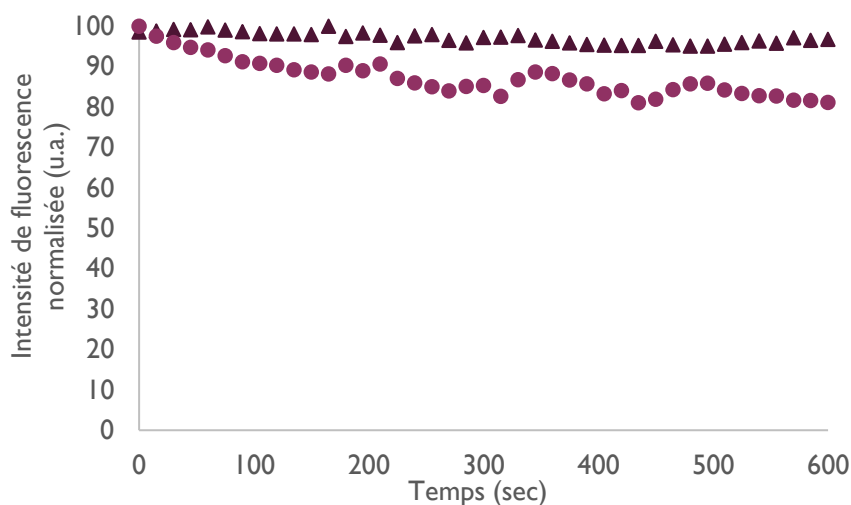


Figure 69 : Stabilité de **SiFluo-L** (rond) et **SiFluo-V** (triangle) sous excitation biphotonique (750 nm et 705 nm respectivement) en fonction du temps d'irradiation

Après 2h d'incubation à 2 μM , ces dernières ont été irradiées pendant 10 min à 705 nm pour **SiFluo-V** et 750 nm pour **SiFluo-L**. Pendant cette irradiation, une image a été acquise toutes les 15 secondes. Après 10 min d'irradiation, l'intensité de fluorescence dans le cas de **SiFluo-V** reste similaire à son niveau initial. Dans le cas de **SiFluo-L**, le signal a diminué de moins de 20 %, ce qui permet d'obtenir des images toujours satisfaisantes avec un bon contraste, comme le montre la Figure 70.

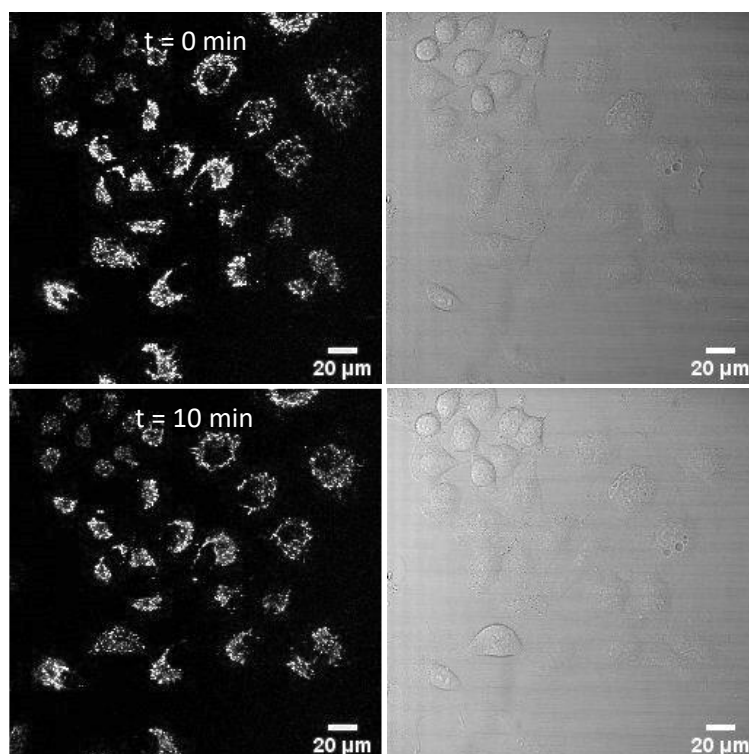


Figure 70 : Cellules A549 incubées avec **SiFluo-L** à 2 μM pendant 2h, sous excitation biphotonique (750 nm) au début de l'expérience et après 10 min d'acquisition. Détection : 500-650 nm. Barre d'échelle : 20 μm

Cette sonde est donc parfaitement adaptée pour faire de l'imagerie sur des temps longs.

4) Imagerie complémentaire pour SiFluo-L

Bien que **SiFluo-L** puisse être excitée à 750 nm *via* un processus biphotonique, cette sonde possède un maximum d'émission vers 530 nm. Cela constitue un désavantage majeur car cette longueur d'onde se situe en dehors de la fenêtre thérapeutique. Néanmoins, il a été montré qu'il est possible de recueillir assez de signal pour obtenir des images exploitables en restreignant la fenêtre de détection de 600 à 700 nm (Figure 71). Cela nécessite d'augmenter la puissance du laser à 20 mW, soit une puissance environ 6 fois supérieure à celle utilisée précédemment (Figure 62).

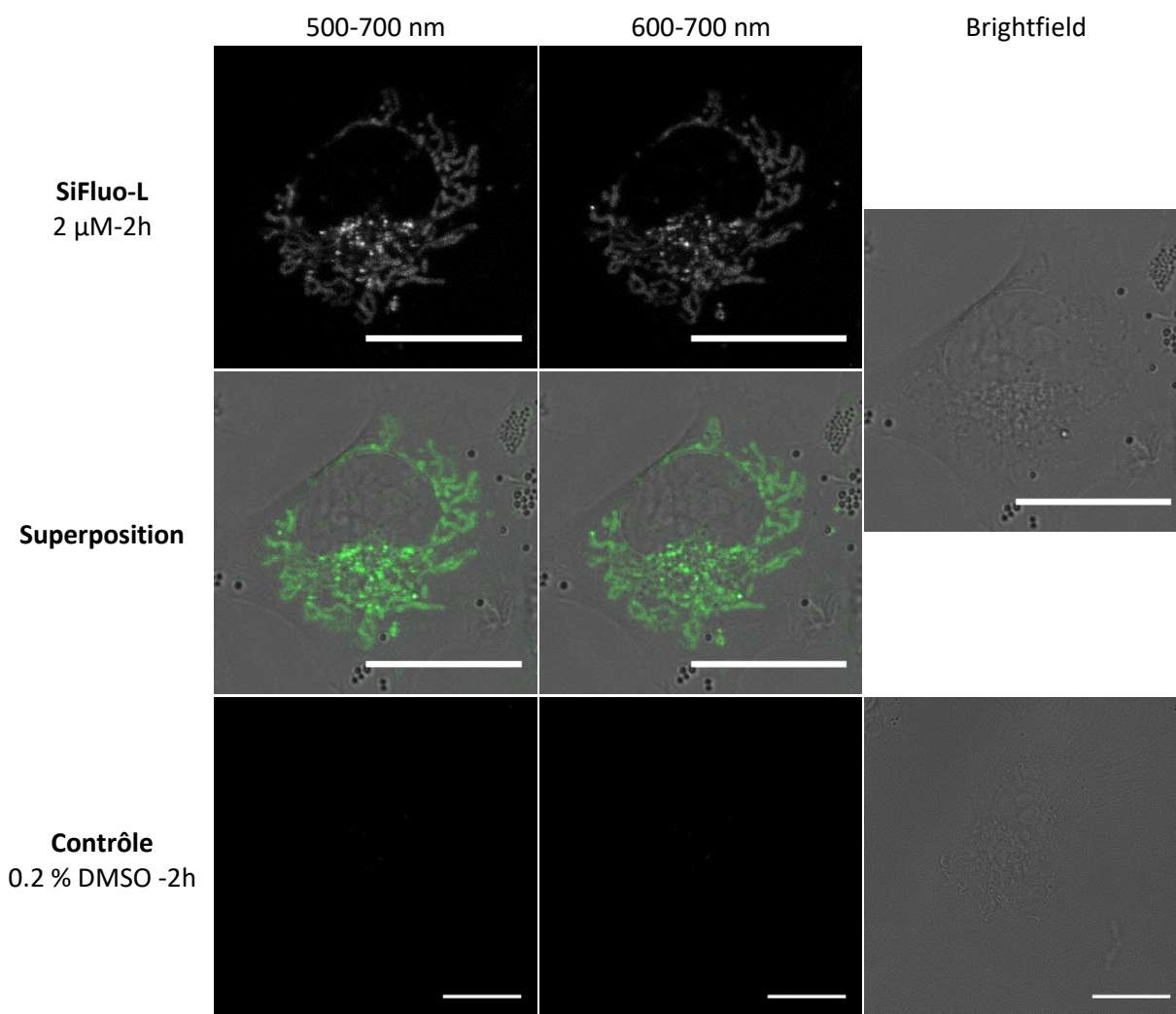


Figure 71 : Cellules A549 incubées en cellules vivantes avec **SiFluo-L** à 2 μM pendant 2h après excitation à 405 nm.
Barre d'échelle : 20 μm

Ainsi, bien que ce dernier ne soit très peu fluorescent dans cette zone (Figure 72), sa forte brillance permet de restreindre la fenêtre d'acquisition à la plage 600-700 nm.

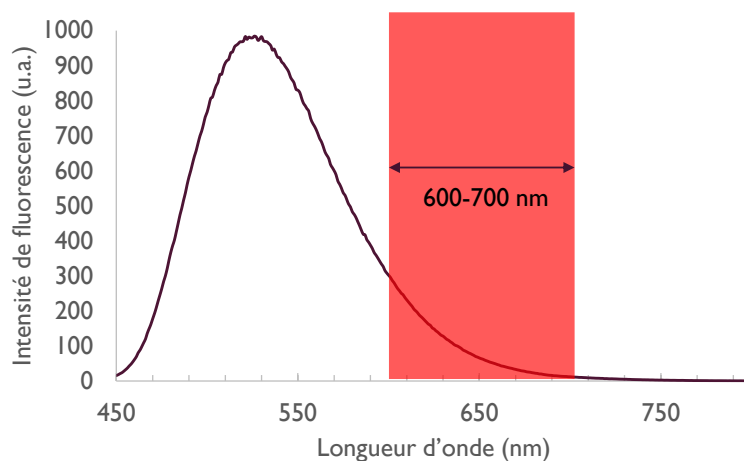


Figure 72 : Spectre d'émission de fluorescence de **SiFluo-L** dans le glycérol superposé avec la fenêtre de détection 600-700 nm

Par ailleurs, des expériences complémentaires ont permis de mettre en évidence qu'il était possible d'utiliser cette sonde à une concentration de 100 nM (Figure 73). Des images ont pu être obtenues suite à une excitation monophotonique ou biphotonique. Cependant, cette baisse de concentration se traduit inévitablement par une baisse notable de l'intensité dans les deux cas.

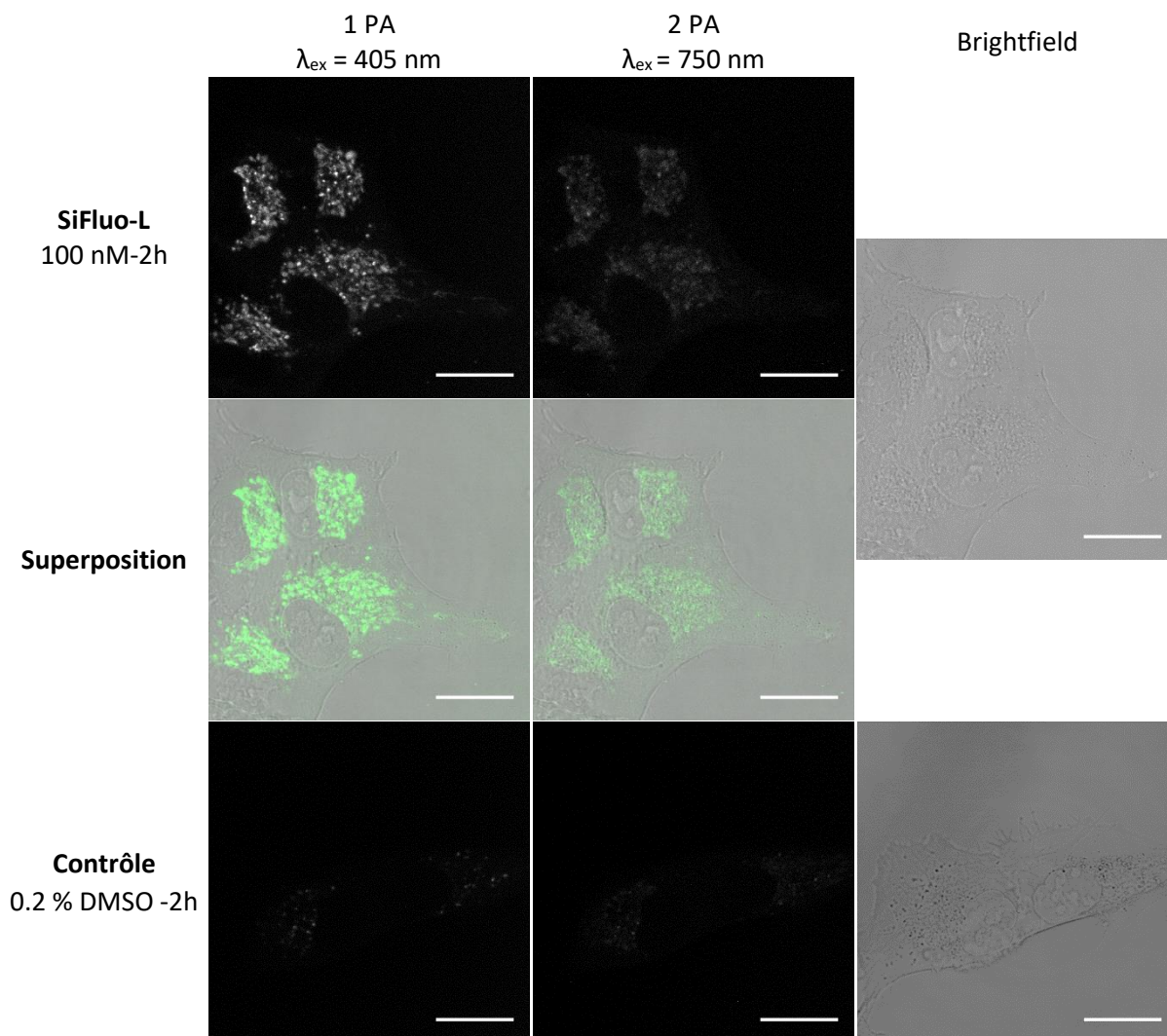


Figure 73 : Cellules A549 incubées en cellules vivantes avec **SiFluo-L** à 100 nM pendant 2h après excitation à un (405 nm) ou deux photons (750 nm). Détection : 500-650 nm. Barre d'échelle : 20 μm

Ces deux expériences complémentaires permettent de mettre en évidence le caractère très brillant de **SiFluo-L**.

V. Conclusion

Deux premières sondes fluorescentes, **SiFluo-V** et **SiFluo-L**, dont les structures sont rappelées en Figure 74 ci-dessous, ont été synthétisées. L'étude de leurs propriétés photophysiques a permis de mettre en évidence le potentiel de ces sondes à être utilisées pour de l'imagerie en cellules vivantes, notamment grâce à leur brillance élevée (monophotonique et biphotonique). Cependant, de très grandes différences entre les deux régioisomères ont pu être observées, notamment concernant leurs propriétés d'absorption biphotonique. Ces différences de propriétés photophysiques ont pu être rationalisées *via* des calculs de TD-DFT. Ces sondes ont par la suite été utilisées pour différentes expériences d'imagerie en microscopie confocale et biphotonique en cellules vivantes.

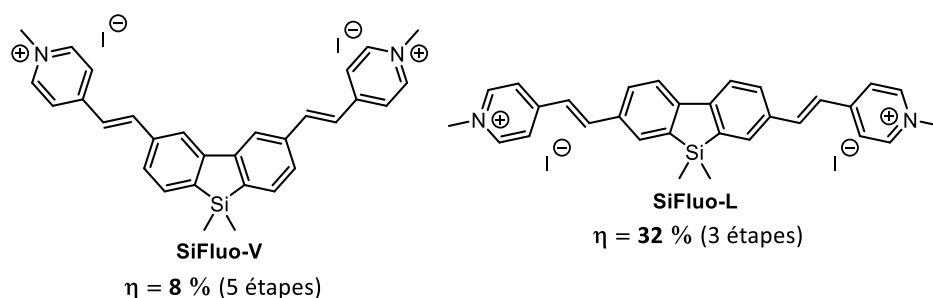


Figure 74 : Structures des composés **SiFluo-V** et **SiFluo-L**

En particulier, **SiFluo-L** s'est révélée être une sonde pénétrant en cellules vivantes, très brillante, photostable, non cytotoxique et possédant d'excellentes propriétés d'absorption biphotonique, comme l'illustre la Figure 75 ci-dessous. Ces résultats ont conduit à la rédaction d'une publication dans le journal *Dyes & Pigments*.¹¹⁷

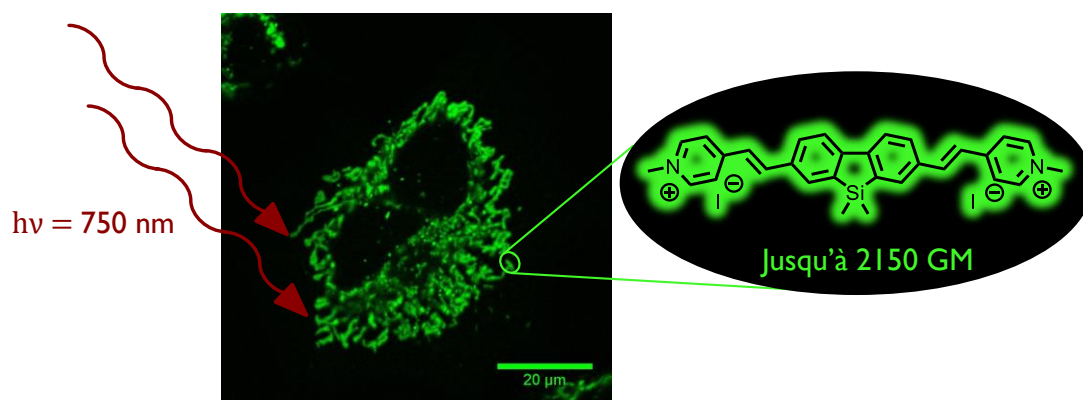


Figure 75 : Image en cellules vivantes de **SiFluo-L** après excitation biphotonique (750 nm)

Malheureusement, cette sonde ne remplit pas complètement les critères d'absorption et d'émission dans le rouge/proche IR énoncées précédemment. Il pourrait être judicieux de développer un fluorophore possédant une émission davantage décalée vers le rouge. L'objectif suivant est donc de trouver une nouvelle structure pouvant remplir ces critères, tout en conservant de bonnes propriétés d'absorption biphotonique.

¹¹⁷ M. Auvray *et al.*, *Dyes Pigment.* **2021**, 187, 10908. DOI : [10.1016/j.dyepig.2020.109083](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.109083)

CHAPITRE 2-1 : Deuxième génération de composés

Pour tenter d'améliorer les propriétés photophysiques par rapport aux structures synthétisées précédemment au laboratoire (triphénylamines et silafluorène), il a été envisagé d'accroître le caractère donneur du cœur en introduisant un hétéroatome supplémentaire. Cela devrait permettre d'enrichir le cœur donneur du système A- π -D- π -A et ainsi entraîner une augmentation de la section efficace d'absorption biphotonique. L'ajout de cet hétéroatome permet également de rigidifier la structure par rapport à la triphénylamine (Figure 76).

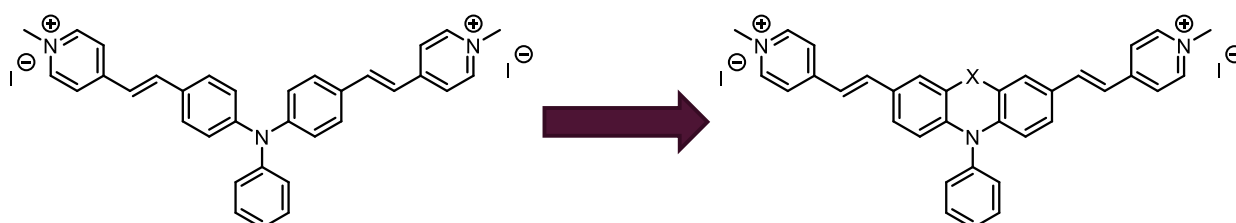


Figure 76 : Modification structurelle envisagée à partir de la triphénylamine

Ce type de structure permet également d'avoir un site facilement fonctionnalisable. En effet, d'autres groupes peuvent aisément être greffés sur l'aniline à la place du phényle. Cela permettra ensuite de diversifier l'utilisation de ce type de sonde.

Après l'optimisation des conditions pour les calculs de modélisation moléculaire, il semblerait que le couple 6-311+G(d,p)/M06-2X permette d'obtenir des résultats fiables. Les propriétés d'absorption de différentes molécules présentées ci-dessous ont donc été simulées dans l'eau (Figure 77).

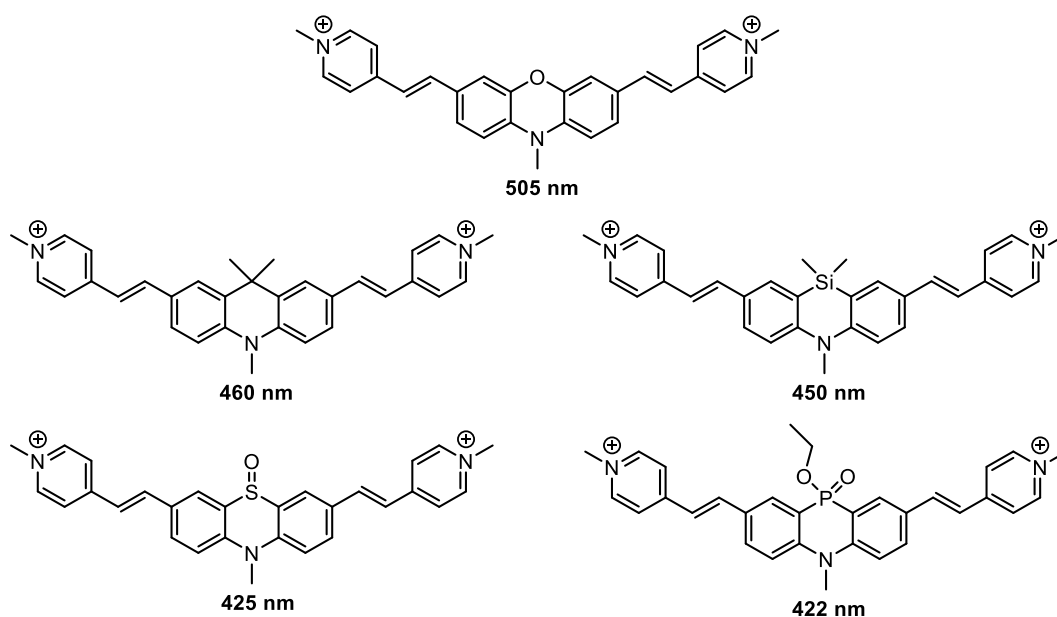


Figure 77 : Structure des molécules dont les longueurs d'onde maximale d'absorption ont été prédites à l'aide de calculs TD-DFT

L'utilisation de différents cœurs a ainsi été envisagée : l'ajout d'un atome d'oxygène, de soufre, de carbone, de silicium ou encore de phosphore permettrait d'enrichir le cœur donneur. Dans le cas de la phénothiazine, le dérivé non oxydé est connu pour ne pas être fluorescent, il paraît donc plus judicieux de s'intéresser au sulfoxyde.¹¹⁸

¹¹⁸ H. Hung Lin and C. Chung Chang, *Dyes Pigm.* **2009**, 83 (2), 230-236. DOI : [10.1016/j.dyepig.2009.05.004](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2009.05.004)

A priori, d'après leurs longueurs d'onde maximum d'absorption, les trois structures les plus intéressantes semblent être l'acridane ($\lambda_{\text{abs,th}} = 460 \text{ nm}$), la phénazasiline ($\lambda_{\text{abs,th}} = 450 \text{ nm}$), la phénoxazine ($\lambda_{\text{abs,th}} = 505 \text{ nm}$). Les propriétés d'absorption biphotonique ont également été simulées afin de décider à quelles structures il est le plus judicieux de s'intéresser. Les résultats sont récapitulés dans le Tableau 13 ci-dessous.

Composé	$\mu_{S_0 \rightarrow S_1}$	$\mu_{S_1 \rightarrow S_2}$	$\Delta \text{ (eV)}$	$\frac{\mu_{S_0 \rightarrow S_1}^2 \times \mu_{S_1 \rightarrow S_2}^2}{\Delta^2}$
Phénophosphazine	5,41	5,71	0,45	4 712
Sulfoxyde	5,28	5,96	0,47	4 483
Phénazasiline	5,81	6,75	0,47	6 962
Acridane	5,58	6,72	0,48	6 103
Phénoxazine	4,99	7,91	0,55	5 150

Tableau 13 : Simulation des propriétés d'absorption biphotonique des différentes sondes via des calculs de TD-DFT

D'après les calculs réalisés, il n'y a pas de différence notable entre les dérivés acridane et phénazasiline. Cependant, les propriétés biphotoniques de la phénoxazine pourraient être très légèrement inférieures à celles de l'acridane et de la phénazasiline. Les trois seront donc synthétisés pour voir quel est le composé le plus prometteur. Par ailleurs, les dérivés sulfoxyde et phénophosphazine qui semblaient dans un premier temps peu intéressants pourraient finalement être d'excellents absorbeurs biphotoniques d'après les calculs réalisés. Ces deux composés seront donc également synthétisés.

I. Synthèse

1) Synthèse de la phénazasiline Phenaz-Py

La voie de synthèse envisagée pour **Phenaz-Py** est décrite en Figure 78 ci-dessous. Comme aucun dérivé de phénazasiline n'est disponible commercialement, il sera dans un premier temps nécessaire de synthétiser ce cœur.

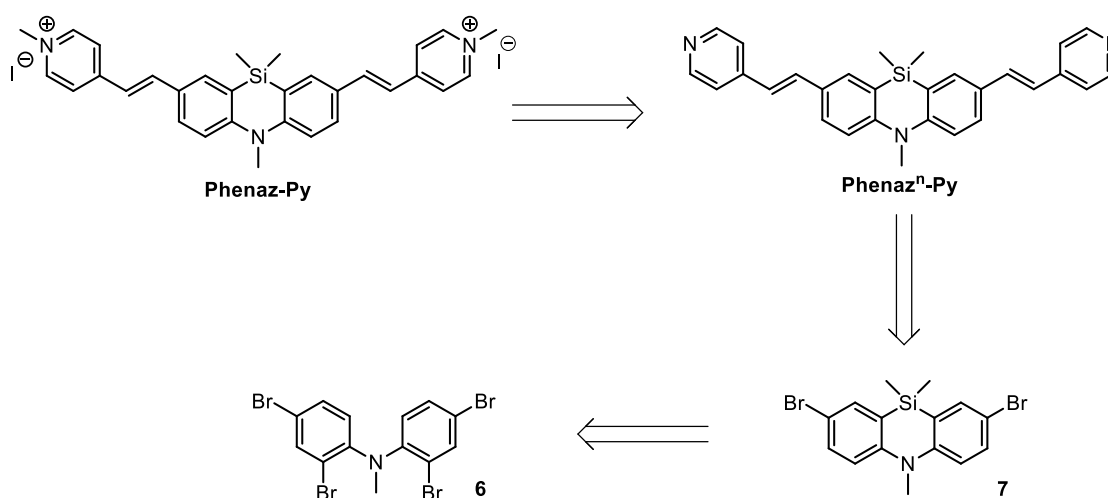


Figure 78 : Voie de synthèse envisagée pour l'obtention du composé **Phenaz-Py**

Comme pour les molécules développées précédemment, l'étape clé de cette synthèse est la réaction de cyclisation qui va permettre l'obtention du cœur bromé **7**. La cyclisation avec le dérivé tétrabromé est

décrite dans la littérature avec des rendements allant de 40 à 61 % selon la nature des groupements R ou R' qui sont des alkyles (Figure 45).^{119,120,121} Aucune explication n'est cependant proposée pour la régiosélectivité de l'échange halogène-métal ; un effet orienteur de l'aniline est probablement en jeu ici.

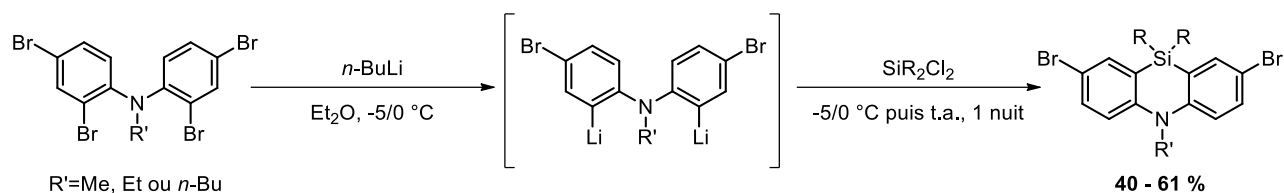


Figure 79 : Conditions de cyclisation présentées dans la littérature

Après avoir réalisé la bromation de la *N*-méthyldiphénylamine, les conditions de cyclisation décrites dans la littérature ont été appliquées au substrat d'intérêt. Il s'agit d'une réaction particulièrement sensible : de nombreux essais ont été réalisés avant de parvenir à obtenir le composé. Le *n*-BuLi (fraichement dosé) est additionné goutte à goutte sur une suspension du dérivé bromé dans de l'éther diéthylique anhydre. Après une heure d'agitation à -5 °C, le milieu devient limpide, ce qui indique que le lithien est formé. Le dichlorodiméthylsilane peut alors être ajouté au milieu réactionnel pour conduire à l'obtention du composé souhaité **7** avec un très bon rendement de 67 %. Cela permet d'accéder au cœur dibromé **7** en deux étapes avec un rendement global de 62 % (Figure 80).

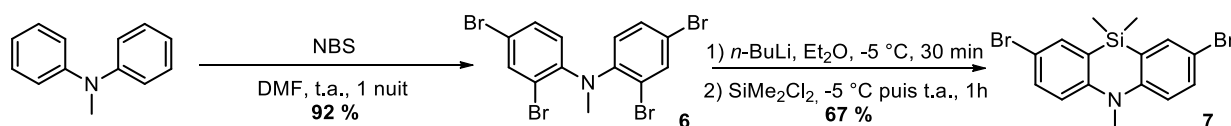


Figure 80 : Voie de synthèse du cœur bromé **7**

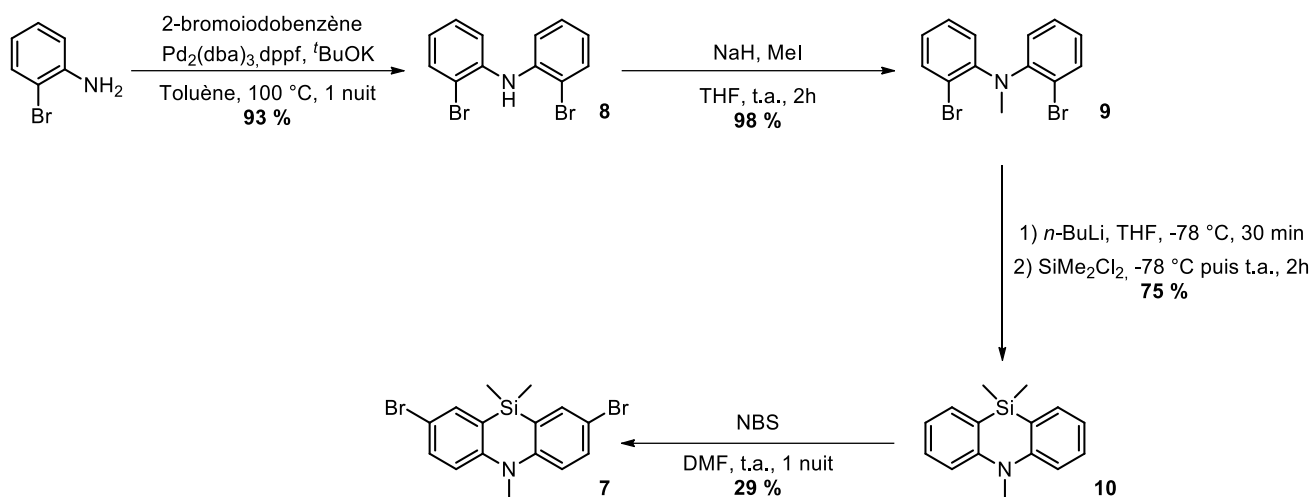
Face aux difficultés rencontrées pour obtenir ce composé, deux autres voies alternatives permettant également d'accéder au cœur phénazasiline dibromé **7** ont parallèlement été explorées. Elles sont présentées en Figure 81 et Figure 82.

La première voie de synthèse consiste à synthétiser la 2-bromo-*N*-(2-bromophényl)-*N*-méthylaniline **9** sur laquelle une réaction de cyclisation pourra ensuite être effectuée. Cette aniline est obtenue en 2 étapes à partir de la 2-bromoaniline. Un couplage pallado-catalysé de type Buchwald-Hartwig entre la 2-bromoaniline et le 2-bromoiodobenzène a permis d'obtenir la 2-bromo-*N*-(2-bromophényl)aniline **8**. Cette dernière a ensuite été méthylée en présence d'iodométhane pour conduire au précurseur de cyclisation **9** avec un excellent rendement de 91 % sur deux étapes. La réaction de cyclisation a été réalisée dans les mêmes conditions que celles utilisées précédemment pour les silafluorènes : dans le THF à -78 °C. Ces conditions ont permis d'accéder au cœur phénazasiline **10** avec un très bon rendement de 75 %.

¹¹⁹ R. E. J. D. Wasserman, S. A. Robinson, J. D. Garber, *J. Org. Chem.* **1965**, *30* (9), 3248-3250. DOI : [10.1021/jo01020a534](https://doi.org/10.1021/jo01020a534)

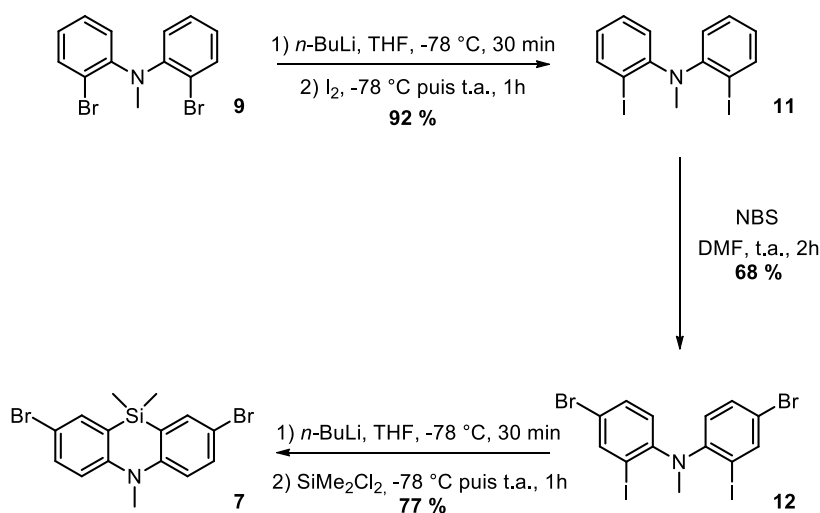
¹²⁰ H. Nakao *et al.*, *Polym. J.* **2001**, *33*, 498-501. DOI : [10.1295/polymj.33.498](https://doi.org/10.1295/polymj.33.498)

¹²¹ H. Hayashi *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.* **2013**, *52* (5S1), 05DA13. DOI : [10.7567/jjap.52.05da13](https://doi.org/10.7567/jjap.52.05da13)

Figure 81 : Première voie de synthèse alternative du composé **7**

Une bromation en présence de *N*-bromosuccinimide dans le DMF a ensuite permis d'accéder au cœur souhaité **7** avec un rendement très modeste de 29 %. En effet, un produit secondaire non identifié a été obtenu. Il ne correspond ni au composé mono-bromé ni à un régioisomère, et co-élue avec le composé d'intérêt en chromatographie sur couche mince. Comme ces composés sont très peu polaires et migrent en 100 % cyclohexane, il semble difficile de trouver un meilleur système d'éluant permettant de les séparer. Bien que ces deux composés co-éluent, la faible proportion de l'impureté dans le brut réactionnel (environ 5 %) permet tout de même d'isoler le produit attendu. Le faible rendement est donc avant tout dû aux difficultés rencontrées pour la purification du composé. Cette première méthode qui pouvait sembler être une bonne alternative aux premiers abords est en réalité peu adaptée.

Une deuxième méthode permettant d'effectuer la cyclisation sur un dérivé semblable à celui utilisé pour les silafluorènes a également été testée (Figure 82). La 2-bromo-*N*-(2-bromophényl)-*N*-méthylaniline **9** a été engagée dans une réaction d'échange halogène-métal avec du *n*-butyllithium puis mis en présence de diiode pour conduire au composé **11** avec un excellent rendement de 92 %. Une bromation en présence de *N*-bromosuccinimide a ensuite permis d'obtenir le précurseur **12**.

Figure 82 : Deuxième voie de synthèse alternative du composé **7**

La cyclisation sur ce dérivé a pu être réalisée dans les mêmes conditions que pour les dérivés silafluorènes (dans le THF à -78 °C) et a permis d'obtenir le cœur phénazasiline dibromé **7** avec un excellent rendement de 77 %. Néanmoins, le rendement global de cette voie de synthèse est de 44 % sur

5 étapes. La meilleure voie de synthèse reste donc celle présentée en Figure 80 bien que la cyclisation sur le dérivé tétrabromé soit une manipulation très délicate.

Une fois le cœur phénazasiline obtenu, ce dernier a été engagé dans un couplage de Heck en présence de 4-vinylpyridine pour conduire au divinyle **Phenazⁿ-Py** (Figure 83).

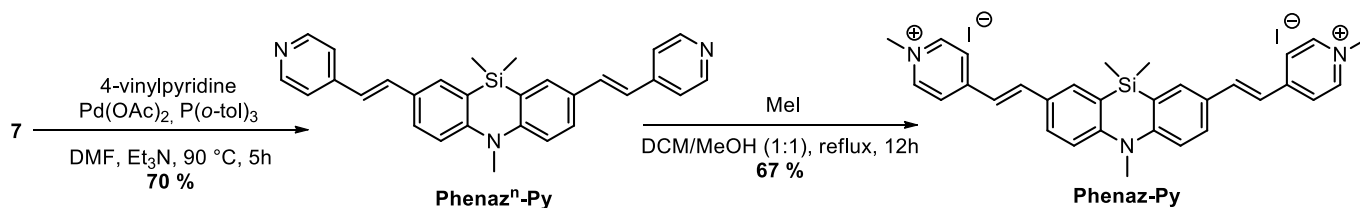


Figure 83 : Synthèse du composé **Phenazⁿ-Py**

Cependant, un manque de reproductibilité de cette réaction a été constaté, notamment à cause de dépôt de palladium métallique sur les parois (probablement dû à l'instabilité du Pd(II) aux températures élevées). Pour pallier ces problèmes de reproductibilité, une voie de synthèse alternative consiste à passer par l'aldéhyde a parallèlement été développée. Deux étapes sont alors nécessaires pour obtenir le divinyle **Phenazⁿ-Py**, mais ce sont des étapes aisées dont le rendement global (79 %) est supérieur au meilleur rendement obtenu lors du couplage de Heck (Figure 84).

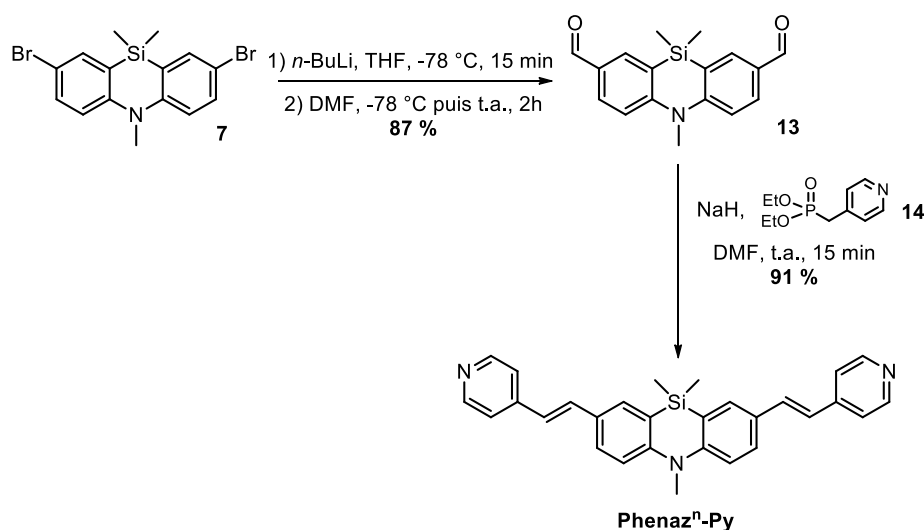


Figure 84 : Voie de synthèse alternative pour l'obtention du divinyle **Phenazⁿ-Py**

Ainsi, le dérivé bromé précédemment obtenu a pu être utilisé pour réaliser une réaction de formylation en présence de *n*-butyllithium/*N,N*-diméthylformamide. Ce dernier a ensuite été engagé dans une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons pour conduire au divinyle **Phenazⁿ-Py**.

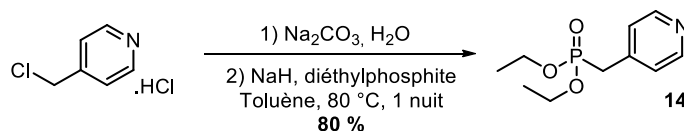


Figure 85 : Synthèse du diéthyl(pyridin-4-ylméthyl)phosphonate **14**

Le phosphonate utilisé pour la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons peut être acheté (environ 400 euros les 5 g chez Epsilon Chimie) ou bien synthétisé en une étape à partir du chlorhydrate de 4-(chlorométhyl)pyridine (Figure 85). Après réaction entre le chlorhydrate et le carbonate de sodium pour obtenir la pyridine, une réaction de substitution nucléophile entre l'anion généré par l'action de l'hydrure

de sodium sur le diéthylphosphite et le dérivé chloré conduit au phosphonate désiré **14** avec un très bon rendement de 80 %.

2) Synthèse du dérivé phénophosphazine **Phospha-Py**

Pour le dérivé phénophosphazine, une voie de synthèse similaire au dérivé phénazasiline est envisagée. Elle est présentée en Figure 86 ci-dessous. Aucun cœur phénophosphazine n'étant disponible commercialement, il est nécessaire de le synthétiser.

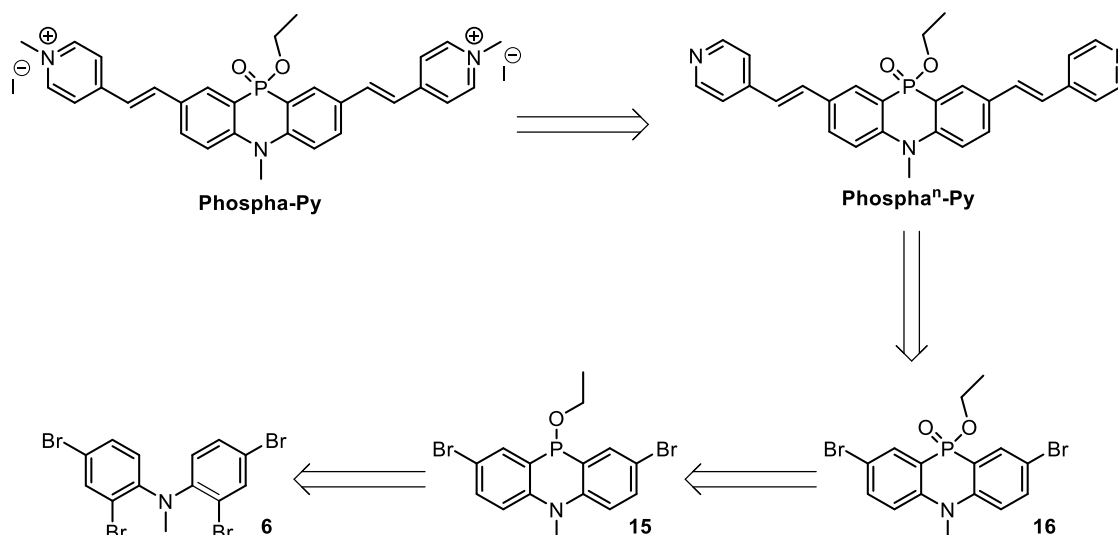


Figure 86 : Voie de synthèse envisagée pour l'obtention de **Phospha-Py**

Le cœur phosphoré pourrait être obtenu à partir du dérivé tétrabromé **6**. En effet, l'obtention du dérivé phénazasiline montre que les conditions utilisées permettent la formation du lithien. Par ailleurs, des réactions entre des lithiens et le dichlorophosphite d'éthyle sont décrites dans la littérature comme l'illustre la Figure 87 ci-dessous.^{122,123}

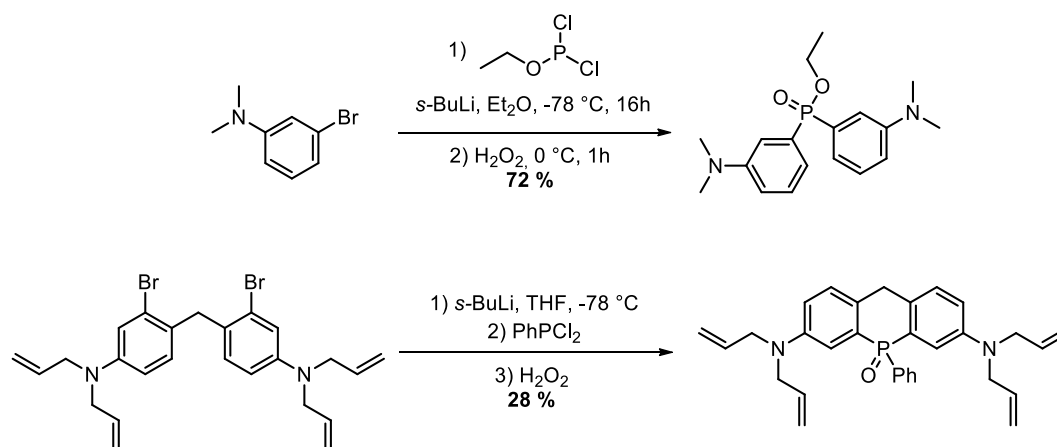


Figure 87 : Exemples de réactions dans la littérature faisant intervenir un lithien et le dichlorophosphite d'éthyle

La 2,4-dibromo-*N*-(2,4-dibromophényl)-*N*-méthylaniline a donc été engagée dans une réaction d'échange halogène-métal avec du *n*-butyllithium à -5 °C dans de l'éther diéthylique anhydre (Figure 88).

¹²² Y. Fang *et al.*, *Chem. Commun.* **2019**, 55 (42), 5962-5965. DOI : [10.1039/C9CC02492A](https://doi.org/10.1039/C9CC02492A)

¹²³ A. Fukazawa *et al.*, *Chem. Commun.* **2016**, 52 (6), 1120-1123. DOI : [10.1039/C5CC09345G](https://doi.org/10.1039/C5CC09345G)

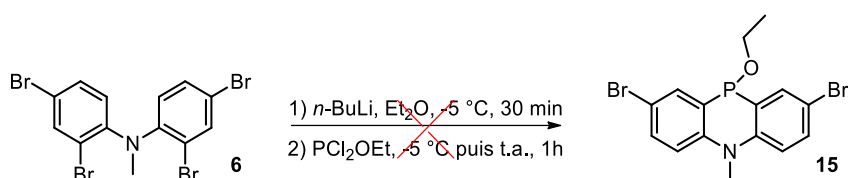


Figure 88 : Réaction entre la 2,4-dibromo-N-(2,4-dibromophényl)-N-méthylaniline **6** et le dichlorophosphite d'éthyle

L'ajout du dichlorophosphite d'éthyle n'a malheureusement pas permis d'accéder au composé souhaité.

Une voie de synthèse alternative serait ainsi de synthétiser le cœur à partir d'une procédure décrite dans la littérature, qui est présentée en Figure 89 ci-dessous.¹²⁴

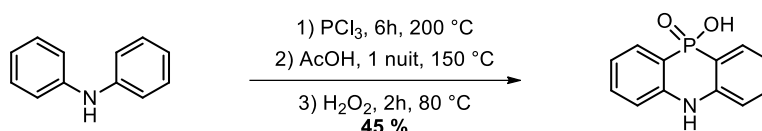


Figure 89 : Synthèse du cœur phénophosphazine proposée J. Cui & S. Zhang¹²⁴

Des problèmes pourraient cependant être rencontrés pour l'obtention du produit bromé, comme cela a été le cas pour la phénaziline. Les calculs de prédiction donnant des résultats quasiment équivalents pour le dérivé de phénothiazine et le dérivé de phénophosphazine, nous avons fait le choix de nous concentrer sur cette première série.

3) Synthèse des autres dérivés

La synthèse des dérivés phénoxazine, acridane et phénothiazine est plus aisée car de nombreux précurseurs sont commerciaux. La voie de synthèse de ces différents composés est présentée en Figure 90 ci-dessous. Ces derniers pourront être obtenus en 3 ou 4 étapes à partir des « cœurs » commerciaux.

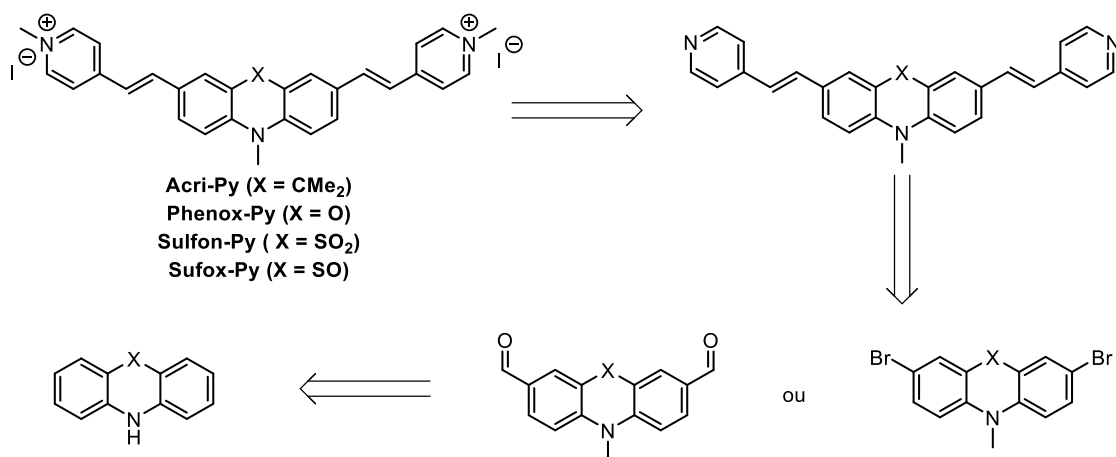


Figure 90 : Stratégie de synthèse pour les dérivés d'acridane, de phénothiazine et de phénoxazine

Les synthèses des différents composés sont présentées dans les trois sous-parties suivantes.

a) Obtention du composé **Acrid-Py**

Le dérivé souhaité peut aisément être obtenu en 4 étapes à partir du composé dibromé commercial **17**. L'aniline de ce dernier a été méthylée en présence d'hydrure de sodium et d'iodométhane pour conduire au composé **18**. L'addition de *n*-butyllithium suivie d'ajout de DMF a permis d'obtenir

¹²⁴ J. Cui and S. Zhang, *Color. Technol.* **2018**, *134* (5), 381-389. DOI : [10.1111/cote.12352](https://doi.org/10.1111/cote.12352)

l'aldéhyde **19** avec un très bon rendement de 90 %. Le divinyle **Acriⁿ-Py** a ensuite été obtenu *via* une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons comme pour le dérivé phénazasiline, avec un rendement de 86 %. Une réaction de méthylation dans un mélange DCM/MeOH a finalement permis d'accéder au composé final **Acri-Py** avec un rendement de 90 %.

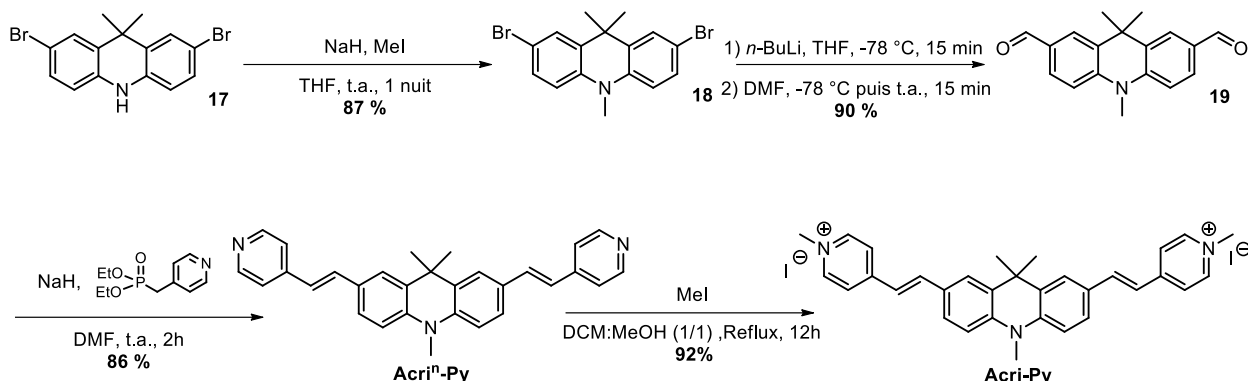


Figure 91 : Synthèse du composé **Acri-Py**

En conclusion, le composé **Acri-Py** a été synthétisé en 4 étapes avec un rendement global de 62 %.

b) Obtention du composé **Pheno-Py**¹²⁵

La synthèse du composé **Pheno-Py** est présentée en Figure 92 ci-dessous. Le précurseur de départ de cette synthèse est la phénoxazine qui est commerciale. Après plusieurs difficultés rencontrées lors de la purification après la première étape, il est apparu nécessaire de purifier au préalable la phénoxazine commerciale *via* une recristallisation dans de l'éthanol (lot provenant du fournisseur Fluorochem). Après purification du substrat de départ, le composé souhaité peut être obtenu en quatre étapes. Premièrement, l'aniline a été méthylée en présence d'hydruire de sodium et d'iodométhane pour conduire au composé **20** avec un rendement de 85 %. L'aldéhyde **21** a ensuite été obtenu par formylation de Vilsmeier-Haack avec un rendement modeste de 39 %, qui s'explique notamment par des difficultés rencontrées lors de l'étape de purification. Comme précédemment, le composé final a ensuite été synthétisé en deux étapes à partir du dialdéhyde *via* une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons suivie d'une réaction de méthylation dans un mélange DCM/MeOH (rendement de 79 % sur deux étapes).

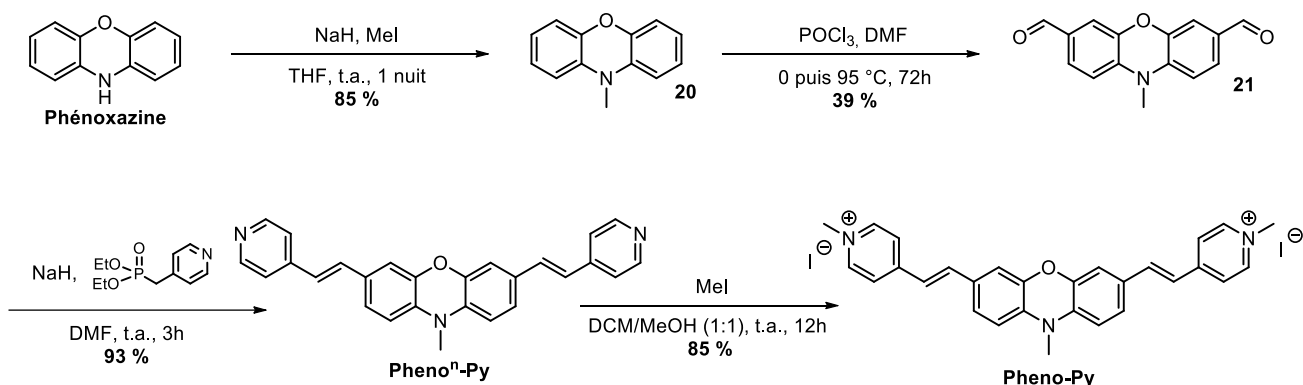


Figure 92 : Voie de synthèse de **Pheno-Py**

Le composé **Pheno-Py** a ainsi été obtenu en 4 étapes à partir de la phénoxazine avec un rendement global de 26 %.

¹²⁵ Composé synthétisé par Matthieu Poulain dans le cadre de son stage de deuxième année de master (2020-2021).

c) Obtention des composés *Sulfox-Py* et *Sulfon-Py*

Les composés sulfone et sulfoxyde ont tous les deux été synthétisés en 5 étapes à partir de la phénothiazine, composé commercial. Les différentes étapes de leur synthèse sont décrites dans les Figures 93 et 94 ci-dessous.

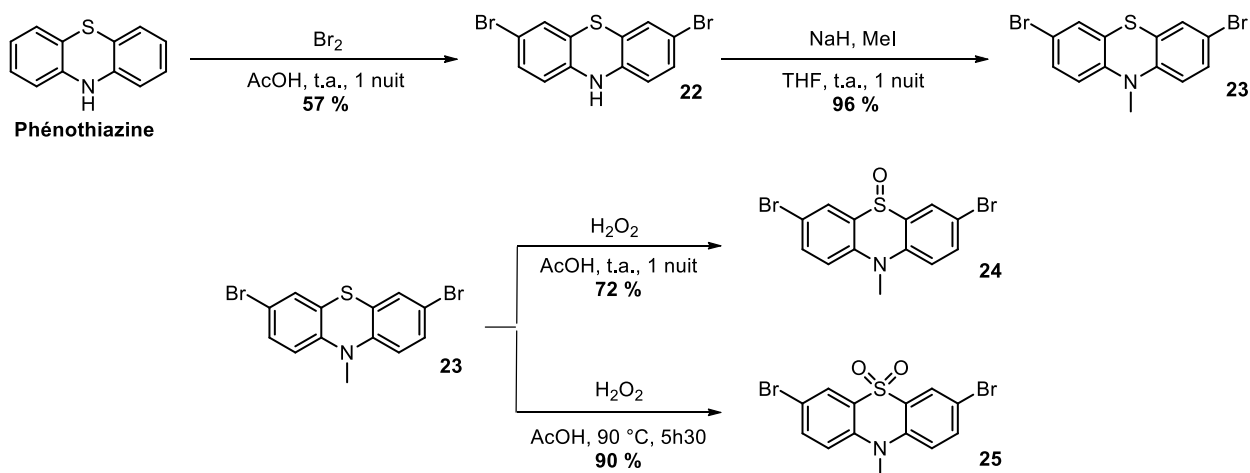


Figure 93 : Voie de synthèse des composés **24** et **25**

La première étape consiste à dibromer la phénothiazine de départ à l'aide de dibrome dans de l'acide acétique ; cette réaction n'ayant pas fonctionnée en présence de *N*-bromosuccinimide dans le THF (avant ou après la réaction de méthylation). Après méthylation, le dérivé sulfoxyde **24** a été obtenu *via* l'oxydation de la phénothiazine en présence de 8 équivalents de peroxyde d'hydrogène dans de l'acide acétique. Après 1 nuit à température ambiante, seul le sulfoxyde a été obtenu avec un rendement de 72 %. Doubler la quantité de peroxyde d'hydrogène et chauffer le milieu réactionnel à 90 °C a permis d'accéder à la sulfone **25** avec un très bon rendement de 90 %.

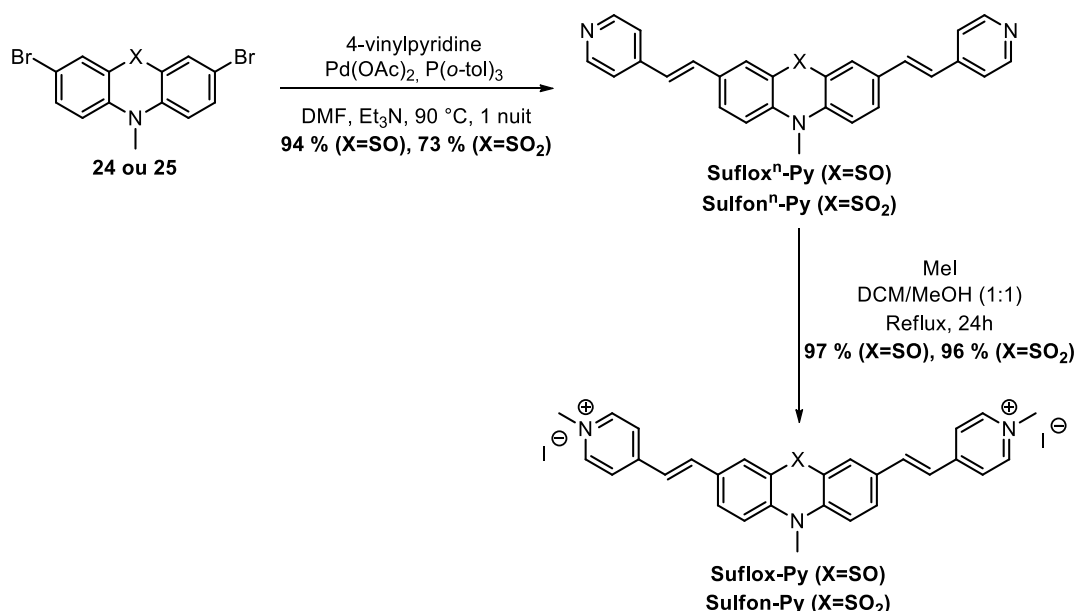


Figure 94 : Synthèse des composés *Sulfox-Py* et *Sulfon-Py*

Les dérivés bromés ont ensuite été engagés dans une réaction de Heck, ce qui a permis d'obtenir les dérivés vinyles avec de très bons rendements de 94 % pour le sulfoxyde et 73 % pour la sulfone. La méthylation des pyridines a ensuite permis d'accéder aux dérivés souhaités.

En conclusion, les composés **Sulfox-Py** et **Sulfon-Py** ont été obtenus en 5 étapes à partir de la phénothiazine, avec des rendements globaux de 36 % et 35 % respectivement.

II. Propriétés spectroscopiques

1) Propriétés linéaires

Les propriétés d'absorption (à un photon) et d'émission des différents composés ont été étudiées. Les mesures ont été effectuées dans l'eau ($\mu = 1,01 \cdot 10^{-3}$ Pa.s à 20 °C) ainsi que dans le glycérol ($\mu = 1.49$ Pa.s à 20 °C). Pour plus de lisibilité, les spectres d'absorption (Figure 95) et d'émission (Figure 96) normalisés sont présentés séparément. La superposition globale est disponible en annexe. Les spectres d'excitation sont également présentés en annexe. Pour chacun des composés le spectre d'excitation est superposable au spectre d'absorption, ce qui confirme la présence d'une unique espèce en solution.

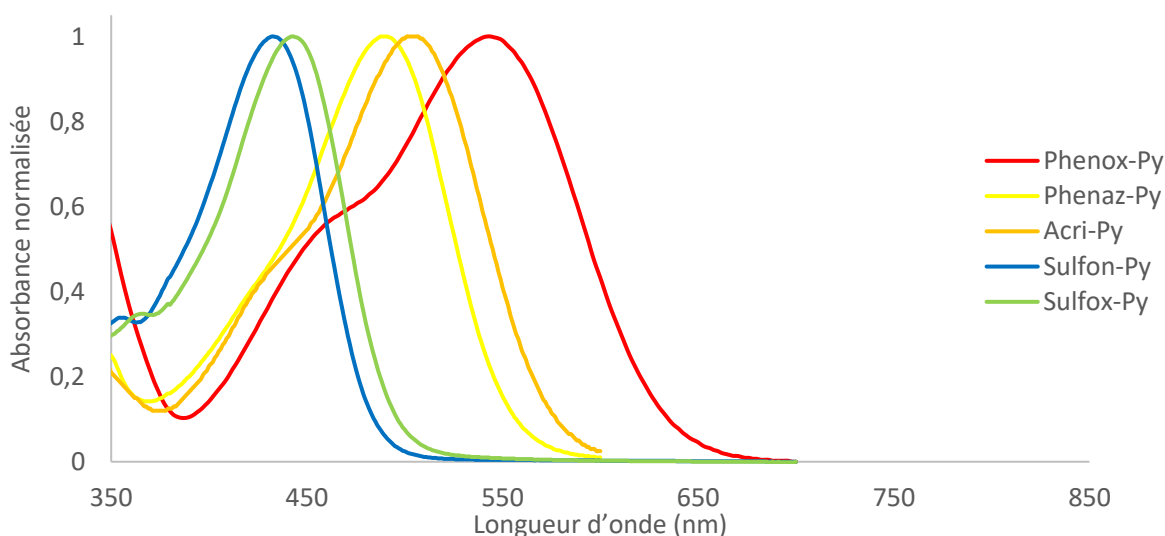


Figure 95 : Spectres d'absorption normalisés des composés **Sulfon-Py**, **Sulfox-Py**, **Phenaz-Py**, **Acri-Py** et **Pheno-Py** dans le glycérol

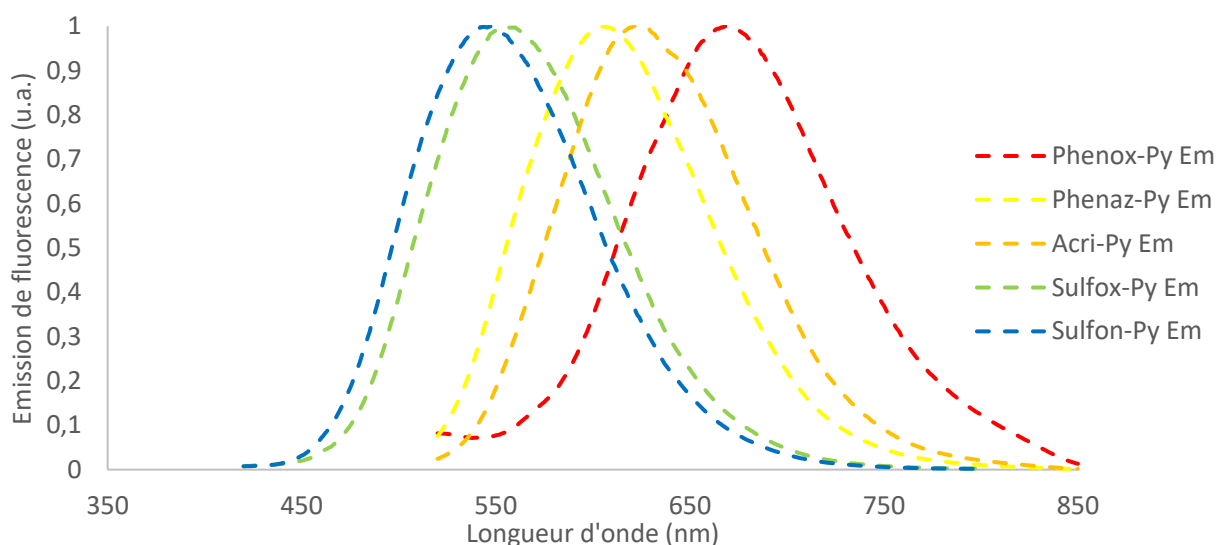


Figure 96 : Spectres d'émission de fluorescence normalisés des composés **Sulfon-Py**, **Sulfox-Py**, **Phenaz-Py**, **Acri-Py** et **Pheno-Py** dans le glycérol

Les propriétés photophysiques dans l'eau et dans le glycérol des différents composés sont récapitulées dans le Tableau 14 ci-contre.

Composé	Solvant	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	λ_{\max} (abs)	λ_{\max} (em)	Φ	$\epsilon\Phi$ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
Sulfon-Py	Eau	80 900	421 nm	556 nm	1 %	810
	Glycérol	56 200	432 nm	547 nm	24 %	13 500
Sulfox-Py	Eau	69 800	431 nm	571 nm	1 %	700
	Glycérol	52 500	443 nm	556 nm	23 %	12 100
Phenaz-Py	Eau	55 400	472 nm	620 nm	< 0,1 %	< 55
	Glycérol	49 600	490 nm	610 nm	11 %	5 500
Acrid-Py	Eau	56 800	483 nm	665 nm	< 0,1 %	< 57
	Glycérol	51 300	505 nm	627 nm	9 %	4 600
Phenoⁿ-Py	Eau	14 000	450 nm	588 nm	< 0,5 %	< 70
	Glycérol	26 300	460 nm	572 nm	10 %	2 630
Pheno-Py	Eau	39 500	526 nm	688 nm	< 0,1 %	< 40
	Glycérol	34 300	544 nm	664 nm	1,5 %	520

Tableau 14 : Propriétés photophysiques des composés **Sulfon-Py**, **Sulfox-Py**, **Phenaz-Py**, **Acrid-Py** et **Pheno-Py** dans l'eau et dans le glycérol¹²⁶

Les différents composés synthétisés peuvent être regroupés en trois familles :

- Une première comprenant **Sulfon-Py** et **Sulfox-Py** : ces composés sont très brillants mais émettent dans le vert, et sont donc *a priori* moins intéressants.
- Une seconde comprenant **Phenaz-Py** et **Acrid-Py** : ces composés émettent dans le rouge et possèdent également des brillances élevées dans le glycérol. Ces sondes semblent donc prometteuses.
- Une troisième comprenant **Pheno-Py** : ce composé émet dans le rouge lointain (688 nm dans l'eau) mais possède une brillance très modeste, notamment à cause de son très faible rendement quantique (1,5 % dans le glycérol).

Sulfon-Py et **Sulfox-Py** présentent des propriétés photophysiques très similaires, ce qui est cohérent avec leurs structures proches. Les deux composés sont peu fluorescents dans l'eau (rendement quantique de 1 %), mais présentent une brillance non négligeable dans l'eau (810 L.mol⁻¹.cm⁻¹ pour **Sulfon-Py** et 700 L.mol⁻¹.cm⁻¹ pour **Sulfox-Py**), notamment en raison de leurs coefficients d'absorption molaire particulièrement élevés dans l'eau (80 900 L.mol⁻¹.cm⁻¹ pour **Sulfon-Py** et 69 800 L.mol⁻¹.cm⁻¹ pour **Sulfox-Py**). Par ailleurs, leurs brillances dans le glycérol sont très élevées (13 500 L.mol⁻¹.cm⁻¹ pour **Sulfon-Py** et 12 100 L.mol⁻¹.cm⁻¹ pour **Sulfox-Py**). Ils possèdent donc de très bons ratios de turn-on entre l'eau et le glycérol. Ils devraient par conséquent fluorescer fortement une fois leur cible biologique atteinte, avec un bon rapport signal sur bruit.

Phenaz-Py et **Acrid-Py** présentent des propriétés photophysiques quasiment idéales pour une utilisation en bioimagerie : une très bonne brillance dans le glycérol et une faible brillance dans l'eau, ainsi

¹²⁶ Les données concernant **Sulfon-Py** et **Sulfox-Py** ont été obtenues par M. Bossuat dans le cadre de son stage de deuxième année de master (2019-2020). Les données concernant **Pheno-Py** et **Phenoⁿ-Py** ont été obtenues par M. Poulain dans le cadre de son stage de deuxième année de master (2020-2021).

qu'une émission dans le rouge (620 nm pour **Phenaz-Py** et 665 nm **Acri-Py** dans l'eau). La seule limitation est qu'ils absorbent dans le bleu. Cela pourra néanmoins être contourné *via* un processus d'absorption biphotonique. Le composé **Acri-Py** présente un déplacement bathochrome pour l'absorption et l'émission en comparaison à **Phenaz-Py**. Ce dernier s'accompagne logiquement d'une baisse de rendement quantique et donc de la brillance.

Bien que **Pheno-Py** émette dans le rouge lointain (688 nm dans l'eau), son très faible rendement quantique dans le glycérol en fait une sonde peu intéressante : sa brillance n'atteint que $520 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ dans le glycérol. Seule une section efficace d'absorption à deux photons exceptionnelle pourrait compenser ce piètre rendement quantique, et en faire une sonde exploitable en microscopie de fluorescence. Cette très faible émission nous a conduit à étudier les propriétés de son analogue non méthylé **Phenoⁿ-Py**. Ce composé possède un bon rendement quantique dans le glycérol (10 %), il émet malheureusement dans le jaune. Il sera ainsi probablement moins intéressant qu'**Acri-Py** et **Phenaz-Py**.

L'étude des propriétés d'absorption biphotoniques des composés permettra d'identifier les composés les plus intéressants pour la microscopie biphotonique.

2) Propriétés d'absorption biphotonique

Les spectres d'excitation biphotonique ont été réalisés en duplicat dans le glycérol, car la méthode utilisée (TPEF) requiert que les composés soient fluorescents. Les spectres obtenus pour les composés **Sulfon-Py**, **Sulfox-Py**, **Phenaz-Py**, **Acri-Py** et **Pheno-Py** sont présentés en Figure 97 ci-dessous.

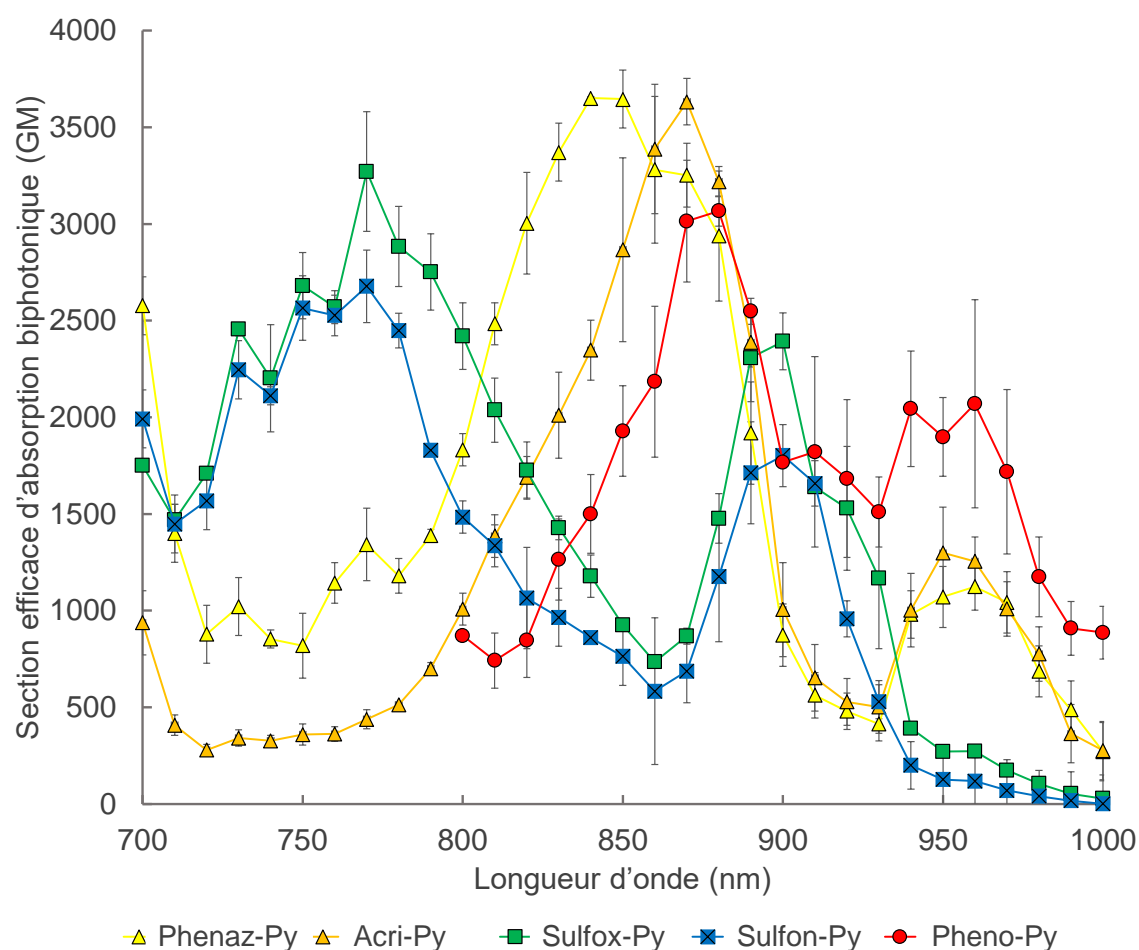


Figure 97 : Spectres d'excitation biphotonique des composés **Sulfon-Py**, **Sulfox-Py**, **Phenaz-Py**, **Acri-Py** et **Pheno-Py** dans le glycérol

Il est cependant indispensable de vérifier que les spectres obtenus sont bien la conséquence d'un processus d'absorption biphotonique et non monophotonique. Lorsque le processus d'absorption est biphotonique, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la puissance du laser au carré. Pour vérifier que la fluorescence observée résulte bien d'un phénomène d'absorption biphotonique, l'intensité de fluorescence obtenue pour chaque composé a donc été mesurée pour différentes puissances de laser à une longueur d'onde donnée. Les résultats sont récapitulés en Figure 98 ci-dessous.

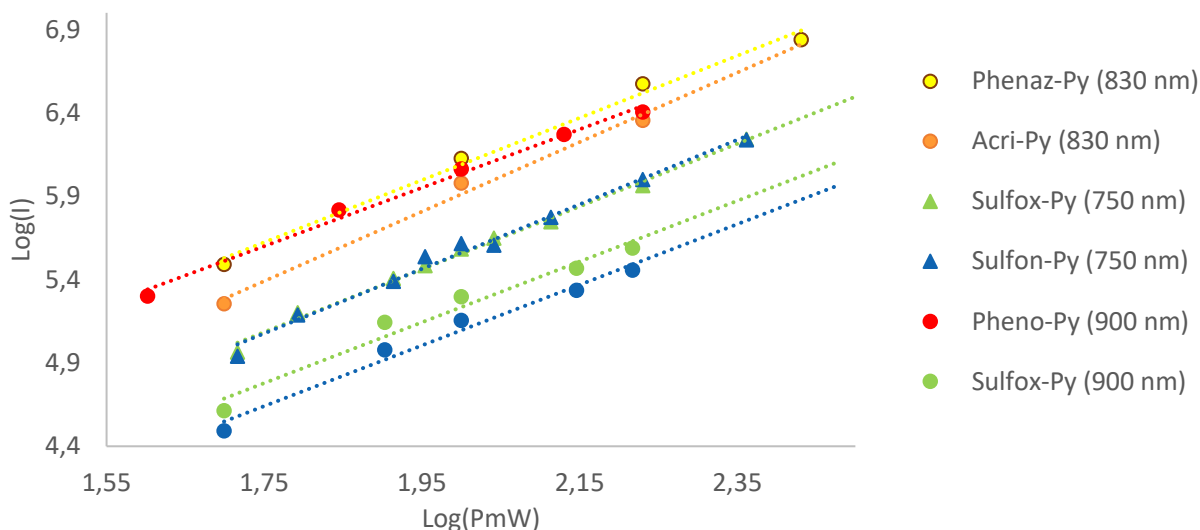


Figure 98 : Logarithme de l'intensité de fluorescence en fonction du logarithme de la puissance du laser pour les composés **Sulfon-Py, Sulfox-Py, Phenaz-Py, Acri-Py et Pheno-Py**

Le Tableau 15 ci-dessous rassemble les coefficients directeurs des droites obtenus pour les régressions linéaires réalisées sur les données expérimentales de la Figure 98.

Composé	λ (nm)	Coefficient directeur de la droite
Sulfon-Py	750	1,93
	900	1,81
Sulfox-Py	750	1,88
	900	1,82
Phenaz-Py	830	1,86
Acri-Py	830	2,08
Pheno-Py	900	1,75

Tableau 15 : Coefficients directeurs des droites obtenues lors des régressions linéaires de la Figure 98

Dans tous les cas, le coefficient directeur de la droite est différent de 1, ce qui met en évidence que le phénomène observé est bien un phénomène d'absorption non linéaire (Tableau 15). Par ailleurs, les valeurs obtenues sont toujours proches de 2, ce qui permet de mettre en évidence la dépendance quadratique de l'intensité de fluorescence par rapport à la puissance du laser, ce qui est caractéristique de l'absorption biphotonique.

Les propriétés d'absorption biphotonique des composés sont récapitulées dans le Tableau 16 ci-dessous.

Composé	$\lambda_{\max,2PA}$ abs (nm)	δ_{\max} (GM)	Φ	$\delta_{\max} \cdot \Phi$ (GM)
Sulfon-Py	770	2 680	24 %	640
	900	1 800		430
Sulfox-Py	770	3 270	23 %	750
	900	2 400		550
Phenaz-Py	840	3 650	11 %	400
	960	1 260		140
Acrid-Py	870	3 630	9 %	330
	950	1 300		120
Pheno-Py	880	3 070	1,5 %	50
	960	2 070		30

Tableau 16 : Propriétés d'absorption biphotonique des composés **Sulfon-Py**, **Sulfox-Py**, **Phenaz-Py**, **Acrid-Py** et **Pheno-Py** dans le glycérol

Tous les composés présentent des sections efficaces d'absorption remarquables dans le glycérol : ils possèdent tous un maximum au-dessus de 2 500 GM, ce qui est plus élevé que la section efficace d'absorption maximale de **SiFluo-L**, composé identifié précédemment comme étant un très bon absorbeur biphotonique.

Deux familles peuvent être identifiées :

- **Sulfon-Py** et **Sulfox-Py** présentent deux bandes d'absorption : une première dont le maximum se situe à 770 nm (2 680 GM pour **Sulfon-Py** et 3 270 GM pour **Sulfox-Py**), et une seconde qui présente un maximum à 900 nm (1 800 GM pour **Sulfon-Py** et 2 400 GM pour **Sulfox-Py**). **Sulfon-Py** possède des sections efficaces légèrement moindres, ce qui est cohérent avec le caractère moins donneur du cœur dans le cas de la sulfone par rapport au sulfoxyde. Les deux composés ont par ailleurs des brillances très élevées dans le glycérol (640 GM pour **Sulfon-Py** et 750 GM pour **Sulfox-Py** à 770 nm).
- **Phenaz-Py**, **Acrid-Py** et **Pheno-Py** possèdent une première bande autour de 860 nm et une seconde autour de 950 nm. **Phenaz-Py** et **Acrid-Py** possèdent de bonnes brillances (330 GM à 870 nm pour **Acrid-Py** et 400 GM à 840 nm pour **Phenaz-Py**). Ils sont ainsi de bons candidats pour être utilisés en microscopie biphotonique. En revanche, **Pheno-Py** possède une brillance faible (de l'ordre de 50 GM à 860 nm au maximum) qui représente une limitation majeure pour son utilisation en microscopie biphotonique.

Cette étude a permis de mettre en évidence que les composés qui sont *a priori* les plus prometteurs pour être utilisés en microscopie de fluorescence sont **Acrid-Py** et **Phenaz-Py**, car ils émettent dans le rouge tout en possédant des brillances élevées dans le glycérol (330 GM à 870 nm pour **Acrid-Py** et 400 GM à 840 nm pour **Phenaz-Py**). Les études en cellules vivantes se focaliseront par conséquent sur ces deux composés.

Avant les études en cellules vivantes, la partie suivante permet de confronter les prédictions réalisées précédemment avec les résultats expérimentaux obtenus.

III. Modélisation moléculaire

Le Tableau 17 rassemble les résultats des différents calculs présentés en introduction, ainsi que les valeurs associées obtenues expérimentalement.

Composé	$\lambda_{\max,th}$ (abs)	$\lambda_{\max,eau}$ (abs)	$\mu_{S_0 \rightarrow S_1}$	$\mu_{S_1 \rightarrow S_2}$	Δ (eV)	$\frac{\mu_{S_0 \rightarrow S_1}^2 \times \mu_{S_1 \rightarrow S_2}^2}{\Delta^2}$	δ_{\max} (GM)
Sulfon-Py	407 nm	421 nm	5,56	5,37	0,47	4 036	2 680
Sulfox-Py	425 nm	431 nm	5,28	5,96	0,47	4 483	3 270
Phenaz-Py	450 nm	472 nm	5,81	6,75	0,47	6 962	3 650
Acrid-Py	460 nm	483 nm	5,58	6,72	0,48	6 103	3 630
Pheno-Py	505 nm	526 nm	4,99	7,91	0,55	5 150	3 070

Tableau 17 : Comparaison entre les propriétés photophysiques des différents composés et les propriétés simulées

La première chose à noter est la bonne concordance entre les longueurs d'onde maximales d'absorption théoriques et celles mesurées dans l'eau : l'écart relatif entre ces deux valeurs est compris entre 1 % pour **Sulfox-Py** et 5 % pour **Acrid-Py**. La méthode utilisée (6-311+G(d,p)/M06-2X) est donc adaptée aux molécules étudiées bien qu'elle semble sous-estimer légèrement les longueurs d'onde maximales d'absorption. De même, les propriétés d'absorption biphotonique sont en accord avec les prédictions réalisées pour 4 molécules sur les 5. En effet, l'ordre des sections efficaces d'absorption maximales est cohérent avec les prédictions réalisées : $\delta_{\max}(\text{Sulfon-Py}) < \delta_{\max}(\text{Sulfox-Py}) < \delta_{\max}(\text{Phenaz-Py}) < \delta_{\max}(\text{Acrid-Py})$. Ces calculs pourraient probablement être affinés notamment en changeant la fonctionnelle, car les valeurs expérimentales de sections efficaces de **Pheno-Py** sont en contradiction avec les valeurs calculées. De la même manière, il n'y a pas de proportionnalité entre la valeur calculée et la section efficace d'absorption obtenue expérimentalement. La méthode utilisée permet donc d'avoir un classement « grossier » pour un groupe de molécules, mais ne permet pas de prédire de manière fine leurs propriétés d'absorption biphotonique.

Pour chacune des molécules, la contribution majoritaire à la transition $S_0 \rightarrow S_1$ est issue de la paire électron-trou HOMO-LUMO (Tableau 18).

	E(eV)	$\lambda_{\max,th}$ abs (nm)	Contributions majeures ($\geq 5\%$)
Sulfon-Py	3,05	407	HOMO \rightarrow LUMO (88 %) HOMO-1 \rightarrow LUMO+1 (12 %)
Sulfox-Py	2,91	425	HOMO \rightarrow LUMO (87 %) HOMO-1 \rightarrow LUMO+1 (10 %)
Phenaz-Py	2,76	450	HOMO \rightarrow LUMO (87 %) HOMO-1 \rightarrow LUMO+1 (10 %)
Acrid-Py	2,69	460	HOMO \rightarrow LUMO (88 %) HOMO-1 \rightarrow LUMO+1 (9 %)
Pheno-Py	2,45	505	HOMO \rightarrow LUMO (91 %) HOMO-1 \rightarrow LUMO+1 (5 %)

Tableau 18 : Contributions à la transition $S_0 \rightarrow S_1$

La localisation des densités électroniques de la HOMO et de la LUMO permettent de confirmer sans ambiguïté le caractère de transfert de charge de cette transition : pour la HOMO, la densité électronique est présente majoritairement sur le cœur donneur tandis que sur la LUMO, la densité électronique est présente majoritairement sur les accepteurs périphériques (Figure 99).

Par ailleurs, toutes les LUMO ont la même répartition dans la densité électronique et la différence d'énergie entre les LUMO des différentes molécules est très faible. Ainsi, les différences de longueur d'onde maximale d'absorption peuvent s'expliquer principalement par l'allure des HOMO. En effet, l'allure des HOMO permet d'identifier deux groupes : un premier comprenant **Sulfon-Py**, **Sulfox-Py**, **Acrid-Py** et **Phenaz-Py** dont les HOMO ont des allures identiques, et un second comprenant **Pheno-Py**.

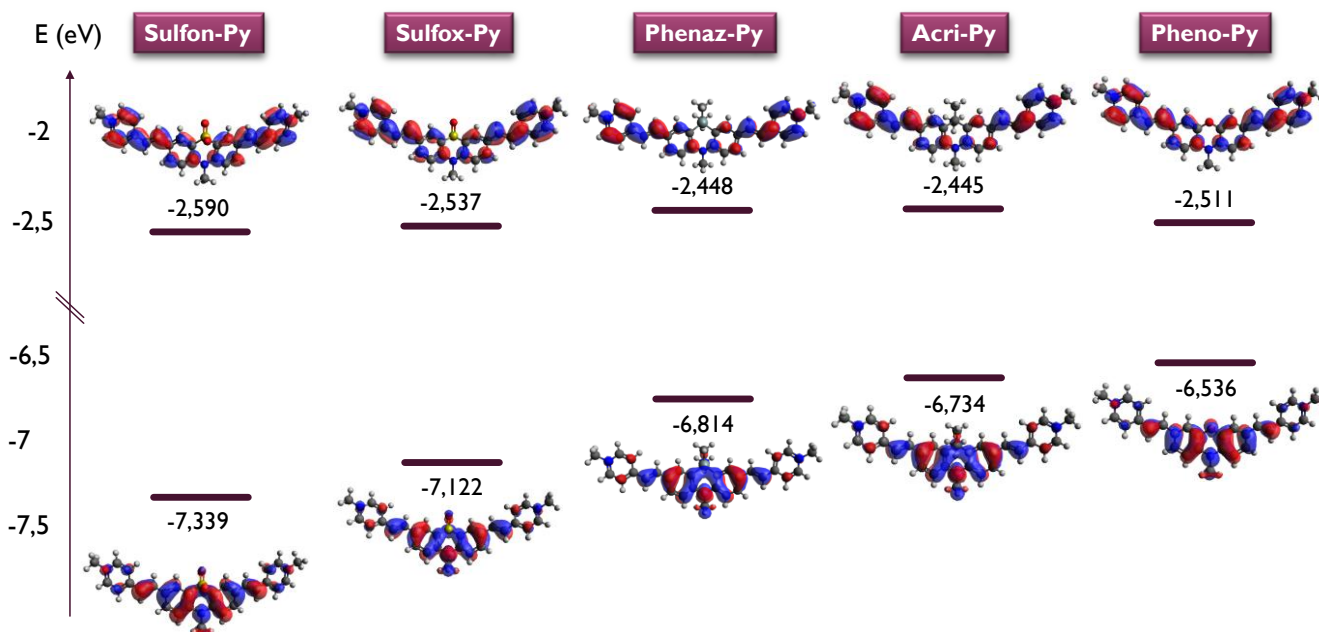


Figure 99 : Orbitales frontières des composés **Sulfon-Py**, **Sulfox-Py**, **Phenaz-Py**, **Acrid-Py** et **Pheno-Py**

Dans la série **Sulfon-Py**, **Sulfox-Py**, **Acrid-Py** et **Phenaz-Py**, l'évolution de l'énergie de la HOMO peut être corrélée avec les effets inductifs du groupement central : les groupements attracteurs (SO et SO₂) vont avoir tendance à abaisser l'énergie de la HOMO, tandis que les groupements donneurs (CMe₂ et SiMe₂) vont quant à eux entraîner une augmentation de l'énergie de la HOMO.

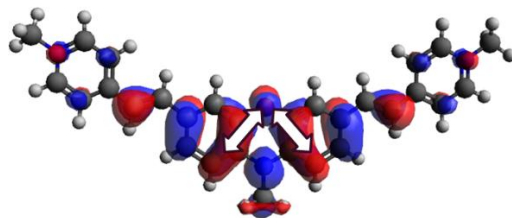


Figure 100 : Interactions antiliantes supplémentaires dans le cas de **Pheno-Py**

Pour **Pheno-Py**, il existe une interaction anti-liante supplémentaire par rapport aux autres composés, ce qui permet d'expliquer la déstabilisation de la HOMO, et donc le décalage vers le rouge de la longueur d'onde maximum d'absorption (Figure 100).

IV. Microscopie en cellules vivantes

1) Cytotoxicité

La cytotoxicité des composés **Phenaz-Py** et **Acri-Py** a été évaluée sur des cellules A549 (cancéreuses du poumon), qui seront par la suite utilisées pour réaliser l'imagerie. Le pourcentage de survie a été évalué à l'aide d'un test MTT. Les résultats de ce test, réalisé en triplicata, sont présentés en Figure 101 ci-dessous.

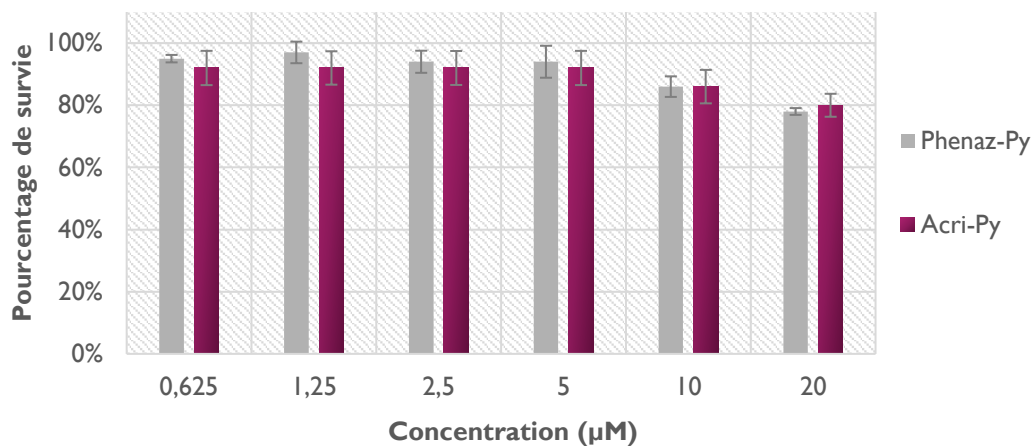


Figure 101 : Pourcentage de survie à 24h de cellules A549 en fonction de la concentration en composé **Phenaz-Py** ou **Acri-Py**

En deçà de 10 µM, les deux sondes ne présentent pas de toxicité après 24h d'incubation. Les expériences de microscopie à 2 µM ou moins pourront donc être réalisées sans problème.

2) Imagerie à un et à deux photons

Des cellules A549 (cellules cancéreuses - poumon) ont été incubées pendant 2h avec 2 µM de **Phenaz-Py** (Figure 102) ou d'**Acri-Py** (Figure 103). Ces dernières ont ensuite été excitées à un photon (496 nm) ou deux photons (850 nm et 950 nm) exactement dans les mêmes conditions. Dans tous les cas, la puissance du laser est suffisamment faible pour s'affranchir de l'autofluorescence liée à l'excitation des molécules endogènes, comme le montrent les images contrôles.

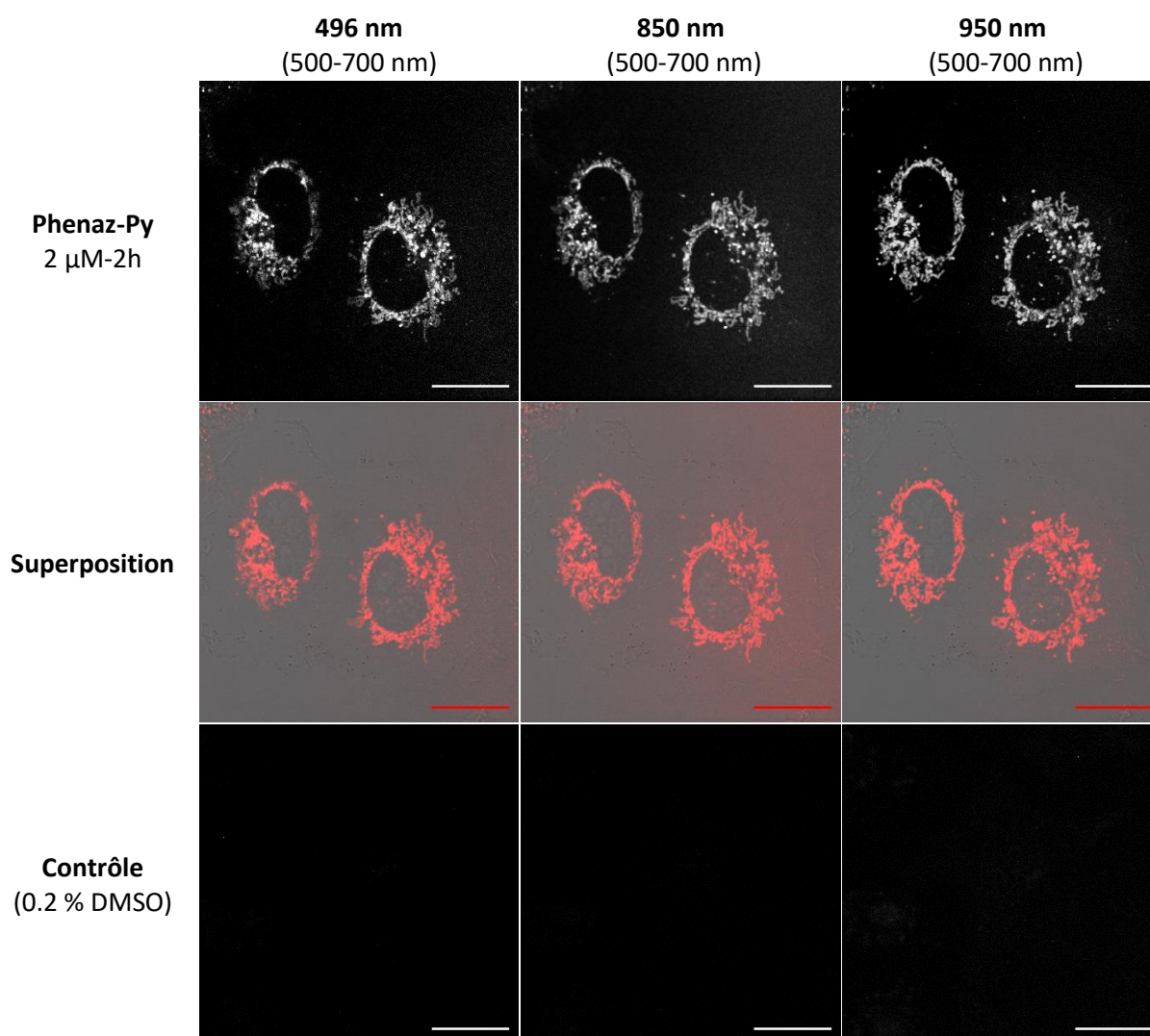


Figure 102 : Cellules A549 incubées en cellules vivantes avec **Phenaz-Py** à 2 μ M pendant 2h après excitation à un (496 nm) ou deux photons (850 nm et 950 nm). Détection : 500-700 nm. Barre d'échelle : 20 μ m

Que ce soit suite à une excitation à un photon ou à deux photons, les images obtenues pour **Phenaz-Py** sont très contrastées, ce qui témoigne de la forte brillance de cette sonde.

Dans le cas d'**Acrid-Py**, les images contrôles ne sont pas présentées car elles sont identiques à celles obtenues pour **Phenaz-Py**. De la même manière, les images obtenues sont très contrastées. Une légère baisse d'intensité par rapport aux images précédentes est néanmoins à noter. Cela est cohérent avec les brillances mesurées lors des expériences *in vitro*.

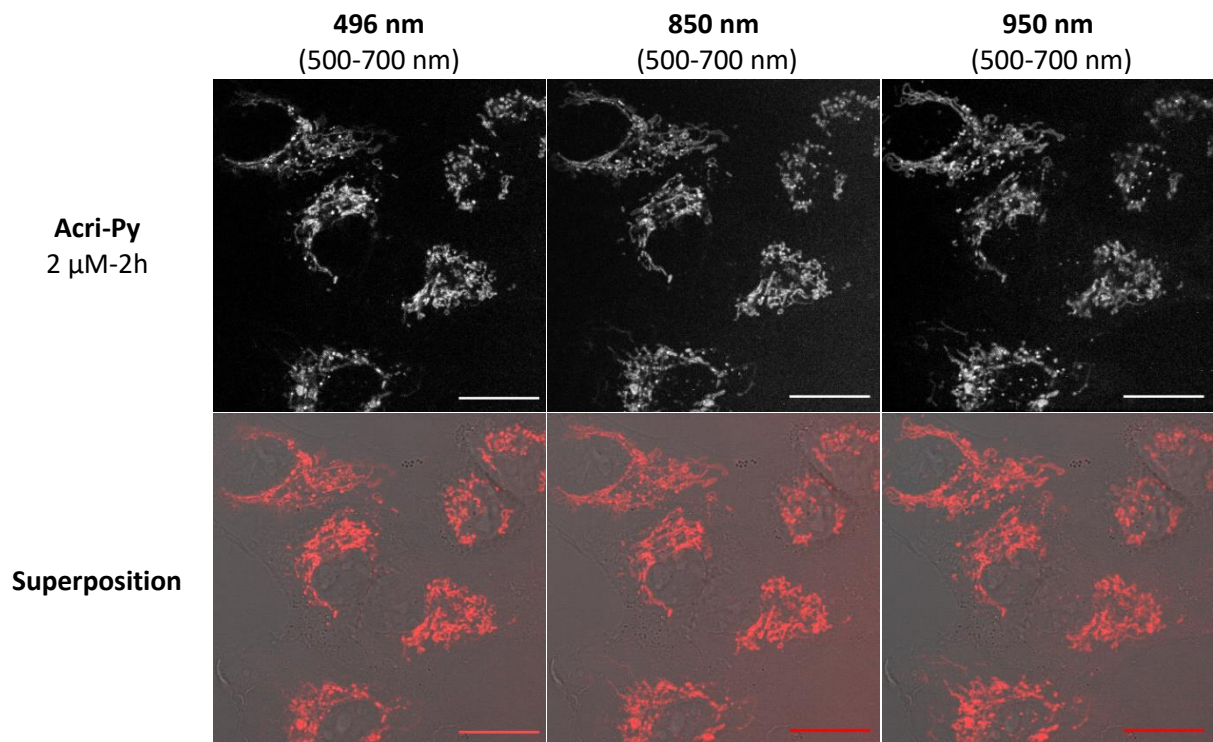


Figure 103 : Cellules A549 incubées en cellules vivantes avec **Acri-Py** à 2 μM pendant 2h après excitation à un (496 nm) ou deux photons (850 nm et 950 nm). Détection : 500-700 nm. Barre d'échelle : 20 μm

L'enregistrement successif d'images en faisant varier la plage de détection de 10 nm en 10 nm permet de reconstruire le spectre d'émission des composés en cellules vivantes (Figure 104). Ces spectres mettent en évidence le léger décalage de l'émission d'**Acri-Py** par rapport à **Phenaz-Py**, ce qui est cohérent avec les expériences réalisées *in vitro*.

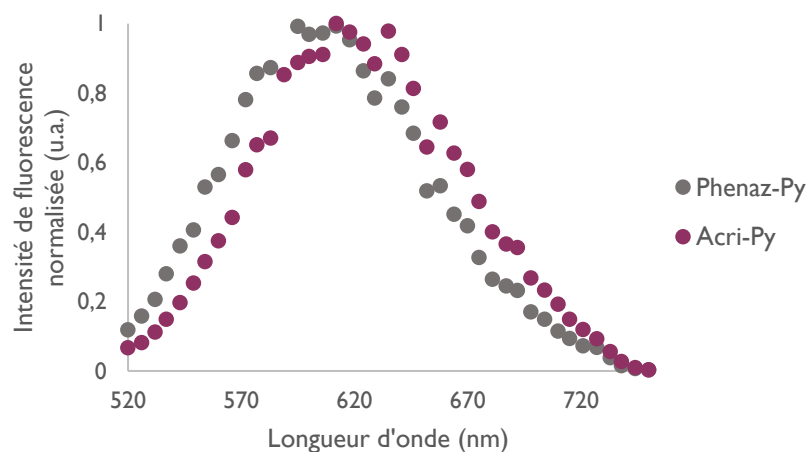


Figure 104 : Spectres d'émission de fluorescence d'**Acri-Py** et de **Phenaz-Py** en cellules

La superposition de spectres d'émission en cellules avec ceux réalisés dans le glycérol est présentée en Figure 105 pour **Phenaz-Py** et en Figure 106 pour **Acri-Py**.

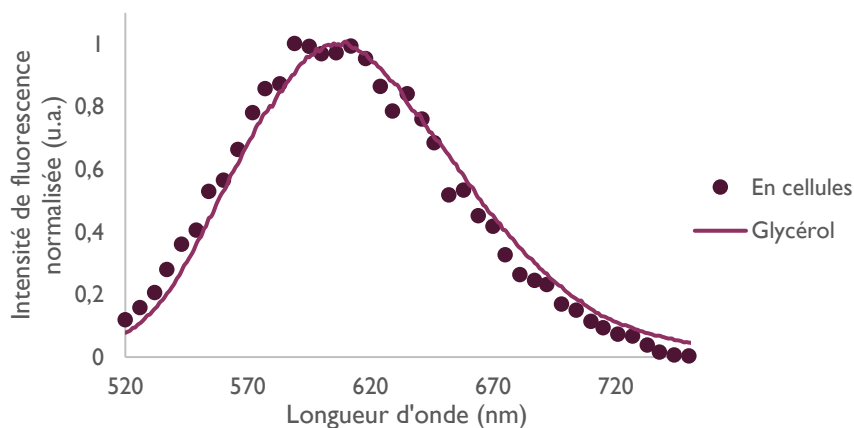


Figure 105 : Spectres d'émission de fluorescence normalisés de **Phenaz-Py** en cellules et dans le glycérol

De manière surprenante, dans chacun des cas, l'émission est légèrement décalée vers le bleu par rapport à l'émission dans le glycérol ; alors que l'on pourrait s'attendre à avoir un déplacement plutôt vers le rouge (car l'émission dans l'eau est décalée vers le rouge par rapport à l'émission dans le glycérol).

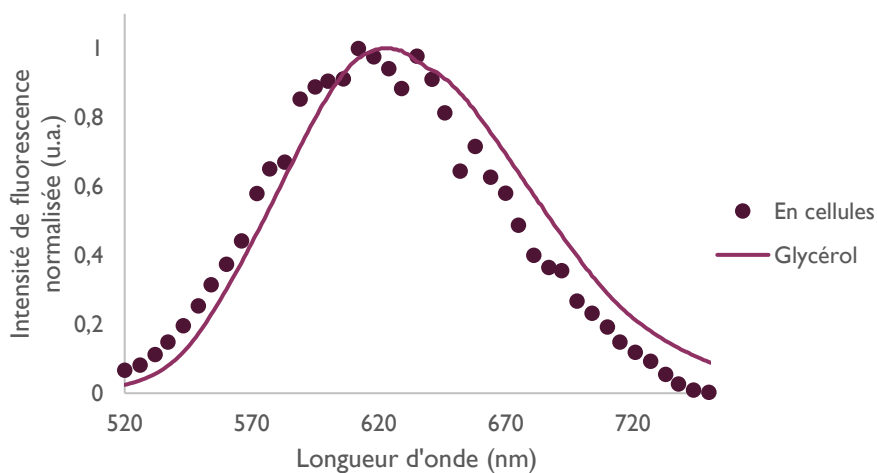


Figure 106 : Spectres d'émission de fluorescence normalisés d'**Acrid-Py** en cellules et dans le glycérol

En conclusion, les images obtenues précédemment (Figure 102 & Figure 103) mettent en évidence que ces deux sondes semblent donc être adaptées pour l'imagerie en cellules vivantes. Seule leur photostabilité reste à étudier.

3) Photostabilité

Dans le but de confirmer leur capacité à être utilisées en imagerie cellulaire, la photostabilité des sondes **Acrid-Py** et **Phenaz-Py** a été évaluée.

Après 2h d'incubation à 2 μ M, ces dernières ont ainsi été irradiées pendant 10 min à 850 nm. Pendant cette irradiation, une image a été acquise toutes les 30 secondes.

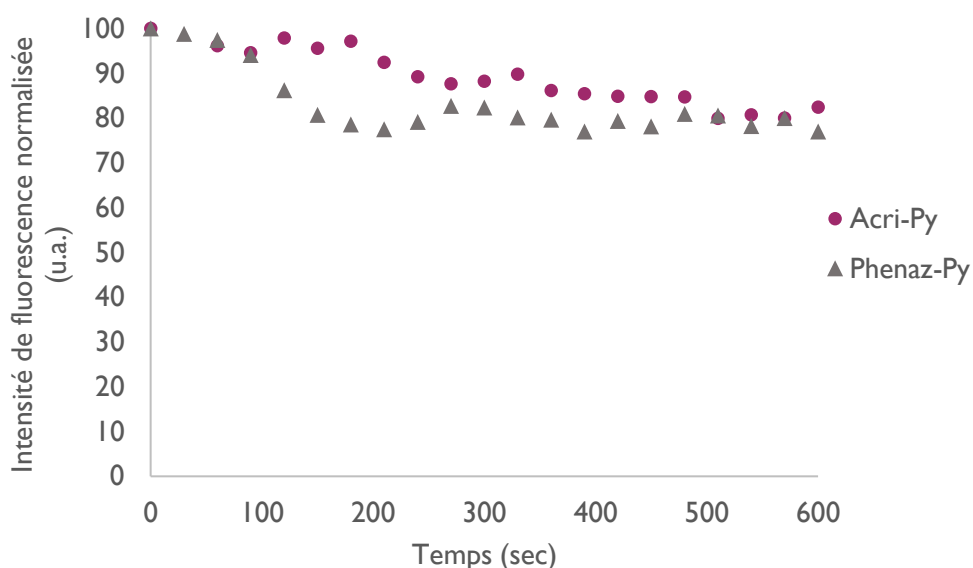


Figure 107 : Variation de l'intensité de fluorescence en fonction du temps d'irradiation à 850 nm pour les composés **Acri-Py** et **Phenaz-Py**

Après 10 min d'irradiation, le signal a diminué de moins de 20 % pour **Acri-Py** et d'environ 25 % pour **Phenaz-Py** (Figure 107). Pour **Acri-Py** la baisse d'intensité devient non négligeable après plus de 3 min, tandis que dans le cas de **Phenaz-Py**, une brusque chute est observée dès les premières minutes. **Acri-Py** semble ainsi être plus photostable que **Phenaz-Py**.

V. Conclusion

En conclusion, 5 nouvelles sondes, dont les structures sont rappelées ci-dessous (Figure 108), ont été obtenues. Elles émettent du vert (**Sulfon-Py**) au rouge (**Pheno-Py**) avec des brillances monophotoniques élevées à faibles.

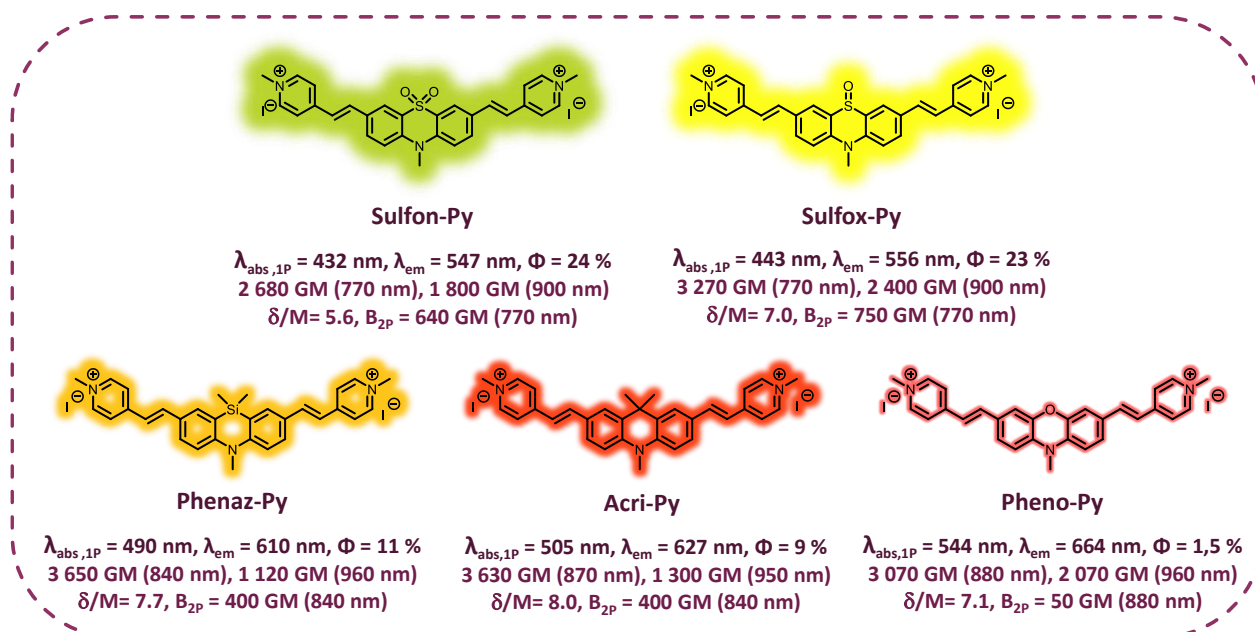


Figure 108 : Deuxième génération de sondes et leurs propriétés photophysiques dans le glycérol

L'étude de leurs propriétés photophysiques a permis de mettre en évidence leurs sections efficaces d'absorption très élevées (maxima compris entre 2 680 GM à 770 nm pour **Sulfon-Py** et 3 650 GM à 840 nm pour **Phenaz-Py**). Ainsi, les brillances biphotoniques de ces sondes vont de 50 GM (à 880 nm) pour

Pheno-Py à 750 GM (à 770 nm) pour **Sulfox-Py**. De plus, ces sondes possèdent des ratios sections efficaces sur masse molaire supérieurs à 5.0. Les fluorophores **Cbz-2Py** et **TP-2Py**, précédemment développés par le laboratoire et présentés en introduction, présentaient quant à eux des ratios inférieurs à 1. Ces fluorophores sont donc particulièrement efficaces tout en restant biocompatibles.

Parmi ces différentes sondes, **Acri-Py** semble la plus adaptée à la microscopie de fluorescence en cellules vivantes (Figure 109). En effet, cette sonde émet dans le rouge, possède une brillance biphotonique élevée ($B_{2P} = 330 \text{ GM à } 870 \text{ nm}$), n'est pas cytotoxique et il est possible de l'imager pendant plusieurs minutes (l'intensité de fluorescence est à 80 % de son niveau initial après l'acquisition d'une vingtaine d'images sur 10 min).

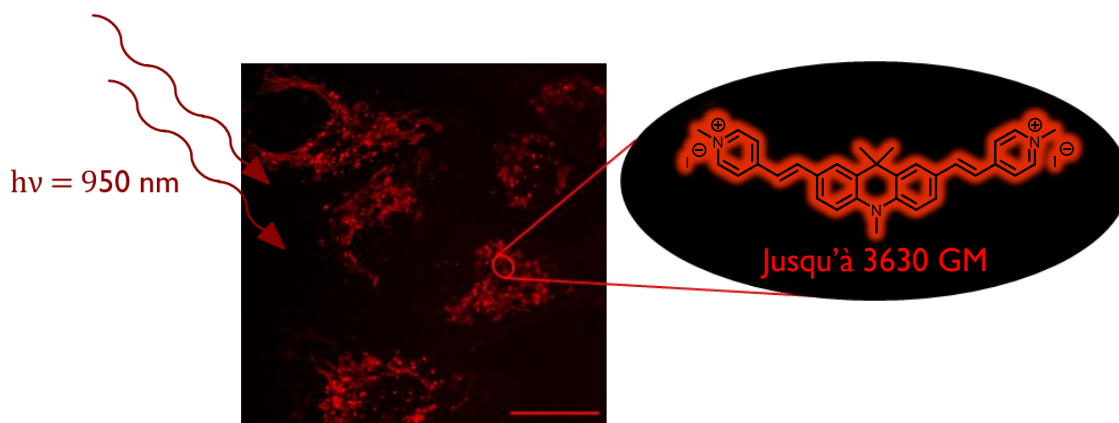


Figure 109 : Image en cellules vivantes d'**Acri-Py** après excitation biphotonique (950 nm)

C'est par conséquent ce squelette qui sera utilisé pour concevoir la sonde fluorogénique dans la deuxième partie.

DEUXIÈME PARTIE :
Développement d'une sonde
fluorogénique excitable à deux photons
pour la chimie bioorthogonale

INTRODUCTION PARTIE N°2

I. Réactions de chimie bioorthogonale fluorogéniques

Cette introduction présente les versions fluorogéniques des réactions bioorthogonales présentées dans l'introduction générale. Dans une première partie seront présentées des exemples de réactions fluorogéniques pour quelques réactions bioorthogonales. Une seconde partie permettra de s'intéresser davantage à la réaction de type Diels-Alder à demande électronique inverse, car son excellente cinétique en fait une réaction de choix pour la chimie bioorthogonale.

1) État de l'art sur les sondes bioorthogonales fluorogéniques

- Condensation d'aldéhydes



Il s'agit d'une des premières réactions à avoir été utilisée en chimie bioorthogonale. Une limitation évidente de cette réaction est la présence d'aldéhydes et de cétones sur des métabolites intracellulaires, ce qui cantonne son utilisation à des réactions extracellulaires. Malgré cette limitation, différentes sondes fluorogéniques comportant des hydrazines ont été synthétisées.¹²⁷ Deux exemples sont présentés en Figure 110 ci-dessous.

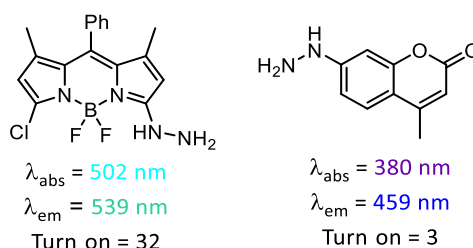
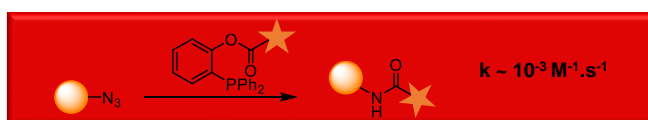


Figure 110 : Dérivés d'hydrazine et leurs propriétés photophysiques (MeOH)

Via un mécanisme de transfert d'électron photo-induit, l'hydrazine permet de quencher la fluorescence du BODIPY et de la coumarine. Les facteurs d'exaltation de fluorescence après réaction restent cependant modestes (32 pour le BODIPY et 3 pour la coumarine).

Avant tout, c'est la cinétique particulièrement lente de cette réaction ($k \approx 10^{-4} - 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) qui représente un désavantage majeur.

- Réaction de Staudinger



La réaction de Staudinger utilisée en chimie bioorthogonale est une modification de la réaction de Staudinger originale, qui consiste à réduire un azoture par une phosphine.

Comme les deux partenaires réactionnels de cette réaction ont des fonctions chimiques absentes des milieux biologiques, il s'agit bien d'une réaction bioorthogonale. Le doublet non liant sur l'atome de phosphore de la phosphine permet de concevoir des sondes fluorogéniques, car il va jouer le rôle de

¹²⁷ O. Dilek and S. L. Bane, *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49 (8), 1413-1416. DOI : [10.1016/j.tetlet.2007.12.052](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.12.052)

quencher. En présence du doublet, un transfert d'électron photoinduit se produit vers le fluorophore et inhibe l'émission de fluorescence. Après oxydation en oxyde de phosphine, la fluorescence est restaurée (Figure 111).¹²⁸

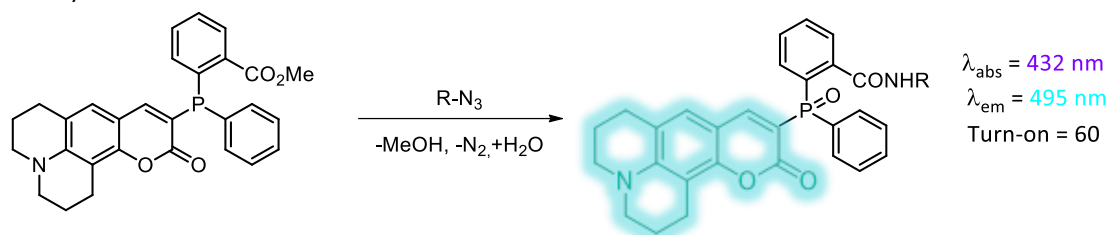
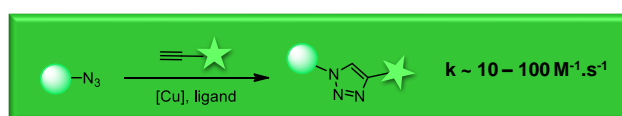


Figure 111 : Exemple de réaction de Staudinger fluorogénique

Cependant, tout comme la réaction présentée précédemment, elle possède une cinétique trop lente ($k \approx 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) qui restreint son champ d'utilisation.

- Cycloadditions de type CuAAC (*Copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*)



Conjointement découverte par Sharpless *et al.* et Meldal *et al.* en 2002, la CuAAC a permis l'émergence des réactions de chimie bioorthogonale.^{129,130} Dès 2004, la première réaction de type CuAAC fluorogénique a vu le jour.^{131,132} H.N. Wang *et al.* ont synthétisé une série de coumarines substituées possédant un azoture en position 3, ainsi qu'une série d'alcynes vrais. Un azoture est ainsi utilisé pour quencher l'émission de fluorescence de coumarines *via* un mécanisme de type PeT. L'efficacité de ce quenching est cependant largement dépendante des groupements R_1 et R_2 utilisés, tout comme les propriétés des triazoles obtenues. En effet, ces derniers possèdent des longueurs d'onde d'absorption comprises entre 298 et 445 nm et des maxima d'émission compris entre 388 et 521 nm. Il s'agit d'une preuve de concept qualitative car les expériences ont été réalisées avec un lecteur de plaques pour constater le rétablissement ou non de la fluorescence, mais aucun facteur d'exaltation n'a été mesuré.

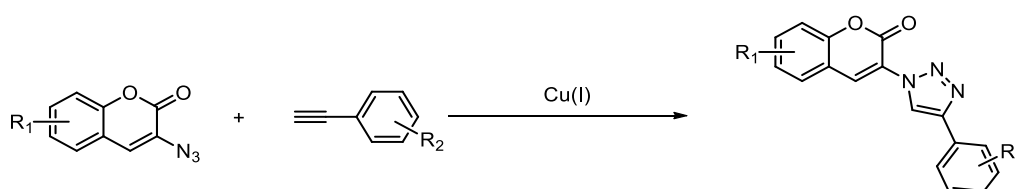


Figure 112 : Première réaction de CuAAC fluorogénique

Par la suite, diverses structures ont été développées afin d'augmenter les longueurs d'onde d'absorption et d'émission des sondes fluorogéniques comportant des azotures. Ainsi en 2015, C. Bertozzi *et al.* ont synthétisé une série de sondes basées sur un squelette de type rhodamine. Ces sondes couvrent la quasi-totalité du spectre du visible et possèdent des facteurs d'exaltation de fluorescence compris entre 24 et 173 (Figure 113).

¹²⁸ P. Shieh and C. R. Bertozzi, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (46), 9307-9320. DOI : [10.1039/C4OB01632G](https://doi.org/10.1039/C4OB01632G)

¹²⁹ V. V. Rostovtsev *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596-2599. DOI : [10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4)

¹³⁰ C. W. Tornøe *et al.*, *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057-3064. DOI : [10.1021/jo011148j](https://doi.org/10.1021/jo011148j)

¹³¹ K. Sivakumar *et al.*, *Org. Lett.* **2004**, *6* (24), 4603-4606. DOI : [10.1021/ol047955x](https://doi.org/10.1021/ol047955x)

¹³² C. Le Droumaguet *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1233-1239. DOI : [10.1039/B901975H](https://doi.org/10.1039/B901975H)

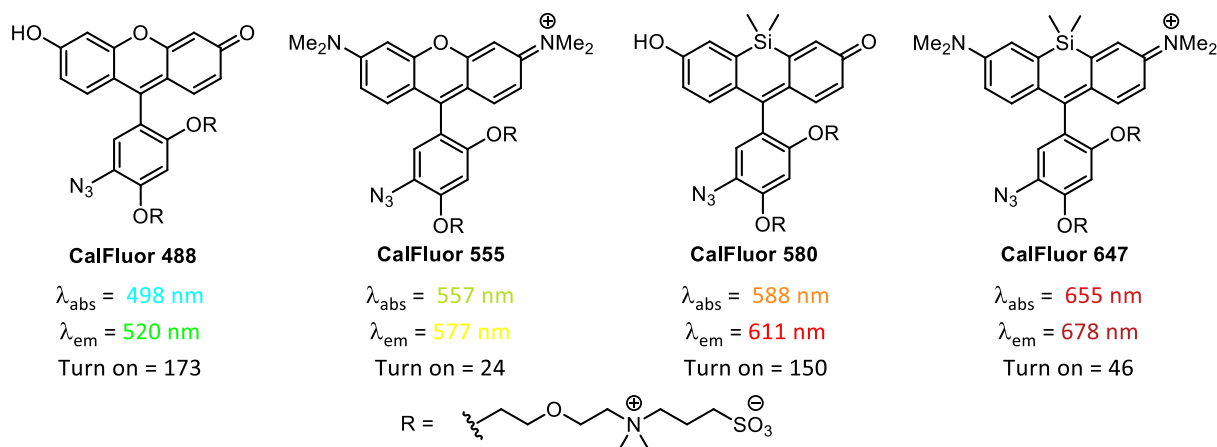
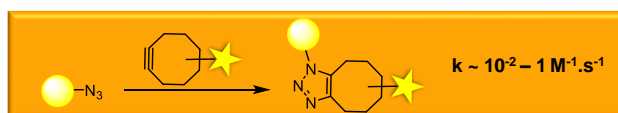


Figure 113 : Sondes développées par C. Bertozzi et al. et leurs propriétés photophysiques dans le PBS

Une stratégie alternative consiste à développer des alcynes fluorogéniques, mais cela reste un domaine relativement peu développé.^{133,134}

Très prometteuse au départ, la cycloaddition de type CuAAC nécessite néanmoins une catalyse au Cu(I), un inconvénient de taille car l'utilisation de cet ion présente une toxicité pour les cellules *via* la génération d'espèces réactives de l'oxygène.¹³⁵ C. Bertozzi *et al.* ont ainsi mis en évidence qu'une concentration en Cu(I) supérieure à 500 μM pendant plus d'une heure était délétère pour les cellules.¹³⁶ Par ailleurs, l'utilisation de Cu(I) à des concentrations inférieures ne permet pas d'atteindre des vitesses de réaction suffisantes. Pour pallier ce problème de toxicité, des ligands de type polytriazole visant à complexer le Cu(I) afin d'améliorer la cinétique de ces réactions, et donc permettre de diminuer la quantité de cuivre utilisée, ont été développés.^{137,138,139} Bien souvent, ils ne permettent cependant pas de s'affranchir totalement de la nocivité de cet ion.

- Cycloadditions de type SPAAC (*Strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*)



Ainsi, en 2004, une version alternative sans catalyseur a été développée par C. Bertozzi et son équipe afin de marquer des glycanes extracellulaires.¹⁴⁰ En utilisant un alcyne contraint qui possède une réactivité accrue, la SPAAC permet de faire réagir ce dernier avec un azoture sans autre partenaire réactionnel. Cependant, l'utilisation de cette réaction *in cellulo* peut être limitée par des réactions secondaires qui peuvent se produire entre l'alcyne contraint et des nucléophiles présents sur des biomolécules, par exemple les thiols des résidus cystéine.^{141,142} Par ailleurs, le désavantage majeur de ce type de réactions reste sa cinétique très lente par rapport à son analogue catalysé au cuivre : les SPAAC sont en moyenne 10 à 100 fois plus lentes que les CuAAC. La première réaction de SPAAC étudiée possède par exemple une constante de vitesse de $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 114).

¹³³ Z. Zhou and C. J. Fahrni, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (29), 8862-8863. DOI : [10.1021/ja049684r](https://doi.org/10.1021/ja049684r)

¹³⁴ F. Friscourt *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (45), 18809-18815. DOI : [10.1021/ja309000s](https://doi.org/10.1021/ja309000s)

¹³⁵ V. Hong *et al.*, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21* (10), 1912-1916. DOI : [10.1021/bc100272z](https://doi.org/10.1021/bc100272z)

¹³⁶ E. M. Sletten and C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (38), 6974-6998. DOI : [10.1002/anie.200900942](https://doi.org/10.1002/anie.200900942)

¹³⁷ T. R. Chan *et al.*, *Org. Lett.* **2004**, *6* (17), 2853-2855. DOI : [10.1021/ol0493094](https://doi.org/10.1021/ol0493094)

¹³⁸ S. I. Presolski *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (41), 14570-14576. DOI : [10.1021/ja105743g](https://doi.org/10.1021/ja105743g)

¹³⁹ V. Bevilacqua *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (23), 5872-5876. DOI : [10.1002/anie.201310671](https://doi.org/10.1002/anie.201310671)

¹⁴⁰ N. J. Agard *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046-15047. DOI : [10.1021/ja044996f](https://doi.org/10.1021/ja044996f)

¹⁴¹ P. V. Chang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107* (5), 1821-1826. DOI : [10.1073/pnas.0911116107](https://doi.org/10.1073/pnas.0911116107)

¹⁴² H. Tian *et al.*, *Chem. Commun.* **2016**, *52* (31), 5451-5454. DOI : [10.1039/C6CC01321J](https://doi.org/10.1039/C6CC01321J)

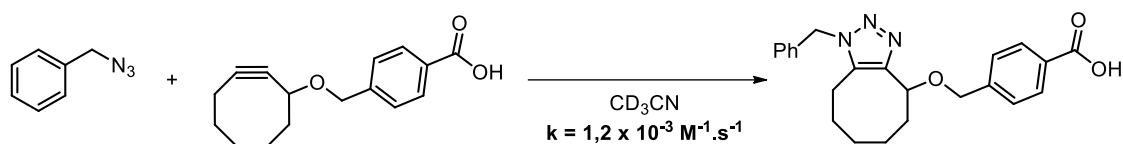


Figure 114 : Réaction entre l'azoture de benzyle et une cyclooctyne

Afin de contourner cette limitation, de nombreuses cyclooctynes ont été développées (Figure 115).^{143,144} En 2006 puis en 2007, le développement d'analogues fluorés de cyclooctyne (**MOFO** et **DIFO**) a permis de multiplier successivement par 3 puis par 60 la vitesse de la réaction avec l'azoture de benzyle (par rapport à la cyclooctyne non substituée).^{145,146} L'ajout d'atome de fluor permet en effet d'abaisser l'énergie de la LUMO de la cyclooctyne, et donc d'augmenter sa réactivité. En 2008, C.-J. Boons *et al.* ont développé la première dibenzocyclooctyne, le **DIBO**.¹⁴⁷ Plusieurs autres composés comme le **DIBAC** ou le **BARAC** ont ensuite vu le jour. L'augmentation du nombre d'atomes hybridés sp^2 dans ces structures permet d'augmenter leur réactivité. Ces dérivés alcyne contraints présentent cependant parfois un manque de stabilité, comme c'est le cas pour le **DIFBO** qui se trimérise spontanément en solution.¹⁴⁸

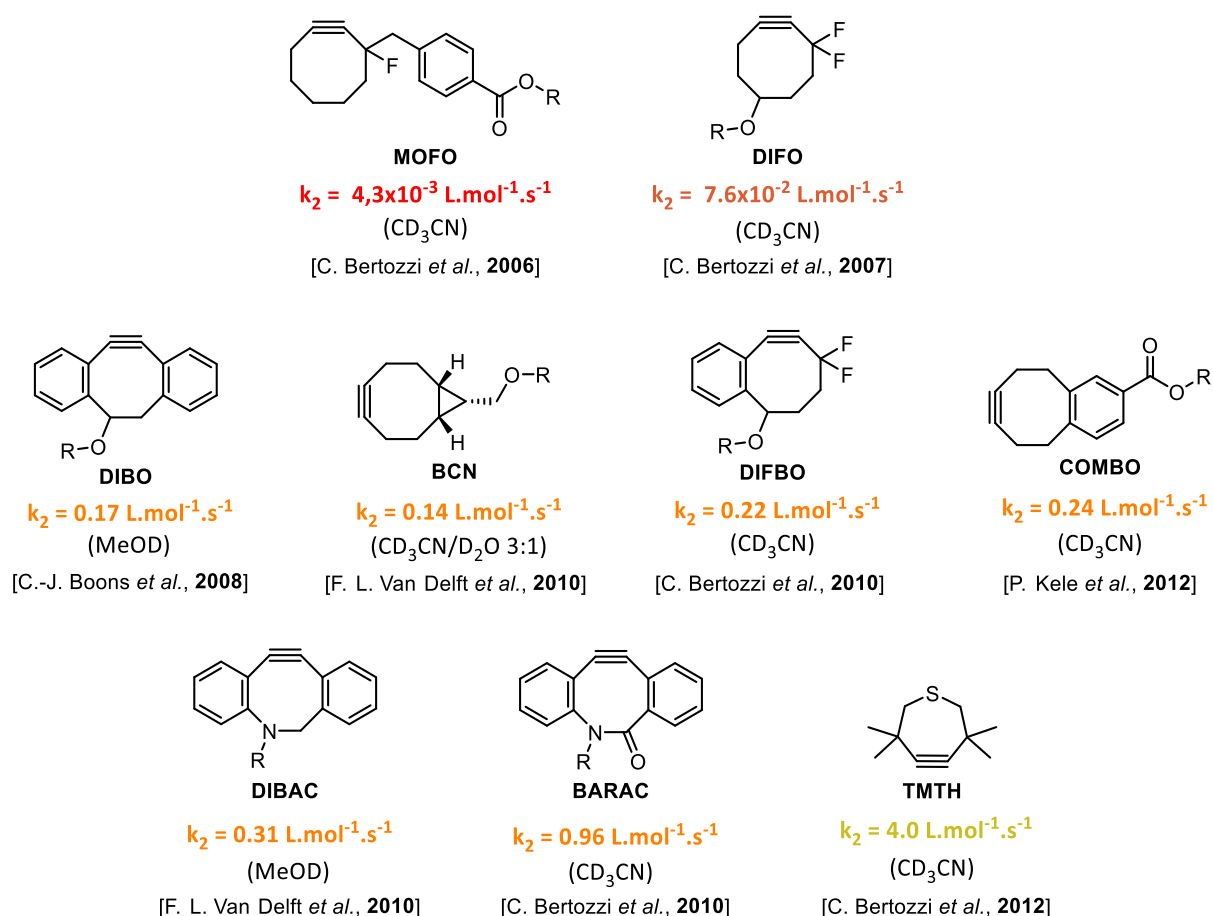


Figure 115 : Exemples de cyclooctynes développées pour améliorer la cinétique de la SPAAC et leur constante de vitesse, mesurée à température ambiante (réaction avec l'azoture de benzyle)

¹⁴³ M. King and A. Wagner, *Bioconjug. Chem.* **2014**, 25 (5), 825-839. DOI : [10.1021/bc500028d](https://doi.org/10.1021/bc500028d)

¹⁴⁴ J. Dommerholt *et al.*, *Top. Curr. Chem.* **2016**, 374 (2), 16. DOI : [10.1007/s41061-016-0016-4](https://doi.org/10.1007/s41061-016-0016-4)

¹⁴⁵ N. J. Agard *et al.*, *ACS Chem. Biol.* **2006**, 1 (10), 644-648. DOI : [10.1021/cb6003228](https://doi.org/10.1021/cb6003228)

¹⁴⁶ J. M. Baskin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, 104 (43), 16793-16797. DOI : [10.1073/pnas.0707090104](https://doi.org/10.1073/pnas.0707090104)

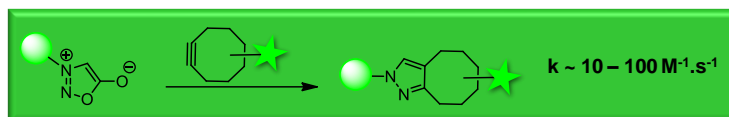
¹⁴⁷ X. Ning *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47 (12), 2253-2255. DOI : [10.1002/anie.200705456](https://doi.org/10.1002/anie.200705456)

¹⁴⁸ E. M. Sletten *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (33), 11799-11805. DOI : [10.1021/ja105005t](https://doi.org/10.1021/ja105005t)

La recherche de nouveaux partenaires alcyne contraint présentant une meilleure réactivité est toujours d'actualité.¹⁴⁹ Jusqu'à présent, le composé présentant la cinétique la plus rapide reste le **TMTH** présenté en Figure 115, développé en 2012.¹⁵⁰ Les valeurs de constante de vitesse présentées restent cependant à nuancer car elles sont hautement dépendantes du solvant utilisé. Les cinétiques sont souvent réalisées en milieu organique, ce qui contribue à parfois sous-estimer ces valeurs. En effet, A. Wagner et son équipe ont montré très récemment que le plasma sanguin permettait par exemple de multiplier par 70 la vitesse de réaction entre le BCN et un azoture modèle, par rapport à la même réaction dans le méthanol.¹⁵¹

En conclusion, les différentes structures développées ont permis de multiplier par 100 environ les constantes de vitesse des réactions de type SPAAC. Malheureusement, l'augmentation dans la réactivité est liée à l'introduction de groupements qui contribuent à augmenter significativement l'hydrophobicité de ces structures. Cela engendre ainsi des difficultés à franchir les membranes. Cette réaction conçue au départ pour l'étude de domaines extracellulaires montre ainsi rapidement ses limites et se montre peu compatible avec l'expérimentation en cellules vivantes. L'utilisation de cette réaction reste néanmoins largement répandue de nos jours, notamment grâce à la très large gamme de partenaires fluorophore-alcyne contraint et fluorophore-azoture actuellement commercialisée.

- Cycloadditions de type SPSAC (*Strain-promoted sydnone-alkyne cycloaddition*)



Les sydnones sont des hétérocycles mésoioniques qui sont depuis peu utilisés en chimie click. C'est en effet en 2013 que F. Taran et son groupe mettent en évidence la première réaction biocompatible avec une sydnone.¹⁵² Depuis, diverses améliorations ont permis de rendre cette réaction fluorogénique.^{153,154} En premier lieu, divers sydnones comportant un dérivé vinylpyridinium ont été synthétisées (Figure 116). L'extension de la conjugaison permet un déplacement bathochrome pour l'absorption et pour l'émission. En revanche, ce dérivé vinylpyridinium adresse aux mitochondries (cation lipophile), ce qui restreint l'utilisation de ce composé à ce compartiment subcellulaire.

¹⁴⁹ J. M. Dones *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (25), 9489-9497. DOI : [10.1021/jacs.1c03133](https://doi.org/10.1021/jacs.1c03133)

¹⁵⁰ G. de Almeida *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (10), 2443-2447. DOI : [10.1002/anie.201106325](https://doi.org/10.1002/anie.201106325)

¹⁵¹ D. Warther *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19* (23), 5063-5067. DOI : [10.1039/D1OB00529D](https://doi.org/10.1039/D1OB00529D)

¹⁵² S. Kolodych *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (46), 12056-12060. DOI : [10.1002/anie.201305645](https://doi.org/10.1002/anie.201305645)

¹⁵³ E. Decuypère *et al.*, *Chem. Commun.* **2018**, *54* (76), 10758-10761. DOI : [10.1039/C8CC06070C](https://doi.org/10.1039/C8CC06070C)

¹⁵⁴ L. Plougastel *et al.*, *Chem. Commun.* **2019**, *55* (31), 4582-4585. DOI : [10.1039/C9CC01458F](https://doi.org/10.1039/C9CC01458F)

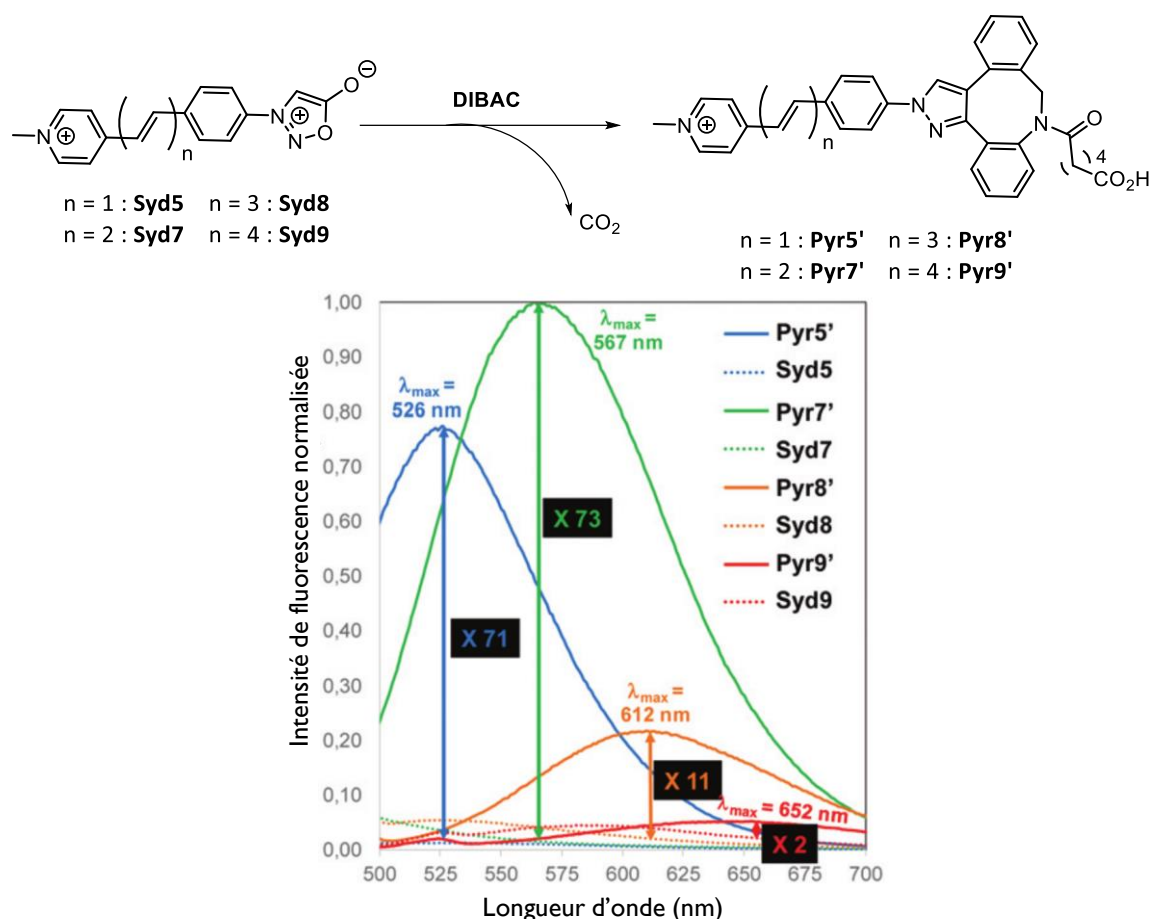


Figure 116 : Spectres d'émission de fluorescence normalisés des composés **Syd5** à **Syd9** et **Pyr5'** à **Pyr9'**.
Illustration adaptée de [L. Plougastel et al., 2019]

Afin de s'affranchir de l'adressage aux mitochondries, quelques dérivés de coumarine comportant une sydnone ont été développés. Un exemple est présenté en Figure 117 ci-dessous.¹⁵³

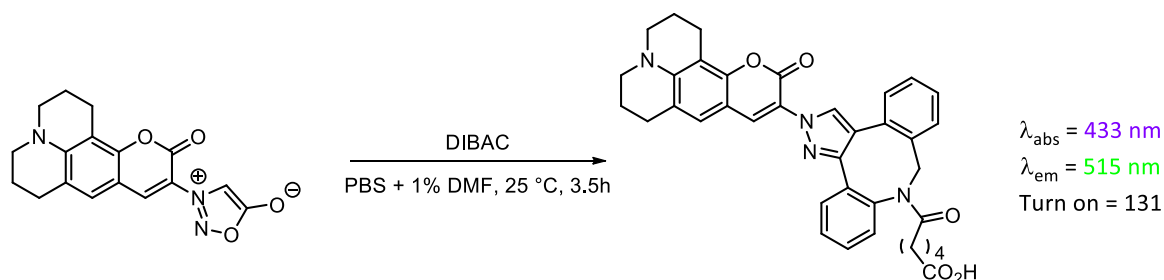


Figure 117 : Réaction entre une sydnone fluorogénique et le DIBAC

Cette sonde fluorogénique présente une exaltation remarquable, mais son absorption dans le violet et son émission dans le vert constituent son désavantage majeur. Un des défis à relever reste ainsi l'extension de cette réaction à des sydnones couplées à des fluorophores dont les longueurs d'onde d'absorption et d'émission sont davantage décalées vers le rouge.

2) Cycloadditions de type IEDDA (*Inverse electron demand Diels-Alder*)

Cette réaction consiste, le plus souvent, à faire réagir une tétrazine avec un diène selon une réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse, pour obtenir une pyridazine comme l'illustre la Figure 118 en page suivante.

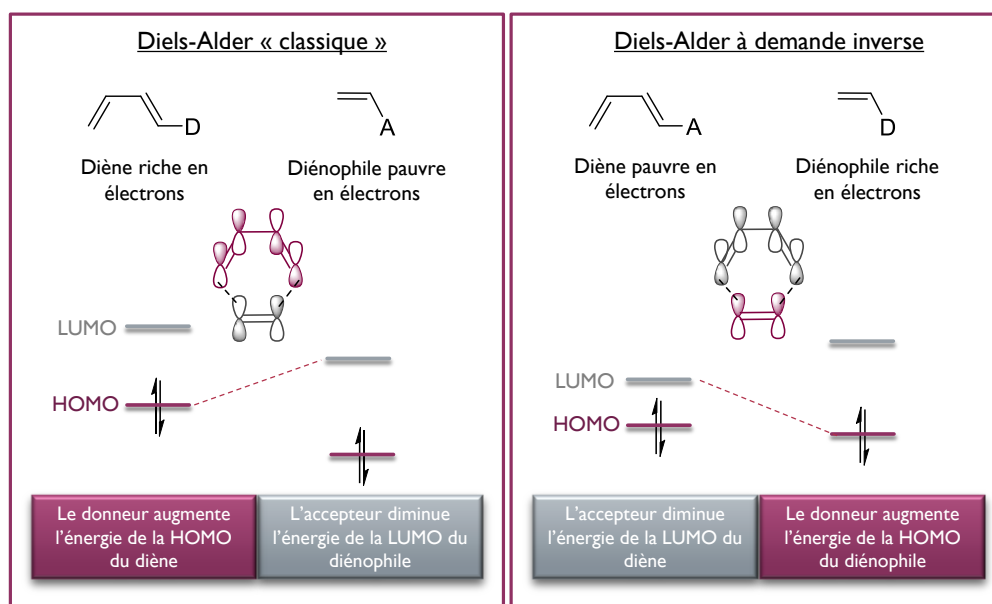
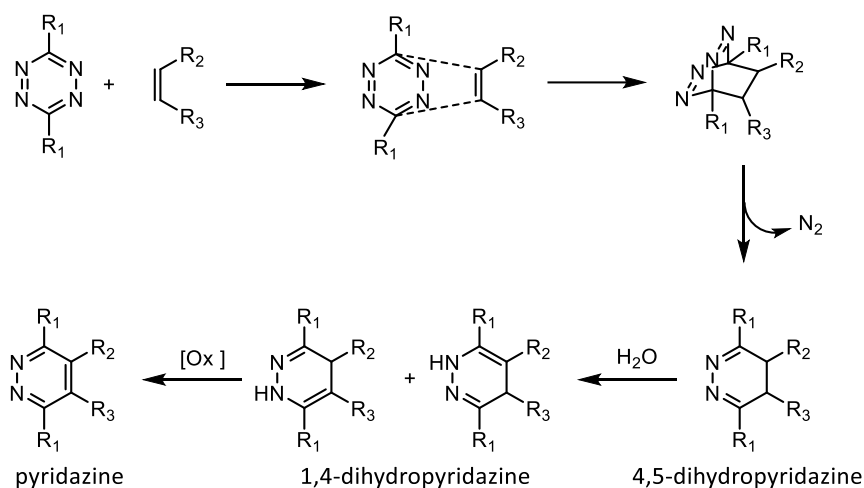


Figure 118 : Mécanisme de la réaction IEDDA

Contrairement à une réaction de Diels-Alder classique, où le diène est enrichi en électron afin d'augmenter l'énergie de sa HOMO et le diénophile est appauvri en électron afin d'abaisser l'énergie de sa LUMO ; c'est dans ce cas le diène qui est appauvri en électrons, et le diénophile qui est enrichi. C'est pourquoi cette réaction est qualifiée d' « à demande électronique inverse ».

Parmi toutes les réactions bioorthogonales développées jusqu'à présent, les cycloadditions de type IEDDA (*Inverse electron demand Diels-Alder*) apparaissent particulièrement prometteuses : sélectives, réalisables sans catalyseur, elles possèdent des vitesses de réaction très élevées (constantes de vitesse comprise entre 1 et 10^6 L.mol⁻¹.s⁻¹) et sont par conséquent réalisables *in vivo*. Ce sont ainsi celles qui respectent actuellement le plus les critères de la chimie bioorthogonale. Jusqu'alors peu développé, ce type de réactions rencontre aujourd'hui un intérêt croissant, notamment en raison du développement de nouvelles méthodes de synthèse des tétrazines, ce qui permet d'accéder à des structures plus diverses.¹⁵⁵

Différents partenaires réactionnels peuvent réagir avec les tétrazines. Un échantillon non exhaustif de ces partenaires est présenté en Figure 119. Il s'agit uniquement de présenter un ordre de grandeur des constantes de vitesse, car les cinétiques des réactions mises en jeu sont très dépendantes du solvant et toutes les constantes de vitesse n'ont pas été mesurées dans le même solvant.

¹⁵⁵ H. Wu and N. K. Devaraj, *Acc. Chem. Res.* **2018**, 51 (5), 1249-1259. DOI : [10.1021/acs.accounts.8b00062](https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00062)

Parmi ces partenaires, deux types sont majoritairement utilisés : les cyclooctynes et les *trans*-cyclooctènes.¹⁵⁶ En revanche, les dibenzocyclooctynes ne réagissent pas avec les tétrazines.

Différents effets permettent d'augmenter la réactivité de la cyclooctyne et du *trans*-cyclooctène.¹⁵⁷ En particulier, c'est l'augmentation de la tension de cycles qui permet d'accroître drastiquement les constantes de vitesse. Par exemple, l'introduction d'un cyclopropane sur le BCN permet de multiplier par 50 environ la constante de vitesse de la réaction par rapport à celle avec la cyclooctyne non substituée.^{158,159}

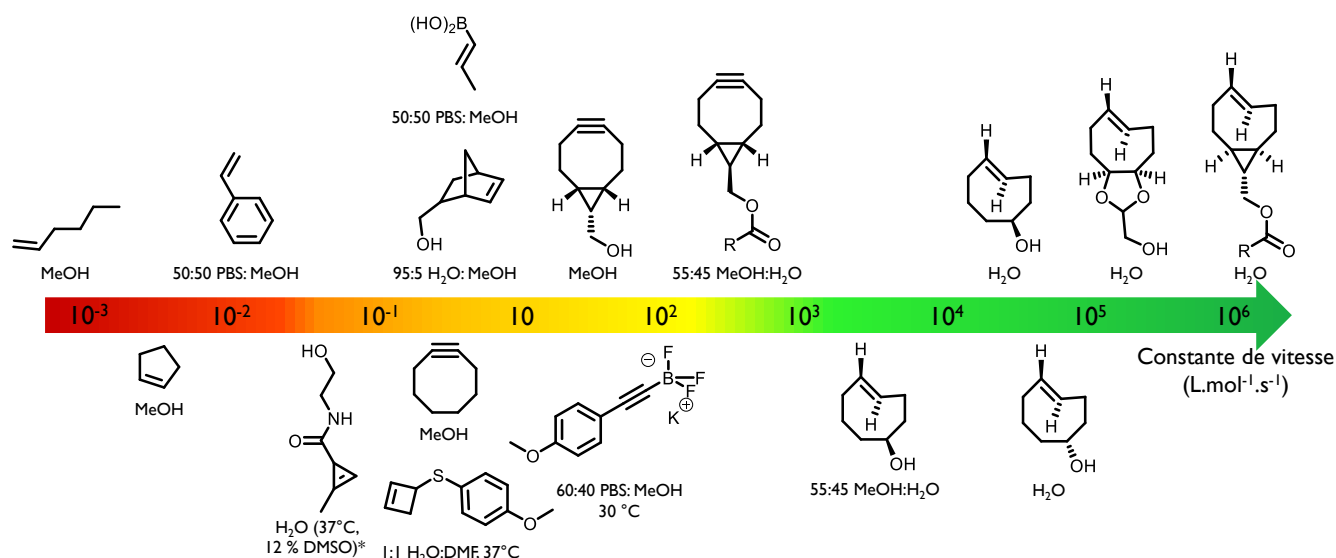


Figure 119 : Ordres de grandeur des constantes de réaction entre les partenaires ci-dessus et la dipyridyltétrazine à 25 °C (à 37 °C avec la benzylalcooltétrazine pour le cyclopropène)

D'autres partenaires comme les norbornènes, cyclobutènes, acides vinylboroniques, styrènes sont plus anecdotiques et présentent un usage plus limité.^{160,161,162} C'est également le cas des aryléthynyltrifluoroborates développés très récemment, qui sont par ailleurs peu biocompatibles car ils nécessitent l'ajout de chlorure d'aluminium (III).¹⁶³

3) Diels-Alder à demande électronique inverse fluorogénique : état de l'art

Cette partie présente de manière non exhaustive la littérature sur les réactions de Diels-Alder à demande électronique inverse fluorogéniques. En effet, par souci de concision, seuls les travaux les plus significatifs seront développés dans cette partie, notamment afin de montrer l'évolution de cette thématique de recherche depuis son émergence il y a une dizaine d'années environ.

En 2010, Weissleder *et al.* ont développé la première sonde fluorogénique contenant un motif tétrazine ayant une application dans le domaine de la biologie.^{164,165} Cette dernière est présentée en Figure 120 page suivante.

¹⁵⁶ A. C. Knall and C. Slugovc, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (12), 5131-51342. DOI : [10.1039/C3CS60049A](https://doi.org/10.1039/C3CS60049A)

¹⁵⁷ T. Deb *et al.*, *Chem. Rev.* **2021**, 121 (12), 6850-6914. DOI : [10.1021/acs.chemrev.0c01013](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01013)

¹⁵⁸ W. Chen *et al.*, *Chem. Commun.* **2012**, 48 (12), 1736-1738. DOI : [10.1039/C2CC16716F](https://doi.org/10.1039/C2CC16716F)

¹⁵⁹ A. Darko *et al.*, *Chem. Sci.* **2014**, 5 (10), 3770-3776. DOI : [10.1039/C4SC01348D](https://doi.org/10.1039/C4SC01348D)

¹⁶⁰ J. Sun *et al.*, *Molecules* **2021**, 26 (2), 276. DOI : [10.3390/molecules26020276](https://doi.org/10.3390/molecules26020276)

¹⁶¹ S. Eising *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55 (40), 12243-7. DOI : [10.1002/anie.201605271](https://doi.org/10.1002/anie.201605271)

¹⁶² A. C. Knall *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55 (34), 4763-4766. DOI : [10.1016/j.tetlet.2014.07.002](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.07.002)

¹⁶³ Z. Zawada *et al.*, *Bioconjug. Chem.* **2021**, 32 (8), 1812-1822. DOI : [10.1021/acs.bioconjchem.1c00276](https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00276)

¹⁶⁴ N. K. Devaraj *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49 (16), 2869-2872. DOI : [10.1002/anie.200906120](https://doi.org/10.1002/anie.200906120)

¹⁶⁵ N. K. Devaraj and R. Weissleder, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44 (9), 816-827. DOI : [10.1021/ar200037t](https://doi.org/10.1021/ar200037t)

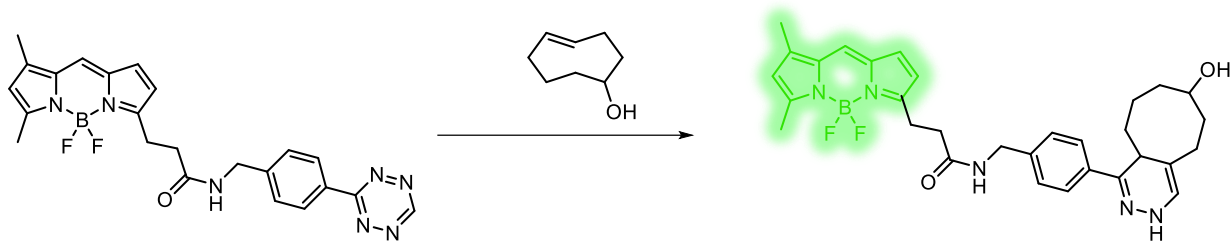


Figure 120 : Première sonde fluorogénique comportant un motif tétrazine, synthétisée par Weissleder et al.

Les auteurs se sont interrogés sur le mécanisme permettant à la tétrazine d'inhiber la fluorescence du BODIPY. Selon eux, le caractère fluorogénique de cette sonde peut reposer sur un mécanisme de quenching de type FRET ou bien PeT. Pour le FRET, il doit y avoir un recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur. C'est bien le cas ici, car la longueur d'onde du maximum d'émission pour le BODIPY est d'environ 515 nm, alors que la tétrazine absorbe entre 500 et 550 nm. Le caractère fluorogénique de la sonde présentée précédemment repose sur un mécanisme de quenching de type FRET et non de type PeT comme l'ont montré C. Dumas-Verdes *et al.*.¹⁶⁶

Un des inconvénients de ce type de quenching est qu'il n'est pas possible de changer significativement la gamme de longueurs d'onde à laquelle les tétrazines absorbent, ce qui limite l'étendue des sondes fluorogéniques pouvant être développées sur le principe du FRET.

En 2013, ce même groupe a tenté d'améliorer les propriétés fluorogéniques de ce type de sonde en jouant sur la position de la tétrazine par rapport au BODIPY, leur objectif étant de montrer que plus la tétrazine est proche de ce dernier, et plus le quenching de type FRET est efficace.¹⁶⁷ Les différents BODIPY synthétisés sont présentés en Figure 121 ci-dessous.

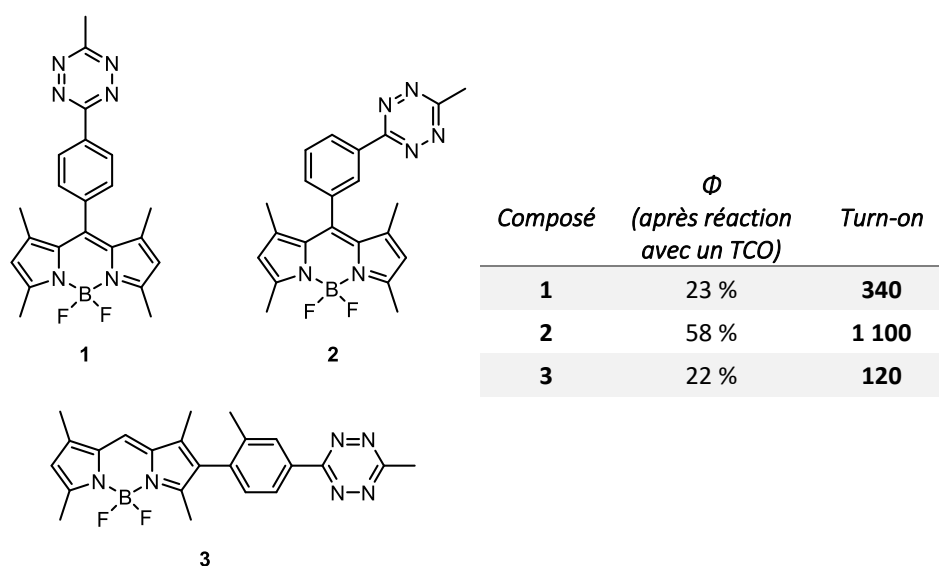


Figure 121 : BODIPY substitués sur différentes positions par des tétrazines et leurs propriétés photophysiques après réaction avec un TCO (trans-cyclooctène) dans l'acétonitrile

De manière surprenante, les ratios des émissions de fluorescence entre la forme tétrazine et la forme « clickée » se sont montrés environ 100 fois supérieurs par rapport au BODIPY comportant un lien « flexible » présenté précédemment (Figure 120). Cette étude montre qu'un mécanisme de quenching de type FRET seul ne permet pas d'expliquer une telle différence et suggère qu'un autre type de quenching, impliquant un transfert d'énergie à travers les liaisons est responsable d'une telle différence : le TBET.

¹⁶⁶ C. Dumas-Verdes *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010 (13), 2525-2535. DOI : [10.1002/ejoc.200900874](https://doi.org/10.1002/ejoc.200900874)

¹⁶⁷ J. C. Carlson *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52 (27), 6917-6920. DOI : [10.1002/anie.201301100](https://doi.org/10.1002/anie.201301100)

Cette découverte a ensuite permis d'étendre la gamme de longueur d'onde d'absorption et d'émission de sondes fluorogéniques possédant des tétrazines. Plus récemment, en 2017, Wieczorek *et al.* ont ainsi synthétisé différents xanthènes fluorogéniques, qui émettent entre 520 et 665 nm selon leur structure, une fois la réaction avec un *trans*-cyclooctène effectuée (Figure 122).¹⁶⁸

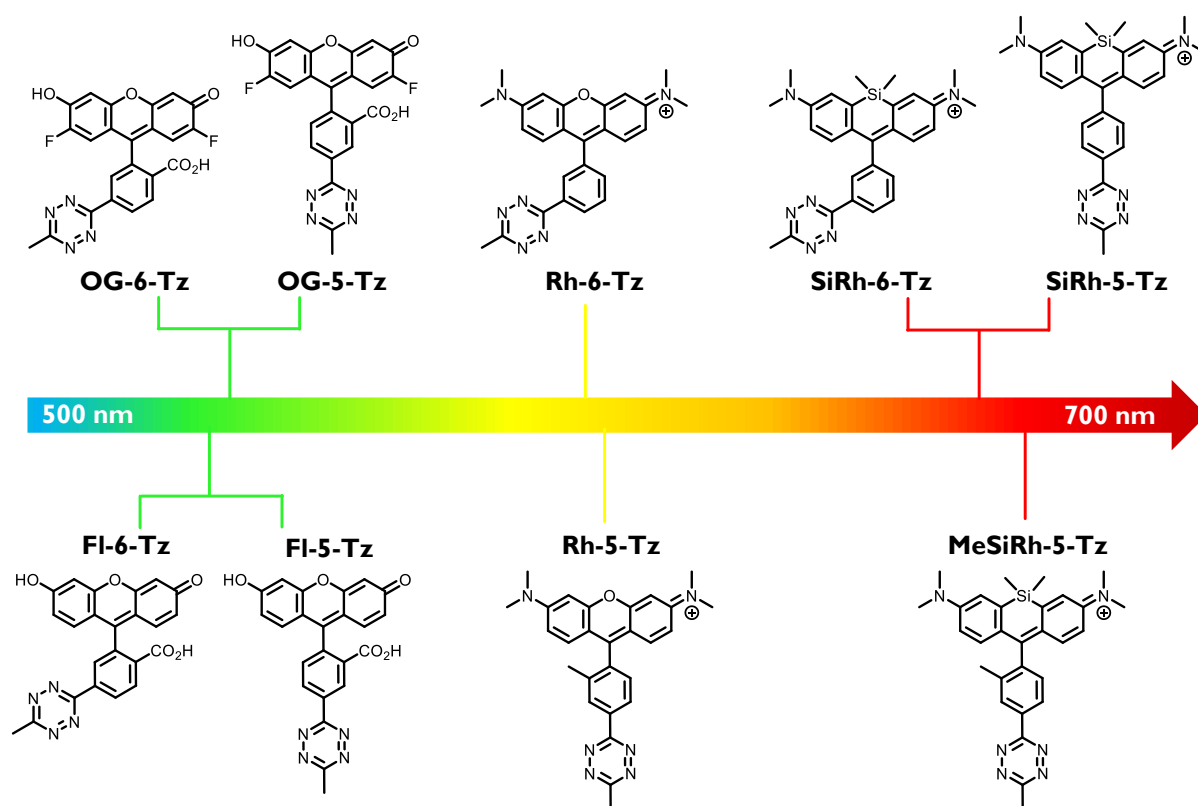


Figure 122 : Sondes fluorogéniques synthétisées par Wieczorek *et al.* classées selon leur longueur d'onde d'émission.
Figure adaptée de [A. Wieczorek *et al.*, 2017]¹⁶⁸

Bien que ces sondes puissent être utilisées en cellules vivantes, elles présentent une faible exaltation de fluorescence entre la forme tétrazine et la forme clickée, et des rendements quantiques faibles. Ainsi, les sondes qui émettent au-delà de 580 nm possèdent des facteurs d'exaltation compris entre 1.8 et 3.7 ainsi que des rendements quantiques inférieurs à 1 % pour la forme clickée, ce qui représente une limitation pour leur utilisation en cellules.

Composé	$\lambda_{max,abs}$ (nm)	$\lambda_{max,em}$ (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	Φ	Turn-on
FI-5-Tz	495	521	57 000	0.4 %	72
FI-6-Tz	495	517	55 000	0.3 %	109
OG-5-Tz	495	524	87 000	0.5 %	60
OG-6-Tz	495	522	70 000	0.4 %	103
Rh-5-Tz	556	580	46 000	0.4 %	22
Rh-6-Tz	554	577	54 000	0.3 %	12
SiRh-5-Tz	650	665	58 000	0.2 %	1.8
SiRh-6-Tz	649	664	62 000	0.2 %	3.7
MeSiRh-5-Tz	651	666	53 000	0.3 %	2.0

Tableau 19 : Propriétés photophysiques des différentes sondes synthétisées par Wieczorek *et al.* dans du PBS

¹⁶⁸ A. Wieczorek *et al.*, *Chem. Sci.* **2017**, 8 (2), 1506-1510. DOI : [10.1039/C6SC03879D](https://doi.org/10.1039/C6SC03879D)

Ces résultats mettent par ailleurs en évidence le double défi à relever pour développer ce type de sonde : d'une part, il faut réussir à quencher la fluorescence du fluorophore, mais aussi réussir à la restaurer après réaction avec le composé cible (Figure 123).¹⁶⁹

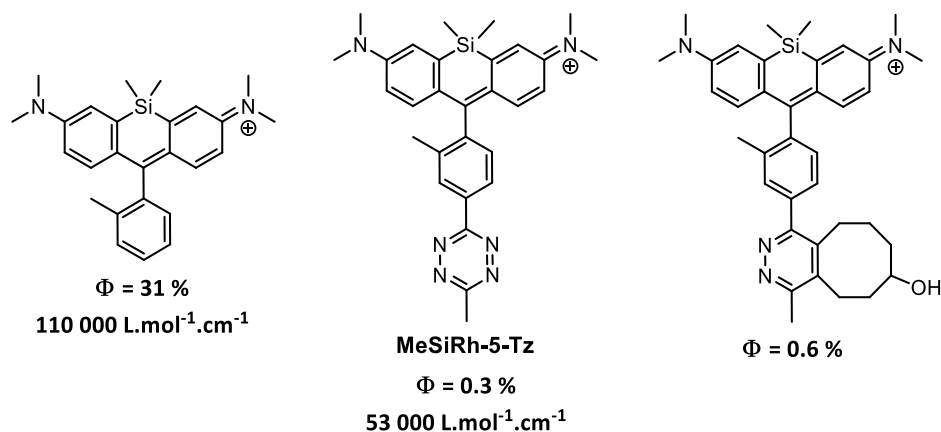
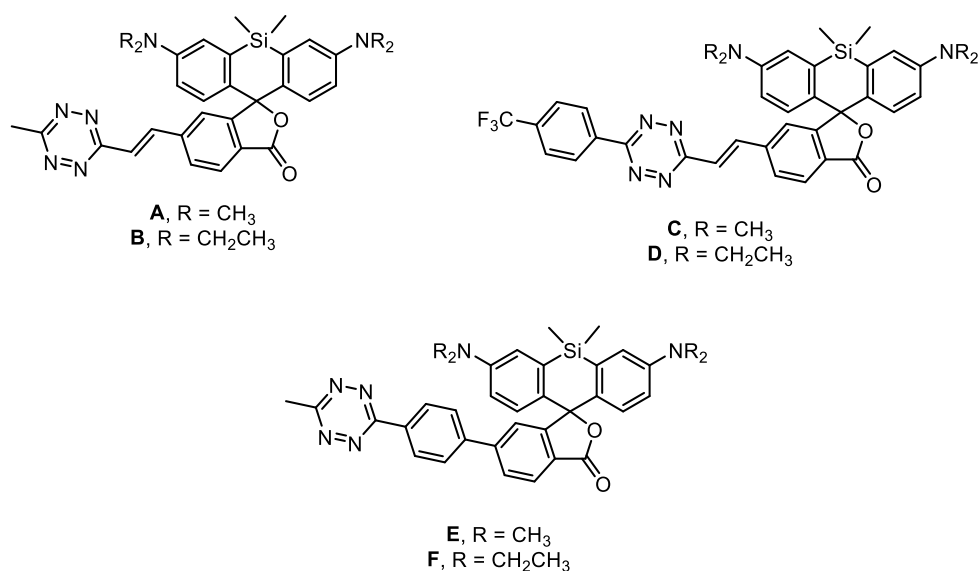


Figure 123 : Propriétés photophysiques dans le PBS (pH = 7,4) de sondes de type SiR avant et après réaction avec le TCO

La même année, E.Koczma *et al.* ont également développé des sondes basées sur un squelette de type SiR.¹⁷⁰ Ces sondes sont présentées en Figure 124 ci-dessous.



Composé	$\lambda_{max,abs}$ (nm)	$\lambda_{max,em}$ (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	Φ (%)	Turn-on
A	643 (645)	665 (667)	19 700 (19 200)	1.6 (34)	22
B	653 (652)	671 (672)	20 600 (19 800)	1.5 (80)	49
C	647 (648)	662 (665)	26 200 (22 500)	2.8 (26)	6
D	655 (654)	673 (672)	29 000 (25 600)	3.7 (27)	8
E	645 (644)	660 (660)	23 000 (21 600)	1.2 (34)	31
F	651 (652)	671 (670)	26 000 (23 900)	1.5 (53)	40

Figure 124 : Propriétés photophysiques des différentes sondes avant (et après) réaction avec le TCO dans l'eau (contenant 0.1 % de SDS)

¹⁶⁹ Y. Kushida *et al.*, *Analyst* **2015**, *140* (3), 685-695. DOI : [10.1039/C4AN01172D](https://doi.org/10.1039/C4AN01172D)

¹⁷⁰ E. Koczma *et al.*, *Chem. Commun.* **2017**, *53* (50), 6696-6699. DOI : [10.1039/C7CC02212C](https://doi.org/10.1039/C7CC02212C)

Ces dernières présentent des exaltations remarquables par rapport aux travaux de l'équipe de R. Wombacher décrits précédemment (jusqu'à 49 pour le dérivé B). Néanmoins, l'article ne permet pas totalement de mettre en lumière l'origine de cette fluorogénicité. En effet, les auteurs évoquent que ces ratios de turn-on sont dus à une « double fluorogénicité ». Les dérivés de SiR comportant un acide carboxylique judicieusement positionné existent effectivement sous deux formes : une zwitterionique, qui est fluorescente ; et une deuxième forme présentant une spirolactone, qui n'est pas fluorescente (Figure 125).¹⁷¹

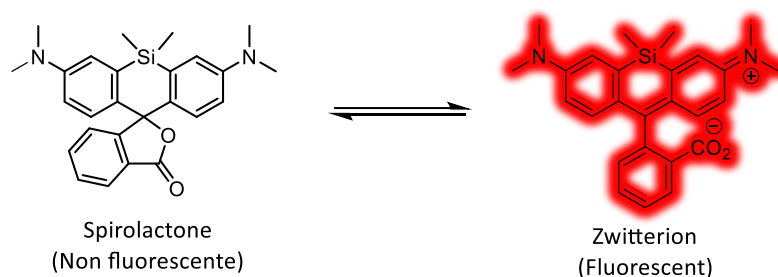
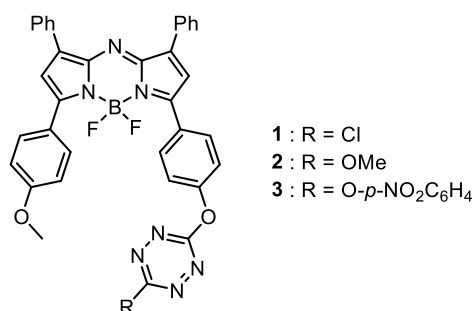


Figure 125 : Formes spirolactone et zwitterionique des dérivés de SiR

Dans l'eau et sans « additifs », ce type de composés forment des agrégats, ce qui conduit à former localement un environnement hydrophobe. Or, la forme spirolactone est majoritaire dans des milieux de constante diélectrique faible, tandis que la forme zwitterionique est favorisée dans des milieux ayant une constante diélectrique élevée. Afin d'obtenir de la forme zwitterionique dans l'eau, c'est-à-dire la forme fluorescente, il est ainsi nécessaire d'ajouter des tensioactifs comme du SDS. Néanmoins, si les expériences sont réalisées toujours dans le même solvant, cet équilibre ne devrait pas influencer sur la fluorogénicité. Dans le cas contraire, la fluorogénicité obtenue résulterait des effets combinés de la forme spirolactone et de la tétrazine, ce qui ne correspond pas à ce qui pourrait être observé en cellules : au sein de celles-ci, la forme zwitterionique est majoritaire. Les valeurs fournies seraient peut-être alors surestimées.

Par ailleurs, les expériences sont réalisées uniquement en cellules fixées : la légende d'une figure stipule que les expériences sont en cellules vivantes mais le protocole associé dans la partie « Matériels & Méthodes » comprend une étape de fixation au paraformaldéhyde.

Afin de pouvoir concevoir des sondes fluorogéniques émettant dans le proche infrarouge, D. O'Shea *et al.* ont synthétisé différents Aza-BODIPY probablement basés sur un mécanisme de quenching de type PeT d'après les auteurs.¹⁷² Les fluorophores ont ainsi été conjugués à des tétrazines substituées par un chlore, un groupement méthoxy ou encore un groupement *p*-nitrobenzyle (Figure 126). La proximité entre la tétrazine et le fluorophore est compatible avec un transfert d'électron photoinduit.



Composé	$\lambda_{max,abs}$ (nm)	$\lambda_{max,em}$ (nm)	Φ	Turn-on
1	673	702	0.7 %	47
2	674	703	5 %	7
3	674	703	0.7 %	8

Figure 126 : Aza-BODIPY fluorogéniques développés par D. O'Shea *et al.* et leurs propriétés photophysiques dans le chloroforme

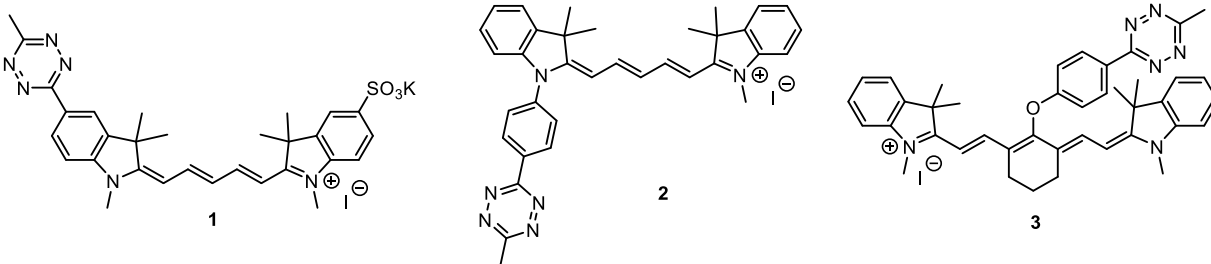
Les tétrazines portant les groupements -Cl et -O-*p*-NO₂C₆H₄ permettent d'annihiler de manière très efficace la fluorescence des sondes associées. Cependant, dans le cas du groupement -OMe, une

¹⁷¹ G. Lukinavičius *et al.*, *Nat. Chem.* **2013**, 5, 132-139. DOI : [10.1038/nchem.1546](https://doi.org/10.1038/nchem.1546)

¹⁷² D. Wu and D. F. O'Shea, *Chem. Commun.* **2017**, 53 (78), 10804-10807. DOI : [10.1039/C7CC06545K](https://doi.org/10.1039/C7CC06545K)

fluorescence résiduelle non négligeable subsiste. Cela peut s'expliquer par le fait qu'un groupement donneur d'électron comme celui-ci abaisse le potentiel d'oxydoréduction de la tétrazine et diminue ainsi sa capacité à se comporter comme un accepteur d'électron. Après réaction avec un dérivé de type BCN (Bicyclo[6.1.0]nonyne), la fluorescence des différentes sondes est restaurée. Malheureusement, aucune preuve de leur utilisation *in cellulo* ou *in vivo* n'a été décrite.

En 2020, des sondes fluorogéniques basées sur des cœurs de type cyanine ont été développées par L. Chen *et al.*¹⁷³ Comme l'illustre la Figure 127 ci-dessous, ces sondes émettent dans l'infrarouge, mais elles fluorescent de manière non négligeable avant même d'avoir réagi. Par ailleurs, l'exaltation entre la forme tétrazine et la forme clickée reste modeste.



Composé	Sans trans-cyclooctène			Après réaction avec le trans-cyclooctène			Turn-on
	$\lambda_{\text{max,abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max,em}}$ (nm)	Φ	$\lambda_{\text{max,abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max,em}}$ (nm)	Φ	
1	658	677	8 %	661	681	30 %	3.7
2	648	676	6 %	648	678	29 %	4.8
3	770	792	6 %	771	791	20 %	3.4

Figure 127 : Sondes de type cyanine développées par L. Chen *et al.*

Plus récemment, en 2021, R. Wombacher et son équipe ont publié une autre série de dérivés SiR fluorogéniques.¹⁷⁴

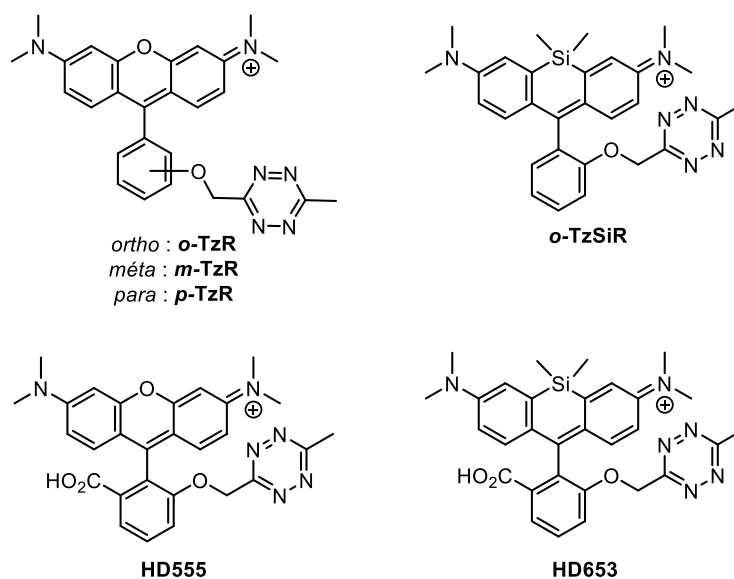


Figure 128 : Sondes fluorogéniques développées par R. Wombacher et son équipe

¹⁷³ L. Chen *et al.*, *Dyes Pigment.* **2020**, 177, 108313. DOI : [10.1016/j.dyepig.2020.108313](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108313)

¹⁷⁴ P. Werther *et al.*, *ACS Cent. Sci.* **2021**, 7 (9), 1561-1571. DOI : [10.1021/acscentsci.1c00703](https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00703)

Composé	$\lambda_{max,abs}$ (nm)	$\lambda_{max,em}$ (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	Φ (%)	Turn-on
o-TzR	557 (557)	583 (582)	55 200 (74 100)	0.3 (44.7)	95
m-TzR	553	578	48 700	2.6	6.9
p-TzR	550	577	64 200	1.6	8.5
HD555	555	581	51 000 (100 000)	0.4 (57.1)	123
o-TzSiR	652	671	21 600	0.7	45
HD653	653 (652)	676 (674)	48 600 (59 200)	2.2 (47.7)	50

Figure 129 : Propriétés photophysiques dans le PBS (pH = 7,4) avant réaction et après réaction avec le BCN (entre parenthèses) des composés développés par R. Wombacher et son équipe

Ces sondes présentent des exaltations remarquables, en particulier pour les dérivés substitués en *ortho* par la tétrazine. Ces différences d'exaltations en fonction des régioisomères peuvent s'expliquer par le type de mécanisme de quenching mis en jeu. R. Wombacher et son équipe ont mis en évidence *via* des expériences d'absorption transitoire qu'il s'agissait soit d'un mécanisme d'échange de type Dexter ou bien d'un transfert d'électron photoinduit, car les constantes de vitesse associées au processus de quenching sont proportionnelles à e^{-R} , où R est la distance chromophore-quencher. L'efficacité de ces deux types de quenching est hautement dépendant de la distance entre le fluorophore et le quencher, et la distance entre la tétrazine et le fluorophore est ici bien inférieure dans le cas du régioisomère *ortho* (Figure 130).

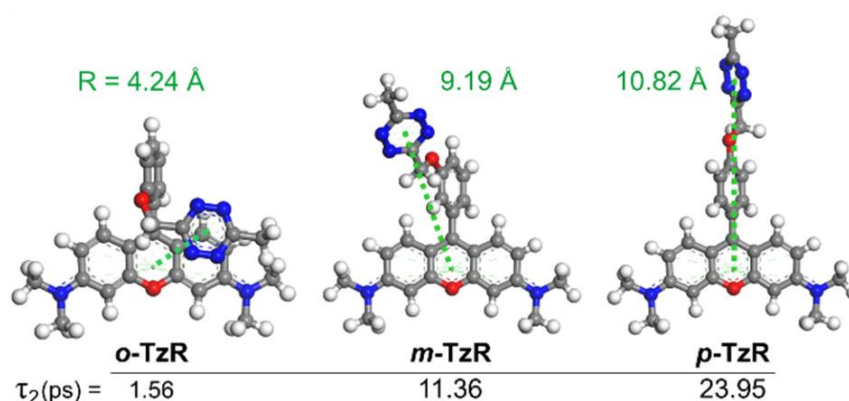


Figure 130 : Distances entre la tétrazine et le fluorophore pour les différents régioisomères, et constantes de temps associées au processus de quenching

Par ailleurs, la dérivatisation des structures de base (**TzSiR** et **TzR**) a permis l'obtention de différents composés utilisables ou non en cellules vivantes selon la position de l'acide carboxylique. Ces composés apparaissent comme étant les plus prometteurs à l'heure actuelle, de par leur haute fluorogénicité et leur capacité à être utilisés en cellules vivantes.

D'autres travaux sur des fluorophores présentant *a priori* des propriétés photophysiques moins intéressantes (coumarine, naphthalimides) ont également été publiés.^{175,176,177,178} En complément, une revue récente sur le sujet est disponible.¹⁷⁹

4) Sondes fluorogéniques de type IEDDA excitables à deux photons

Il existe à ce jour très peu de travaux sur des sondes fluorogéniques excitables à deux photons dont la tétrazine sert de quencher de fluorescence.

¹⁷⁵ J. Galeta *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2020**, *26* (44), 9945-9953. DOI : [10.1002/chem.202001290](https://doi.org/10.1002/chem.202001290)

¹⁷⁶ M. E. Graziotto *et al.*, *RSC Chem. Biol.* **2021**, *2* (5), 1491-1498. DOI : [10.1039/D1CB00128K](https://doi.org/10.1039/D1CB00128K)

¹⁷⁷ E. Nemeth *et al.*, *Biomolecules* **2020**, *10* (3), 397. DOI : [10.3390/biom10030397](https://doi.org/10.3390/biom10030397)

¹⁷⁸ Y. Lee *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *140* (3), 974-983. DOI : [10.1021/jacs.7b10433](https://doi.org/10.1021/jacs.7b10433)

¹⁷⁹ S. K. Choi *et al.*, *Molecules* **2021**, *26* (7), 1868. DOI : [10.3390/molecules26071868](https://doi.org/10.3390/molecules26071868)

Une première série de fluorophores a été développée par S. B. Park en 2020.¹⁸⁰ Les structures des sondes ainsi que leurs caractéristiques photophysiques sont présentées en Figure 131 ci-dessous.

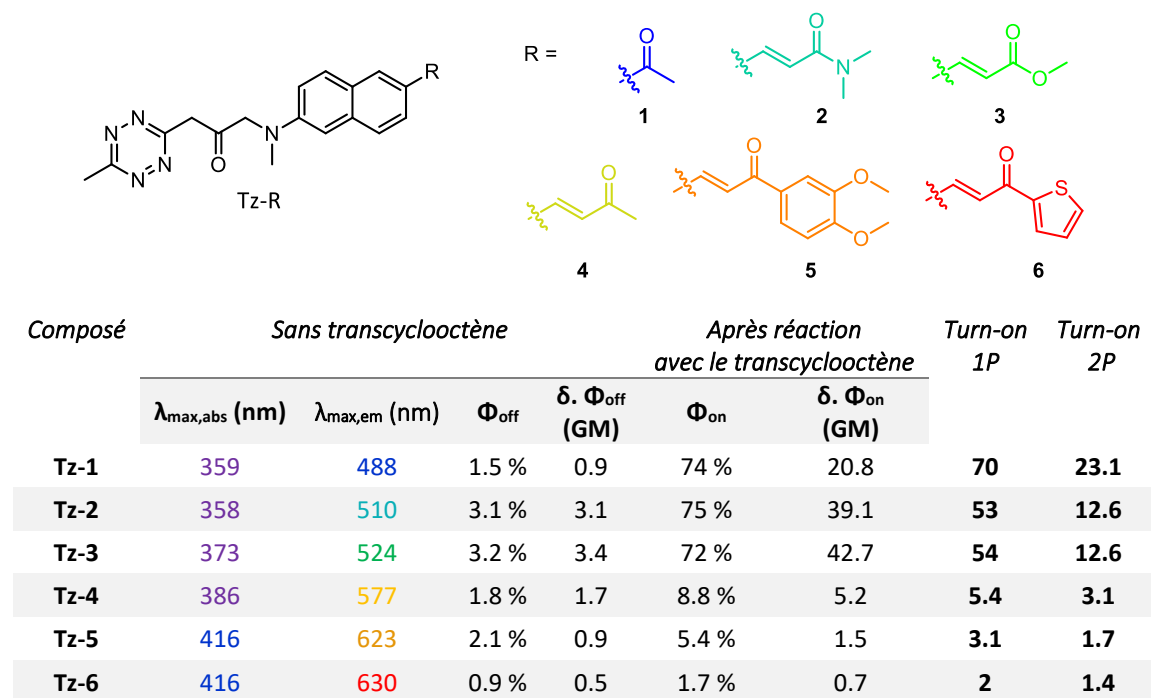


Figure 131 : Propriétés photophysiques des sondes bioorthogonales excitables à deux photons développées par S. B. Park

La modification du groupement R permet de moduler les propriétés photophysiques du squelette de base. Ils ont ainsi développé 6 sondes ayant des émissions allant du bleu au rouge. Néanmoins, comme pour les sondes présentées précédemment, l'exaltation de fluorescence entre la forme avant réaction et la forme clickée reste relativement faible (3.1 au maximum) pour les sondes dont l'émission est jaune à rouge. De plus, la forme non clickée est déjà fluorescente quel que soit le substituant, ce qui conduit à un faible rapport signal sur bruit. Par ailleurs, les sections efficaces d'absorption des sondes sont très modestes : au maximum 100 GM quelle que soit la forme considérée. Les brillances à deux photons sont par conséquent extrêmement faibles, en particulier pour les sondes qui émettent au-delà de 530 nm (brillance comprise entre 0.7 et 5.2 GM).

Une différence conséquente entre les facteurs turn-on un photon et deux photons peut par ailleurs être constatée. Comme la tétrazine n'est pas conjuguée au fluorophore, il paraît difficile d'expliquer cette différence par la modification de structure engendrée par la réaction.

Très récemment, H. Wu et son équipe ont développé une seconde série de sondes fluorogéniques excitables à deux photons dont le quencher est un motif tétrazine. Elle est présentée en Figure 132.¹⁸¹

¹⁸⁰ D. Kim *et al.*, *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31* (5), 1545-1550. DOI : [10.1021/acs.bioconjchem.0c00197](https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00197)

¹⁸¹ W. Mao *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60* (5), 2393-2397. DOI : [10.1002/anie.202011544](https://doi.org/10.1002/anie.202011544)

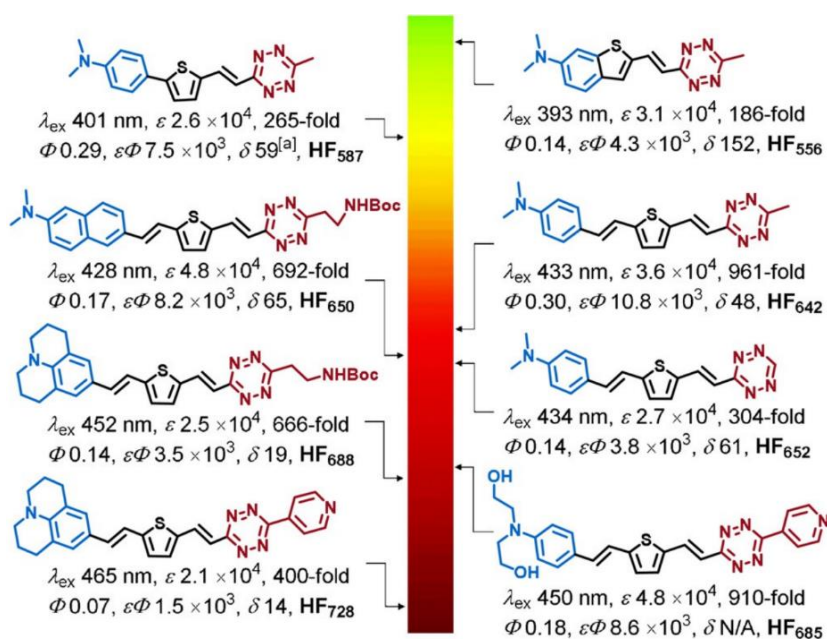


Figure 132 : Structure des sondes fluorogéniques développées par H. Wu et al. et leurs propriétés photophysiques après réaction avec un dérivé de type BCN.

Ces sondes présentent des exaltations de fluorescentes jusqu'à 1 000 entre la forme clickée et non clickée. En revanche, les valeurs de sections efficaces d'absorption biphotonique des composés émettant dans le rouge sont particulièrement faibles (entre 14 et 65 GM). Bien que des exemples d'application en cellules vivantes et même *in vivo* soient présentés, il est certain qu'une puissance très élevée a été utilisée pour les expériences en microscopie biphotonique, ce qui est dommageable pour l'échantillon.

En conclusion, l'étude détaillée de ces travaux permet de mettre en évidence qu'il n'existe pas réellement de sondes fluorogéniques excitables à deux photons ayant pour motif quencher une tétrazine : soit les sondes développées possèdent des exaltations très faibles, soit elles n'émettent pas à des longueurs d'onde se trouvant dans le rouge/proche IR.

En utilisant les composés présentés dans la première partie de ce manuscrit, l'objectif de cette seconde partie sera donc de développer une sonde fluorogénique excitable à deux photons, dont la fluorescence est quenchée *via* un motif tétrazine.

II. Design des sondes

1) Généralités

Le squelette acridane développé précédemment sera utilisé pour concevoir les sondes fluorogéniques. Le fluorophore **Acrid-Py** présente en effet des propriétés d'absorption biphotonique très intéressantes (3 630 GM à 870 nm) et l'azote de l'acridane constitue un « point d'accroche » accessible pour introduire les groupements dérivés de tétrazine.

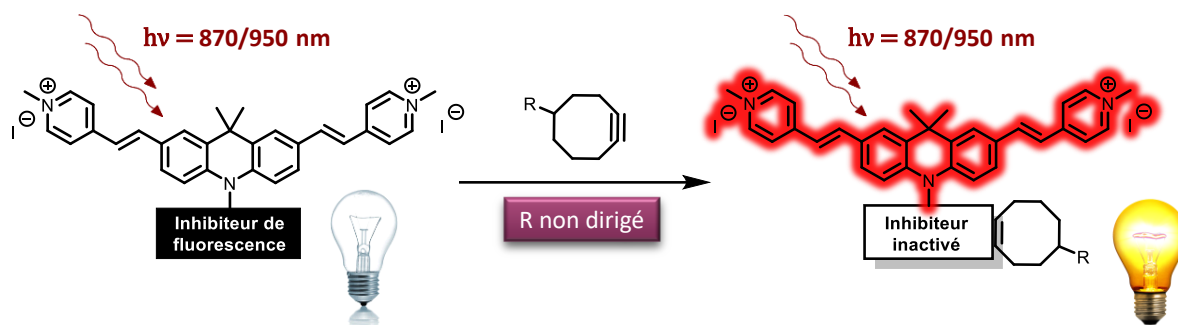


Figure 133 : Preuve de concept

Le principal inconvénient de ce fluorophore est qu'il s'accumule dans les mitochondries. Pour les expériences en cellules vivantes, il faudra donc utiliser un partenaire réactionnel qui ne possède pas une localisation particulière (ou alors s'accumulant également dans les mitochondries). Les sondes fluorogéniques développées dans un premier temps permettront donc uniquement de valider une preuve de concept (Figure 133). Ces dernières ne pourront pas être utilisées pour réagir avec une cible possédant une localisation particulière (qui peut être n'importe où dans la cellule), ce qui constitue le but de ce type d'outils (Figure 134).

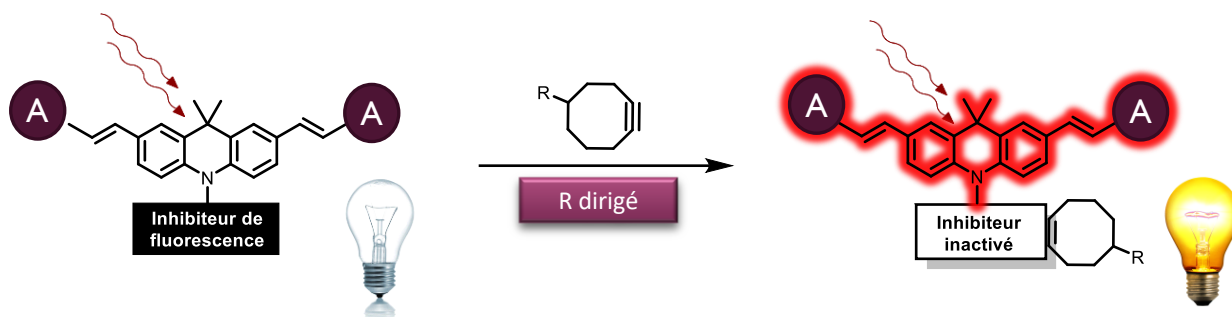


Figure 134 : Objectif final des outils développés, avec une cible possédant une localisation particulière

Les stratégies développées pour obtenir un fluorophore ne s'accumulant pas dans un sous-compartiment cellulaire particulier seront détaillées par la suite. Pour cela, il sera nécessaire de modifier le groupement vinylpyridinium.

Les différentes sondes développées dans la littérature ont mis en évidence qu'un mécanisme de type de quenching de type TBET permettait de s'affranchir des contraintes de longueur d'onde rencontrées avec le quenching de type FRET. C'est par conséquent ce type de transfert qui sera envisagé.

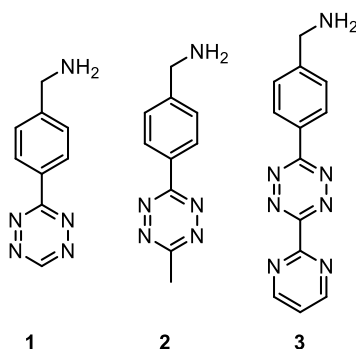
Pour qu'un transfert d'énergie de type TBET puisse se produire, il est nécessaire que l'inhibiteur de fluorescence et le fluorophore se trouvent, de manière optimale, à 90° l'un de l'autre (Introduction générale, Figure 9). Par ailleurs, diverses études ont mis en évidence que pour que ce transfert soit le plus performant possible, les moments de transition de l'accepteur et du donneur doivent être alignés.¹⁶ Ces critères devront guider la conception de la sonde.

Très récemment, des sondes basées sur un mécanisme de quenching de type PeT ou Dexter ont également montré des exaltations remarquables. Une deuxième stratégie consistera ainsi à synthétiser une sonde ayant cette fois-ci pour mécanisme de quenching un transfert de type PeT.¹⁷⁴

2) Substitution du motif tétrazine

Les tétrazines monosubstituées sont connues pour être particulièrement réactives dans les réactions de type IEDDA. Néanmoins, cela les rend peu stables car elles peuvent subir des additions en présence de

diverses nucléophiles. En 2011, une étude s'est intéressée au ratio stabilité/réactivité de tétrazines diversement substituées.¹⁸² Une partie des résultats est présentée en Figure 135 ci-dessous.



Tétrazine	Constante de vitesse de cycloaddition [4+2] entre la tétrazine et le TCO à 37 °C dans du PBS	Pourcentage de tétrazine restante après 10 h à 37 °C dans du sérum bovin
1	26 000 ± 250 L.mol ⁻¹ .s ⁻¹	40 ± 5 %
2	820 ± 35 L.mol ⁻¹ .s ⁻¹	95 ± 5 %
3	22 000 ± 2000 L.mol ⁻¹ .s ⁻¹	25 ± 5 %

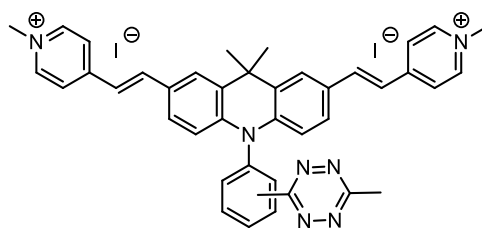
Figure 135 : Réactivité et stabilité de tétrazines diversement substituées

Les tétrazines monosubstituées ou bien celles substituées par une pyrimidine sont particulièrement peu stables. Après 10h à 37 °C dans du PBS, plus de 50 % des molécules se sont dégradées. Pour pallier ce manque de stabilité, la tétrazine peut être substituée par un méthyle. Néanmoins, cette substitution se traduit par une chute drastique de la constante de vitesse de la réaction entre la tétrazine et le *trans*-cyclooctène (diminution d'un facteur 30 environ). La constante de vitesse entre la tétrazine méthylée et le TCO reste cependant 800 fois supérieure à la constante de vitesse d'une cycloaddition de type SPAAC.

Un avantage supplémentaire est que la tétrazine substituée par un méthyle n'est pas fluorescente, contrairement à certaines tétrazines.¹⁸³

3) Position du motif tétrazine

Dans le cas de la stratégie TBET, deux types de structures peuvent être envisagés pour respecter le critère de non-coplanarité entre le fluorophore et le motif tétrazine à l'état fondamental. Un premier type de structure est présenté en Figure 136 ci-dessous.



Ortho : A, Méta : B, Para : C

Figure 136 : Structures des composés pour lesquels un transfert d'énergie de type TBET est attendu

Pour confirmer la position relative de la tétrazine par rapport aux fluorophores, des optimisations de géométrie ont été réalisées. Elles sont présentées en Figure 137 page suivante.

¹⁸² M. R. Karver *et al.*, *Bioconjug. Chem.* **2011**, 22 (11), 2263-2270. DOI : [10.1021/bc200295y](https://doi.org/10.1021/bc200295y)

¹⁸³ F. Miomandre and P. Audebert, *J. Photochem. Photobiol. C* **2020**, 44, 100372. DOI : [10.1016/j.jphotochemrev.2020.100372](https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2020.100372)

Pour chacun des trois régioisomères (*ortho*, *méta* et *para*) la tétrazine est bien perpendiculaire à l'acridane. Le premier critère pour qu'un transfert de type TBET se produise est respecté. Sur les optimisations figurent également les moments dipolaires associés à l'émission de l'acridane et à l'absorption de la tétrazine. D'après les études structure-efficacité de quenching effectuées pour le TBET (Introduction générale, Figure 10), il est préférable que ces deux moments soient alignés, sans que cela soit nécessaire.

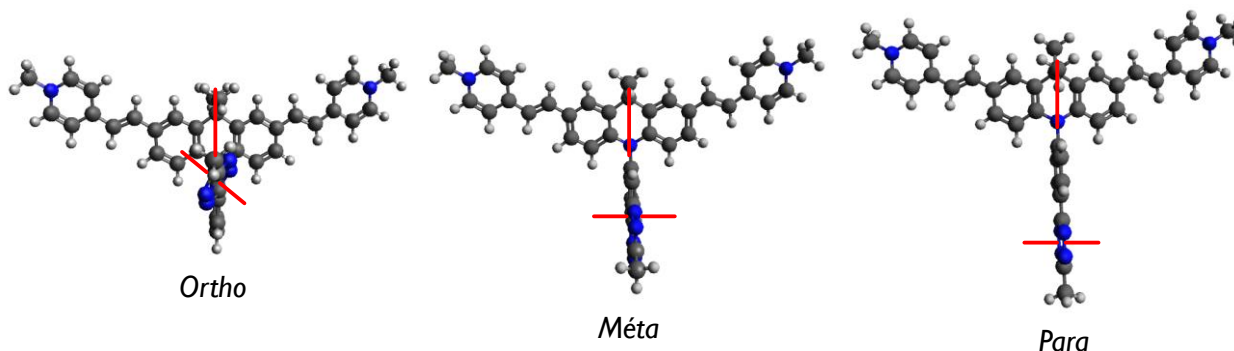


Figure 137 : Optimisation de géométrie des différents régioisomères (6-31G(d), B3LYP) – Stratégie TBET1

Pour ce premier design, le quenching devrait par conséquent être plus efficace dans le cas du régioisomère *ortho*, car les moments dipolaires, en rouge sur le schéma, ne sont pas perpendiculaires, contrairement aux régioisomères *méta* et *para*.

Un deuxième type de structures pour lequel un quenching de type TBET peut se produire est présenté en Figure 138 ci-dessous.

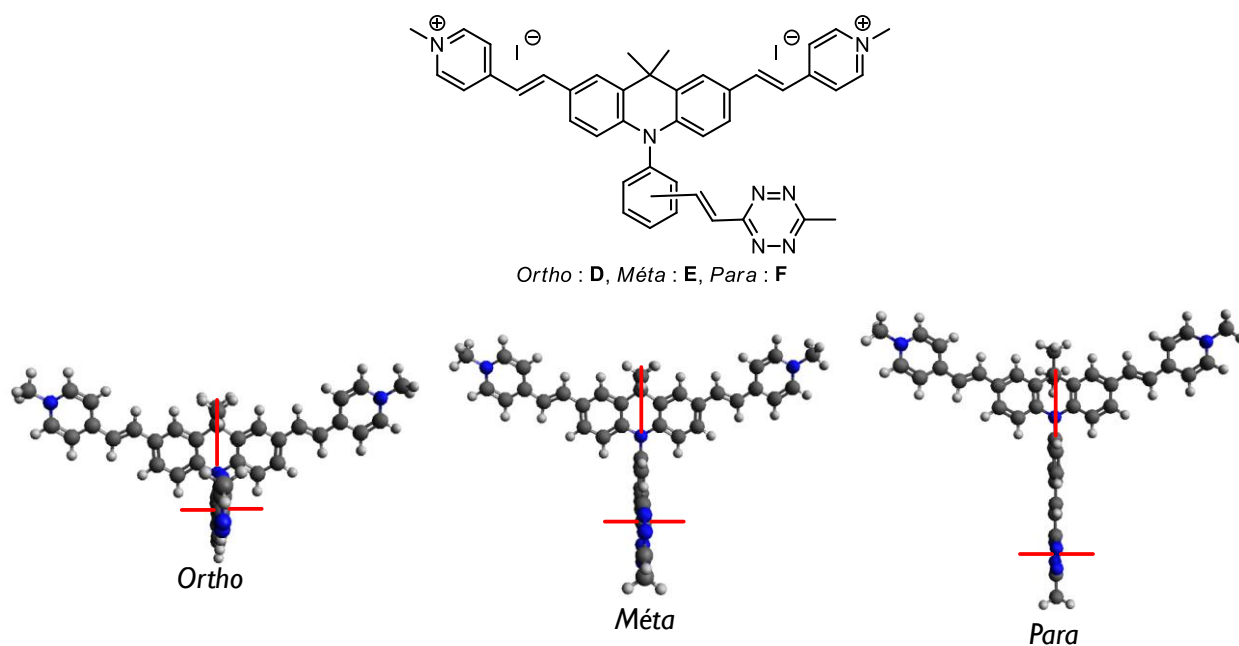


Figure 138 : Structures et optimisation de géométrie des différents régioisomères (6-31G(d), B3LYP) – Stratégie TBET2

Dans ce cas, les moments dipolaires sont perpendiculaires pour les trois régioisomères. Dans la littérature, cette stratégie s'est néanmoins avérée fructueuse et peut donc sembler être une alternative judicieuse à la première stratégie en cas d'échec (Figure 124).

Les structures envisagées pour la stratégie PeT sont quant à elles présentées en Figure 139 ci-contre. La distance entre le fluorophore et la tétrazine a également été évaluée, car l'efficacité de ce type de quenching diminue exponentiellement avec la distance. Elle varie entre 7,0 Å pour le régioisomère *ortho*

à 9,6 Å pour le régioisomère *para*. La différence est ainsi moins marquée qu'entre les différents régioisomères sur les SiR présentées dans la littérature (entre 4,2 Å pour l'isomère *ortho* et 10,8 Å pour l'isomère *para*).¹⁷⁴ En effet pour le régioisomère en *ortho*, la tétrazine pourrait effectuer des interactions de type π -stacking stabilisantes qui explique cette proximité. Cela ne semble pas être le cas sur l'optimisation de géométrie présentée en Figure 139 ci-dessous, car la tétrazine est assez éloignée de l'acridane.

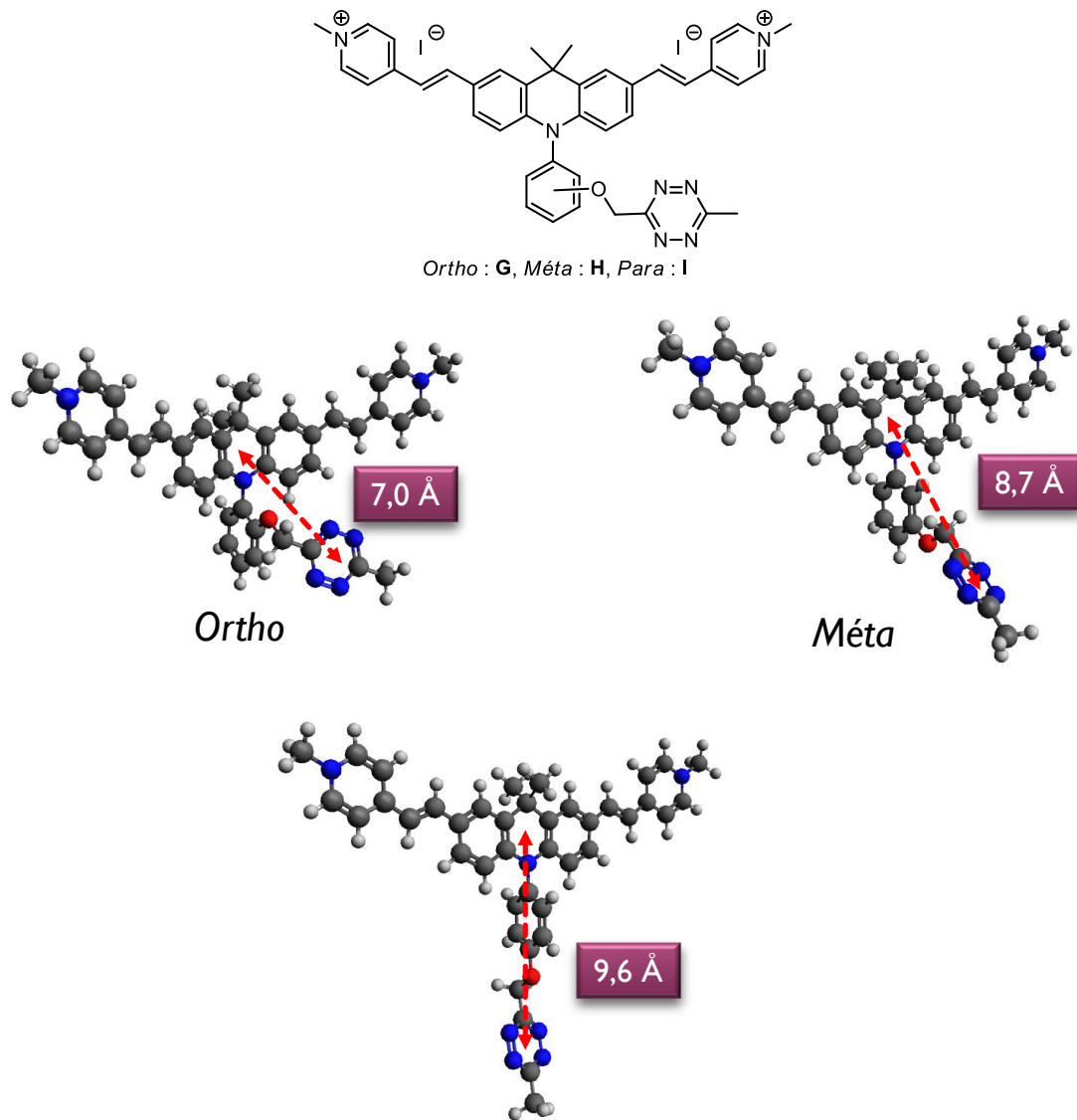


Figure 139 : Structures et optimisation de géométrie des différents régioisomères (6-31G(d), B3LYP) – Stratégie PeT

La synthèse de ces différentes structures est présentée dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 1-2 : Synthèse des sondes fluorogéniques

I. Stratégie de synthèse

1) Etat de l'art sur la synthèse des tétrazines

Le noyau 1,2,4,5-tétrazine (Figure 140) connaît un intérêt croissant dans de nombreux domaines.¹⁸⁴ C'est pourquoi de nombreuses méthodes de synthèse de ce dernier ont été développées.

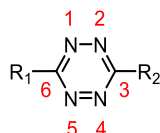


Figure 140 : Structure des 1,2,4,5-tétrazines

La première méthode de synthèse des tétrazines a été développée à la fin du 19^{ème} siècle par A. Pinner.¹⁸⁵ Elle consiste à faire réagir un nitrile avec de l'hydrazine, puis d'oxyder la 1,4-dihydrotétrazine précédemment obtenue.

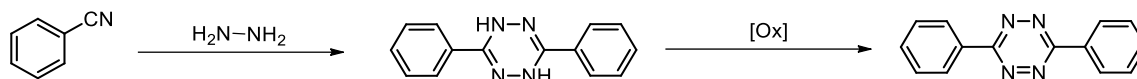
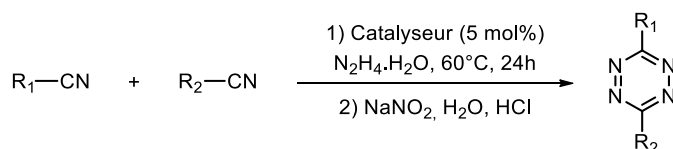


Figure 141 : Synthèse développée par A. Pinner en 1893

Néanmoins, cette approche requiert de réaliser des manipulations à une concentration très élevée et de chauffer. Elle n'est par ailleurs compatible qu'avec certains nitriles aromatiques. En 1968, il a été mis en évidence que l'ajout de soufre colloïdal permettait de catalyser cette réaction.¹⁸⁶ En effet, l'hydrazine s'additionne rapidement sur le soufre pour conduire à la formation de $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}-\text{SH}$, ce qui permet d'obtenir une espèce plus nucléophile que l'hydrazine.¹⁸⁷

En 2012, N. K. Devaraj *et al.* ont développé une synthèse basée sur une catalyse avec un acide de Lewis.¹⁸⁸ Cette méthode permet de synthétiser des tétrazines à partir de nitrile aromatique et aliphatique. Le triflate de zinc et le triflate de nickel se sont révélés particulièrement efficaces en assistant la formation de l'amidrazone intermédiaire (Figure 142).



Mécanisme proposé pour la catalyse métallique :

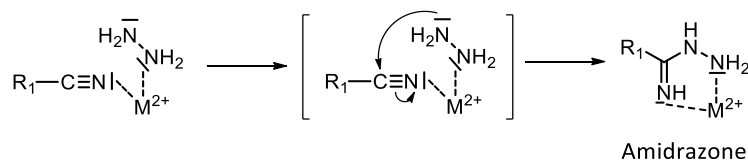


Figure 142 : Méthode de synthèse développée par N. K. Devaraj *et al.*

¹⁸⁴ G. Clavier and P. Audebert, *Chem. Rev.* **2010**, *110* (6), 3299-3314. DOI : [10.1021/cr900357e](https://doi.org/10.1021/cr900357e)

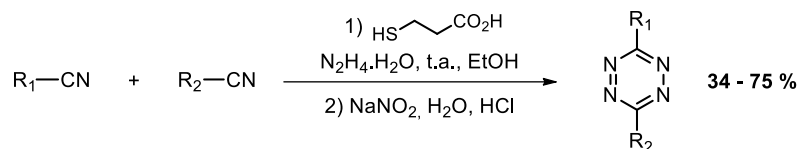
¹⁸⁵ A. Pinner, *Chem. Ber.* **1893**, (26), 2126-2135. DOI : [10.1002/cber.189302602188](https://doi.org/10.1002/cber.189302602188)

¹⁸⁶ N. O. Abdel *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9* (35), 3871-3872. DOI : [10.1016/S0040-4039\(01\)99123-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)99123-3)

¹⁸⁷ P. Audebert *et al.*, *New J. Chem.* **2004**, *28* (3), 387-392. DOI : [10.1039/B310737J](https://doi.org/10.1039/B310737J)

¹⁸⁸ J. Yang *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (21), 5222-5225. DOI : [10.1002/anie.201201117](https://doi.org/10.1002/anie.201201117)

En 2019, W. Mao *et al.* ont développé une méthode permettant de synthétiser des tétrazines dissymétriques avec des rendements compris entre 34 et 75 % *via* une catalyse par de l'acide 3-mercaptopropionique, évitant ainsi l'utilisation de métaux.¹⁸⁹ Cette réaction a par ailleurs pu être testée sur des échelles allant du milligramme au gramme. Ces conditions sont par ailleurs assez douces puisque la réaction peut être effectuée à température ambiante (Figure 143).



Mécanisme proposé :

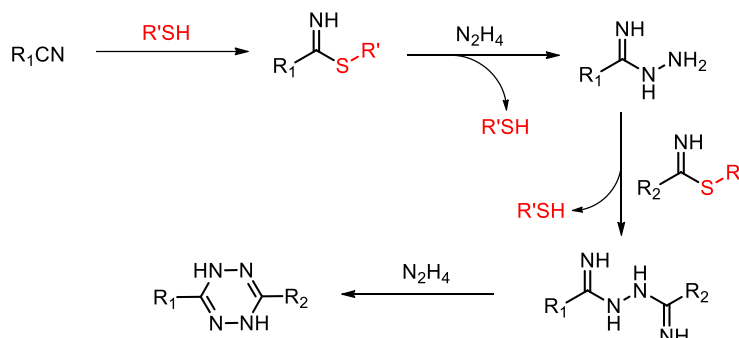


Figure 143 : Méthode de synthèse développée par W. Mao *et al.*

En 2019, une autre méthode permettant de synthétiser à la fois des tétrazines mono et disubstituées a été développée.¹⁹⁰ Elle est présentée en Figure 144 ci-dessous.

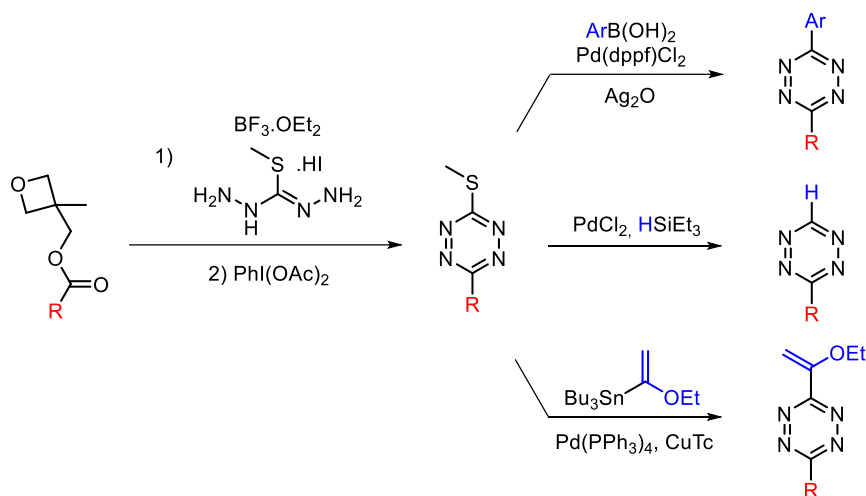


Figure 144 : Méthode de synthèse permettant d'accéder à des tétrazines mono et disubstituées développées par J. M. Fox

En présence de diéthylétherate de trifluorure de bore, l'ester peut réagir de manière intramoléculaire pour former un orthoester.¹⁹¹

Cette méthode permet d'accéder à de nombreux dérivés de tétrazine. Sa principale limitation reste le nombre d'étapes nécessaire à l'obtention de ces composés, car il faut au préalable préparer les esters comportant l'oxétane. Cela peut néanmoins être effectué en une étape entre l'acide carboxylique

¹⁸⁹ W. Mao *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (4), 1106-1109. DOI : [10.1002/anie.201812550](https://doi.org/10.1002/anie.201812550)

¹⁹⁰ Y. Xie *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (39), 16967-16973. DOI : [10.1002/ange.202005569](https://doi.org/10.1002/ange.202005569)

¹⁹¹ E. J. Corey and N. Raju, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24* (50), 5571-5574. DOI : [10.1016/S0040-4039\(00\)94143-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)94143-1)

correspondant et le 3-méthyl-3-oxétaneméthanol qui est commercial et dont le prix est peu élevé (43 € les 10 g chez Sigma-Aldrich).

2) Synthèses de sondes fluorogéniques comportant des tétrazines

Il existe essentiellement deux stratégies pour synthétiser des dérivés comportant des tétrazines. Une première stratégie couramment employée consiste à introduire un groupement nitrile sur le fluorophore, puis de former la tétrazine, comme c'est le cas pour les BODIPY présentés précédemment.¹⁶⁷

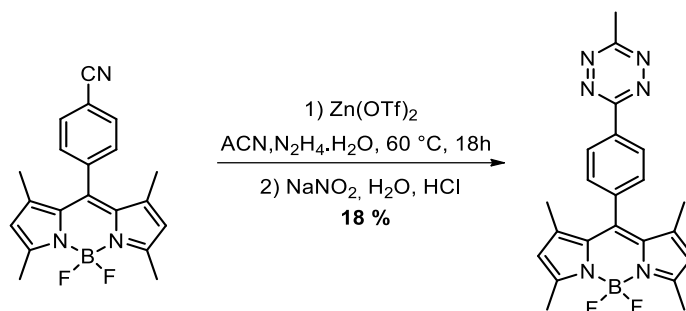


Figure 145 : Synthèse d'une sonde fluorogénique basée sur un BODIPY

Cette méthode de synthèse, en plus de présenter des rendements très modestes, est peu convergente.

Quand cela est envisageable, la stratégie de synthèse la plus convergente consiste à synthétiser d'une part le fluorophore, d'autre part le synthon contenant la tétrazine. C'est l'approche proposée par P. Audebert *et al.* : un couplage est effectué entre un dérivé bromé et le fluorophore et permet d'accéder aisément et avec de bons rendements à la sonde fluorogénique désirée (Figure 146).¹⁹²

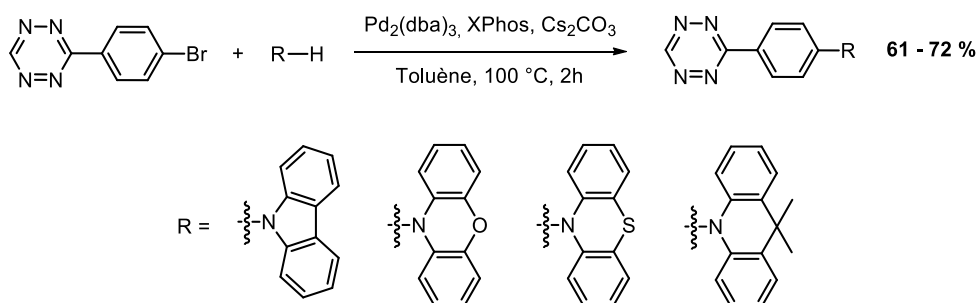


Figure 146 : Réaction développée par P. Audebert *et al.*

C'est donc cette voie qui a été choisie dans un premier temps.

II. Première voie de synthèse

La première voie de synthèse envisagée est présentée en Figure 147 ci-contre. Elle est celle qui semble être la plus convergente possible pour l'obtention des 9 composés. Cette stratégie consiste à synthétiser d'une part le composé divinylacridane **26** en grande quantité, et d'autre part les différentes tétrazines. Ces composés seront ensuite couplés *via* la réaction de couplage mise au point par P. Audebert *et al.* . Une réaction de méthylation permettra ensuite d'accéder aux différents composés cibles.

¹⁹² Y. Qu *et al.*, *J. Org. Chem.* **2020**, *85* (5), 3407-3416. DOI : [10.1021/acs.joc.9b02817](https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b02817)

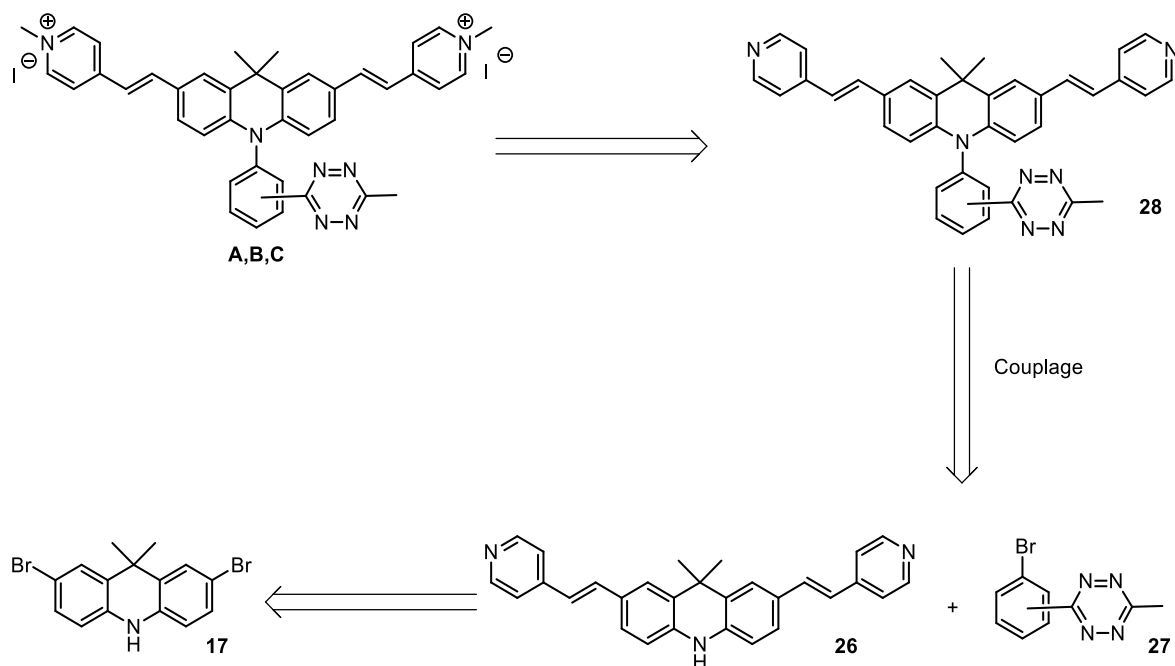


Figure 147 : Première voie de synthèse envisagée pour les sondes fluorogéniques **A**, **B** et **C**

1) Essais préliminaires

Quelques dérivés de tétrazines ont été synthétisés *via* la méthode développée par W. Mao, utilisant une catalyse à l'acide 3-mercaptopropionique.¹⁸⁹

Les tétrazines ont été obtenues avec des rendements modestes de l'ordre de 40 %, qui sont néanmoins cohérents avec ceux observés dans la littérature pour ce type de composés. Le dérivé en position *ortho* **o-27** n'a quant à lui jamais été obtenu.

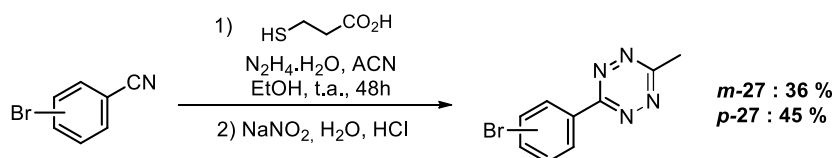


Figure 148 : Synthèse des dérivés tétrazine

Pour s'assurer de leur compatibilité avec la tétrazine méthylée, les conditions de couplage développées par P. Audebert *et al.* ont dans un premier temps été testées sur un substrat modèle : la phénothiazine (Figure 149). Dans leur publication, le temps de réaction est volontairement limité à deux heures afin d'éviter la dégradation de la tétrazine.

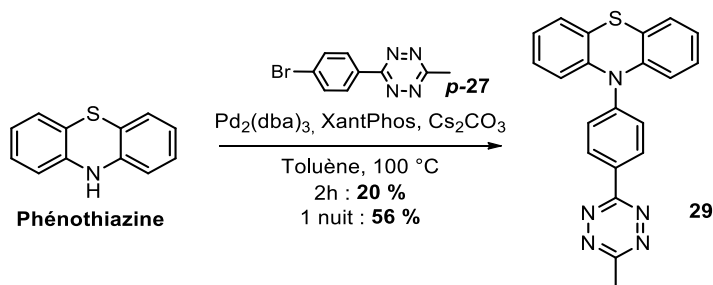


Figure 149 : Application des conditions de couplage à un substrat modèle, la phénothiazine

Dans le cas de la phénothiazine, un temps de réaction de deux heures n'a pas permis d'avoir une conversion totale, le rendement de la réaction est donc très modeste (20 %). Les deux partenaires

réactionnels ne se sont néanmoins pas dégradés après deux heures. Une réaction durant une nuit complète a ainsi permis d'augmenter le rendement et d'atteindre 56 %.

2) Synthèse du synthon « vinylpyridine »

Dans le cadre de travaux non présentés dans ce manuscrit, le dialdéhyde **30** a été obtenu. Il a donc été choisi de synthétiser le divinylacridane à partir de ce dernier plutôt qu'en effectuant par exemple un couplage de type Heck à partir du 2,7-dibromoacridane **17**. La synthèse du dialdéhyde **30** est par conséquent présentée ci-après.

Différents essais de synthèse du dialdéhyde **30** sont présentés en Figure 150 ci-dessous. Malheureusement, ce dernier n'a pas pu être obtenu en une seule étape à partir des composés commercialement disponibles, que ce soit par une formylation de Vilsmeier-Haack sur l'acridane ou bien une réaction d'échange halogène-métal sur le 2,7-dibromoacridane **17**.

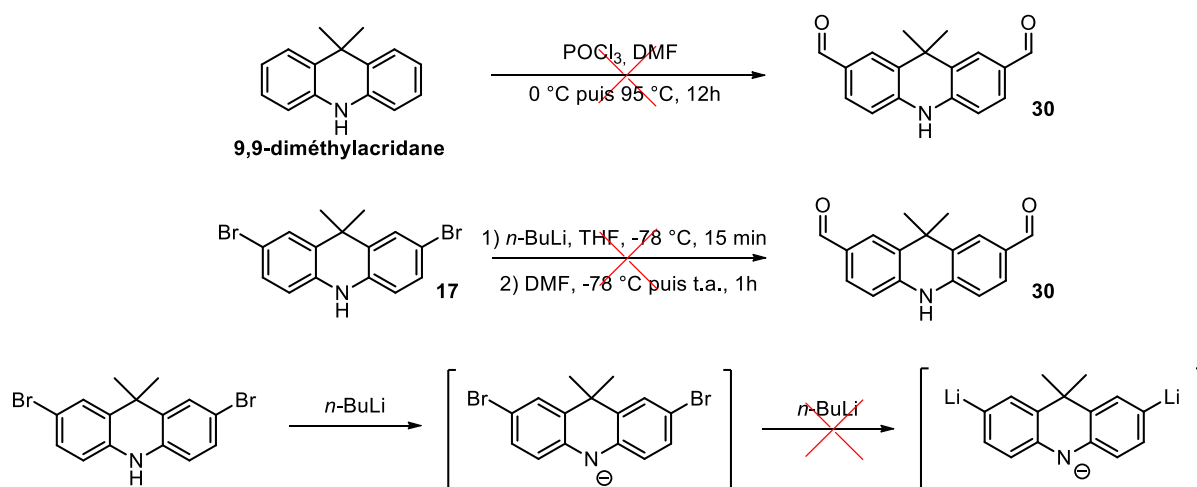


Figure 150 : Essai de formylation sans protection de l'aniline

En effet, la 2,7-dibromoacridane commerciale **17** a été mise en présence de 3 équivalents de $n\text{-BuLi}$. Après ajout de DMF, une LC/MS a été réalisée. De manière surprenante, seul le composé de départ dibromé a été observé. La déprotonation de l'aniline empêche donc probablement l'échange halogène-métal sur les atomes de brome. L'augmentation de la température du milieu réactionnel lors de l'ajout de $n\text{-BuLi}$ ne permet pas non plus d'obtenir le produit souhaité.

Une autre voie de synthèse pour la synthèse du dialdéhyde **30** a donc été utilisée, et elle est présentée en Figure 151 ci-contre. La première étape de la synthèse consiste à protéger par un groupement p -méthoxybenzyle l'azote du 9,9-diméthylacridane. Une substitution nucléophile en présence de chlorure de p -méthoxybenzyle a été réalisée après déprotonation de l'aniline par de l'hydrure de sodium. Le dérivé protégé **31** a ainsi été obtenu avec un excellent rendement de 94 %. Le lithien formé par échange halogène-métal à partir du dérivé **31** et de n -butyllithium est ensuite mis en présence de N,N -diméthylformamide pour conduire au dialdéhyde **32** avec un rendement de 95 %.

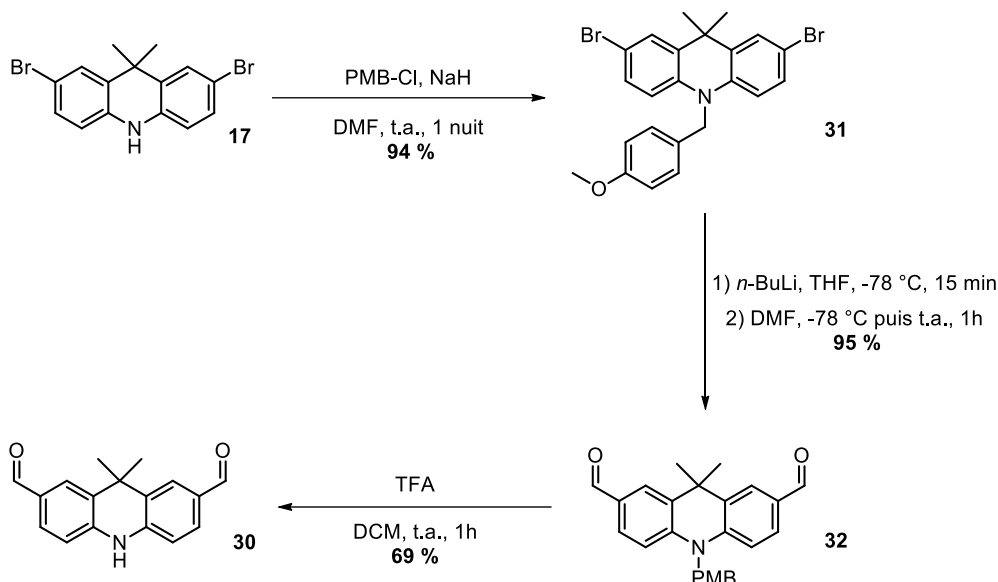


Figure 151 : Synthèse du cœur acridane **30**

L'acridane **32** a ensuite été déprotégé en présence d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane à température ambiante, ce qui a permis d'accéder au dialdéhyde **30** avec un bon rendement de 69 %.

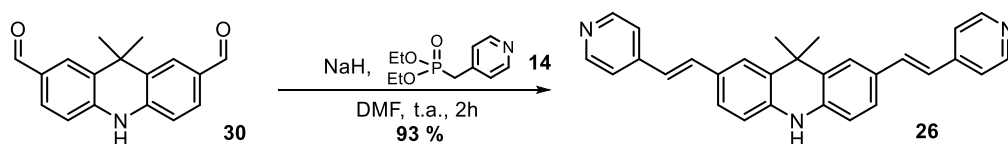


Figure 152 : Réaction de Horner-Wadsworth-Emmons sur le dialdéhyde **30**

La réaction de Horner-Wadsworth-Emmons entre le dialdéhyde **30** et le phosphonate **14** a par la suite permis d'obtenir le composé **26** avec un très bon rendement de 93 %.

3) Synthèse des différents synthons tétrazines et essais de couplage

a) Stratégie TBET

Après les avoir précédemment testées sur un substrat modèle (Figure 149), les conditions de couplage de P. Audebert *et al.* ont été appliquées à un substrat d'intérêt : le divinylacridane **26** (Figure 153 ci-dessous).

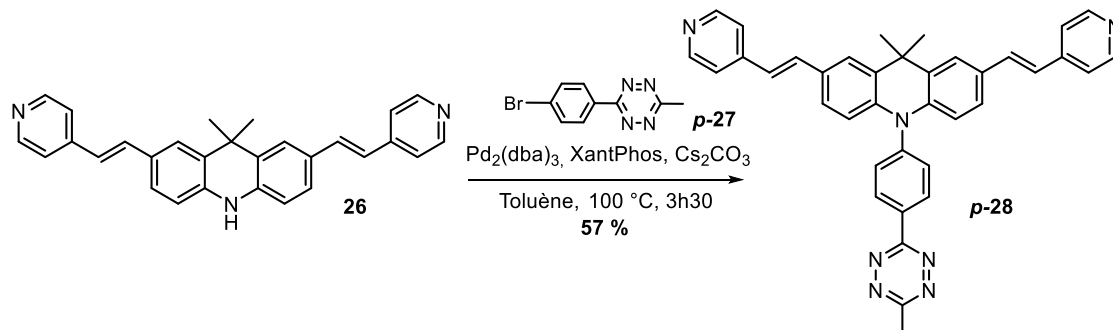


Figure 153 : Couplage du divinyle **26** et du dérivé tétrazine **p-27**

Ce couplage a permis d'obtenir le dérivé **p-28** avec un bon rendement de 57 %. Ce dernier a ensuite été méthylé avec un rendement de 88 % pour conduire à une première sonde fluorogénique **C** (Figure 154).

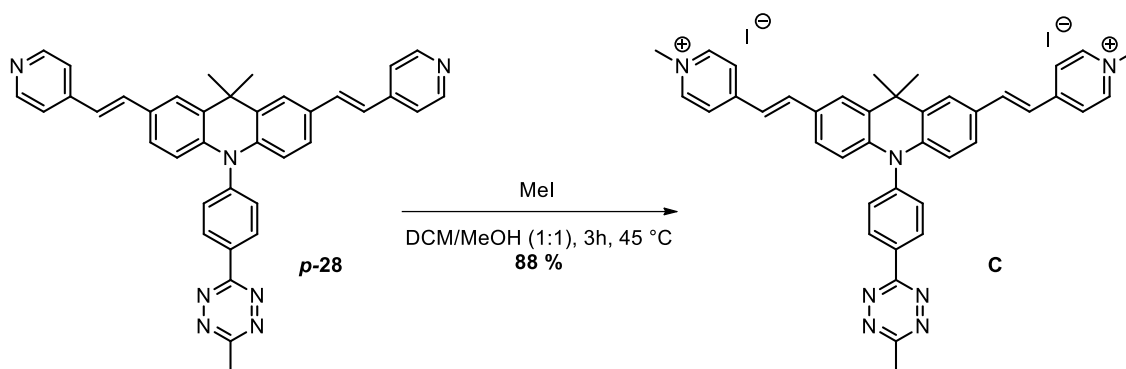
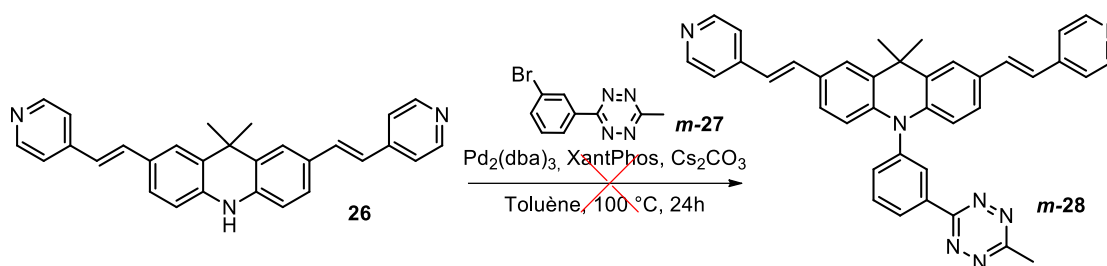


Figure 154 : Méthylation des pyridines

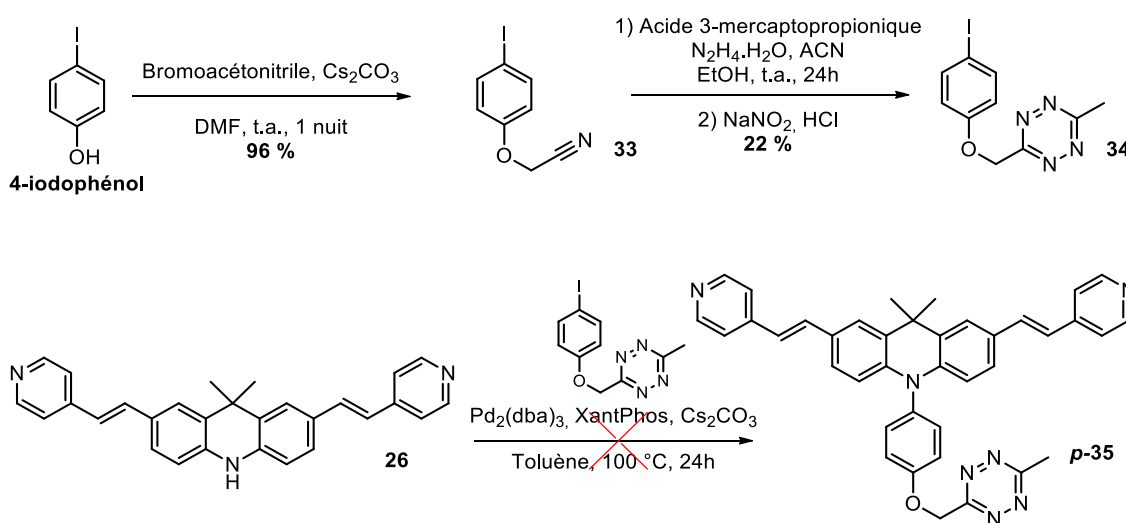
Cependant, les conditions de couplage précédemment utilisées avec le dérivé de tétrazine en *para* n'ont pas permis d'obtenir le produit désiré dans le cas de la tétrazine en position *métra* (Figure 155).

Figure 155 : Couplage entre le dérivé **26** et la tétrazine **m-27**

De nombreuses conditions ont été testées à l'aide d'un robot de synthèse (modification de la source de palladium, du ligand, du solvant, de la température). Malheureusement, le composé souhaité n'a jamais été obtenu, mais seulement observé à hauteur de moins de 5 % dans des LC/MS de suivi réactionnel.

b) Stratégie PeT

Dans le cas de la stratégie PeT, un premier dérivé de tétrazine a été synthétisé en deux étapes à partir du 4-iodophénol qui est commercial (Figure 156). Une réaction de substitution nucléophile a tout d'abord été effectuée en présence de bromoacétonitrile pour conduire au nitrile **33** avec un rendement de 96 %. Ce dernier a ensuite permis de former la tétrazine cible **34** avec un modeste rendement de 22 %.

Figure 156 : Synthèse de la tétrazine **34** et essai de couplage avec le divinylacridane **26**

Malheureusement, les conditions de couplage mises au point dans le cadre de la synthèse du composé **C** n'ont là encore pas permis d'obtenir le composé cible.

Les échecs successifs des réactions de couplage pour différentes tétrazines ont conduit à envisager d'autres voies de synthèse pour les sondes fluorogéniques. Elles sont présentées dans la partie suivante.

III. Deuxième voie de synthèse

Les difficultés rencontrées lors de la précédente voie de synthèse ont conduit au développement de voie de synthèses moins convergentes, mais adaptées à chaque stratégie (PeT, TBET avec lien vinyle et TBET avec lien direct).

1) Cas de la stratégie TBET1 (lien vinyle)¹⁹³

La voie de synthèse qui pourrait permettre d'accéder aux sondes fluorogéniques comportant un lien vinyle est présentée en Figure 157 ci-dessous.

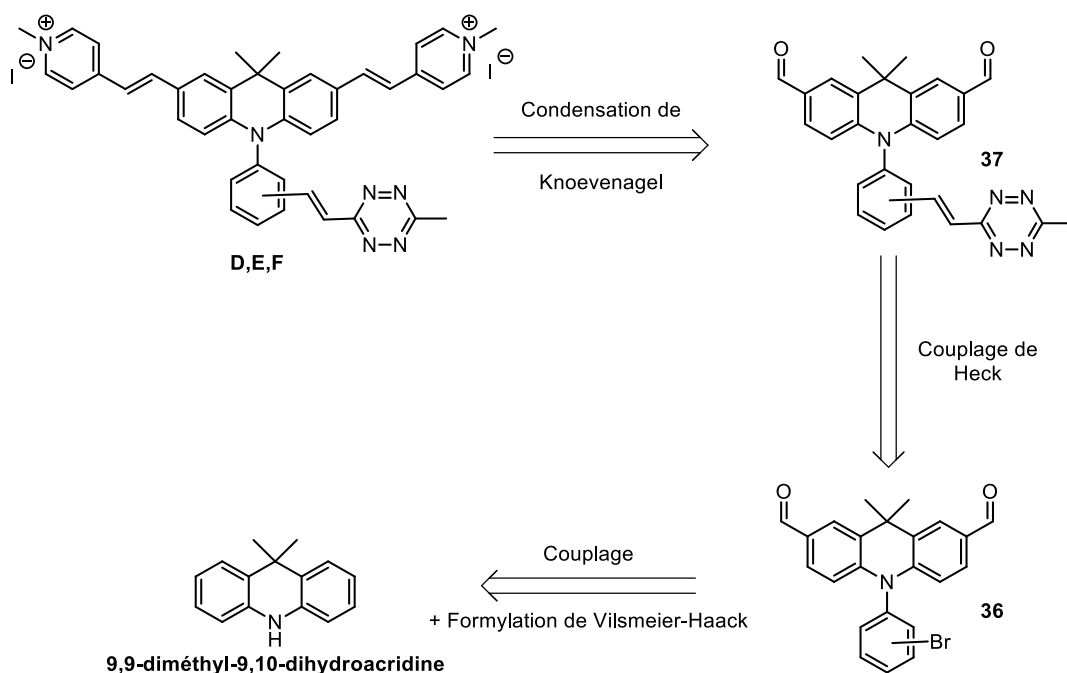


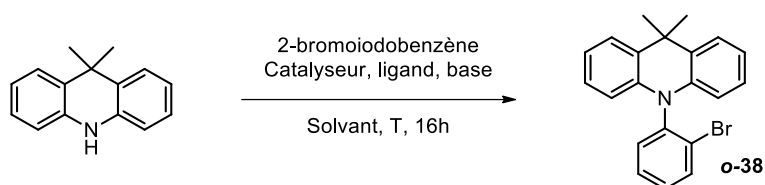
Figure 157 : Rétrosynthèse des sondes fluorogéniques qui comportent un lien vinyle **D, E et F**

Les composés finaux pourront être obtenus *via* une condensation de Knoevenagel à partir des dialdéhydes **37**. Une réaction de Heck sur le dérivé bromé **36** pourra au préalable permettre d'obtenir ces vinyltétrazines.

La synthèse des dérivés bromés est présentée en Figure 159 ci-contre. Les différents dialdéhydes bromés ont été obtenus en deux étapes à partir de la 9,9-diméthyl-9,10-dihydroacridine commercialement disponible. La première étape consiste à réaliser un couplage entre ce composé et les bromiodobenzènes différemment substitués.

Ce couplage a tout d'abord été testé avec le 2-bromiodobenzène. Différentes conditions trouvées dans la littérature ou bien utilisées précédemment au laboratoire pour ce même type de couplages (entre une aniline et un dérivé bromé ou iodé possédant un substituant en *ortho*) ont été testées. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau présenté en Figure 158.

¹⁹³ La synthèse du dérivé possédant la tétrazine en position méta a été effectuée par Matthieu Poulain dans le cadre de son stage de deuxième année de master.



Solvant	Catalyseur et ligand	Base	T (°C)	Rendement
Toluène	Pd ₂ (dba) ₃ , P(^t Bu) ₃ .HBF ₄	NaO ^t Bu	110	1 % (LC/MS)
DMSO	CuCl	K ₂ CO ₃	170	3 % (LC/MS)
1,2-dichlorobenzène	CuI	K ₂ CO ₃	180	10 % (LC/MS)
DMF	CuI	K ₂ CO ₃	160	1 % (LC/MS)
Toluène	Pd ₂ (dba) ₃ , XPhos	NaO ^t Bu	110	74 % (isolé)

Figure 158 : Optimisation du couplage entre le 2-bromoiodobenzène et la 9,9-diméthyl-9,10-dihydroacridine

C'est finalement en utilisant du Pd₂(dba)₃ et du XPhos (Figure 159) dans du toluène en présence de *tert*-butanolate de sodium que le composé en *ortho* a été obtenu avec un rendement satisfaisant de 74 %. Ces mêmes conditions ont donc été testées sur le 3-bromoiodobenzène. Dans ce cas, le produit a été obtenu avec un rendement modeste de 38 %.

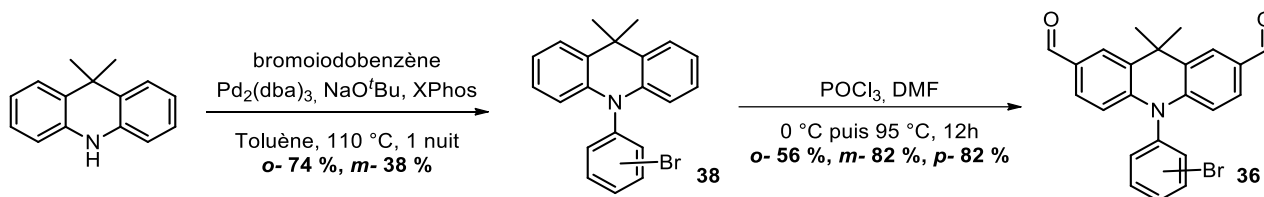


Figure 159 : Obtention des dialdéhydes bromés 36

Ce faible rendement peut s'expliquer par la formation d'un sous-produit au cours de la réaction (Figure 160). Ce dernier a été formé malgré la présence d'un excès de 3-bromoiodobenzène (3 équivalents).

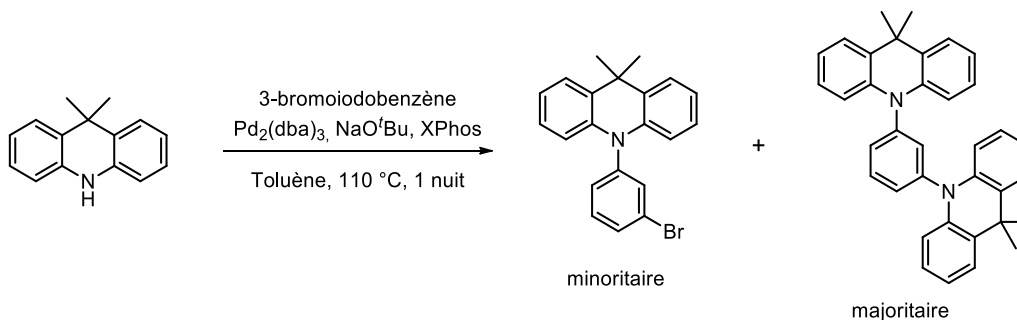


Figure 160 : Produits obtenus lors du couplage entre l'acridane et le 3-bromoiodobenzène

Dans la littérature, les réactions de couplage entre la 9,9-diméthyl-9,10-dihydroacridine et le 3-bromiodobenzène sont également réalisées en présence de SPhos ou de ^tBu₃P.HBF₄ (Figure 161). Dans le cas du tétrafluoroborate de tri-*tert*-butylphosphonium, la réaction est réalisée sur le même substrat, et le produit est obtenu avec un rendement de 76 %.¹⁹⁴

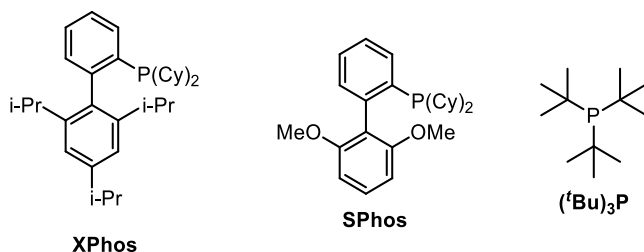


Figure 161 : Structures des ligands XPhos, Sphos et de (^tBu)₃P

Dans le cas du SPhos, la réaction de couplage a été réalisée sur la 9,9-diphényl-9,10-dihydroacridine et non la 9,9-diméthyl-9,10-dihydroacridine (Figure 162).¹⁹⁵ Le produit souhaité a été obtenu avec un rendement de 85 %.

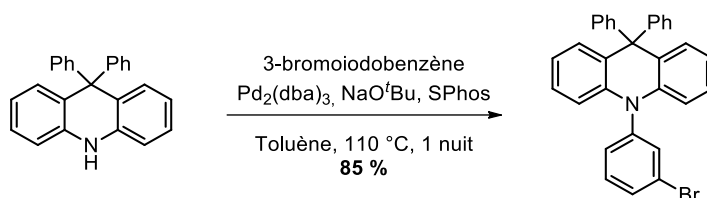


Figure 162 : Réaction publiée par X-Y Liu et al.

Ces deux ligands (SPhos et ^tBu₃P.HBF₄) ont donc été testés sur la 9,9-diméthyl-9,10-dihydroacridine. Malheureusement le changement de ligand n'a pas eu d'effet significatif sur la proportion produit/sous-produit en LC/MS. Il aurait pu être souhaitable de tester cette réaction avec d'autres phosphines plus encombrées et plus riches en électrons pour favoriser la réaction d'addition oxydante.¹⁹⁶ D'autres optimisations pourront être effectuées par la suite si la sonde obtenue possède de bonnes propriétés photophysiques.

Les trois régioisomères bromés, le *para* étant commercial, ont ensuite pu être engagés dans une réaction de formylation de Vilsmeier-Haack pour accéder aux trois dialdéhydes **36** avec des rendements compris entre 52 et 82 % selon le régioisomère considéré (Figure 159).

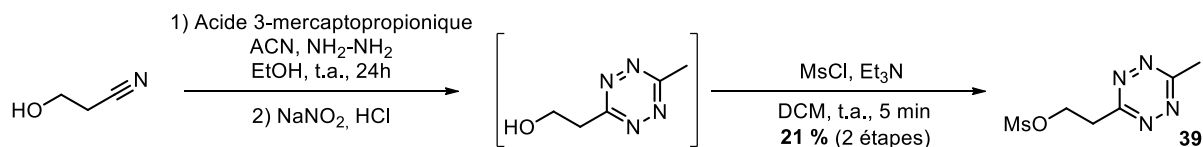


Figure 163 : Synthèse de la tétrazine **39**

La tétrazine **39** a parallèlement été synthétisée en adaptant une procédure décrite dans la littérature à partir du 3-hydroxypropionitrile : après la synthèse de la tétrazine, le brut a directement été engagé dans la réaction de méthylation (Figure 163).¹⁹⁷ La tétrazine souhaitée a ainsi été obtenue avec un rendement de 21 % sur deux étapes.

¹⁹⁴ M. Yuguang; *et al.* CN111675693, **2020**.

¹⁹⁵ X. Y. Liu *et al.*, *Chem. Asian J.* **2015**, *10* (6), 1402-1409. DOI : [10.1002/asia.201500235](https://doi.org/10.1002/asia.201500235)

¹⁹⁶ D. S. Surry and S. L. Buchwald, *Chem. Sci.* **2011**, *2* (1), 27-50. DOI : [10.1039/C0SC00331J](https://doi.org/10.1039/C0SC00331J)

¹⁹⁷ H. Wu *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (23), 5805-5809. DOI : [10.1002/anie.201400135](https://doi.org/10.1002/anie.201400135)

Un couplage de Heck a ensuite été effectué. Dans la littérature, le couplage avec cette tétrazine a premièrement été décrit au micro-onde en présence de QPhos, tris(dibenzylidèneacétone)dipalladium (0) et de *N,N*-dicyclohexylméthylamine dans le DMF.¹⁹⁷ Plus récemment, une équipe a mis en évidence qu'il était également possible d'effectuer cette réaction par voie thermique.¹⁹⁸ La vinyltétrazine est générée *in situ via* une réaction d'élimination à l'aide de *N,N*-dicyclohexylméthylamine (DCMA), car il s'agit d'un composé extrêmement volatil. Il est indispensable d'utiliser une base encombrée pour éviter toute réaction parasite d'addition nucléophile sur la tétrazine (et de substitution nucléophile sur le dérivé mésylé). Ces conditions ont été appliquées et ont permis d'obtenir les composés vinyliques **37** avec de bons rendements compris entre 62 % et 88 % selon le régioisomère considéré (Figure 164).

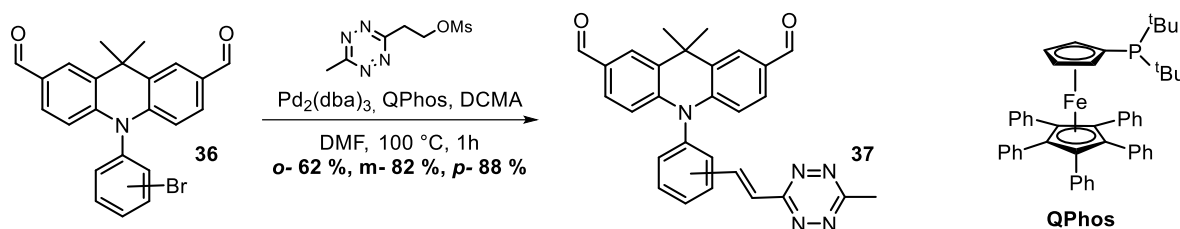


Figure 164 : Réaction de Heck sur le dérivé bromé **36**

La dernière étape de synthèse, une réaction de Knoevenagel, a nécessité quelques étapes d'optimisation. En effet, cette réaction est usuellement réalisée en présence d'une amine secondaire comme la pipéridine ou la pyrrolidine qui permet de catalyser la réaction. Néanmoins, la tétrazine est instable en présence de nucléophile et en milieu basique. Il semble par conséquent judicieux d'effectuer cette réaction à l'aide d'une catalyse acide, plutôt qu'avec les catalyseurs usuels. La possibilité d'utiliser le chlorure de triméthylsilyle pour catalyser ce type de réaction a été mise en évidence pour plus de 10 000 composés dans une publication du groupe de A. Tolmachev.¹⁹⁹ Le chlorotriméthylsilane sert à la fois à piéger l'eau formée au cours de la réaction et permet également d'exalter l'électrophilie de l'aldéhyde mis en jeu.

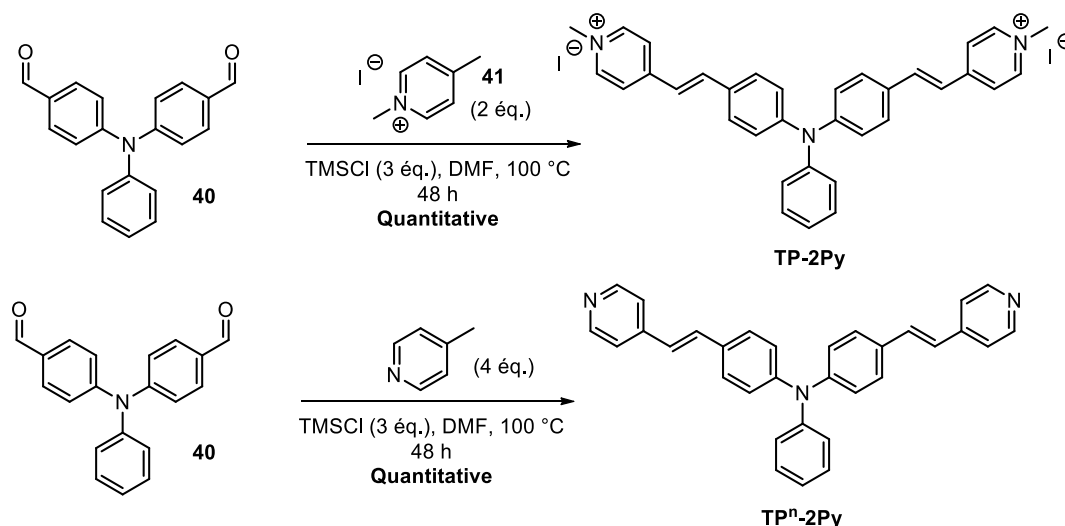


Figure 165 : Réaction de Knoevenagel catalysée par le chlorure de triméthylsilyle

¹⁹⁸ M. Bojtar *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142 (35), 15164-15171. DOI : [10.1021/jacs.0c07508](https://doi.org/10.1021/jacs.0c07508)

¹⁹⁹ S. V. Ryabukhin *et al.*, *J. Comb. Chem.* **2007**, 9, 1073-1078. DOI : [10.1021/cc070073f](https://doi.org/10.1021/cc070073f)

Cette réaction a dans un premier temps été testée sur un substrat modèle, la triphénylamine **40**, en présence du sel **41** ou bien de 4-méthylpyridine (Figure 165). Le sel **41** a préalablement été obtenu en méthylant la 4-méthylpyridine avec un rendement quantitatif.

En 48h et en présence de deux équivalents de sel de pyridinium, une conversion totale a été atteinte, et seul le produit attendu était présent en LC/MS. Un résultat identique a été obtenu en utilisant 4 équivalents de 4-méthylpyridine.

Malheureusement, ces conditions n'ont pas fonctionné avec les dérivés comportant une tétrazine. Malgré différents essais en modifiant la concentration de la réaction, le nombre d'équivalents de chlorure de triméthylsilyle ou de sel de pyridinium, le produit souhaité n'a jamais été obtenu avec cette méthode de synthèse. Il a donc été nécessaire de trouver un autre catalyseur pour effectuer une réaction de Knoevenagel sur ce type de substrat.

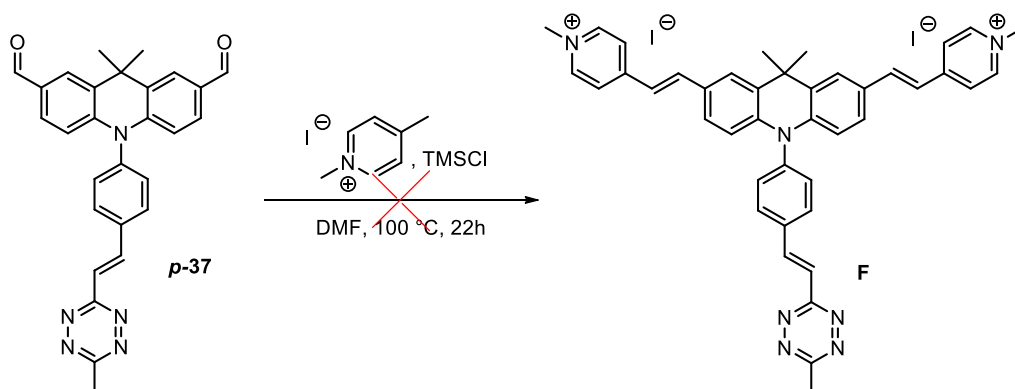


Figure 166 : Réaction en présence de Knoevenagel sur le composé **p-37** en présence de chlorotriméthylsilane

Lors de la réaction de Heck, la *N,N*-dicyclohexylméthylamine est utilisée en excès dans le DMF et ne conduit pas à la dégradation de la tétrazine. Il a par conséquent été envisagé de l'utiliser pour catalyser la réaction de Knoevenagel en milieu basique (Figure 167).

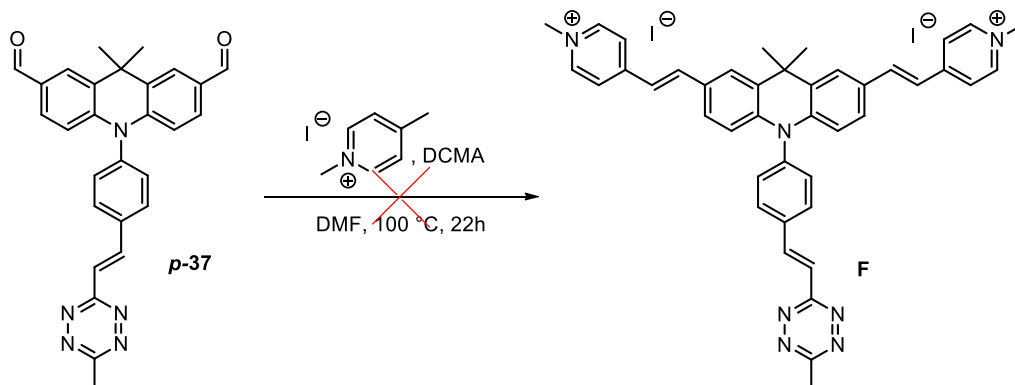


Figure 167 : Réaction de Knoevenagel avec la *N,N*-dicyclohexylméthylamine

Cette réaction, qui n'a pas fonctionné, permet de confirmer que la catalyse effectuée habituellement avec de la pyrrolidine est une catalyse nucléophile et non acido-basique, car la *N,N*-dicyclohexylméthylamine et la pyrrolidine ont des pKa très proches.

Une étude préliminaire a permis de mettre en évidence que la réaction de formation des iminiums est plus rapide que la réaction qui engendre la dégradation de la tétrazine. En effet, en présence de 2.0 équivalents de pyrrolidine, aucune dégradation du substrat n'est observée en une heure à température ambiante dans le DMF (Figure 168).

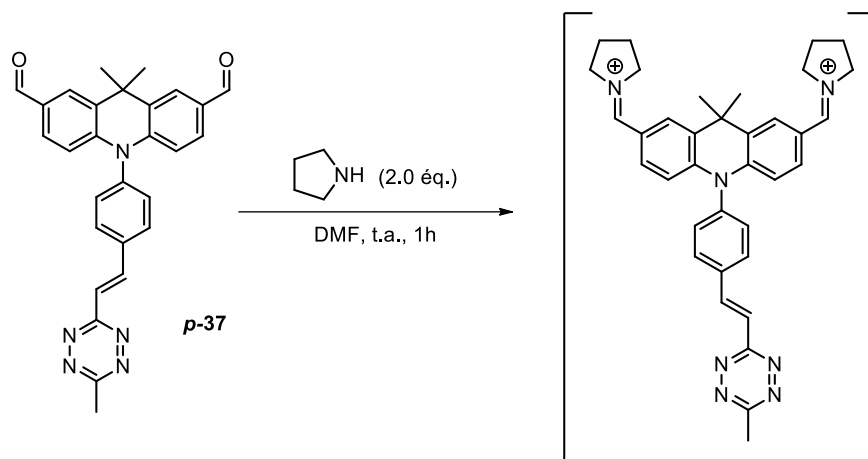


Figure 168 : Réaction entre le dialdéhyde **p-37** et 2.0 équivalents de pyrrolidine

Malheureusement, après l'ajout du sel de pyridinium, la réaction de Knoevenagel a bien eu lieu, mais le « relargage » de la pyrrolidine dans le milieu a engendré la dégradation de la tétrazine (Figure 169). Cette réaction laisse supposer une formation très rapide des iminiums à partir du dialdéhyde lors de la première étape. Dans le cas contraire, le produit de départ se serait dégradé.

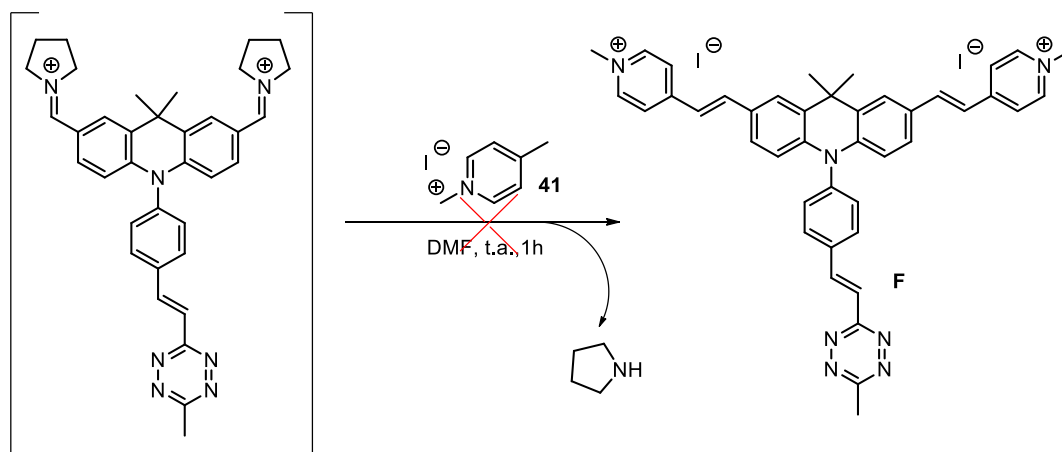


Figure 169 : Dégradation du produit après le relargage de la pyrrolidine

Pour éviter cette dégradation, il a été envisagé d'utiliser une amine secondaire plus encombrée, la 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine, afin de catalyser cette réaction. Malheureusement, l'utilisation de cette amine sur la « réaction modèle » n'a pas permis d'obtenir le produit souhaité (Figure 170). Cette amine est probablement trop encombrée pour former les iminiums.

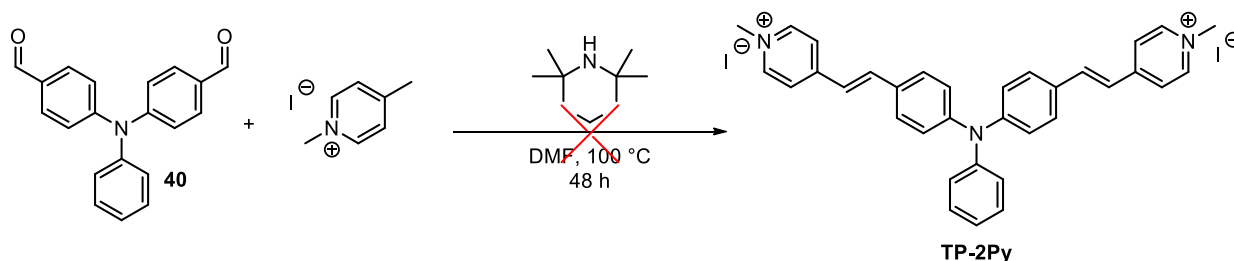
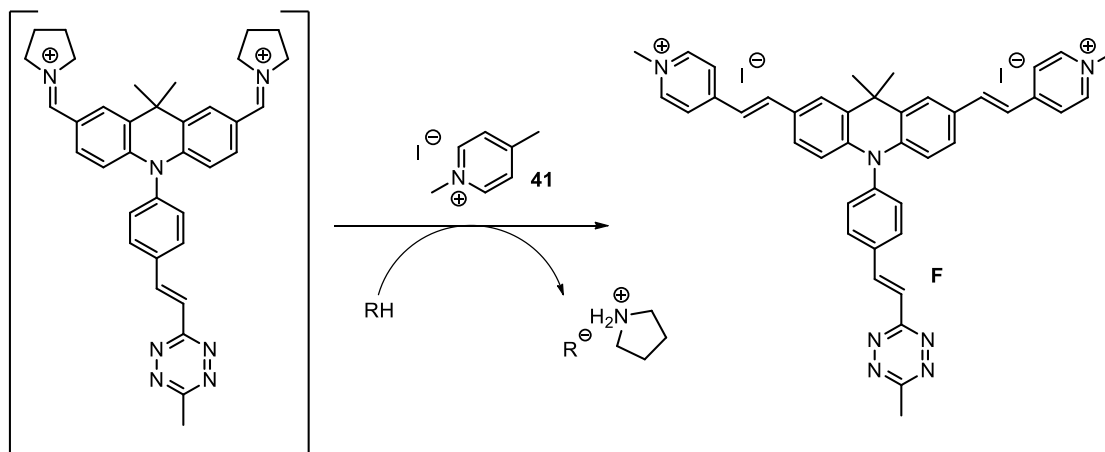


Figure 170 : Réaction de Knoevenagel en présence de 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine

Cet échec nous a conduit à reconsidérer l'utilisation de la pyrrolidine comme catalyseur pour cette condensation de Knoevenagel.

La réaction entre le dialdéhyde et la pyrrolidine (Figure 168) permet de mettre en évidence la possibilité d'utiliser la pyrrolidine comme catalyseur pour cette réaction, car la formation des iminiums est plus rapide que la dégradation de la tétrazine. Il est néanmoins nécessaire de piéger la pyrrolidine qui est relarguée au cours de la réaction de Knoevenagel afin d'empêcher la dégradation de la tétrazine. Deux types de piège peuvent être envisagés : un électrophile ou bien un acide. Dans les deux cas, le piège ne doit pas interférer avec la réaction, tout comme le produit formé avec la pyrrolidine. Dans le cas des acides, il sera également nécessaire de choisir un acide dont la base conjuguée n'est pas nucléophile pour éviter que celle-ci ne réagisse avec la tétrazine. Différents pièges présentés en Figure 171 ont été testés.²⁰⁰



Piège	Résultats
HCl	Pas de réaction
APTS	Pas de réaction
4-nitrophénylisocyanate	Dégradation du produit
Isocyanate de triméthylsilyle	Dégradation du produit
Acide 2-nitrobenzoïque	Conversion totale. Pas de dégradation
AcOH	Moins de 5 % de produit dégradé

Figure 171 : Réaction entre les iminiums et le sel de pyridinium **41**

Deux premières tentatives ont été effectuées avec l'acide chlorhydrique (36 % dans l'eau) et l'acide *p*-toluènesulfonique. Aucune réaction ne s'est produite en présence de l'un ou l'autre de ces deux acides. Une des hypothèses est qu'ils sont tous les deux suffisamment forts pour protoner l'acridane, ce qui entraîne une précipitation du substrat.

Dans le cas du 4-nitrophénylisocyanate, ce dernier n'était pas suffisamment soluble dans les conditions de réaction. Même en diluant le milieu réactionnel (par 2), il ne semblait pas se solubiliser davantage. C'est pourquoi l'isocyanate de triméthylsilyle, qui est quant à lui liquide, a par la suite été utilisé. Malheureusement, la réaction entre la pyrrolidine et la tétrazine s'est avérée être plus rapide que celle entre la pyrrolidine et l'isocyanate.

Deux acides possédant un pKa plus faible ne pouvant pas protoner l'acridane ont été testés : l'acide acétique (pKa = 4,8) et l'acide 2-nitrobenzoïque (pKa = 4,2). Pour avoir une base conjuguée peu nucléophile, l'acide 2-nitrobenzoïque qui possède un substituant électroattracteur en *ortho* a été préféré

²⁰⁰ Certains tests ont été effectués sur le squelette triphénylamine (synthétisé par D. Naud, AI CNRS au laboratoire) et d'autres sur le squelette acridane

à l'acide benzoïque non substitué. Les suivis réactionnels ont permis de conclure que l'acide 2-nitrobenzoïque empêchait la formation du produit secondaire qui correspond à la dégradation de la tétrazine ; et que sa formation restait modérée mais avait tout de même lieu dans le cas de l'acide acétique.

La LC/MS du précipité obtenu suite à la réaction avec l'acide 2-nitrobenzoïque s'est avérée très prometteuse : le produit attendu est largement majoritaire avec une pureté supérieure à 95 % (Figure 172).

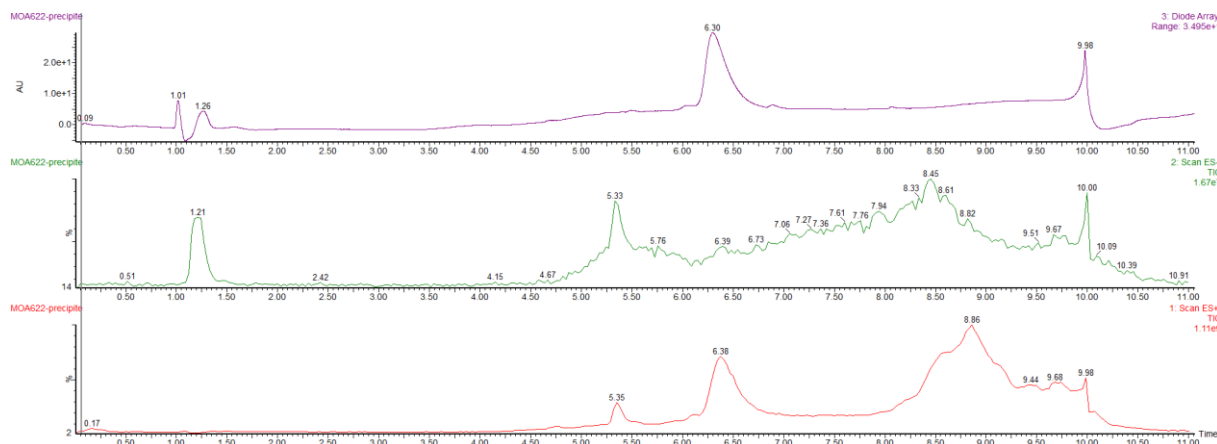


Figure 172 : LC/MS du précipité obtenu après la réaction de Knoevenagel (Piège = acide 2-nitrobenzoïque)

La RMN ¹H de ce même précipité a néanmoins mis en évidence la présence d'un (ou plusieurs) produit(s) secondaire(s) au sein de celui-ci, dont les signaux sont entourés sur la Figure 173.

Piège utilisé :

RMN ¹H du précipité obtenu :

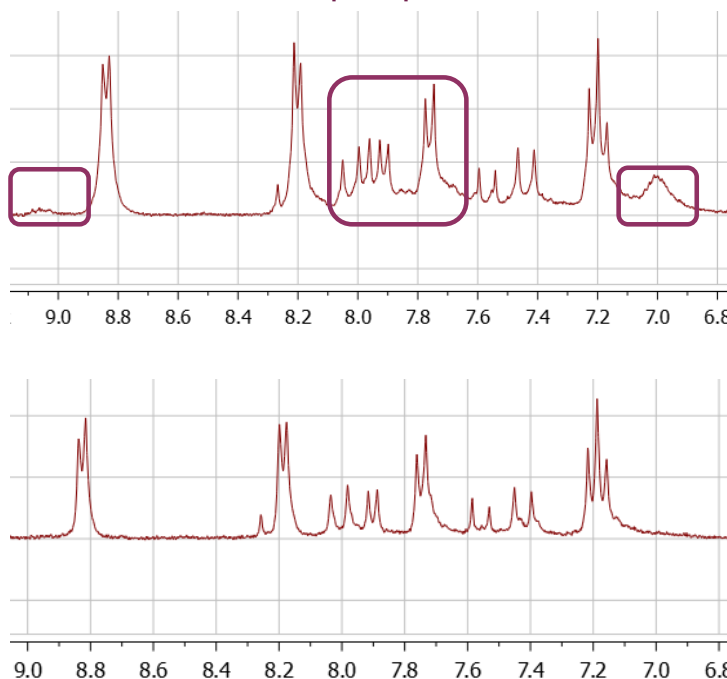
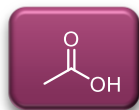


Figure 173 : RMN du proton dans le DMSO-d₆ des précipités obtenus après la réaction de Knoevenagel (Piège = acide 2-nitrobenzoïque en haut et acide acétique en bas) – zoom sur les signaux aromatiques

La structure de ce produit secondaire n'a pas pu être déterminée. À part un éventuel produit de dégradation, les seuls composés du milieu réactionnel comportant des signaux aromatiques sont le sel de pyridinium, l'acide benzoïque ainsi que le benzoate de pyrrolidinium formé au cours de la réaction. Les

RMN ^1H dans le DMSO de ces différents composés ont été effectuées, et aucun des signaux présents dans la RMN du précipité n'a pas pu être attribué à des signaux de ces différents composés. Ces expériences complémentaires seraient en faveur de la formation d'un produit secondaire au cours de la réaction co-éluant avec le produit en LC/MS. Etrangement, aucune différence dans les spectres de masse n'a pu être décelée. Pour s'assurer que ce composé provenait bien de la manipulation et n'était pas issu d'une contamination extérieure, la manipulation a été réalisée en tube RMN dans du diméthylformamide- d_7 . Cela a permis de confirmer que ce produit était bien formé au cours la manipulation, sans pour autant que cela permette de l'identifier.

Finalement, c'est donc l'acide acétique qui a été choisi comme piège pour réaliser cette réaction. Il a été ensuite nécessaire d'optimiser les autres paramètres réactionnels afin d'obtenir une conversion totale tout en prévenant la dégradation de la tétrazine. En particulier, l'expérience présentée en Figure 168 a permis de mettre en évidence la non-dégradation de la tétrazine en présence de 2.0 équivalents de pyrrolidine. Comme la pyrrolidine sera piégée une fois relarguée, il est nécessaire de s'assurer que la première étape de formation des iminiums est quantitative. Il est par conséquent peu judicieux de mettre exactement 2.0 équivalents de pyrrolidine, notamment car les quantités manipulées impliquent que deux équivalents représentent moins d'une dizaine de microlitres, ce qui rend peu précis le nombre d'équivalents introduits même à l'aide d'une seringue de précision de type Hamilton. Pour pallier ce problème, l'expérience présentée en Figure 174 a été réalisée : le dialdéhyde a été mis en présence d'un excès de pyrrolidine. Un suivi en LC/MS a permis de mettre en évidence que le composé ne s'était pas dégradé en 15 min à $0\text{ }^\circ\text{C}$.

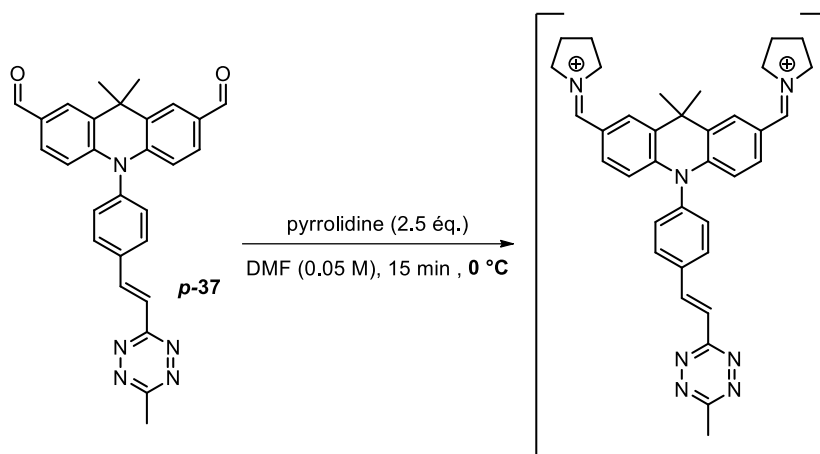


Figure 174 : Formation des iminiums en présence de pyrrolidine à $0\text{ }^\circ\text{C}$

Pour limiter la dégradation, il est donc souhaitable de réaliser la réaction à froid. Comme la réaction dure plus de 12h et qu'aucun cryostat n'est disponible au laboratoire, les condensations de Knoevenagel ont été effectuées dans une chambre froide (thermostatée à $4\text{ }^\circ\text{C}$).

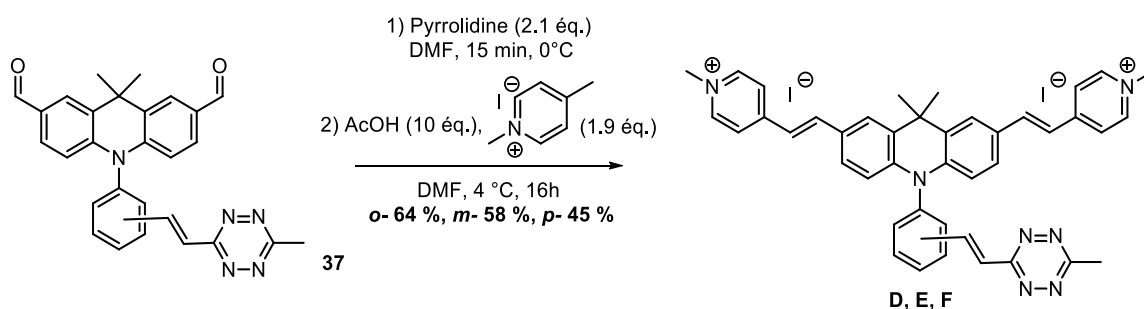


Figure 175 : Condensation de Knoevenagel

Par ailleurs, les premiers essais ont été réalisés avec un excès de sel de pyridinium. Malheureusement, l'excès de sel de pyridinium précipitait avec le composé attendu. Cela nous a conduit à abaisser la quantité de sel de pyridinium à 1.9 équivalents. Cela entraîne la formation de 10 % de composé possédant encore un aldéhyde. Néanmoins, ce dernier étant monochargé, il peut être en partie éliminé lors de l'étape de précipitation. Ainsi, il est présent à moins de 5 % dans les précipités finaux d'après les analyses LC/MS. Ces différentes optimisations ont permis d'accéder aux composés souhaités avec de bons rendements compris entre 45 et 64 % selon le régioisomère concerné (Figure 175).

2) Cas de la stratégie PeT²⁰¹

La voie de synthèse qui pourrait permettre d'accéder aux sondes fluorogéniques comportant un lien éther est présentée en Figure 176 ci-dessous.

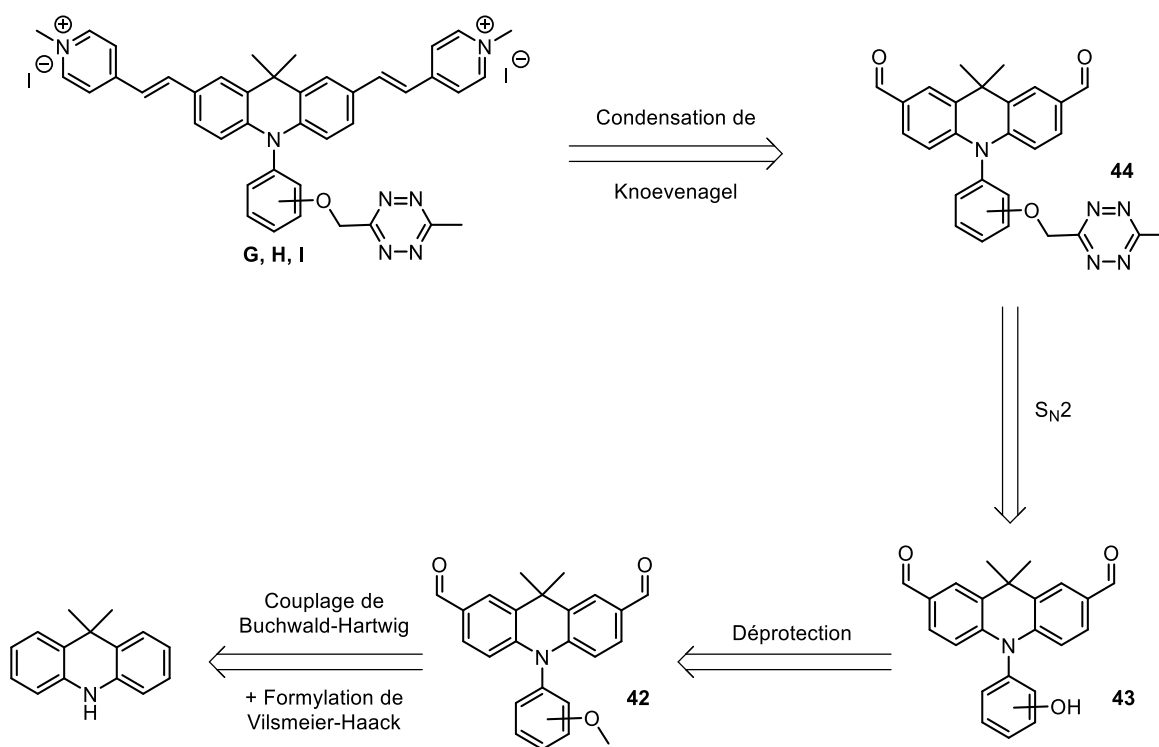


Figure 176 : Rétrosynthèse des sondes fluorogéniques qui comportent un lien éther

Cette voie de synthèse reprend l'étape clé développée sur les dérivés comportant un lien vinyle, la condensation de Knoevenagel. Le dérivé **44** pourra quant à lui être obtenu *via* une réaction entre une tétrazine bromée et le phénol **43**. Ce dernier sera synthétisé en 3 étapes à partir de la 9,9-diméthyl-9,10-dihydroacridine commerciale.

La synthèse de ces dérivés est présentée en Figure 177 page suivante. La première étape qui consiste en un couplage de Buchwald-Hartwig a été réalisée en adaptant des conditions décrites dans la littérature, en remplaçant le Pd(dba)₂ par du Pd₂(dba)₃.²⁰² Ces conditions ont permis de coupler les trois iodoanisoles avec l'acridane avec de très bons rendements compris entre 86 et 96 % selon le régioisomère considéré. Une formylation de type Vilsmeier-Haack a ensuite été réalisée pour obtenir les différents dialdéhydes avec des rendements compris entre 54 et 87 %. L'utilisation de tribromure de bore dans du dichlorométhane a ensuite permis d'accéder aux trois phénols cibles, avec de bons rendements, allant de 66 % pour l'isomère *ortho* à 87 % pour l'isomère *para*.

²⁰¹ La synthèse du dérivé possédant la tétrazine en position méta a été effectuée par Matthieu Poulain dans le cadre de son stage de deuxième année de master.

²⁰² B. L. Buss et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59 (8), 3209-3217. DOI : [10.1002/anie.201910828](https://doi.org/10.1002/anie.201910828)

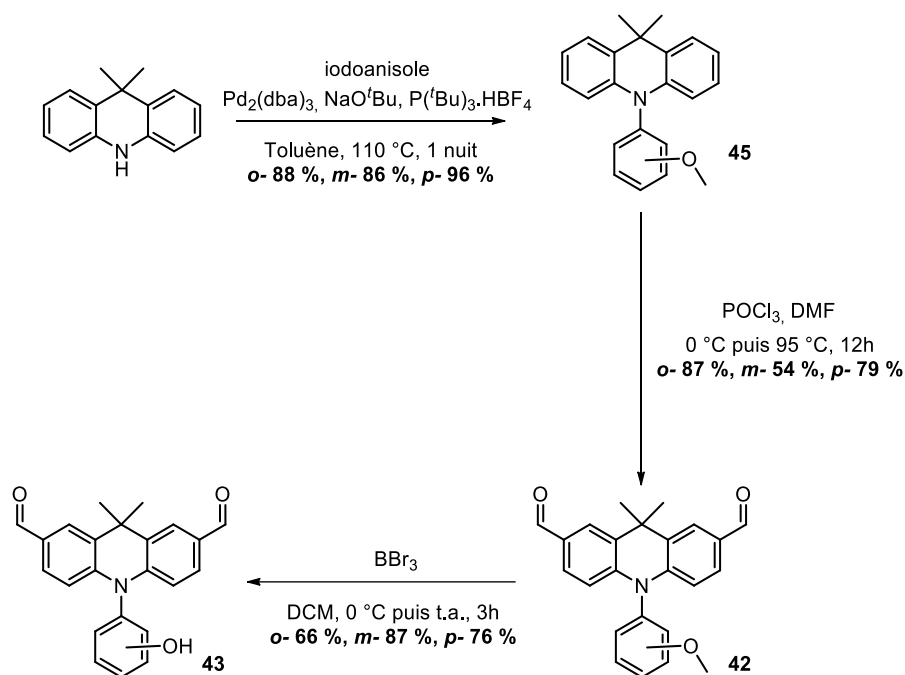


Figure 177 : Synthèse des différents phénols **43**

En parallèle, la bromotétrazine **48** a été synthétisée en 3 étapes selon une procédure décrite dans la littérature à partir du méthoxyacétonitrile qui est commercial (Figure 178).¹⁷⁴

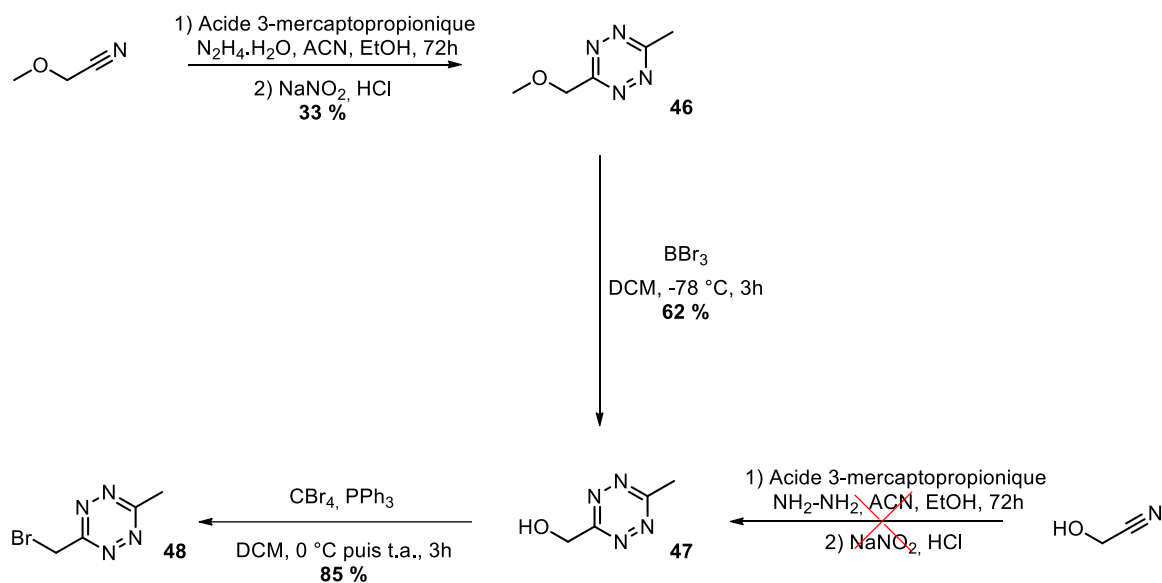
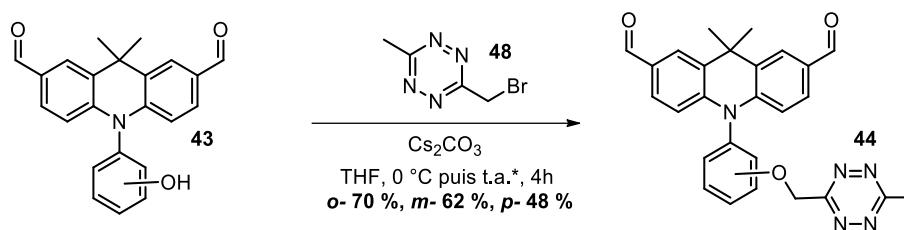


Figure 178 : Synthèse de la bromotétrazine **48**

De manière surprenante, la synthèse cette tétrazine en une étape à partir l'hydroxyacétonitrile n'a pas fonctionné alors que cette réaction fonctionne avec le 3-hydroxypropionitrile (Figure 163). La première étape consiste donc à synthétiser la tétrazine à partir du méthoxyacétonitrile et d'acétonitrile. La tétrazine **46** a ainsi été obtenue avec un rendement de 33 %. Une déprotection en présence de tribromure de bore a ensuite été effectuée pour obtenir l'alcool **47**. Il est nécessaire d'effectuer cette réaction à une température de -78 °C pour éviter la dégradation de la tétrazine. Enfin, une réaction d'Appel a permis d'obtenir le dérivé bromé **48** avec un très bon rendement de 85 %. Il s'agit d'un dérivé très volatile, la purification sur gel de silice a donc été effectuée dans un mélange pentane/dichlorométhane afin d'éviter que le composé ne s'évapore pendant la concentration après la purification.



* Pour le régioisomère *ortho*, la réaction a été réalisée à 50 °C dans un mélange THF/DMF 1:1

Figure 179 : Substitution nucléophile entre la bromotétrazine **48** et les phénols **43**

Une substitution nucléophile a ensuite été effectuée dans le THF en adaptant une procédure décrite dans la littérature (Figure 179).¹⁷³ Après avoir introduit le phénol et la tétrazine, le milieu réactionnel a été refroidi à 0 °C pour l'ajout du carbonate de césium. Le milieu réactionnel a ensuite été agité 4h à température ambiante. Cela a permis d'obtenir les composés en *mé*ta **m-44** et en *para* **p-44** avec de bons rendements (62 et 48 % respectivement). Dans le cas du régioisomère *ortho*, le produit n'a pas été obtenu. Pour pallier un éventuel problème de solubilité, du *N,N*-diméthylformamide a été ajouté. En l'absence de réaction, la température du milieu réactionnel a été augmentée à 50 °C ce qui a permis d'accéder au composé souhaité **o-44** avec un très bon rendement de 70 %.

La réaction de Knoevenagel a ensuite été menée dans les conditions précédemment optimisées (Figure 180).

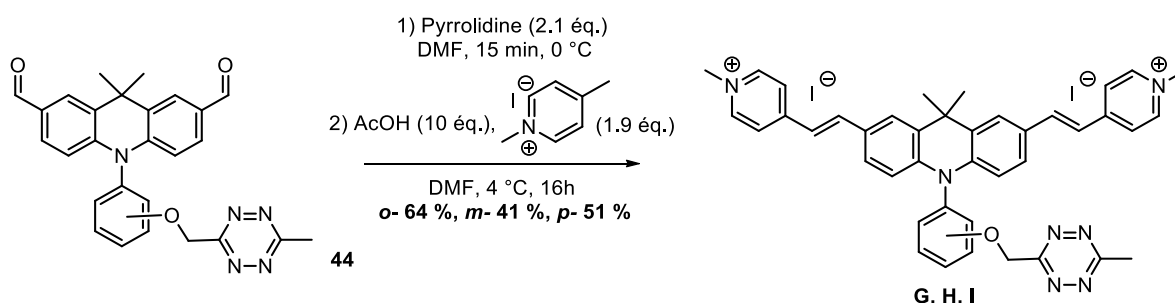


Figure 180 : Condensation de Knoevenagel

Cette réaction a permis d'accéder aux trois composés souhaités **G**, **H** et **I** avec de bons rendements compris entre 41 et 64 %.

3) Cas de la stratégie TBET2 (Lien direct)

Une première voie de synthèse présentée précédemment (Figure 147) a déjà permis d'obtenir le régioisomère *para* (sonde fluorogénique **C**). Cette partie sera donc consacrée à la synthèse des régioisomères *ortho* et *mé*ta.

La voie de synthèse qui pourrait permettre d'accéder aux sondes fluorogéniques avec un « lien direct » est présentée en Figure 181 ci-contre. Face aux difficultés rencontrées pour réaliser des couplages palladocatalysés sur des composés comportant des tétrazines (évoquées en début de chapitre), cette voie de synthèse a été choisie car elle permet de réaliser le couplage entre l'acridane et un nitrile. La tétrazine pourra ensuite être synthétisée à partir de ce dernier. Une formylation de Vilsmeier-Haack (POCl_3/DMF) sera ensuite réalisée pour accéder au dialdéhyde. Cela devrait être compatible avec la présence de la tétrazine car celle-ci se dégrade avant tout en présence de nucléophile.

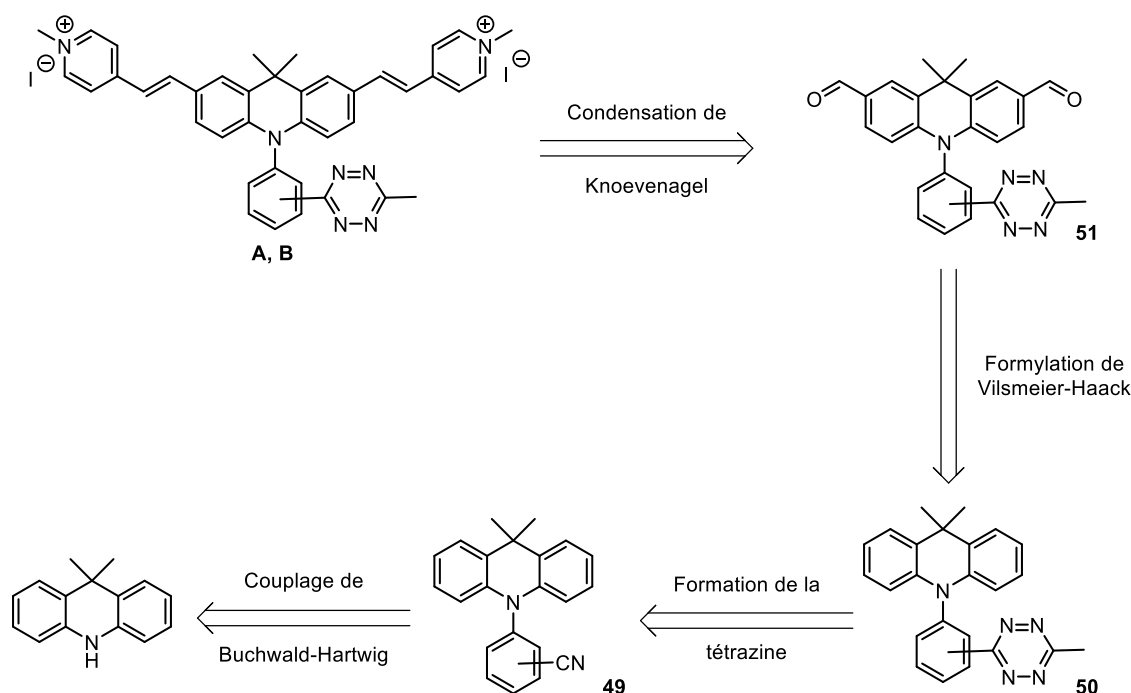


Figure 181 : Rétrosynthèse des sondes fluorogéniques qui comportent un lien direct

La première étape consiste à coupler un bromobenzonitrile avec la 9,9-diméthyl-9,10-dihydroacridine. Dans la littérature, cette réaction est décrite entre le 2- et le 3-bromobenzonitrile et la 9,9-diphényl-9,10-dihydroacridine selon les conditions suivantes : $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (0.3 éq.), $\text{P}(\text{tBu})_3 \cdot \text{HBF}_4$ (2.0 éq.), NaO^tBu (2.0 éq.) dans du toluène (0.09 M) à 110 °C pendant 24h.²⁰³

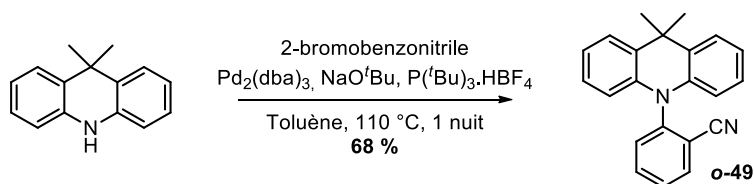


Figure 182 : Réaction entre le 2-bromobenzonitrile et la 9,9-diméthyl-9,10-dihydroacridine

Ces conditions n'ont néanmoins pas permis d'obtenir le composé souhaité **o-49**. Les quantités de palladium et de ligands utilisées étant peu usuelles, un second essai a été réalisé en diminuant ces dernières à respectivement 2 mol% et 4 mol%. Le produit **o-49** a ainsi été obtenu avec un bon rendement de 68 % (Figure 182). Ces mêmes conditions réactionnelles n'ont cependant pas permis d'obtenir le dérivé **m-49** (Figure 183). Il a été décidé de valider la suite de la voie réactionnelle avec **o-49** avant de trouver une autre méthode pour obtenir **m-49**.

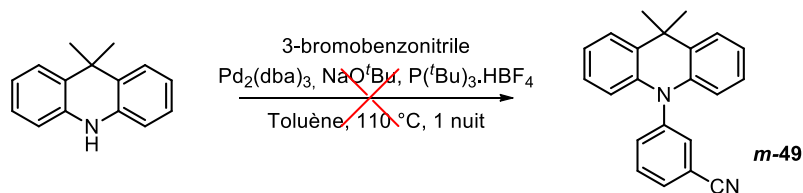


Figure 183 : Réaction entre le 3-bromobenzonitrile et la 9,9-diméthyl-9,10-dihydroacridine

²⁰³H. Noda et al., *Chem. Lett.* **2016**, 45 (12), 1463-1466. DOI : [10.1246/cl.160814](https://doi.org/10.1246/cl.160814)

Les conditions utilisées usuellement pour la synthèse des tétrazines (catalyse à l'acide 3-mercaptopropionique dans l'éthanol) ont été appliquées au nitrile **o-49**. Malheureusement, ces conditions n'ont pas permis d'accéder au composé souhaité (Figure 184).

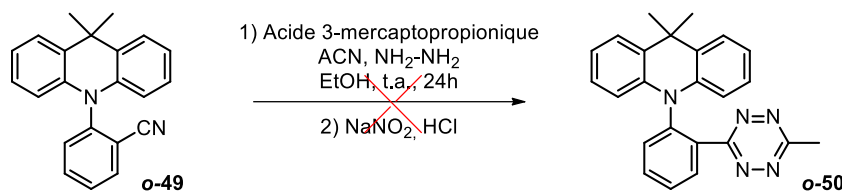


Figure 184 : Synthèse de la tétrazine **o-50** à partir du nitrile **o-49**

Cela s'explique probablement par la très faible solubilité du composé de départ, très hydrophobe, dans le milieu réactionnel. Pour pallier ce problème, la même réaction a été réalisée à 50 °C, mais cela n'a pas permis d'obtenir la tétrazine. Ce type de réactions peut également être effectué dans le DMF ou encore le dioxane.¹⁷ Malheureusement, aucun changement de solvant n'a permis d'obtenir la tétrazine souhaitée.

Une voie de synthèse alternative serait de faire un couplage de Liebeskind–Srogl en faisant réagir l'acide boronique de l'acridane avec la thiométhyltetrazine, décrit dans la littérature sur des substrats similaires (Figure 185).²⁰⁴ La réaction de formation de l'acide boronique est par ailleurs décrite dans la littérature sur la triphénylamine correspondante avec un rendement de 56 %.²⁰⁵ En cas d'échec, l'acide boronique **o-51** pourrait également être obtenu en couplant la 9,9-diméthyl-9,10-dihydroacridine avec l'acide 2-bromophénylboronique, cette réaction étant décrite dans la littérature entre la 9,9-diméthyl-9,10-dihydroacridine avec l'acide 3-bromophénylboronique.²⁰⁶

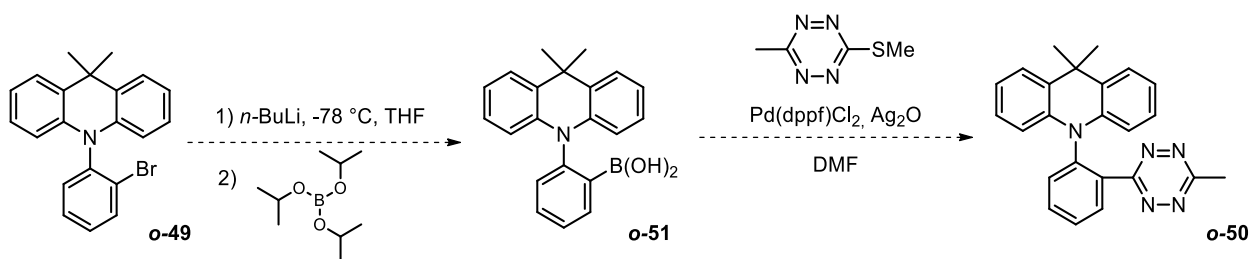


Figure 185 : Voie de synthèse alternative du dérivé **o-50**

La tétrazine peut quant à elle être obtenue en trois étapes selon des conditions décrites dans la littérature (Figure 186).²⁰⁷

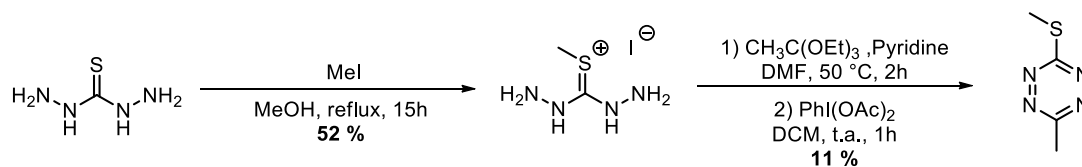


Figure 186 : Synthèse de la 6-méthyl-3-méthylthio-1,2,4,5-tétrazine²⁰⁷

En cas de succès, une voie de synthèse similaire pourra être utilisée également pour l'obtention du régioisomère *méto*.

²⁰⁴ W. D. Lambert *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (43), 17068-17074. DOI : [10.1021/jacs.9b08677](https://doi.org/10.1021/jacs.9b08677)

²⁰⁵ M. S. Yun *et al.* KR20150051662, **2015**.

²⁰⁶ M. Guangyan *et al.* CN109438435, **2019**.

²⁰⁷ Z. Zhu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (49), 20778-20787. DOI : [10.1021/jacs.0c09775](https://doi.org/10.1021/jacs.0c09775)

IV. Conclusion

Grâce à la première voie de synthèse développée, une première sonde fluorogénique **C** a pu être obtenue avec un rendement global de 30 % sur 6 étapes. Malheureusement, aucun autre composé n'a pu être synthétisé *via* cette voie de synthèse.

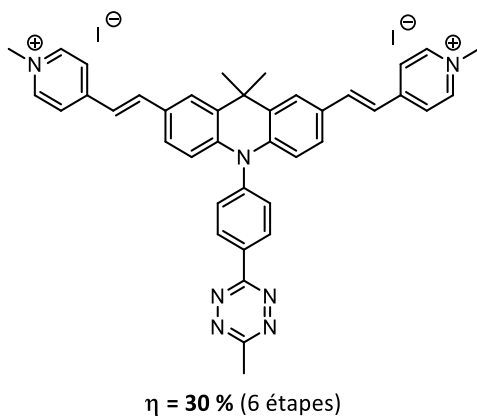


Figure 187 : Sonde fluorogénique **C** obtenue grâce à la première voie de synthèse développée

Les voies de synthèse alternatives développées ont néanmoins permis d'accéder à six autres sondes fluorogéniques, avec des rendements globaux compris entre 10 % sur 5 étapes pour **H** et 32 % sur 3 étapes pour **F** (Figure 188).

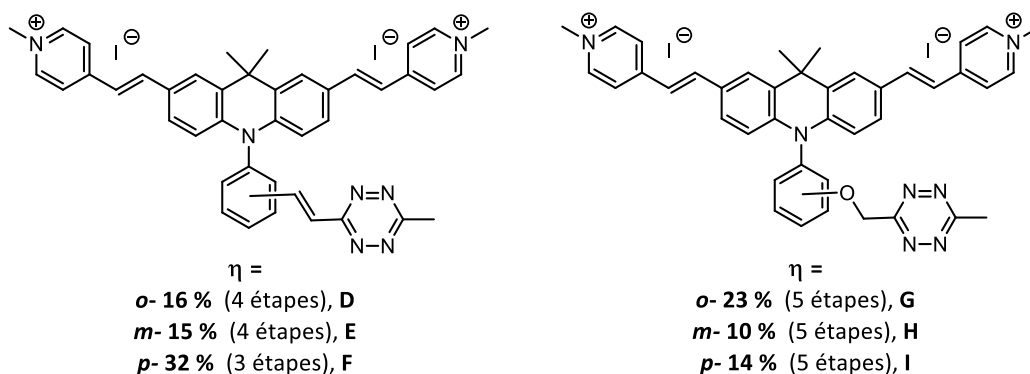


Figure 188 : Sondes fluorogéniques obtenues grâce aux voies de synthèse alternatives

L'obtention de ces composés a nécessité un effort de méthodologie de synthèse notamment sur la dernière étape de Knoevenagel. Le développement de conditions compatibles avec la tétrazine sensible en présence de nucléophiles a été mené avec succès.

CHAPITRE 2-2 : Études *in vitro*

I. Généralités

1) Choix du partenaire réactionnel

Il existe de nombreux partenaires qui peuvent réagir selon une réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse avec une tétrazine (Figure 119). Le choix du partenaire va influencer plusieurs paramètres. En particulier, la vitesse de réaction sera dépendante de ce dernier. La nature du produit obtenu dépend également du partenaire utilisé. Ainsi, bien que les *trans*-cyclooctènes soient les partenaires qui permettent d'atteindre les vitesses de réaction les plus élevées, ils entraînent la formation de dihydropyridazine, alors que les cyclooctynes conduisent à la formation de pyridazine (Figure 189).

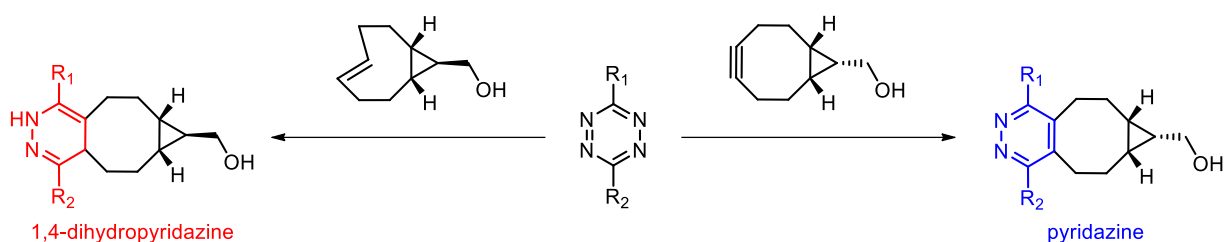


Figure 189 : Réaction entre la tétrazine et un *trans*-cyclooctène ou une cyclooctyne

Un des inconvénients de l'utilisation de *trans*-cyclooctènes est que la dihydropyridazine est elle-même un inhibiteur de fluorescence *via* un mécanisme de type PeT (Figure 190).²⁰⁸ En effet, le rendement quantique du produit avec le *trans*-cyclooctène est de 30 %, tandis que celui du produit avec la cyclooctyne est de 95 %. La dihydropyridazine peut ensuite être oxydée en pyridazine mais cela requiert la présence d'un oxydant.

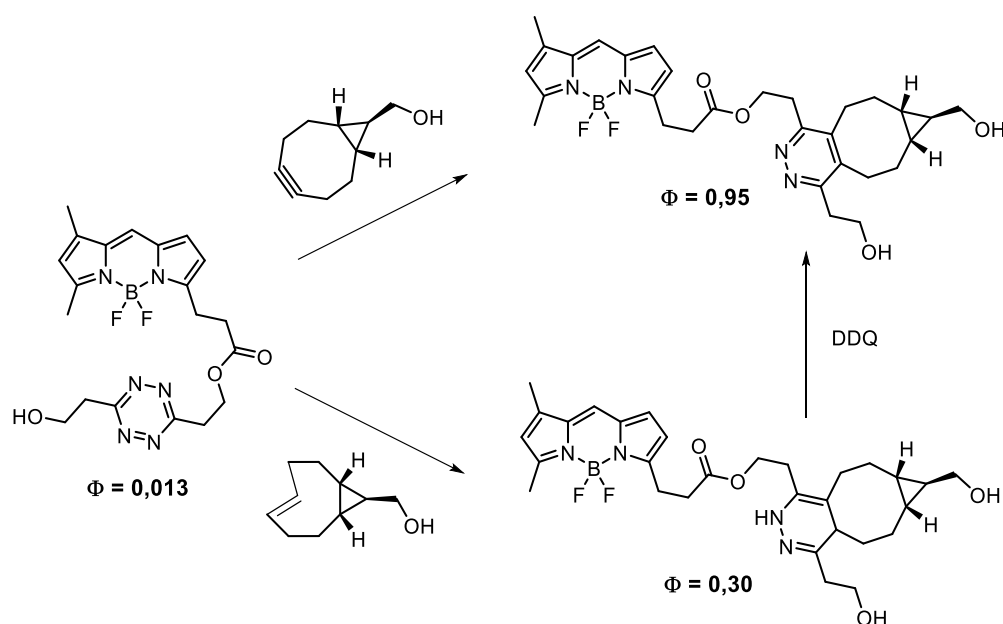


Figure 190 : Structures et rendements quantiques de BODIPY conjugués à une tétrazine, une dihydropyridazine ou une pyridazine. Figure adaptée de [B. Pinto-Pacheco et al., 2020]²⁰⁸

²⁰⁸ B. Pinto-Pacheco et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2020, 59 (49), 22140-22149. DOI : [10.1002/anie.202008757](https://doi.org/10.1002/anie.202008757)

Sans contrôle de l'oxydation de la dihydropyridazine en pyridazine, il peut donc être difficile de mener des expériences reproductibles. L'utilisation de dérivé de type BCN semble ainsi être un bon compromis, car les vitesses de réaction avec ce partenaire reste très élevées ($k \approx 10^2$ à 10^3 L.mol⁻¹.s⁻¹) et cela permet d'effectuer des études photophysiques sans devoir contrôler l'oxydation.

Par ailleurs, l'utilisation de BCN permet d'obtenir un composé clické qui est conjugué. Cela constitue une approche judicieuse parfois utilisée pour générer *in situ* un fluorophore après réaction avec la tétrazine, et donc obtenir des exaltations de fluorescence très élevées. Cette approche a par exemple été développée par S.J. Siegl *et al.* puis reprise par W. Mao *et al.* afin d'obtenir des exaltations de fluorescence de plus de 900 (Figure 132).^{181,209}

Dans le cadre de ce projet, même si les sondes fluorogéniques développées comportent déjà un fluorophore, cela pourrait permettre d'obtenir une structure octupolaire, qui sont connues pour avoir de meilleures sections efficaces d'absorption biphotonique que leurs analogues dipolaires (Introduction de la première partie, Figure 36).

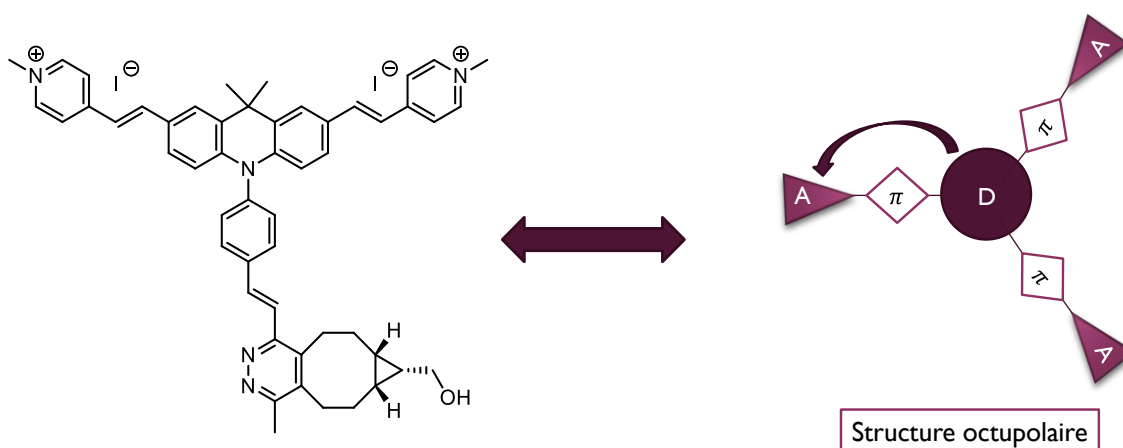


Figure 191 : Structure d'un composé clické et analogie avec une structure octupolaire

Le BCN sera donc utilisé pour les expériences de restauration de fluorescence. Sa synthèse est présentée dans la partie suivante.

2) Synthèse d'une cyclooctyne, le BCN

La cyclooctyne cible a été synthétisée en 5 étapes à partir du 1,5-cyclooctadiène selon le schéma réactionnel décrit en Figure 192, en s'inspirant à la fois de la première synthèse décrite pour le BCN et une procédure décrite par J. M. Fox *et al.*.^{210,211} La première étape entre le 1,5-cyclooctadiène et le diazoacétate d'éthyle n'est pas diastéréosélective. L'apport de J. M. Fox *et al.* a ainsi été de proposer une étape conjointe de saponification et d'épimérisation afin d'obtenir un acide carboxylique sous forme d'un unique diastéréoisomère, en utilisant du *tert*-butanolate de potassium comme base. Cette réaction n'a cependant pas fonctionné, il a été nécessaire d'ajouter de la soude dans le milieu réactionnel afin d'observer la réaction de saponification, et les deux diastéréoisomères **53** ont été obtenus dans des proportions équivalentes avec un rendement global de 52 % sur deux étapes.

²⁰⁹ S. J. Siegl *et al.*, *ChemBioChem* **2019**, 20 (7), 886-890. DOI : [10.1002/cbic.201800711](https://doi.org/10.1002/cbic.201800711)

²¹⁰ J. Dommerholt *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49 (49), 9422-9425. DOI : [10.1002/anie.201003761](https://doi.org/10.1002/anie.201003761)

²¹¹ J. G. K. O'Brien *et al.*, *J. Org. Chem.* **2018**, 83 (14), 7500-7503. DOI : [10.1021/acs.joc.7b02329](https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02329)

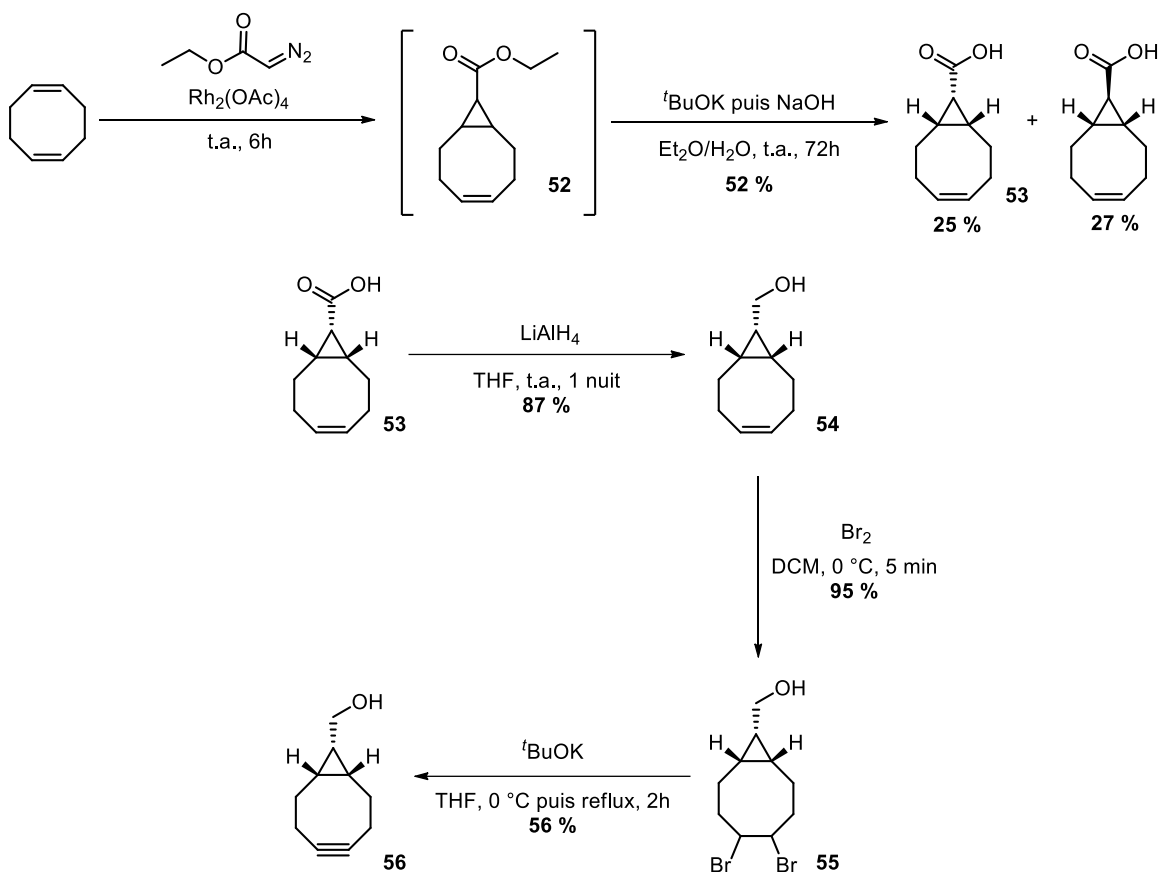


Figure 192 : Synthèse du dérivé BCN **56**

Un des diastéréoisomères a ensuite été réduit en présence de tétrahydroaluminat de lithium dans le THF pour obtenir l'alcool **54** avec un très bon rendement de 87 %. L'alcène **54** a ensuite été dibromé en présence de dibrome dans le dichlorométhane. L'étape clé de cette synthèse est la dernière étape de double élimination en présence de *tert*-butanolate de potassium dans le THF qui a permis d'accéder à la cyclooctyne **56** avec un bon rendement de 56 %.

Il serait par conséquent plus pertinent d'enlever l'étape de saponification et de réduire directement les esters avec du borohydrure de lithium pour obtenir les alcools correspondants, ce qui est d'ailleurs proposé dans d'autres synthèses du BCN.²¹⁰ Cette approche est d'autant plus pertinente que d'autres catalyseurs ont été développés très récemment pour augmenter la diastéréosélectivité de la première étape, cela permet d'enlever l'étape de saponification tout en obtenant un diastéréoisomère majoritaire.²¹² La principale limitation de ces synthèses reste le coût du catalyseur à base de rhodium utilisé pour la première étape : l'acétate de rhodium est vendu au prix de 428 € les 250 mg chez Sigma-Aldrich.

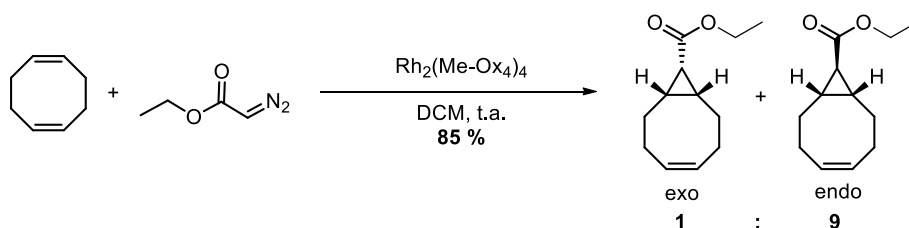


Figure 193 : Réaction développée par J.M. Ravasco et al.

²¹² J. M. Ravasco et al., *Pure Appl. Chem.* **2020**, 92 (1), 15-23. DOI : [10.1515/pac-2019-0201](https://doi.org/10.1515/pac-2019-0201)

II. Réactions *in vitro*

1) Généralités

Le but de cette partie est d'effectuer la réaction IEDDA avec le BCN, et d'évaluer la brillance des sondes fluorogéniques avant et après cette réaction. Usuellement, ces réactions sont réalisées dans un tampon, et il est possible de suivre la cinétique de ces réactions par spectroscopie de fluorescence. Les exaltations sont de la même manière relativement simple à évaluer car il suffit de faire le ratio entre la fluorescence à la fin de la réaction et la fluorescence avant l'ajout du partenaire réactionnel. Malheureusement, ce type d'expériences n'est pas possible pour les sondes fluorogéniques synthétisées pour ce projet. En effet, les composés clickés ne fluoresceront pas ou très peu dans l'eau, comme c'est le cas pour **Acri-Py** synthétisé en première partie.

Bien que ces composés soient censés être fluorescents dans le glycérol, il est par ailleurs inenvisageable de faire la réaction directement dans ce solvant du fait de sa viscosité. Les réactions ont donc été réalisées dans du DMSO ou de l'acétonitrile selon les composés, à des concentrations de l'ordre du millimolaire, et avec deux équivalents de BCN. Après avoir contrôlé l'avancement de la réaction IEDDA par LC/MS, différentes caractérisations ont pu être effectuées. En particulier, les rendements quantiques et les coefficients d'absorption molaire des sondes avant et après réaction ont été ensuite évalués dans le glycérol.

2) Mise en solution des sondes fluorogéniques

Néanmoins, différents problèmes ont été rencontrés en amont de la réalisation des expériences de spectroscopie. La mise en solution des composés dans le DMSO a entraîné l'apparition de produits de dégradation. En Figure 194 se trouve la LC/MS d'un précipité des composés de la série vinyle obtenue à la fin de la réaction de Knoevenagel. Deux produits sont présents : le produit attendu (pureté > 96 %) et le mono issu de la Knoevenagel (< 4 %).

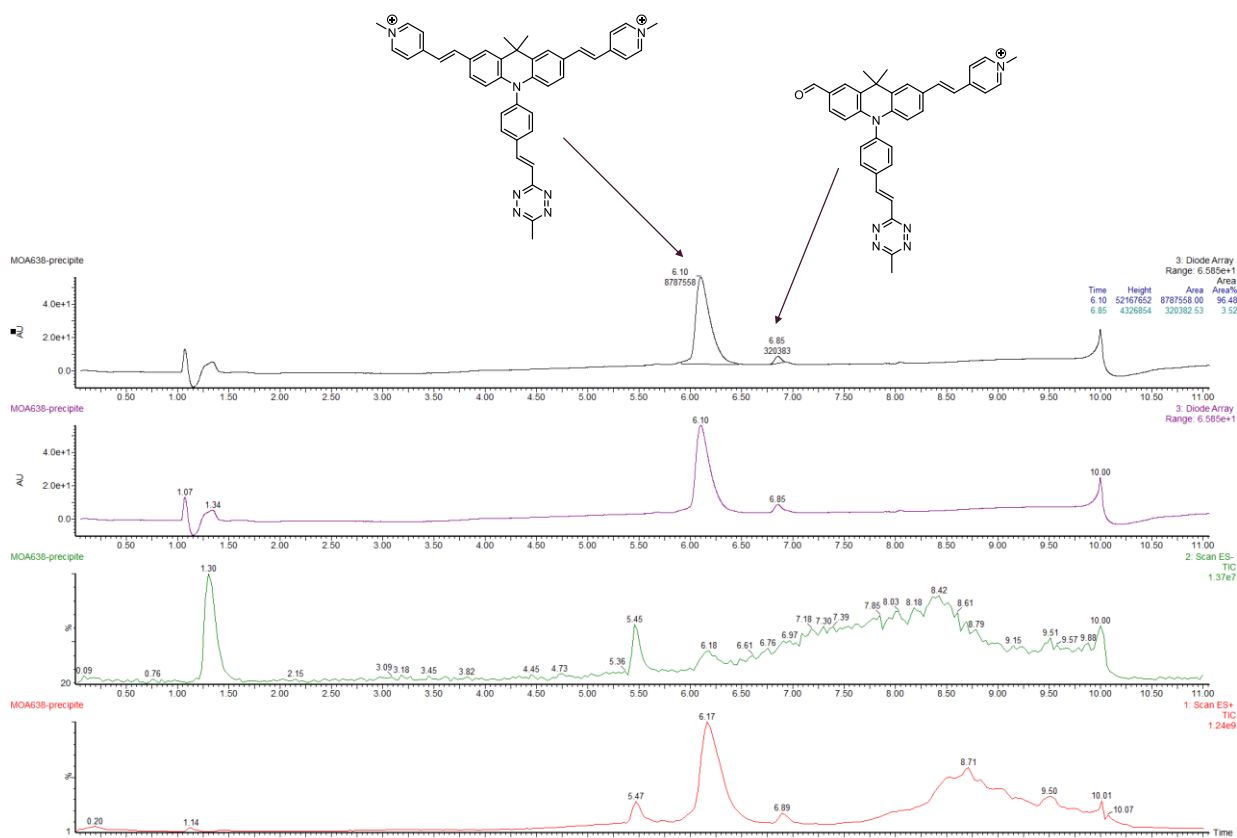


Figure 194 : Exemple de LC/MS d'un précipité obtenu à la fin de la réaction de Knoevenagel

Les spectres de masse présentés en Figure 195 permettent de confirmer la nature de ces produits.

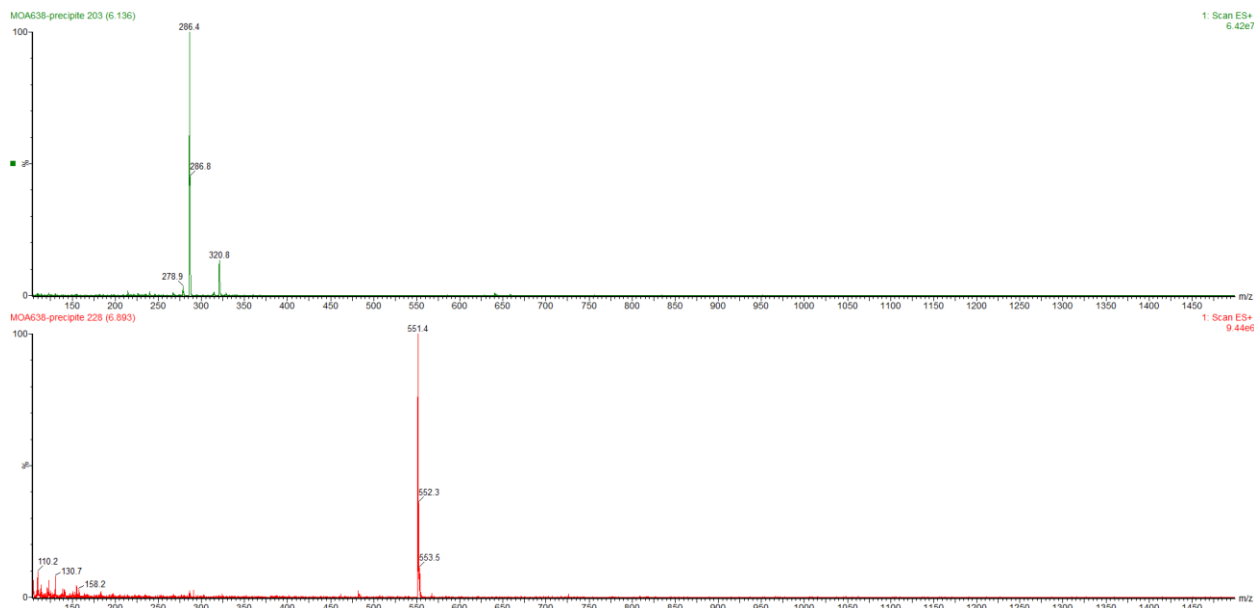


Figure 195 : Spectres de masse des composés présents dans le chromatogramme Figure 194

Malheureusement, après la mise en solution pour réaliser une solution stock dans le DMSO, la présence de produits de dégradation a été identifiée (Figure 196).

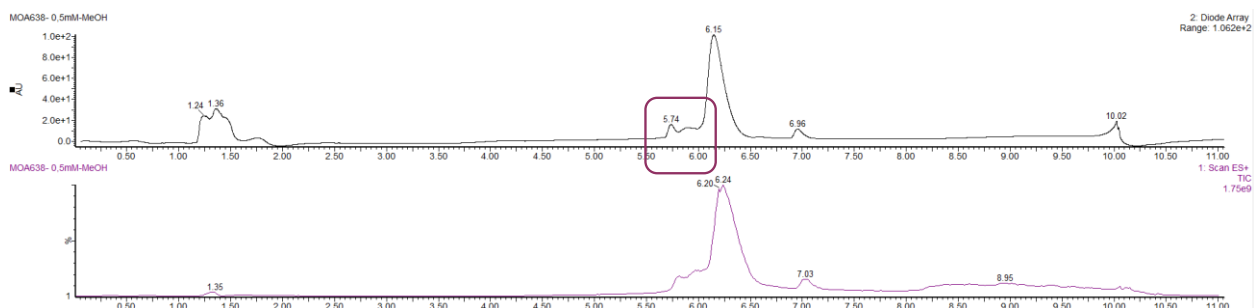


Figure 196 : LC/MS de la solution du composé dans le DMSO

Ces produits de dégradation sont probablement issus de la réaction d'un ou plusieurs nucléophiles avec la tétrazine. Le nucléophile pourrait provenir du DMSO ou bien d'un nucléophile ayant précipité avec le composé suite à la réaction de Knoevenagel (par exemple de l'acétate généré à partir de l'acide acétique ayant réagi avec la pyrrolidine). La dégradation s'est néanmoins produite avec plusieurs lots et qualités de DMSO (essais avec du DMSO qualité « Molecular Biology », DMSO anhydre etc.). Par ailleurs, la superposition de la RMN ^1H du composé et de la RMN ^1H de l'acétate de potassium n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'acétate dans le précipité final. Cependant, pour éliminer l'hypothèse d'un nucléophile dans le précipité, et également pour récupérer du produit propre à partir des différentes solutions dégradées, les composés ont été purifiés à nouveau, cette fois-ci par HPLC préparative. La nature des composés n'a pas permis de réaliser les purifications sans acide. Ces purifications ont été réalisées en présence de TFA. Afin d'éviter tout problème de dégradation, le trifluoroacétate a été échangé par un chlorure suite à la purification.

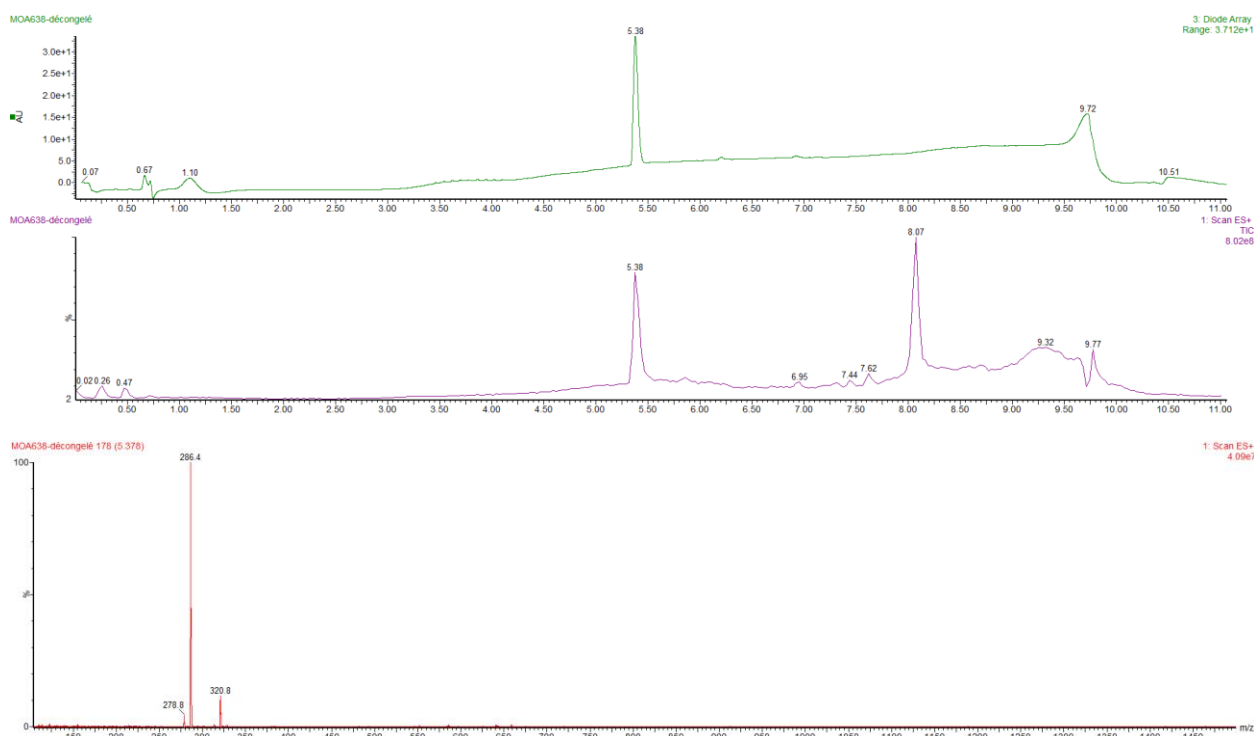


Figure 197 : Produit obtenu suite à purification par HPLC préparative. Le changement de temps de rétention par rapport aux précédents chromatogrammes est dû à un changement de colonne

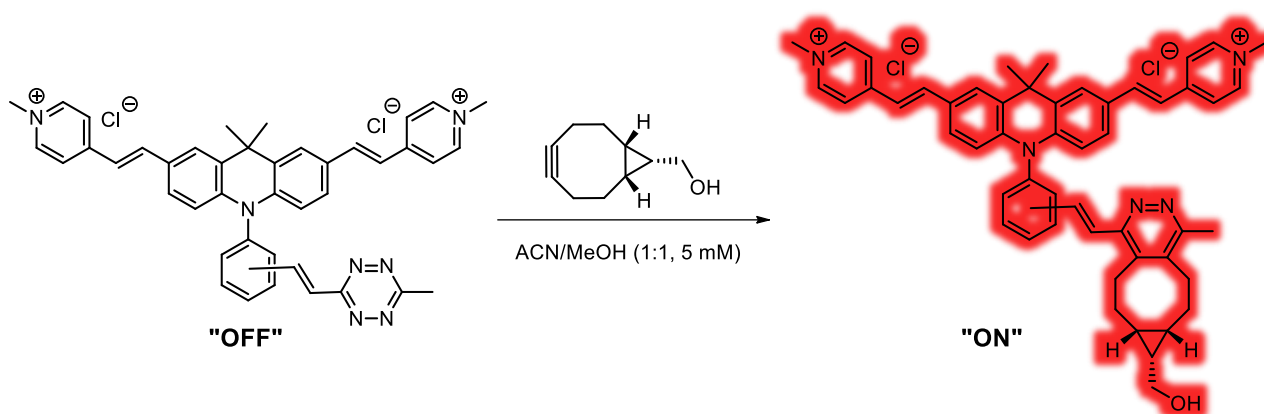
Cette procédure a permis la purification d'une partie des composés (exemple de LC/MS en Figure 197) dont les propriétés photophysiques sont présentées dans la partie suivante.

Malgré ces purifications, des problèmes de dégradation sont à nouveau survenus dans le DMSO. Ainsi, les solutions stocks des composés ont par la suite été réalisées dans un mélange 1:1 ACN/MeOH, les composés fluorogéniques étant beaucoup plus stables dans ce mélange que dans le DMSO.

3) Détermination des exaltations de fluorescence

Les propriétés photophysiques des différentes sondes fluorogéniques ont été évaluées dans le glycérol, après réaction de ces dernières avec du BCN.

Les résultats obtenus pour les sondes fluorogéniques « lien vinyle » sont récapitulés dans le Tableau 20. Pour chaque régioisomère, le rendement quantique de la sonde après la réaction de click est supérieur à celui avant la réaction de click, ce qui permet de valider le design utilisé.

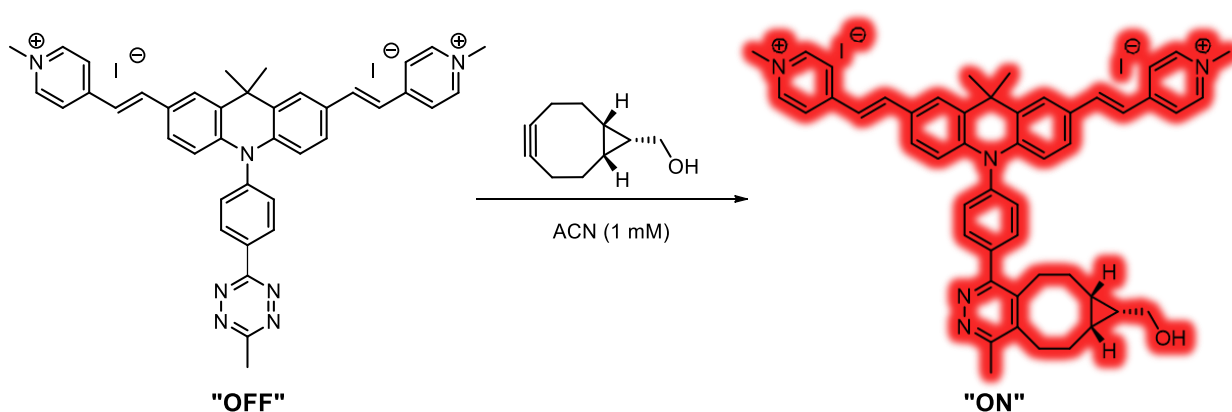


	ϵ_{off} L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	Φ_{off}	$\epsilon \cdot \Phi_{\text{off}}$ L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	ϵ_{on} L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	Φ_{on}	$\epsilon \cdot \Phi_{\text{on}}$ L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	Turn-on
<i>ortho</i>	58 500	1 %	590	59 700	15 %	8 960	14,4
<i>mé</i> ta	52 500	4 %	2 100	54 600	11 %	6 010	2,6
<i>para</i>	53 700	5 %	2 690	54 600	11 %	6 010	2,3

Tableau 20 : Propriétés photophysiques dans le glycérol des sondes fluorogéniques possédant un lien vinyle avant et après réaction avec le BCP

Dans chaque cas, les coefficients d'absorption molaire avant et après réaction sont sensiblement identiques. La fluorogénicité s'explique par conséquent essentiellement par l'augmentation du rendement quantique. Les exaltations de fluorescence sont comprises entre 2,3 pour l'isomère *para* et 14,4 pour l'isomère *ortho*. Par ailleurs, par souci de concision les longueurs d'onde d'absorption et d'émission maximales ne sont pas précisées dans le tableau, car elles sont très peu modifiées au cours de la réaction (de l'ordre de 1 à 3 nm au maximum). Enfin, il est intéressant de noter que les composés clickés sont plus fluorescents que le fluorophore **Ac**ri-Py décrit en première partie. Cela pourrait suggérer que les structures clickées peuvent être assimilées à des structures octupolaires (hypothèse proposée en Figure 191).

Les propriétés photophysiques de l'unique sonde obtenue avec un lien direct (régioisomère *para*) ont également été évaluées (Tableau 21).



	ϵ_{off} L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	Φ_{off}	$\epsilon \cdot \Phi_{\text{off}}$ L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	ϵ_{on} L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	Φ_{on}	$\epsilon \cdot \Phi_{\text{on}}$ L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	Turn-on
<i>para</i>	53 800	3,5 %	1 880	54 200	12 %	6 500	3,4

Tableau 21 : Propriétés photophysiques dans le glycérol de la sonde fluorogénique lien « direct » avant et après réaction avec le BCP

De la même manière, les coefficients d'absorption molaire avant et après réaction sont similaires, la fluorogénicité est donc due à l'augmentation du rendement quantique. Les longueurs d'onde maximales pour l'absorption et pour l'émission sont également très peu modifiées au cours de la réaction. Pour cette sonde, l'exaltation de fluorescence est de 3,4, ce qui est supérieur à l'exaltation obtenue avec le lien vinyle. Cela pourrait ainsi suggérer que ce design est plus prometteur que celui avec un lien vinyle.

III. Conclusion

Malgré les difficultés rencontrées pour réaliser les études biophysiques, les propriétés spectroscopiques de 4 sondes fluorogéniques ont été étudiées. Des premiers résultats très encourageants ont été obtenus pour la stratégie TBET. En particulier une exaltation de fluorescence de 14,4 a été mesurée pour la sonde fluorogénique **D** (régioisomère *ortho*, lien vinyle). Par ailleurs, une exaltation de 3,4 a été obtenue pour la sonde fluorogénique **C** (régioisomère *para*, lien direct). Il sera ainsi pertinent de s'intéresser rapidement à l'optimisation de nouvelles voies de synthèse pour l'obtention de la sonde fluorogénique **A** (régioisomère *ortho*, lien direct), car la modélisation moléculaire a permis de mettre en évidence son fort potentiel par rapport à l'isomère *para*.

Faute de temps, les expériences n'ont malheureusement pas pu être réalisées sur la série comportant le lien éther (stratégie PeT).

CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le premier objectif de ces travaux de thèse était de développer un fluorophore excitable à deux photons aux propriétés photophysiques et physico-chimiques optimisées pour la microscopie biphotonique en cellules vivantes. Dans cette démarche, 7 nouvelles sondes excitables à deux photons ont été synthétisées. Leurs structures sont rappelées en Figure 198 ci-dessous.

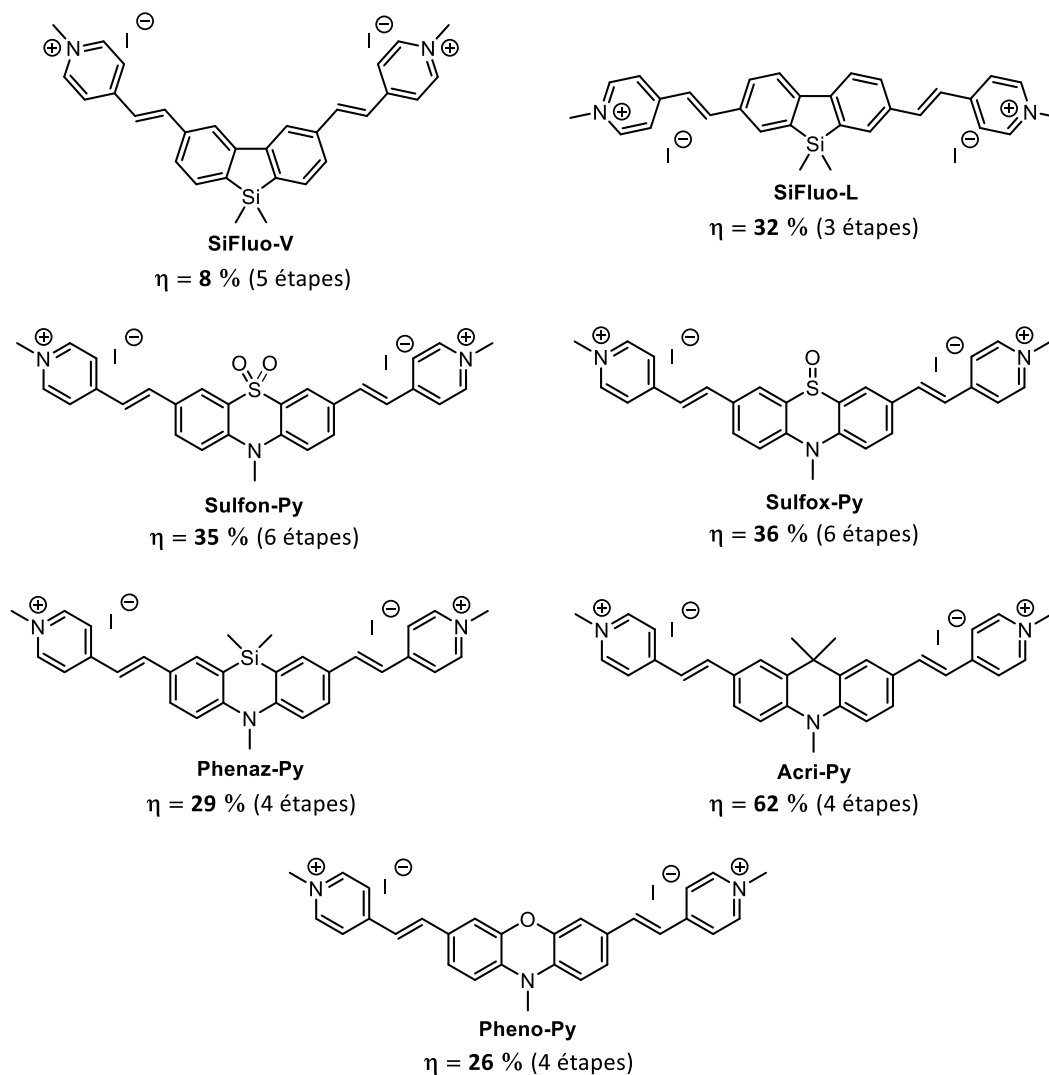


Figure 198 : Structures des sondes excitables à deux photons obtenus et rendements globaux associés

Elles ont été obtenues en 3 à 6 étapes avec des rendements globaux compris entre 8 % pour **SiFluo-V** et 62 % pour **Acri-Py**. Leurs propriétés photophysiques linéaires et non linéaires ont ensuite été étudiées. Un récapitulatif succinct des données obtenues est proposé en Figure 199 page suivante. Ces sondes ont des propriétés similaires : elles sont quasiment éteintes dans l'eau, mais sont fluorescentes dans le glycérol avec des rendements quantiques de très faibles (1,5 % pour **Pheno-Py**) à bons (31 % pour **SiFluo-V**). Leurs propriétés d'absorption biphotonique sont très élevées (sections efficaces d'absorption biphotonique maximales comprises entre 1 000 et 3 650 GM, en excluant **SiFluo-V**), ce qui permet de valider le design quadrupolaire choisi. Différentes études de modélisation moléculaire ont par ailleurs permis de comprendre les données obtenues pour une première série de molécules (les silafluorènes) et de prédire une tendance pour une deuxième série de sondes.

Parmi ces différents fluorophores, **Acri-Py** s'est révélé comme étant particulièrement prometteur : il émet dans le rouge et possède une section efficace d'absorption biphotonique maximale de 3 630 GM à 870 nm. Par conséquent, bien que son rendement quantique soit modeste (9 % dans le glycérol), sa

brillance biphotonique est très élevée (330 GM à 870 nm). Son ratio section efficace d'absorption biphotonique sur masse molaire est de 8.0, ce qui en fait un fluorophore particulièrement efficace.

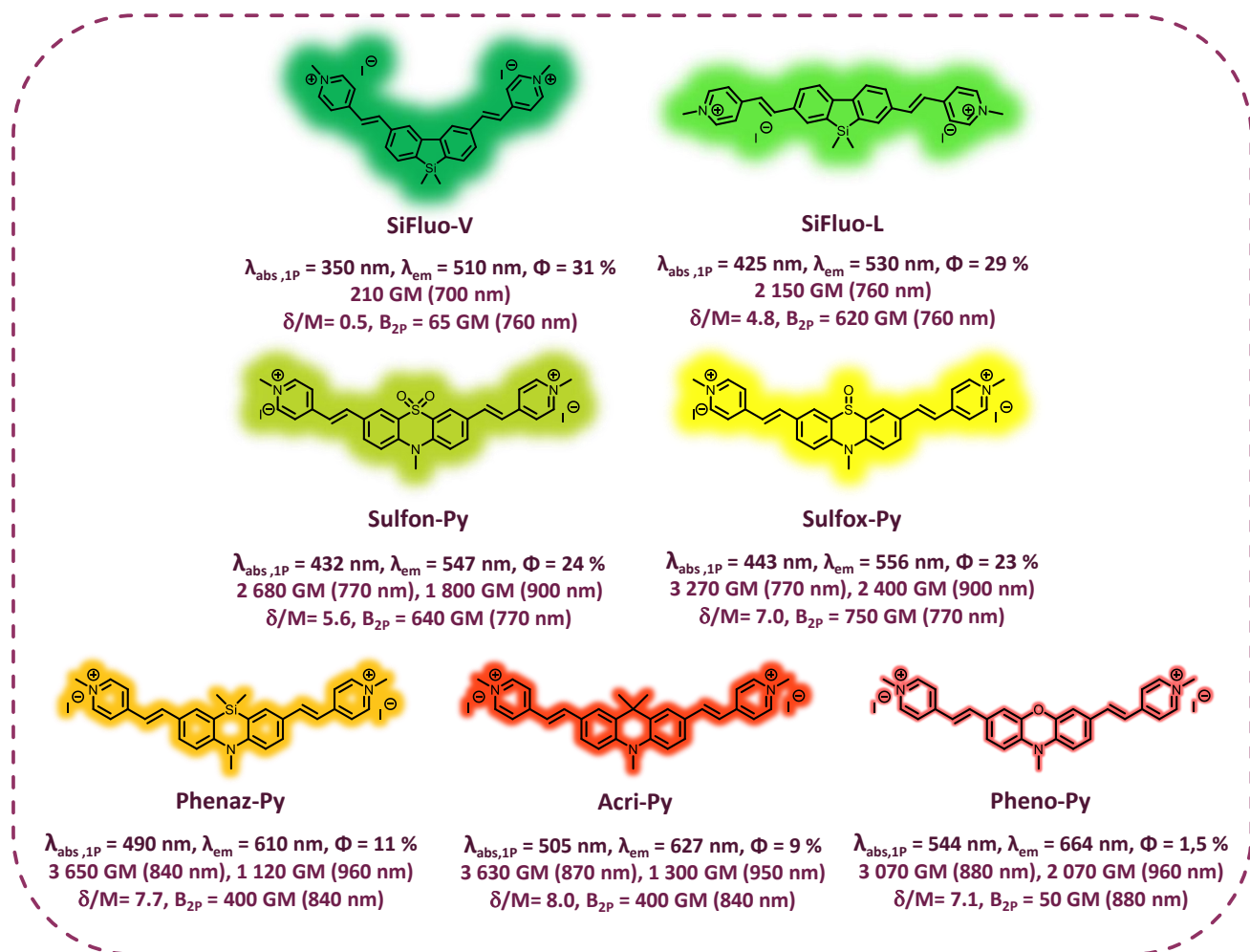


Figure 199 : Composés excitables à deux photons obtenus et leurs propriétés photophysiques dans le glycérol

Ces premiers résultats encourageants nous ont conduit à réaliser des expériences de microscopie en cellules vivantes avec cette sonde, après s'être assuré de son absence de toxicité *via* un test MTT. Le potentiel de cette sonde a été confirmé par les images obtenues en microscopie biphotonique (Figure 200).

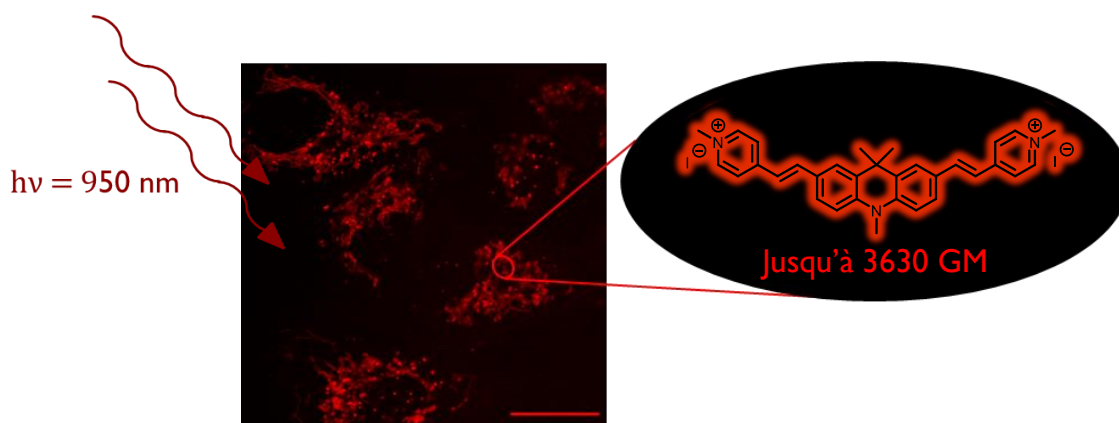


Figure 200 : Image en cellules vivantes d'Acri-Py après excitation biphotonique (950 nm)

Ces expériences ont pu mettre en évidence sa capacité à franchir la membrane des cellules, ce qui a permis d'obtenir des images très contrastées, cohérentes avec la forte brillance de cette sonde évaluée préalablement *in vitro*. Sa photostabilité est également un atout de taille pour la microscopie biphotonique.

Après avoir rempli le premier objectif et avoir trouvé un excellent candidat pour la microscopie biphotonique en cellules vivantes, le second objectif de ce projet a été d'utiliser ce fluorophore, **Acrid-*Py***, afin de concevoir une sonde fluorogénique (ou OFF-ON) excitable à deux photons pour la chimie bioorthogonale. En s'appuyant sur différents mécanismes d'inhibition de fluorescence, et en particulier le PeT et le TBET, la synthèse de 9 sondes fluorogéniques a été envisagée. Parmi elles, la synthèse de 7 sondes fluorogéniques a été menée avec succès, notamment *via* un effort de développement méthodologique de conditions réactionnelles compatibles avec la tétrazine. Leurs structures sont rappelées dans Figure 201 ci-dessous.

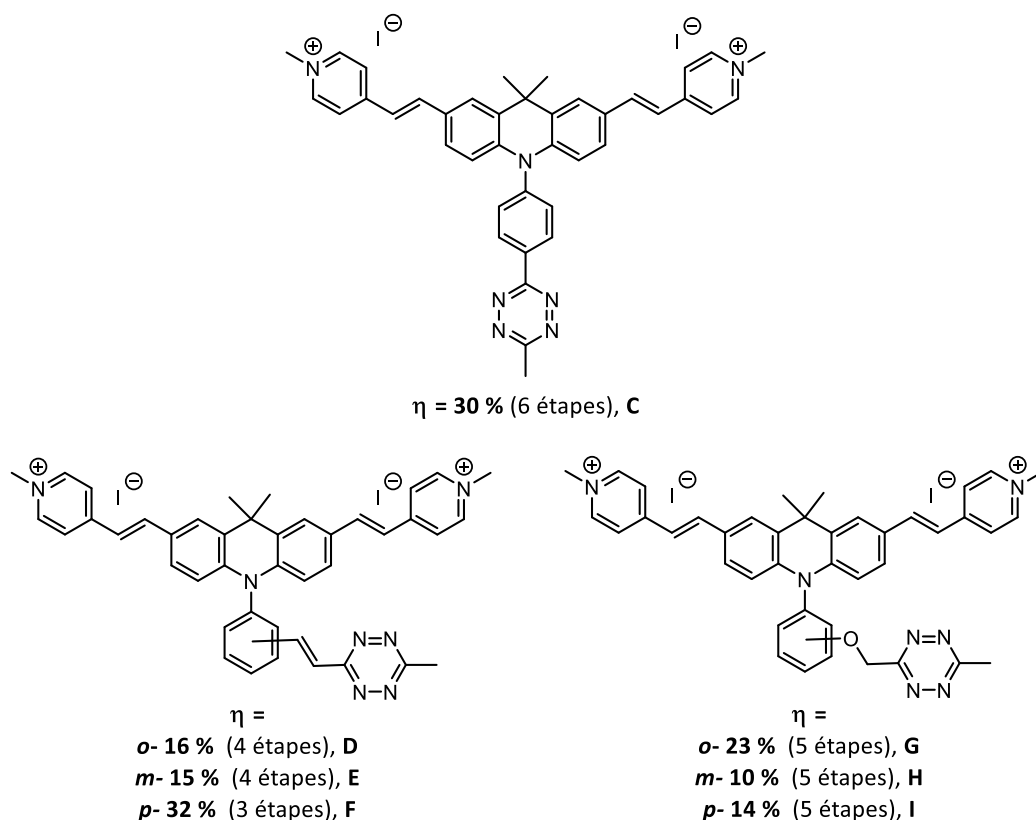


Figure 201 : Structures des 7 sondes fluorogéniques obtenues et rendements globaux associés

Enfin, des résultats préliminaires très encourageants ont été obtenus *in vitro*. Notamment, une exaltation de fluorescence de 14,4 a été mesurée pour la sonde fluorogénique **D** (régioisomère *ortho*, lien vinyle). Dans le cas de la stratégie TBET, l'isomère *ortho* semble ainsi le plus prometteur. Il sera par conséquent essentiel de s'intéresser prochainement au développement de nouvelles voies de synthèse pour l'isomère *ortho* dans le cas du lien direct (sonde **A**). En effet, la comparaison des deux régioisomères *para* a permis de mettre en évidence que la stratégie lien direct pourrait être plus efficace que la stratégie lien vinyle (exaltation de 3,4 contre 2,3). Il sera par la suite nécessaire de poursuivre les études photophysiques, notamment sur les composés non étudiés par manque de temps, afin d'évaluer l'efficacité de la stratégie PeT.

Les sections efficaces d'absorption biphotonique des composés avant et après réaction de click seront également évaluées afin d'obtenir des exaltations de fluorescence « biphotoniques ». Les excellentes propriétés biphotoniques du fluorophore utilisé (**Acrid-*Py***), laissent espérer des sections

efficaces de plusieurs milliers de GM pour les sondes fluorogéniques. Par ailleurs, les études photophysiques réalisées sur les composés clickés ont mis en évidence que ces derniers possédaient un rendement quantique supérieur à **Acrid-*Py***, ce qui laisse penser que la structure de ces sondes peut être assimilée à une structure octupolaire et non plus quadrupolaire. Il est possible que les sondes fluorogéniques aient par conséquent des propriétés biphotoniques encore plus spectaculaires que celles d'**Acrid-*Py*** ($\delta_{\max} = 3\ 630$ GM à 870 nm). Elles seraient ainsi bien plus performantes que celles décrites dans la littérature, qui possèdent des sections efficaces d'absorption biphotonique d'une dizaine de GM environ.

Une fois ces études terminées, une preuve *in cellulo* devra être réalisée (Figure 202).

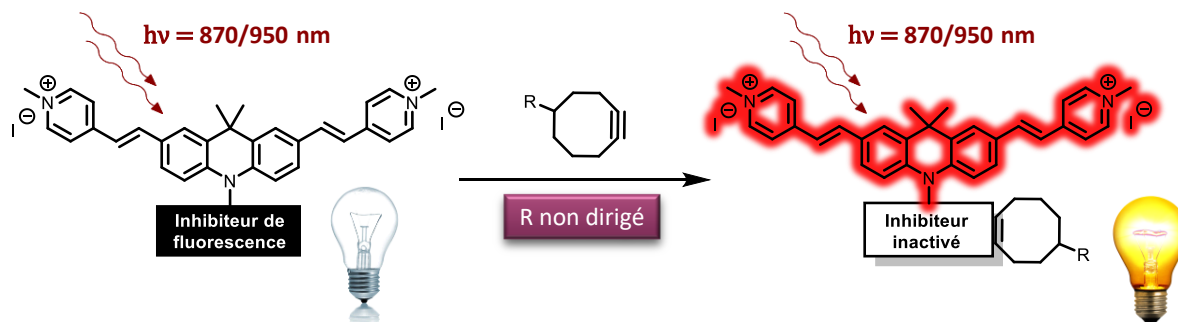


Figure 202 : Preuve de concept *in cellulo* des sondes fluorogéniques développées

PERSPECTIVES

Une fois la preuve de concept validée avec les composés précédemment synthétisés, il sera nécessaire de s'affranchir de leur adressage aux mitochondries. Cette étape est cruciale afin qu'il puisse jouer pleinement leur rôle, c'est-à-dire pouvoir réagir avec une cible n'importe où dans une cellule, et non pas exclusivement dans les mitochondries (Figure 203).

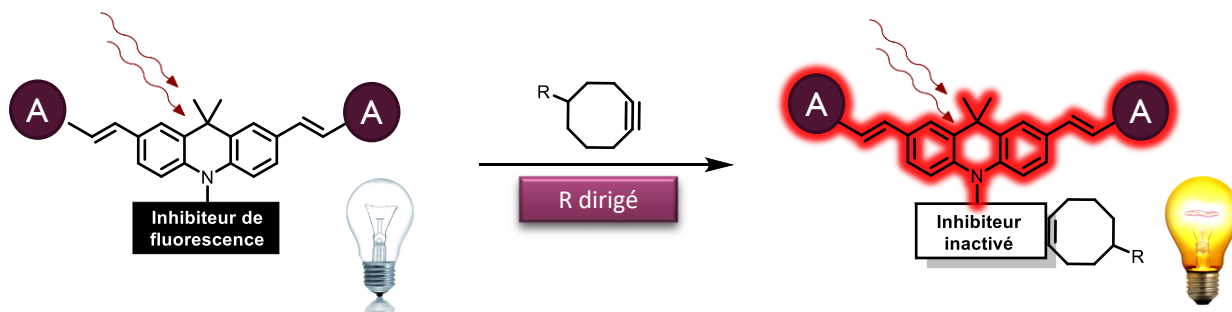
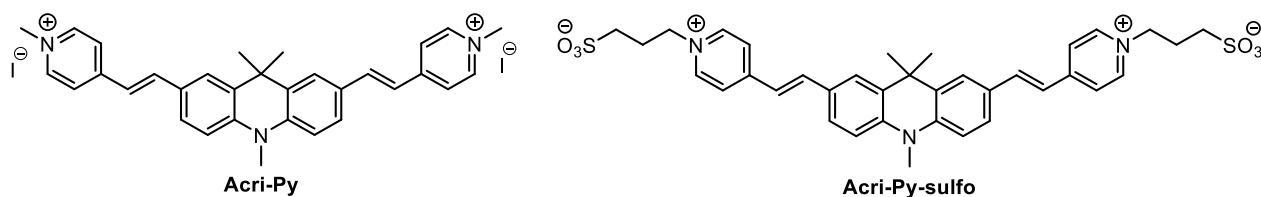


Figure 203 : Objectif final des outils développés, avec une cible possédant une localisation particulière

Pour cela, la modification des accepteurs vinylpyridiniums sera incontournable. Il sera indispensable d'utiliser des accepteurs permettant un marquage non dirigé. Des études préliminaires à ce sujet ont mis en évidence le potentiel d'un accepteur de type py-sulfonate à répondre à cette problématique. En effet, dans le cadre de cette thèse, le composé **Acrid-Py-sulfo** a été synthétisé et ses propriétés photophysiques étudiées (Tableau 22 ci-dessous).



Composé	Solvant	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	λ_{\max} (abs)	λ_{\max} (em)	Φ	$\epsilon\Phi$ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
Acrid-Py-sulfo	Eau	45 600	488 nm	665 nm	< 0,1 %	< 45
	Glycérol	42 200	508 nm	625 nm	11 %	4 640
Acrid-Py	Eau	56 800	483 nm	665 nm	< 0,1 %	< 57
	Glycérol	51 300	505 nm	627 nm	9 %	4 600

Tableau 22 : Propriétés photophysiques d'**Acrid-Py** et d'**Acrid-Py-sulfo**

Ce composé possède des propriétés très similaires à **Acrid-Py**, et en particulier une brillance dans le glycérol quasiment identique. Les résultats obtenus sur les premières sondes fluorogéniques pourront ainsi être étendus sans difficultés à ce nouveau fluorophore. De la même manière, **Acrid-Py-sulfo** possède des propriétés d'absorption biphotonique similaires, et même très légèrement meilleures que son analogue **Acrid-Py**, comme le montre les spectres d'excitation biphotonique en Figure 204 en page suivante.

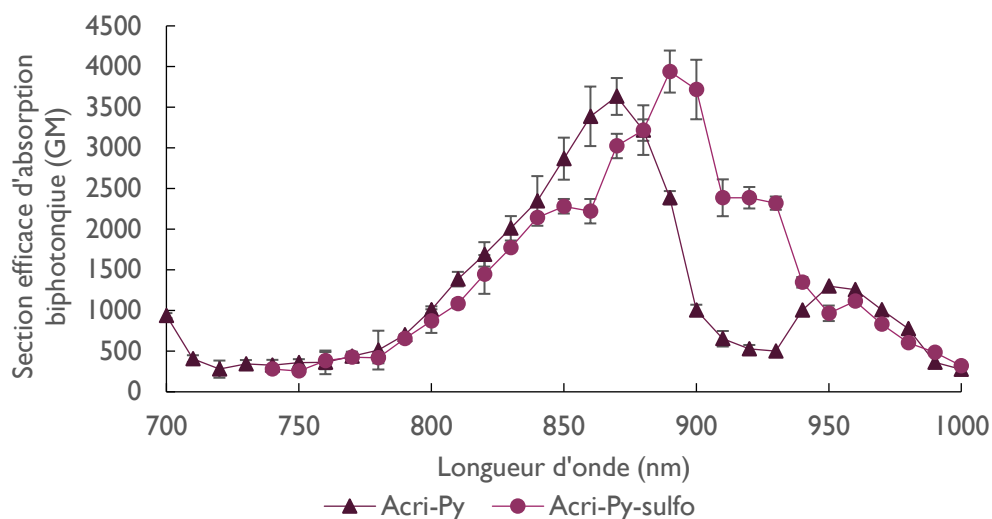


Figure 204 : Spectres d'excitation biphotonique d'**Acri-Py** et d'**Acri-Py-sulfo** dans le glycérol

Le composé **Acri-Py-sulfo** possède une brillance biphotonique environ 25 % plus élevée que le dérivé **Acri-Py** (Tableau 23).

Composé	$\lambda_{\max,2PA}$ abs (nm)	δ_{\max} (GM)	Φ	$\delta_{\max} \cdot \Phi$ (GM)
Acri-Py	870	3 630	9 %	330
	950	1 300		120
Acri-Py-sulfo	890	3 940	11 %	430

Tableau 23 : Propriétés d'absorption biphotonique d'**Acri-Py** et d'**Acri-Py-sulfo**

La pénétration cellulaire de composé a été évaluée *via* des expériences préliminaires de microscopie en cellules vivantes (Figure 205).

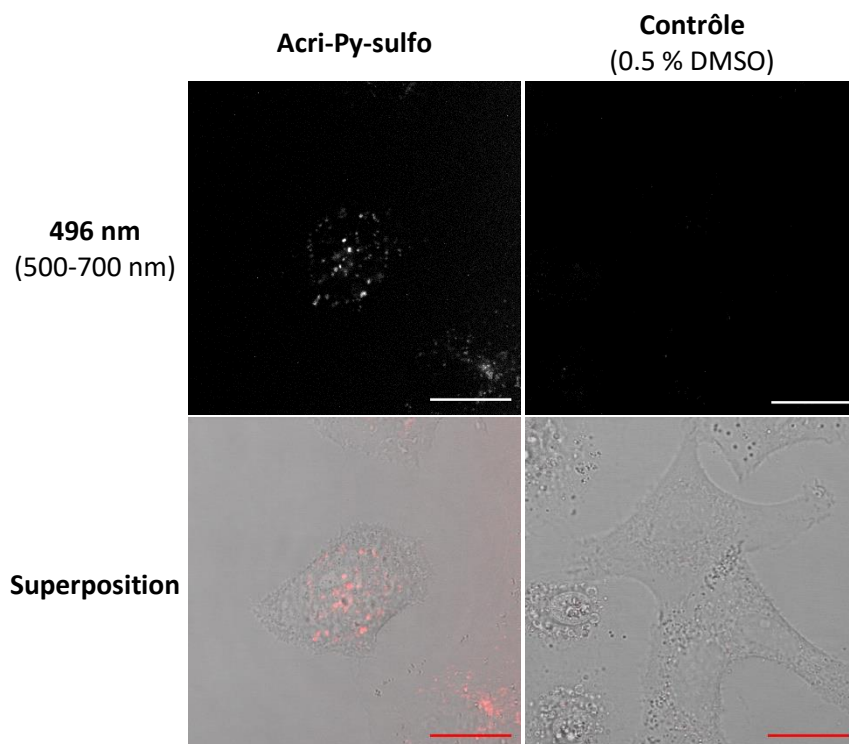


Figure 205 : Cellules A549 incubées en cellules vivantes avec **Acri-Py-sulfo** à 5 μ M pendant 2h après excitation à 496 nm. Détection : 500-700 nm. Barre d'échelle : 20 μ m

Ces images permettent de conclure que ce composé rentre bien en cellules. Les images obtenues sont peu contrastées, mais cela peut s'expliquer par le fait que le composé a un marquage non dirigé. L'absence d'accumulation localisée entraîne inévitablement un moindre rapport signal sur bruit par rapport aux autres images présentées dans ce manuscrit. Cela s'ajoute également au fait que ce type de composés est quasiment éteint dans l'eau. En l'absence de cible qui pourrait créer un environnement contraint, la brillance de ce composé est faible. Cela pourra être un réel avantage pour les sondes synthétisées qui posséderont une « double-fluorogénicité » : une première liée au changement d'environnement, et une seconde liée à la réaction bioorthogonale. Même si les exaltations mesurées *in vitro* sont modestes, elles seront probablement sous-estimées par rapport à ce à quoi il est possible de s'attendre *in cellulo*.

Par ailleurs, en cas de problème avec la stratégie sulfonate, il sera également envisageable de changer totalement d'accepteur. Il est par exemple possible d'utiliser des rhodanines, par analogie avec la **TP-2Rho** précédemment synthétisée au laboratoire (Figure 206).⁹⁶

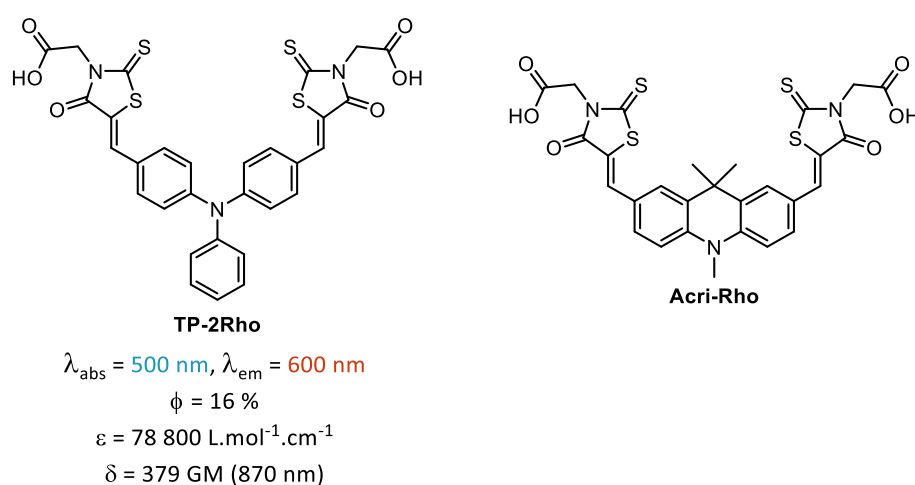


Figure 206 : Structure et propriétés photophysiques de la **TP-2Rho** dans le DCM et structure d'**Acri-Rho**

L'inconvénient de ce type d'accepteurs est qu'ils sont chargés négativement à pH physiologique, ce qui peut entraver le passage à travers la membrane des cellules. Pour pallier ce problème, il pourrait être pertinent de transformer les acides carboxyliques en esters méthyliques. Ces derniers pourront ensuite être aisément saponifiés par des estérases présentes dans le milieu intracellulaire (Figure 207).

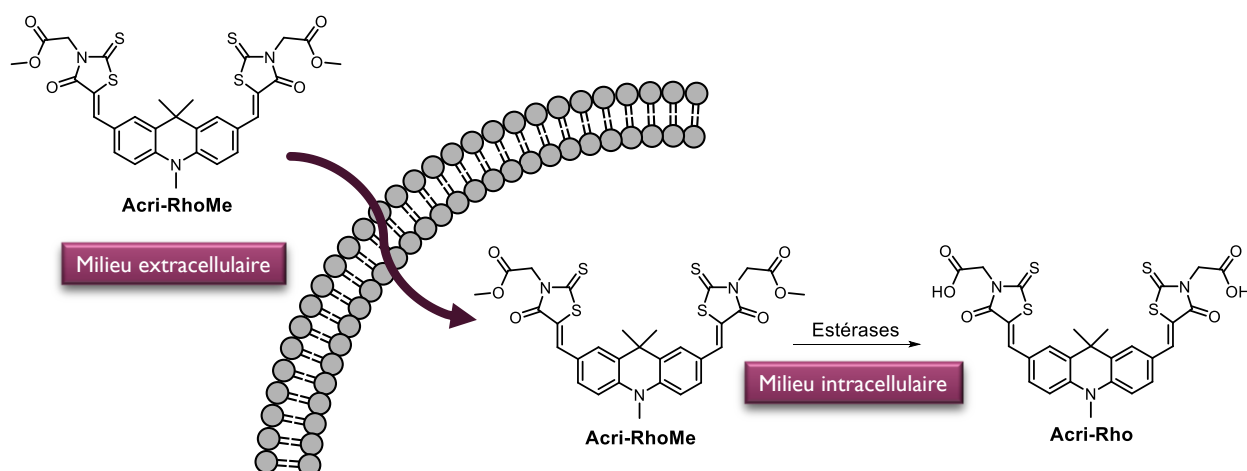


Figure 207 : Obtention d'**Acri-Rho** à partir d'**Acri-RhoMe** après franchissement de la membrane d'une cellule et réaction avec des estérases

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Synthesis

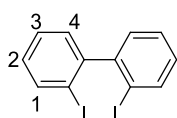
Reagents were purchased as reagent-grade and used without further purification unless otherwise stated. THF, DMF, DCM, Et₃N and pyrrolidine were freshly distilled before use. The concentration of *n*-BuLi in hexanes was determined by titration performed in triplicate prior to use, thanks to the method described by J. Suffert.²¹³ Analytical thin-layer chromatographies (TLC) were carried out on Macherey Nagel Alugram Xtra SIL G/UV254 plates using UV light ($\lambda = 254$ nm) as visualizing agent. Flash chromatographies were carried out with Macherey Nagel silica gel (40-63 μm) on CombiFlash Companion from Teledyne Isco equipped with packed silica cartridges from Macherey Nagel. Preparative TLC were carried out on Macherey Nagel TLC plates SIL G-200 UV254. NMR spectra were recorded on Bruker AV300 spectrometer at room temperature. Chemical shifts (δ), which are expressed in part per million (ppm), were determined relative to residual non-deuterated solvent as an internal reference respectively CD₃OD, CDCl₃, (CD₃)₂SO (¹³C NMR: $\delta = 49.00$; 77.23; 39.52 ppm; ¹H NMR: $\delta = 3.31$; 7.26; 2.50 ppm). Coupling constant(s) in hertz (Hz) were measured from one-dimensional spectra and multiplicities were abbreviated as following: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet). Melting points were measured with a Melting Point Apparatus SMP30 (Stuart). LC-MS spectra (ESI in the positive ion mode) were recorded on a Waters Micromass ZQ instrument (source voltage : 30 V) coupled to a Waters Alliance Separations Module 2695, equipped with a Waters XBridge C18 - 3.5 μm column (3.0 x 100 mm) and a Waters PDA 2998, using the following gradient (Solvent A : H₂O + 0.1% Formic Acid, Solvent B : CH₃CN + 0.1% Formic Acid, Flow : 0.5 mL/min) :

<i>Time (min)</i>	<i>A (%)</i>	<i>B (%)</i>
0	98	2
1	98	2
7	0	100
9	0	100
13	98	2

Or equipped with a Luna Omega C18 - 3 μm 100 Å column (3.0 x 50 mm) and a Waters PDA 2998, using the following gradient (Solvent A : H₂O + 0.1% Formic Acid, Solvent B : CH₃CN + 0.1% Formic Acid) :

<i>Time (min)</i>	<i>A (%)</i>	<i>B (%)</i>	<i>Flow (mL/min)</i>
0	95	5	0.5
1	95	5	0.5
6	0	100	0.5
8	0	100	0.5
8.5	95	5	0.6
10.5	95	5	0.6
11	95	5	0.5

²¹³ J. Suffert, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 510-512. DOI : [10.1021/jo00263a052](https://doi.org/10.1021/jo00263a052)

2,2'-diiodobiphenyl 4 :

Chemical Formula: C₁₂H₈I₂
Exact Mass: 405,8715

At -78 °C and under Ar atmosphere, *n*-BuLi in hexanes (28.0 mL, 1.45 M, 40.5 mmol, 2.3 eq.) was added over 1 h to a solution of 2,2'-dibromobiphenyl **2** (5.50 g, 17.6 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (30 mL). A solution of I₂ (10.3 g, 40.5 mmol, 2.3 eq.) in dry THF was then added dropwise. The mixture was allowed to warm to r.t. and stirred for 2h. A 2 % aqueous sodium thiosulfate solution (100 mL) was used to quench the reaction. The aqueous layer was extracted three times with DCM. Organic layers were combined, washed with brine and dried over MgSO₄. The crude was filtered over a small silica plug (Eluent : Cyclohexane) and after concentration, the filtrate was recrystallized in pure heptane to give the expected product as white crystals (5.40 g, 13.3 mmol, η = 75 %).

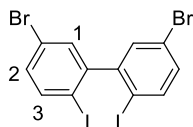
CAS number [2236-52-4]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.95 (dd, *J* = 7.5 Hz, 1.0 Hz, 2H, H₁), 7.42 (td, *J* = 7.5 Hz, 1.0 Hz, 2H, H₂), 7.20 (dd, *J* = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₄), 7.09 (td, *J* = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₃).

LC/MS (ES+) : tr = 8.37 min

TLC : R_f (Cyclohexane) = 0.59

Melting point : 105 °C

5,5'-dibromo-2,2'-diiodobiphenyl 3 :

Chemical Formula: C₁₂H₆Br₂I₂
Exact Mass: 561,6926

Under Ar atmosphere, Br₂ (1.43 mL, 27.8 mmol, 2.2 eq.) and Iron (106 mg, 1.9 mmol, 0.2 eq.) were added to a solution of 2,2'-diiodobiphenyl **4** (5.15 g, 12.6 mmol, 1.0 eq) in dry DCM (120 mL). The mixture was heated under reflux 2h, a 2 % aqueous sodium thiosulfate solution (100 mL) was then used to quench the reaction. The aqueous layer was extracted three times with DCM.

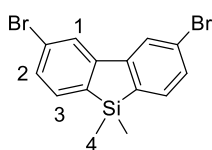
Organic layers were combined, washed with brine and dried over MgSO₄. The crude was washed with DCM and filtered to give the expected product as a white powder (5.00 g, 8.87 mmol, η = 70 %).

CAS number [852139-02-7]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₃), 7.32 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H, H₁), 7.24 (dd, *J* = 8.5 Hz, 2.5 Hz, 2H, H₂).

LC/MS (ES+) : tr = 9.17 min

TLC : R_f (Cyclohexane) = 0.68

2,8-dibromo-5,5-dimethyl-5H-dibenzo[b,d]silole - SiFluo-Br-V :

Chemical Formula: C₁₄H₁₂Br₂Si
Exact Mass: 365,9075

At -78 °C and under Ar atmosphere, *n*-BuLi in hexanes (5.81 mL, 1.45 M, 8.42 mmol, 2.0 eq.) was added over 1h to a solution of 5,5'-dibromo-2,2'-diiodobiphenyl **3** (2.38 g, 4.21 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (80 mL). After 30 min, dichlorodimethylsilane (0.77 mL, 6.32 mmol, 1.5 eq.) was added dropwise. The

mixture was then allowed to warm to r.t. and stirred for 4h. Water (100 mL) was introduced to quench the reaction. The aqueous layer was extracted three times with DCM. Organic layers were combined, washed with brine and dried over MgSO₄. The crude was filtered over a small silica plug (Eluent : Cyclohexane) and the filtrate was concentrated under reduce pressure. The resulting residue was washed with pentane and filtered to give the expected product as white crystals (0.96 g, 2.61 mmol, η = 62 %).

CAS number [1315321-81-3]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.90 (d, J = 1.5 Hz, 2H, H₁), 7.48 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H₃), 7.43 (dd, J = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₂), 0.41 (s, 6H, H₄).

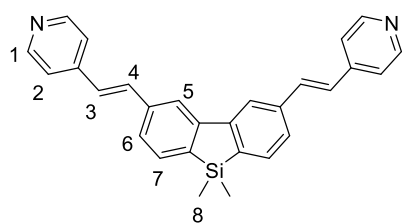
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 148.7 (C_q), 137.9 (C_q), 134.2 (C₃), 130.9 (C₂), 125.5 (C_q), 124.6 (C₁), -3.3 (C₄).

LC/MS (ES+) : tr = 9.36 min

TLC : R_f (Cyclohexane) = 0.59

Melting point : 138 °C

4,4'-((1E,1'E)-(5,5-dimethyl-5H-dibenzo[b,d]silole-2,8-diyl)bis(ethene-2,1-diyl))dipyridine, SiFluoⁿ-V :



Chemical Formula: C₂₈H₂₄N₂Si
Exact Mass: 416,1709

Under Ar atmosphere, Pd(OAc)₂ (3 mg, 14 μ mol, 0.1 eq.) and P(*o*-tol)₃ (6.5 mg, 21 μ mol, 0.2 eq.) were solubilized in a Et₃N/DMF mixture (2:1, 2 mL) freshly degassed. The mixture was stirred 15 min and degassed once again. **SiFluo-Br-V** (52 mg, 0.14 mmol, 1.0 eq.) and 4-vinylpyridine (0.04 mL, 0.35 mmol, 2.5 eq.) were added. The mixture was then stirred at 90 °C overnight. The crude was diluted in DCM

(25 mL). The organic layer was washed with a saturated NaHCO₃ aqueous solution and dried over MgSO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (DCM/EtOH, 100:0 to 90:10). The resulting solid was dissolved in DCM, then diethyl ether was added to obtain a precipitate which was filtered to give the expected product as a white powder (23 mg, 55 μ mol, η = 39 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.62 (d, J = 6.0 Hz, 4H, H₁), 8.05 (s, 2H, H₅), 7.68 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H₇), 7.50 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H₆), 7.43 (d, J = 6.0 Hz, 4H, H₂), 7.42 (d, J = 16.5 Hz, 2H, H₃), 7.18 (d, J = 16.5 Hz, 2H, H₄), 0.46 (s, 6H, H₈).

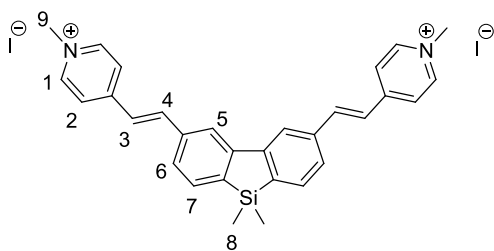
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 150.4 (C₁), 148.1 (C_q), 144.6 (C_q), 140.4 (C_q), 138.2 (C_q), 133.5 (C₃), 133.4 (C₇), 126.7 (C₄), 126.5 (C₆), 121.0 (C₂), 119.3 (C₅), -3.1 (C₈).

LC/MS (ES+) : m/z = 417.3 ([M+H]⁺), tr = 6.19 min

HRMS (ES+) : calculated for C₂₈H₂₅N₂Si⁺ 417.1782, found 417.1784

TLC : R_f (DCM/EtOH, 95:5) = 0.21

Melting point : > 240 °C

SiFluo-V :

Chemical Formula: $C_{30}H_{30}I_2N_2Si$
Exact Mass: 700,0268

A large excess of iodomethane (0.3 mL, 100 eq.) was added to a solution of **SiFluoⁿ-V** (20 mg, 48 μ mol, 1.0 eq.) in a MeOH/DCM (1:1) mixture (2 mL). The reaction was stirred at 30 °C overnight : a yellow precipitate appeared. Diethyl ether was added to increase the amount of solid. It was then filtered under vacuum to give the expected product as a pale-yellow solid (21 mg, 30 μ mol, η = 62 %).

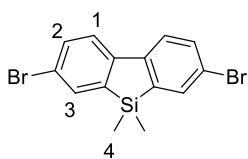
¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) : δ = 8.92 (d, J = 6.0 Hz, 4H, H₁), 8.63 (s, 2H, H₅), 8.35 (d, J = 6.0 Hz, 4H, H₂), 8.12 (d, J = 16.5 Hz, 2H, H₄), 7.98 (d, J = 16.5 Hz, 2H, H₃), 7.88 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H₇), 7.65 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H₆), 4.29 (s, 6H), 0.46 (s, 6H, H₈).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) : δ = 152.4 (C_q), 147.5 (C_q), 145.2 (C₁), 141.8 (C_q), 140.5 (C₄), 137.4 (C_q), 133.9 (C₇), 128.5 (C₆), 124.0 (C₃), 123.6 (C₂), 119.7 (C₅), 47.0 (C₉), -3.4 (C₈).

LC/MS (ES+) : m/z = 445.3 ([M-2I]²⁺), t_r = 8.50 min

HRMS (ES+) : calculated for $C_{30}H_{30}N_2I_2Si^+$ 573.1217, found 573.1250

Melting point : > 240 °C

3,7-dibromo-5,5-dimethyl-5H-dibenzo[b,d]silole, SiFluo-Br-L :

Chemical Formula: $C_{14}H_{12}Br_2Si$
Exact Mass: 365,9075

At -78 °C and under Ar atmosphere, *n*-BuLi in hexanes (0.49 mL, 1.45 M, 0.71 mmol, 2.0 eq.) was added over 1h to a solution of 4,4'-dibromo-2,2'-diiodo-1,1'-biphenyl **5** (200 mg, 0.35 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (6 mL). After 30 min, dichlorodimethylsilane (65 μ L, 0.53 mmol, 1.5 eq.) was added dropwise. The mixture was then allowed to warm to r. t. and stirred for 4h.

Water (10 mL) was introduced to quench the reaction. The aqueous layer was extracted three times with DCM. Organic layers were combined, washed with brine and dried over MgSO₄. The crude was filtered over a small silica plug (Eluent : Cyclohexane) and the filtrate was concentrated under reduce pressure. The resulting residue was washed with pentane and filtered to give the expected product as white crystals (75 mg, 0.20 mmol, η = 57 %).

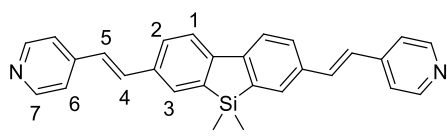
CAS number [1228595-79-6]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.71 (d, J = 2.0 Hz, 2H, H₃), 7.63 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₁), 7.54 (dd, J = 8.5 Hz, 2.0 Hz, 2H, H₂), 0.43 (s, 6H, H₄).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 145.6 (C_q), 141.5 (C_q), 135.7 (C₃), 133.4 (C₂), 122.6 (C₁), 122.5 (C_q), -3.4 (C₄).

TLC : R_f (Cyclohexane) = 0.68

Melting point : 147 °C

4,4'-((1E,1'E)-(5,5-dimethyl-5H-dibenzo[b,d]silole-3,7-diyl)bis(ethene-2,1-diyl))dipyridine, **SiFluoⁿ-L** :

Chemical Formula: C₂₈H₂₄N₂Si
Exact Mass: 416,1709

Under Ar atmosphere, Pd(OAc)₂ (4 mg, 18 μmol, 0.1 eq.) and P(*o*-tol)₃ (8 mg, 26 μmol, 0.15 eq.) were solubilized in a Et₃N/DMF mixture (2:1, 3 mL) freshly degassed. The mixture was stirred 15 min and degassed once again. **SiFluo-Br-L** (65 mg, 0.18 mmol, 1.0 eq.) and 4-vinylpyridine (47 μL, 0.44 mmol, 2.5 eq.) were added. The mixture was then stirred at 90 °C overnight. The crude was diluted in DCM (25 mL). The organic layer was washed with a saturated aqueous NaHCO₃ solution and dried over MgSO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (DCM/EtOH, 100 :0 to 90 :10) to give the expected product as a yellow solid (52 mg, 0.12 mmol, η = 71 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.58 (d, *J* = 6.0 Hz, 4H, H₇), 7.83 (s, 2H, H₃), 7.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H₁), 7.60 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₂), 7.37 (d, *J* = 6.0 Hz, 4H, H₆), 7.34 (d, *J* = 16.0 Hz, 2H, H₅), 7.07 (d, *J* = 16.0 Hz, 2H, H₄), 0.50 (s, 6H, H₈).

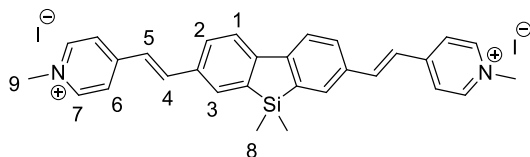
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 150.4 (C₇), 148.0 (C_q), 144.8 (C_q), 140.1 (C_q), 135.5 (C_q), 133.1 (C₅), 131.5 (C₃), 129.5 (C₂), 125.8 (C₄), 121.6 (C₁), 120.9 (C₆), -3.1 (C₈).

LC/MS (ES+) : *m/z* = 417.4 ([M+H]⁺), *tr* = 6.78 min

HRMS (ES+) : calculated for C₂₈H₂₅N₂Si⁺ 417.1782, found 417.1779

TLC : R_f (DCM/EtOH, 95:5) = 0.31

Melting point : > 240 °C

4,4'-((1E,1'E)-(5,5-dimethyl-5H-dibenzo[b,d]silole-3,7-diyl)bis(ethene-2,1-diyl))bis(1-methylpyridin-1-ium) iodide, **SiFluo-L** :

Chemical Formula: C₃₀H₃₀I₂N₂Si
Exact Mass: 700,0268

A large excess of iodomethane (0.35 mL, 100 eq.) was added to a solution of **SiFluoⁿ-L** (20 mg, 48 μmol, 1.0 eq.) in a MeOH/DCM (1:1) mixture (2 mL). The reaction was stirred at r.t. overnight : an orange precipitate appeared. Diethyl ether was added to increase the amount of solid.

It was then filtered under vacuum to give the expected product as an orange solid (31 mg, 44 μmol, η = 80 %).

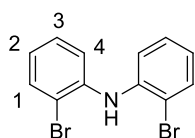
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ = 8.86 (d, *J* = 6.5 Hz, 4H, H₇), 8.22 (d, *J* = 6.5 Hz, 4H, H₆), 8.19 (d, *J* = 1.0 Hz, 2H, H₃), 8.13 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H₁), 8.06 (d, *J* = 16.0 Hz, 2H, H₄), 7.85 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1.0 Hz, 2H, H₂), 7.60 (d, *J* = 16.0 Hz, 2H, H₅), 4.26 (s, 6H, H₉), 0.50 (s, 6H, H₈).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) : δ = 152.4 (C_q), 148.5 (C_q), 145.1 (C₇), 140.4 (C₄), 140.1 (C_q), 134.7 (C_q), 132.6 (C₃), 131.1 (C₂), 123.4 (C₆), 123.1 (C₅), 122.3 (C₁), 46.9 (C₉), -3.4 (C₈).

LC/MS (ES+) : *m/z* = 445.1 ([M-2I]²⁺), *tr* = 7.49 min

HRMS (ES+) : calculated for C₃₀H₃₀N₂Si⁺ 573.1217, found 573.1227

Melting point : > 240 °C

2-bromo-N-(2-bromophenyl)aniline, 8 :

Chemical Formula: C₁₂H₉Br₂N
Exact Mass: 324,9102

Under Ar atmosphere, ^tBuOK (2.68 g, 27.9 mmol, 1.2 eq.), dppf (260 mg, 0.470 mmol, 0.02 eq.), Pd₂(dba)₃ (210 mg, 0.230 mmol, 0.01 eq.), 2-bromoaniline (4.0 g, 23.3 mmol, 1.0 eq.) and 2-bromiodobenzene (2.99 mL, 23.3 mmol, 1.0 eq.) were dissolved in dry toluene. This solution was stirred at 100 °C overnight. Water and DCM were added. The aqueous layer was extracted three times with DCM. Organic layers were combined, washed with brine and dried over Na₂SO₄. The crude was filtered over a small silica plug (Eluent : Cyclohexane) to give the expected product as a white solid (7.08 g, 22 mmol, η = 93 %).

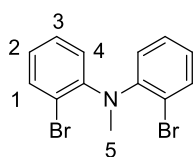
CAS number [67242-17-5]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.58 (dd, J = 8.0 Hz, 1.0 Hz, 2H, H₁), 7.32 – 7.18 (m, 4H, H₃, H₄), 6.84 (td, J = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₂), 6.44 (br s, 1H, NH).

LC/MS (ES+) : m/z = 328.0 ([M+H]⁺), t_r = 7.88 min

TLC : R_f (Cyclohexane) = 0.53

Melting point : 62 °C

2-bromo-N-(2-bromophenyl)-N-methylaniline, 9 :

Chemical Formula: C₁₃H₁₁Br₂N
Exact Mass: 338,9258

Under Ar atmosphere, aniline **8** (1.90 g, 5.81 mmol, 1.0 eq.) and sodium hydride 60 % in oil (260 mg, 6.39 mmol, 1.1 eq.) were dissolved in dry THF (28 mL). After 30 min stirring, iodomethane (0.43 mL, 6.97 mmol, 1.2 eq.) was introduced and the solution was stirred at r.t. for 2h. Water and DCM were added. The aqueous layer was extracted three times with DCM. Organic layers were combined, washed with brine and dried over Na₂SO₄. The resulting solid was washed with pentane to give the expected product as a white solid (1.95 g, 5.72 mmol, η = 98 %).

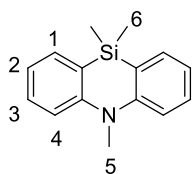
CAS number [87345-09-3]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.56 (dd, J = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₁), 7.29 – 7.21 (m, 2H, H₃), 7.01 (dd, J = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₄), 6.94 (td, J = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₂), 3.23 (s, 3H, H₅).

LC/MS (ES+) : m/z = 342.1 ([M+H]⁺), t_r = 7.78 min

TLC : R_f (Cyclohexane) = 0.36

Melting point : 98 °C

5,10,10-trimethyl-5,10-dihydrophenazasiline, 10 :

Chemical Formula: C₁₅H₁₇NSi
Exact Mass: 239,1130

At -78 °C and under Ar atmosphere, *n*-BuLi in hexanes (5.68 mL, 1.55 M, 8.80 mmol, 2.0 eq.) was added dropwise to a solution of bromine derivative **9** (1.50 g, 4.40 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (30 mL). After 30 min, dichlorodimethylsilane (803 μ L, 6.60 mmol, 1.5 eq.) was added dropwise. The mixture was then allowed to warm to r.t. and stirred for 2h. Water (20 mL)

was introduced to quench the reaction. The aqueous layer was extracted three times with DCM. Organic layers were combined, washed with brine and dried over MgSO₄. The crude was filtered over a small silica plug (Eluent : Cyclohexane). The resulting residue was washed with pentane to give the expected product as a white solid (790 mg, 3.30 mmol, η = 75 %).

CAS number [63447-24-5]

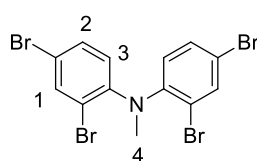
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.52 (dd, J = 7.0 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₁), 7.44 – 7.35 (m, 2H, H₂/H₃), 7.10 – 6.99 (m, 4H, H₄, H₂/H₃), 3.55 (s, 3H, H₅), 0.43 (s, 6H, H₆).

LC/MS (ES+) : m/z = 240.2 ([M+H]⁺), t_r = 7.92 min

TLC : R_f (Cyclohexane) = 0.16

Melting point : 103 °C

2,4-dibromo-*N*-(2,4-dibromophenyl)-*N*-methylaniline, **6** :



Chemical Formula: C₁₃H₉Br₄N
Exact Mass: 494,7468

Under Ar atmosphere, *N*-methyldiphenylamine (1.50 g, 8.19 mmol, 1.0 eq.) and *N*-bromosuccinimide (6.41 g, 36.0 mmol, 4.4 eq.) were dissolved in dry THF (30 mL). The solution was stirred at r.t. overnight, and DCM and water were added. The organic layer was washed three times with water, once with brine and dried over MgSO₄. A recrystallisation was then performed (DCM + some drops of EtOH) to give the expected product as a white solid (3.75 g, 7.52 mmol, η = 92 %).

CAS number [3666-95-3]

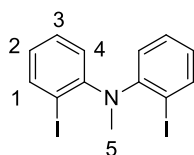
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.70 (d, J = 2.0 Hz, 2H, H₁), 7.36 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 2H, H₂), 6.86 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₃), 3.18 (s, 3H, H₄).

LC/MS (ES+) : m/z = 500.0 ([M+H]⁺), t_r = 9.95 min

TLC : R_f (Cyclohexane) = 0.51

Melting point : 136 °C

2-iodo-*N*-(2-iodophenyl)-*N*-methylaniline, **11** :



Chemical Formula: C₁₃H₁₁I₂N
Exact Mass: 434,8981

At -78 °C and under Ar atmosphere, *n*-BuLi in hexanes (7.91 mL, 1.55 M, 12.3 mmol, 2.2 eq.) was added dropwise to a solution of bromine derivative **9** (1.90 g, 5.57 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (30 mL). A solution of I₂ (3.11 g, 12.3 mmol, 2.2 eq.) in dry THF (10 mL) was then added over 30 min to this solution. The mixture was allowed to warm to r.t. and stirred for 30 min. A 2 % aqueous sodium thiosulfate solution (100 mL) was used to quench the reaction. The aqueous layer was extracted three times with DCM. Organic layers were combined, washed with brine and dried over MgSO₄. The crude was filtered over a small silica plug (Eluent : Cyclohexane). A recrystallisation was then performed (heptane) to give the expected product as white crystals (2.23 g, 5.13 mmol, η = 92 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.87 (dd, J = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₁), 7.33 – 7.26 (m, 2H, H₃), 6.95 (dd, J = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₄), 6.79 (td, J = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₂), 3.23 (s, 3H, H₅).

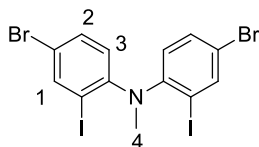
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) : δ = 151.6 (C_q), 141.3 (C_1), 129.2 (C_3), 125.3 (C_2), 123.9 (C_4), 97.9 (C_q), 42.5 (C_5).

LC/MS (ES+) : m/z = 436.0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), t_r = 7.96 min

TLC : R_f (Cyclohexane) = 0.25

Melting point : 107 °C

4-bromo-*N*-(4-bromo-2-iodophenyl)-2-iodo-*N*-methylaniline, **12** :



Chemical Formula: $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{Br}_2\text{I}_2\text{N}$
Exact Mass: 590,7191

Under Ar atmosphere, aniline **11** (1.90 g, 4.37 mmol, 1.0 eq.) and *N*-bromosuccinimide (1.63 g, 36.0 mmol, 2.1 eq.) were dissolved in dry DMF (45 mL). The solution was stirred at r.t. for 2h, and DCM and water were added. The aqueous layer was extracted three times with DCM. Organic layers were combined, washed with brine and dried over MgSO_4 .

The crude was filtered over a small silica plug (Eluent : Cyclohexane) to give the expected product as a white powder (1.75 g, 2.95 mmol, η = 68 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ = 7.99 (d, J = 2.0 Hz, 2H, H_1), 7.40 (dd, J = 8.5 Hz, 2.0 Hz, 2H, H_2), 6.78 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H_3), 3.16 (s, 3H, H_4).

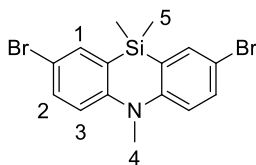
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) : δ = 150.3 (C_q), 143.2 (C_1), 132.2 (C_2), 124.8 (C_3), 117.4 (C_q), 98.1 (C_q), 42.4 (C_4).

LC/MS (ES+) : t_r = 8.46 min

TLC : R_f (Cyclohexane) = 0.48

Melting point : 179 °C

2,8-dibromo-5,10,10-trimethyl-5,10-dihydrophenazasiline, **7** :



Chemical Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{Br}_2\text{NSi}$
Exact Mass: 394,9341

At 0 °C and under Ar atmosphere, *n*-BuLi in hexanes (2.59 mL, 1.55 M, 4.01 mmol, 2.0 eq.) was added dropwise to a suspension of 2,4-dibromo-*N*-(2,4-dibromophenyl)-*N*-methylaniline **6** (1.00 g, 2.00 mmol, 1.0 eq.) in dry Et_2O (10 mL). Once the media was homogeneous (around 20 min), dichlorodimethylsilane (0.37 mL, 3.01 mmol, 1.5 eq.) was added dropwise.

The mixture was then allowed to warm to r.t. and stirred for 30 min. The organic layer was washed with water and dried over Na_2SO_4 . The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane) to give the expected as a white solid (530 mg, 1.33 mmol, η = 67 %).

First alternative procedure :

Under Ar atmosphere, 5,10,10-trimethyl-5,10-dihydrophenazasiline **10** (300 mg, 1.25 mmol, 1.0 eq.) and *N*-bromosuccinimide (468 mg, 2.63 mmol, 2.1 eq.) were dissolved in dry DMF (12 mL). The solution was stirred at r.t. overnight, and DCM and water were added. The organic layer was washed three times with water, once with brine and dried over Na_2SO_4 . The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane) to give the expected as a white solid (145 mg, 0.37 mmol, η = 29 %).

During the chromatography, an impurity co-elute with the product, LC/MS analysis was performed for each tubes to check its purity.

Second alternative procedure :

At -78 °C and under Ar atmosphere, *n*-BuLi in hexanes (1.74 mL, 1.55 M, 2.70 mmol, 2.0 eq.) was added dropwise to a suspension of aniline **12** (0.80 g, 1.35 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (13 mL). After 30 min, dichlorodimethylsilane (0.25 mL, 2.02 mmol, 1.5 eq.) was added dropwise. The mixture was then allowed to warm to r.t. and stirred for 30 min. The organic layer was washed with water and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane) to give the expected as a white solid (413 mg, 1.04 mmol, η = 77 %).

CAS number [3666-97-5]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.53 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H, H₁), 7.45 (dd, *J* = 9.0 Hz, 2.5 Hz, 2H, H₂), 6.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H₃), 3.47 (s, 3H, H₄), 0.42 (s, 6H, H₅)

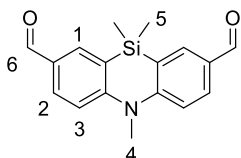
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 149.5 (C_q), 135.5 (C₁), 132.8 (C₂), 125.9 (C_q), 117.2 (C₃), 114.0 (C_q), 38.5 (C₄), -2.3 (C₅).

LC/MS (ES+) : *m/z* = 398.0 ([M+H]⁺), *tr* = 8.33 min

TLC : R_f (Cyclohexane) = 0.30

Melting point : 131 °C

5,10,10-trimethyl-5,10-dihydrophenazasiline-2,8-dicarbaldehyde, **13** :



Chemical Formula: C₁₇H₁₇NO₂Si
Exact Mass: 295.1029

At -78 °C and under Ar atmosphere, *n*-BuLi in hexanes (420 μ L, 1.55 M, 0.66 mmol, 3.0 eq.) was added dropwise to a solution of bromine derivative **7** (87 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (10 mL). After 15 min, DMF (51 μ L, 0.66 mmol, 3.0 eq.) was added dropwise. The mixture was then allowed to warm to r.t. and stirred for 1h. Water (10 mL) was introduced dropwise to quench the reaction. The aqueous layer was extracted two times with DCM. Organic layers were combined, washed with brine and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 70:30) to give the expected product as a pale-yellow powder (56 mg, 0.19 mmol, η = 87 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 9.95 (s, 2H, H₆), 8.05 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, H₁), 7.92 (dd, *J* = 8.5 Hz, 2.0 Hz, 2H, H₂), 7.24 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₃), 3.69 (s, 3H, H₄), 0.51 (s, 6H, H₅).

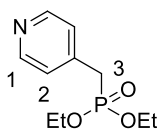
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 191.1 (C₆), 154.5 (C_q), 136.2 (C₁), 132.3 (C₂), 129.9 (C_q), 123.4 (C_q), 116.1 (C₃), 39.5 (C₄), -1.83 (C₅).

LC/MS (ES+) : *m/z* = 296.1 ([M+H]⁺), *tr* = 6.91 min

HRMS (APPI+) : calculated for C₁₇H₁₇NO₂Si⁺ 295.1024 found 295.1020

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 7:3) = 0.34

Melting point : 146 °C

diethyl(pyridin-4-ylmethyl)phosphonate, **14** :

Chemical Formula: C₁₀H₁₆NO₃P
Exact Mass: 229,0868

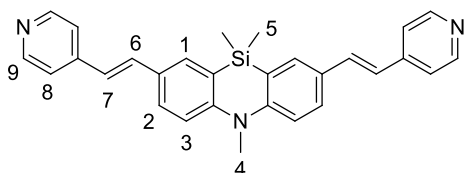
Under Ar atmosphere, sodium hydride 60 % in oil (5.12 g, 128 mmol, 3.0 eq.), and diethyl phosphite (16.4 mL, 128.0 mmol, 3.0 eq.) were dissolved in dry toluene (175 mL). The mixture was stirred at r.t. for 30 min. At the same time, 4-(chloromethyl)pyridine hydrochloride (7.00 g, 42.7 mmol, 1.0 eq.) was solubilized in an aqueous Na₂CO₃ solution (6.78 g, 64.0 mmol, 1.5 eq. in 70 mL of water). The aqueous layer was extracted three times with AcOEt. Organic layers were combined and dried over MgSO₄. Solvent was removed under vacuum and the resulting pyridine was added in the mixture, which was stirred at 80 °C overnight. Water was then added. The aqueous layer was extracted five times with DCM. Organic layers were combined and dried over MgSO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (DCM/EtOH, 100:0 to 95:5) to give the expected product as a colourless oil (7.79 g, 34.0 mmol, η = 80 %).

CAS number [77047-42-8]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.54 (d, J = 5.5 Hz, 2H, H₁), 7.26 – 7.22 (m, 2H, H₂), 4.11 – 3.99 (m, 4H, -OCH₂CH₃), 3.13 (d, J = 22.5 Hz, 2H, H₃), 1.26 (t, J = 7.0 Hz, 6H, -OCH₂CH₃).

LC/MS (ES+) : m/z = 230.4 ([M+H]⁺), t_r = 3.43 min

TLC : R_f (DCM/MeOH, 95:5) = 0.39

Phenazⁿ-Py :

Chemical Formula: C₂₉H₂₇N₃Si
Exact Mass: 445,1974

Under Ar atmosphere, Pd(OAc)₂ (14 mg, 63 μ mol, 0.2 eq.) and P(*o*-tol)₃ (29 mg, 94 μ mol, 0.3 eq.) were dissolved in a Et₃N/DMF mixture (2:1, 5 mL) freshly degassed. The mixture was stirred 15 min and degassed once again. Bromine derivative **7** (125 mg, 0.31 mmol, 1.0 eq.) and 4-vinylpyridine (74 μ L, 0.69 mmol, 2.2 eq.) were added. The mixture was then stirred at 90 °C overnight. The crude was diluted in AcOEt (25 mL). The organic layer was washed with water twice, with a saturated NaHCO₃ aqueous solution, with brine and dried over MgSO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (DCM/EtOH 100:0 to 95:5). The resulting solid was dissolved in DCM, then pentane was added to obtain a precipitate which was filtered to give the expected product as a yellow powder (98 mg, 0.22 mmol, η = 70 %).

Alternative procedure (HWE) :

Under Ar atmosphere, **13** (95 mg, 0.32 mmol, 1.0 eq.) and sodium hydride 60 % in oil (24 mg, 0.80 mmol, 2.5 eq.) were dissolved in dry DMF (2.9 mL). The phosphonate (167 μ L, 0.80 mmol, 2.0 eq.) was then added and the solution was stirred at r.t. for 1h. Water was introduced dropwise to quench the reaction. The aqueous layer was extracted once with DCM. Organic layer was washed twice with brine and dried over Na₂SO₄. After partial evaporation, addition of drops of AcOEt were added to obtain a precipitate which was filtered to give the expected product as a yellow powder (130 mg, 0.29 mmol, η = 91 %).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : δ = 8.56 (d, J = 2.0 Hz, 4H, H_9), 7.66 (d, J = 2.0 Hz, 2H, H_1), 7.61 (dd, J = 8.5 Hz, 2.0 Hz, 2H, H_2), 7.37 (d, J = 5.5 Hz, 4H, H_8), 7.30 (d, J = 16.5 Hz, 2H, H_7), 7.11 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H_3), 6.94 (d, J = 16.5 Hz, 2H, H_6), 3.61 (s, 3H, H_4), 0.51 (s, 6H, H_5).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) : δ = 150.8 (C_q), 150.2 (C_9), 145.2 (C_q), 132.8 (C_1/C_7), 132.8 (C_1/C_7), 128.8 (C_2), 128.6 (C_q), 123.6 (C_6), 123.2 (C_q), 120.8 (C_8), 115.8 (C_3), 38.9 (C_4), -1.69 (C_5).

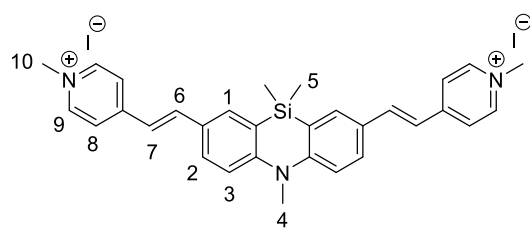
LC/MS (ES+) : m/z = 446.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), t_r = 5.00 min

HRMS (ES+) : calculated for $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{Si}^+$ 446.2047 found 446.2048

TLC : R_f (DCM/EtOH, 95:5) = 0.37

Melting point : > 240 °C

Phenaz-Py :



Chemical Formula: $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{Si}^{2+}$
Exact Mass: 475,2433

A large excess of iodomethane (0.21 mL, 3.37 mmol, 50 eq.) was added to a solution of **Phenazⁿ-Py** (30 mg, 67 μmol , 1.0 eq.) in a MeOH/DCM (1:1) mixture (2 mL). The reaction was stirred at 40 °C for 3h. Pentane was introduced to get a precipitate which was filtered to give the expected product as a red powder (33 mg, 45 μmol ,

η = 67 %).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) : δ = 8.81 (d, J = 7.0 Hz, 4H, H_9), 8.16 (d, J = 7.0 Hz, 4H, H_8), 8.03 (d, J = 16.0 Hz, 2H, H_6), 7.95 (d, J = 2.0 Hz, 2H, H_1), 7.84 (dd, J = 9.0 Hz, 2.0 Hz, 2H, H_2), 7.45 (d, J = 16.0 Hz, 2H, H_7), 7.35 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H_3), 4.23 (s, 6H, H_{10}), 3.63 (s, 3H, H_4), 0.50 (s, 6H, H_5).

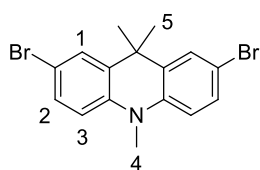
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO-d_6) : δ = 152.9 (C_q), 151.1 (C_q), 144.8 (C_9), 140.5 (C_6), 134.3 (C_1), 130.4 (C_2), 127.6 (C_q), 122.9 (C_8), 122.3 (C_q), 120.5 (C_7), 116.5 (C_3), 46.8 (C_{10}), 38.8 (C_4), -1.62 (C_5).

LC/MS (ES+) : m/z = 237.9 ($[\text{M}-2\text{I}^-/2]^+$), t_r = 4.87 min

HRMS (ES+) : calculated for $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{SiI}^+$ 602.1483 found 602.1483

Melting point : > 240 °C

2,7-dibromo-9,9,10-trimethyl-9,10-dihydroacridine, **18** :



Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{Br}_2\text{N}$
Exact Mass: 378,9571

Under Ar atmosphere, 2,7-dibromo-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine **17** (500 mg, 1.36 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry THF (28 mL). Sodium hydride 60 % in oil (60 mg, 1.50 mmol, 1.1 eq.) was added and the gas production was controlled thanks to a bubbler. Once the bubbling has stopped, iodomethane (0.10 mL, 1.63 mmol, 1.2 eq.) was introduced and the

solution was stirred at r.t. overnight. The mixture was diluted with DCM. The organic layer was washed three times with water and dried over Na_2SO_4 . The resulting solid was washed with pentane to give the expected product as a white solid (454 mg, 1.19 mmol, η = 87 %).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : δ = 7.46 (d, J = 2.0 Hz, 2H, H_1), 7.32 (dd, J = 8.5 Hz, 2.0 Hz, 2H, H_2), 6.80 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H_3), 3.39 (s, 3H, H_4), 1.49 (s, 6H, H_5).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 141.1 (C_q), 134.5 (C_q), 129.6 (C₂), 126.9 (C₁), 114.0 (C₃), 113.8 (C_q), 36.9 (C_q), 33.7 (C₄), 27.2 (C₅).

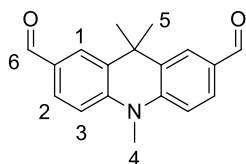
LC/MS (ES+) : m/z = 382.2 ([M+H]⁺), tr = 8.24 min

HRMS (ES+) : calculated for C₁₆H₁₅Br₂N⁺ 378.9571 found 378.9568

TLC : R_f (Cyclohexane) = 0.50

Melting point : 205 °C

9,9,10-trimethyl-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **19** :



Chemical Formula: C₁₈H₁₇NO₂
Exact Mass: 279,1259

At -78 °C and under Ar atmosphere, *n*-BuLi in hexanes (2.21 mL, 1.55 M, 3.42 mmol, 3.0 eq.) was added dropwise to a solution of 2,7-dibromo-9,9,10-trimethyl-9,10-dihydroacridine **18** (435 mg, 1.14 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (17 mL). After 15 min, DMF (260 μL, 3.42 mmol, 3.0 eq.) was added dropwise.

The mixture was then allowed to warm to r.t. and stirred for 15 min. Water was introduced dropwise to quench the reaction. The aqueous layer was extracted once with AcOEt. The organic layer was washed twice with brine and dried over Na₂SO₄. The resulting solid was washed with pentane and filtered to give the expected product as a pale-yellow powder (287 mg, 1.03 mmol, η = 90 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 9.92 (s, 2H, H₆), 7.97 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, H₁), 7.79 (dd, *J* = 8.5 Hz, 2.0 Hz, 2H, H₂), 7.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₃), 3.61 (s, 3H, H₄), 1.62 (s, 6H, H₅).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 191.1 (C₆), 146.0 (C_q), 133.1 (C_q), 130.8 (C_q), 130.4 (C₁), 125.8 (C₂), 113.3 (C₃), 36.7 (C_q), 34.6 (C₄), 28.1 (C₅).

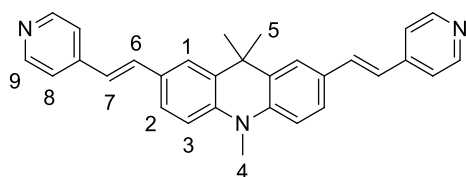
LC/MS (ES+) : m/z = 280.3 ([M+H]⁺), tr = 6.63 min

HRMS (ES+) : calculated for C₁₈H₁₈NO₂⁺ 280.1332 found 280.1339

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 7:3) = 0.26

Melting point : 166 °C

9,9,10-trimethyl-2,7-bis[(E)-2-(pyridin-4-yl)ethenyl]-9,10-dihydroacridine, **Acriⁿ-Py** :



Chemical Formula: C₃₀H₂₇N₃
Exact Mass: 429,2205

Under Ar atmosphere, aldehyde **19** (100 mg, 0.36 mmol, 1.0 eq.) and sodium hydride 60 % in oil (36 mg, 0.90 mmol, 2.5 eq.) were dissolved in dry DMF (6.5 mL). The phosphonate (149 μL, 0.72 mmol, 2 eq.) was then added and the solution was stirred at r.t. for 2h. Water was introduced dropwise to quench the reaction. The aqueous layer was extracted once with DCM.

Organic layer was washed twice with brine and dried over Na₂SO₄. The resulting solid was washed with Et₂O and filtered to give the expected product as a yellow powder (133 mg, 0.31 mmol, η = 86 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.55 (d, *J* = 6.0 Hz, 4H, H₉), 7.60 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H, H₁), 7.45 (dd, *J* = 8.5 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₂), 7.34 (m, 6H, H₈, H₇), 6.98 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₃), 6.92 (d, *J* = 16.5 Hz, 2H, H₆), 3.52 (s, 3H, H₄), 1.63 (s, 6H, H₅).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 150.1 (C₉), 145.4 (C_q), 142.6 (C_q), 133.5 (C₇), 132.8 (C_q), 129.2 (C_q), 126.0 (C₂), 123.2 (C₁/C₆), 123.1 (C₁/C₆), 120.7 (C₈), 113.0 (C₃), 36.7 (C_q), 33.9 (C₄), 28.0 (C₅).

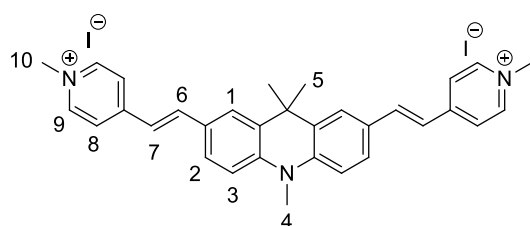
LC/MS (ES+) : m/z = 430.5 ([M+H]⁺), t_r = 4.94 min

HRMS (ES+) : calculated for C₃₀H₂₈N₃⁺ 430.2278 found 430.2286

TLC : R_f (DCM/EtOH 95:5) = 0.24

Melting point : > 240 °C

Acri-Py :



Chemical Formula: C₃₂H₃₃N₃²⁺
Exact Mass: 459,2664

A large excess of iodomethane (0.28 mL, 2.33 mmol, 40 eq.) was added to a solution of **Acriⁿ-Py** (50 mg, 0.12 mol, 1.0 eq.) in a MeOH/DCM (1:1) mixture (3.5 mL). The reaction was stirred at 45 °C for 50h. Pentane was introduced to get a precipitate which was filtered to give the expected product as a red powder (76 mg, 0.11 mmol,

η = 92 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) : δ = 8.80 (d, J = 7.0 Hz, 4H, H₉), 8.16 (d, J = 7.0 Hz, 4H, H₈), 8.05 (d, J = 16.0 Hz, 2H, H₆), 7.88 (d, J = 1.0 Hz, 2H, H₁), 7.69 (dd, J = 8.5 Hz, 1.0 Hz, 2H, H₂), 7.45 (d, J = 16.0 Hz, 2H, H₇), 7.24 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₃), 4.23 (s, 6H, H₁₀), 3.56 (s, 3H, H₄), 1.60 (s, 6H, H₅).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) : δ = 153.0 (C_q), 144.7 (C₉), 142.5 (C_q), 141.12 (C₆), 132.1 (C_q), 128.2 (C_q), 127.8 (C₂), 124.6 (C₁), 122.8 (C₈), 119.9 (C₇), 113.8 (C₃), 46.7 (C₁₀), 36.2 (C_q), 34.0 (C₄), 28.3 (C₅).

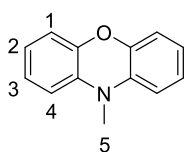
LC/MS (ES+) : m/z = 229.9 ([M-2I/2]⁺), t_r = 6.05 min

HRMS (ES+) : calculated for C₃₂H₃₃N₃I⁺ 586.1714 found 586.1700

Melting point : > 240 °C

10-methylphenoxazine, 20 :

Synthesized by Matthieu Poulain during his master internship



Chemical Formula: C₁₃H₁₁NO
Exact Mass: 197,0841

Under Ar atmosphere, phenoxazine (500 mg, 2.73 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry THF (24 mL). Sodium hydride 60 % in oil (131 mg, 3.27 mmol, 1.2 eq.) was added and the gas production was controlled thanks to a bubbler. Once the bubbling has stopped, iodomethane (0.25 mL, 4.09 mmol, 1.2 eq.) was introduced and the solution was stirred at r.t. overnight. Water and DCM were

added. The aqueous layer was extracted three times with DCM. Organic layers were combined, washed with brine and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 80:20) to give the expected product a white solid (457 mg, 2.31 mmol, η = 85 %).

CAS number [25782-99-4]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 6.88 – 6.81 (m, 2H), 6.71 – 6.68 (m, 4H), 6.53 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 3.05 (s, 3H, H₅).

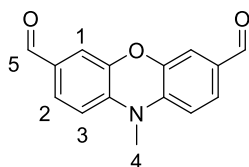
LC/MS (ES+) : $m/z = 197.2$ ($[M+H]^+$), $tr = 7.26$ min

TLC : R_f (Cyclohexane) = 0.43

Melting point : < 40 °C

10-methylphenoxazine-3,7-dicarbaldehyde, **21** :

Synthesized by Matthieu Poulain during his master internship



Chemical Formula: $C_{15}H_{11}NO_3$
Exact Mass: 253,0739

Under Ar atmosphere and at 0 °C, $POCl_3$ (11.3 mL, 121 mmol, 100 eq.) was added dropwise to dry DMF (20 mL). After 1h stirring at 0 °C, 10-methylphenoxazine **20** (240 mg, 1.22 mmol, 1.0 eq.) was introduced. The solution was stirred at 95 °C for 72h. The dark mixture was poured into an ice bath and this solution was quenched by NaOH 3M. The aqueous layer was extracted three times with AcOEt. Organic layers were combined, washed with brine and dried over Na_2SO_4 . The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 50:50) to give the expected product as a yellow solid (119 mg, 0.47 mmol, $\eta = 39$ %).

CAS number [1680217-94-0]

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 9.75$ (s, 2H, H_5), 7.41 (dd, $J = 8.0$ Hz, 2.0 Hz, 2H, H_2), 7.19 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H_1), 6.67 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_3), 3.20 (s, 3H, H_4).

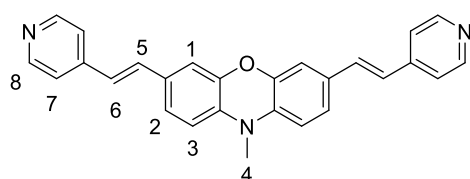
LC/MS (ES+) : $m/z = 254.2$ ($[M+H]^+$), $tr = 6.32$ min

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 1:1) = 0.36

Melting point : 205 °C

10-methyl-3,7-bis[(E)-2-(pyridin-4-yl)ethenyl]-10H-phenoxazine, **Phenoⁿ-Py** :

Synthesized by Matthieu Poulain during his master internship



Chemical Formula: $C_{27}H_{21}N_3O$
Exact Mass: 403,1685

Under Ar atmosphere, 10-methylphenoxazine-3,7-dicarbaldehyde **21** (52 mg, 0.21 mmol, 1.0 eq.) and sodium hydride 60 % in oil (33 mg, 0.82 mmol, 4.0 eq.) were dissolved in dry DMF (2.5 mL). The phosphonate **14** (94 μ L, 0.45 mmol, 2.0 eq.) was then added and the solution was stirred at r.t. for 3h. Water was introduced dropwise to quench the reaction. The aqueous layer was extracted three times with DCM. Organic layers were combined and washed with brine and dried over Na_2SO_4 . The resulting solid was washed with Et_2O and filtered to give the expected product as a yellow powder (77 mg, 0.19 mmol, $\eta = 93$ %).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 8.54$ (d, $J = 5.5$ Hz, 4H, H_8), 7.30 (d, $J = 5.5$ Hz, 4H, H_7), 7.11 (d, $J = 16.0$ Hz, 2H, H_5/H_6), 7.01 – 6.95 (dd, $J = 8.0$ Hz, 1.5 Hz, 2H, H_2), 6.92 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H, H_1), 6.80 (d, $J = 16.0$ Hz, 2H, H_5/H_6), 6.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_3), 3.08 (s, 3H, H_4).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 150.3$ (C_8), 145.4 (C_q), 144.9 (C_q), 134.6 (C_q), 132.1 (C_5/C_6), 129.9 (C_q), 124.2 (C_2), 123.8 (C_5/C_6), 120.7 (C_7), 112.8 (C_1), 111.7 (C_3), 31.2 (C_4).

LC/MS (ES+) : $m/z = 404.3$ ($[M+H]^+$), $tr = 5.25$ min

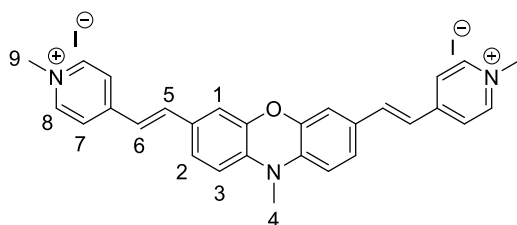
TLC : R_f (DCM/MeOH 95:5) = 0.28

HRMS (ES+) : calculated for $C_{27}H_{22}N_3O^+$ 404.1758 found 404.1771

Melting point : > 240 °C

Pheno-Py :

Synthesized by Matthieu Poulain during his master internship



Chemical Formula: $C_{29}H_{27}N_3O^{2+}$
Exact Mass: 433,2143

A large excess of iodomethane (0.62 mL, 9.91 mmol, 100 eq.) was added to a solution of **Phenoⁿ-Py** (40 mg, 0.10 mol, 1.0 eq.) in a MeOH/DCM (1:1) mixture (4 mL). The reaction was stirred at r.t. overnight. Et₂O was added to get a precipitate which was filtered to give the expected product as a red powder (58 mg, 84 μmol, $\eta = 85\%$).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) : $\delta = 8.79$ (d, $J = 6.5$ Hz, 4H, H₈), 8.10 (d, $J = 6.5$ Hz, 4H, H₇), 7.85 (d, $J = 16.0$ Hz, 2H, H₅), 7.33 (d, $J = 16.0$ Hz, 2H, H₆), 7.26 (dd, $J = 8.5$ Hz, 1.5 Hz, 2H, H₂), 7.18 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H, H₁), 6.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H₃), 4.22 (s, 6H, H₉), 3.17 (s, 3H, H₄).

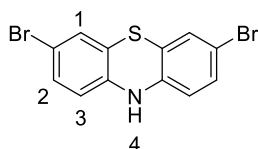
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) : $\delta = 152.7$ (C_q), 144.8 (C₈), 144.4 (C_q), 139.8 (C₅), 135.4 (C_q), 129.0 (C_q), 126.6 (C₂), 122.9 (C₇), 120.8 (C₆), 112.9 (C₁), 112.9 (C₃), 46.7 (C₉), 31.4 (C₄).

LC/MS (ES+) : $m/z = 216.7$ ($[M-2I^-]/2^+$), $tr = 5.11$ min

HRMS (ES+) : calculated for $C_{29}H_{27}N_3OI^+$ 560.1193 found 560.1197

Melting point : > 240 °C

3,7-dibromo-10H-phenothiazine, 22 :



Chemical Formula: $C_{12}H_7Br_2NS$
Exact Mass: 354,8666

Under Ar atmosphere, 10H-phenothiazine (2.00 g, 20.1 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in AcOH (20 mL). Br₂ (1.08 mL, 21.1 mmol, 2.1 eq.) was then added dropwise. The mixture was stirred at r.t. overnight. A saturated Na₂SO₃ aqueous solution was then used to quench the reaction. The aqueous layer was extracted three times with Et₂O. Organic layers were combined, washed

with brine and dried over MgSO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 80:20) to give the expected product as a white solid (2.03 g, 5.69 mmol, $\eta = 57\%$).

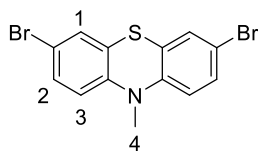
CAS number [21667-32-3]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : $\delta = 7.12 - 7.05$ (m, 4H, H₁, H₂), 6.40 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H₃), 5.78 (s, 1H, NH).

LC/MS (ES+) : $m/z = 357.0$ ($[M+H]^+$), $tr = 8.01$ min

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 8:2) = 0.42

Melting point : 180 °C

3,7-dibromo-10-methyl-10H-phenothiazine, **23** :

Chemical Formula: C₁₃H₉Br₂NS
Exact Mass: 368,8822

Under Ar atmosphere, 3,7-dibromo-10H-phenothiazine **22** (1.94 g, 5.40 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry THF (13 mL). Sodium hydride 60 % in oil (324 mg, 8.10 mmol, 1.5 eq.) was added and the gas production was controlled thanks to a bubbler. Once the bubbling has stopped, iodomethane (1.00 mL, 16.2 mmol, 3.0 eq.) was introduced and the solution was stirred at r.t. overnight. Water was added. The aqueous layer was extracted three times with DCM. Organic layers were combined, washed with brine and dried over MgSO₄. The resulting solid was washed with pentane to give the expected product as a white solid (1.94 g, 5.19 mmol, $\eta = 96\%$).

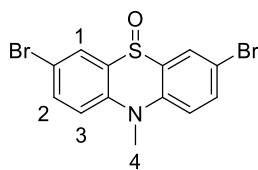
CAS number [34964-70-0]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : $\delta = 7.28 - 7.22$ (m, 4H, H₁, H₂), 6.64 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H₃), 3.30 (s, 3H, H₄).

LC/MS (ES+) : $m/z = 371.0$ ([M+H]⁺), $tr = 8.67$ min

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 9:1) = 0.55

Melting point : 137 °C

Compound **24** :

Chemical Formula: C₁₃H₉Br₂NOS
Exact Mass: 384,8772

Compound **23** (90 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in AcOH (2.5 mL). H₂O₂ (30 % in water, 0.20 mL, 1.94 mmol, 8.0 eq.) was introduced and the solution was stirred at r.t. overnight. The mixture was diluted with AcOEt. The organic layer was washed several times with a saturated NaHCO₃ aqueous solution until gas release ceased. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 80:20 to 20:80) to give the expected product as a white solid (68 mg, 0.18 mmol, $\eta = 72\%$).

CAS number [52492-81-6]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : $\delta = 8.03$ (d, $J = 2.5$ Hz, 2H, H₁), 7.71 (dd, $J = 9.0$ Hz, 2.5 Hz, 2H, H₂), 7.27 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H₃), 3.73 (s, 3H, H₄).

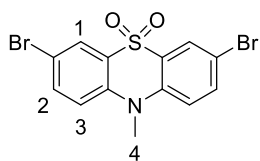
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : $\delta = 138.6$ (C_q), 135.8 (C₂), 133.2 (C₁), 126.3 (C_q), 117.5 (C₃), 114.4 (C_q), 35.8 (C₄).

LC/MS (ES+) : $m/z = 388.0$ ([M+H]⁺), $tr = 7.10$ min

HRMS (APPI+) : calculated for C₁₃H₁₀Br₂NOS⁺ 385.8845 found 385.8827

TLC : R_f (AcOEt) = 0.77

Melting point : 194 °C

Compound 25 :

Chemical Formula: $C_{13}H_9Br_2NO_2S$
Exact Mass: 400,8721

Compound **23** (95 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in AcOH (2.7 mL). H_2O_2 (30 % in water, 0.39 mL, 3.84 mmol, 15.0 eq.) was introduced and the solution was heated at 90 °C for 5h30. The mixture was diluted with water to increase the amount of precipitate. It was filtered and washed with water to give the expected product as a white solid (93 mg, 0.23 mmol,

$\eta = 90 \%$).

CAS number [2003260-06-6]

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 8.20$ (d, $J = 2.5$ Hz, 2H, H_1), 7.72 (dd, $J = 9.0$ Hz, 2.5 Hz, 2H, H_2), 7.19 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H_3), 3.68 (s, 3H, H_4).

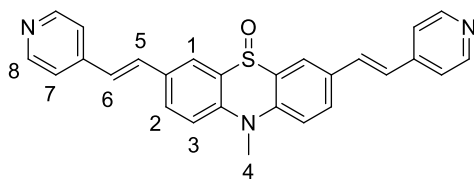
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 140.9$ (C_q), 136.4 (C_2), 126.3 (C_1), 125.7 (C_q), 117.7 (C_3), 114.9 (C_q), 36.2 (C_4).

LC/MS (ES+) : $m/z = 404.1$ ($[M+H]^+$), $tr = 7.69$ min

HRMS (APPI+) : calculated for $C_{13}H_9Br_2NO_2S^+$ 400.8697 found 400.8697

TLC : R_f (AcOEt) = 0.51

Melting point : > 240 °C

Sulfoxⁿ-Py :

Chemical Formula: $C_{27}H_{21}N_3OS$
Exact Mass: 435,1405

Under Ar atmosphere, $Pd(OAc)_2$ (5 mg, 21 μ mol, 0.1 eq.) and $P(o-tol)_3$ (9 mg, 31 μ mol, 0.15 eq.) were dissolved in a Et_3N/DMF mixture (2:1, 3 mL) freshly degassed. The mixture was stirred 15 min and degassed once again during 5 min.

Bromine derivative **24** (80 mg, 0.21 mmol, 1.0 eq.) and 4-vinylpyridine (66 μ L, 0.62 mmol, 3.0 eq.) were added. The mixture was then stirred at 90 °C overnight. The crude was diluted in DCM. The organic layer was washed twice with water, once with a saturated $NaHCO_3$ aqueous solution, once with brine and dried over $MgSO_4$. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 100:0 to 90:10) to give the expected product as a yellow powder (85 mg, 0.20 mmol, $\eta = 94 \%$).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 8.60$ (d, $J = 6.0$ Hz, 4H, H_8), 8.12 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H, H_1), 7.82 (dd, $J = 9.0$ Hz, 1.5 Hz, 2H, H_2), 7.44 – 7.33 (m, 8H, H_3 , H_5/H_6 , H_7), 7.05 (d, $J = 16.5$ Hz, 2H, H_5/H_6), 3.83 (s, 3H, H_4).

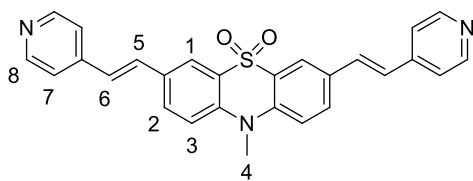
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 150.4$ (C_8), 144.4 (C_q), 139.3 (C_q), 131.3 ($C_2/C_5/C_6$), 131.0 ($C_2/C_5/C_6$), 130.8 (C_q), 129.8 (C_1), 126.1 (C_5/C_6), 125.2 (C_q), 120.9 (C_7), 116.3 (C_3), 35.8 (C_4).

LC/MS (ES+) : $m/z = 436.5$ ($[M+H]^+$), $tr = 5.19$ min

HRMS (ES+) : calculated for $C_{27}H_{22}N_3OS^+$ 436.1478 found 436.1504

TLC : R_f (DCM/MeOH 95:5) = 0.31

Melting point : > 240 °C

Sulfonⁿ-Py :

Chemical Formula: C₂₇H₂₁N₃O₂S
Exact Mass: 451,1354

Under Ar atmosphere, Pd(OAc)₂ (5 mg, 20 μmol, 0.1 eq.) and P(*o*-tol)₃ (9 mg, 30 μmol, 0.15 eq.) were dissolved in a Et₃N/DMF mixture (2:1, 3 mL) freshly degassed. The mixture was stirred 15 min and degassed once again during 5 min. Bromine derivative **25** (80 mg, 0.20 mmol, 1.0 eq.) and 4-vinylpyridine (63 μL, 0.60 mmol, 3.0 eq.) were added. The mixture was then stirred at 90 °C overnight. The crude was diluted in DCM. The organic layer was washed twice with water, once with a saturated NaHCO₃ aqueous solution, once with brine and dried over MgSO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (DCM/MeOH 100:0 to 90:10) to give the expected product as a yellow powder (65 mg, 0.14 mmol, η = 73 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.61 (d, *J* = 5.5 Hz, 4H, H₈), 8.30 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H, H₁), 7.80 (dd, *J* = 9.0 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₂), 7.42 – 7.29 (m, 7H, H₃, H₇, H₅/H₆), 7.09 (d, *J* = 16.5 Hz, 2H, H₅/H₆), 3.79 (s, 3H, H₄).

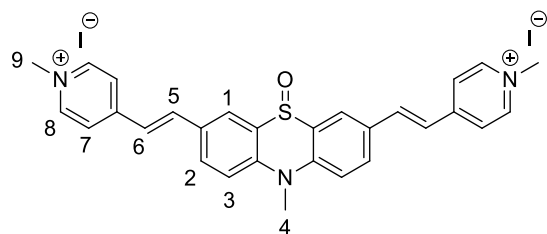
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 150.5 (C₈), 144.2 (C_q), 141.5 (C_q), 131.8 (C₂), 130.9 (C_q), 130.6 (C₅/C₆), 126.9 (C₅/C₆), 124.9 (C_q), 122.0 (C₁), 121.0 (C₇), 116.4 (C₃), 36.2 (C₄).

LC/MS (ES+) : *m/z* = 452.4 ([M+H]⁺), *tr* = 5.32 min

HRMS (ES+) : calculated for C₂₇H₂₂N₃O₂S⁺ 452.1427 found 452.1454

TLC : R_f (DCM/MeOH 95:5) = 0.39

Melting point : > 240 °C

Sulfox-Py :

Chemical Formula: C₂₉H₂₇N₃OS²⁺
Exact Mass: 465,1864

A large excess of iodomethane (0.50 mL, 8.04 mmol, 100 eq.) was added to a solution of **Sulfoxⁿ-Py** (35 mg, 80 μmol, 1.0 eq.) in a MeOH/DCM (1:1) mixture (4 mL). The reaction was stirred at 45 °C overnight. Et₂O was introduced to increase the amount of precipitate. It was filtered to give the expected product as a red powder (56 mg, 78 μmol, η = 97 %).

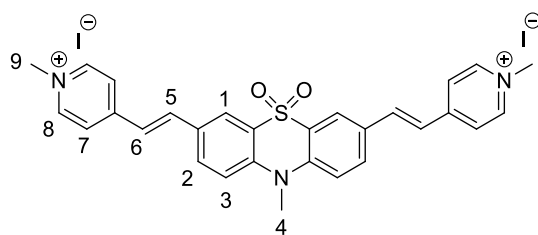
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ = 8.87 (d, *J* = 6.5 Hz, 4H, H₈), 8.43 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H, H₁), 8.19 (d, *J* = 6.5 Hz, 4H, H₇), 8.16 – 8.07 (m, 4H, H₂, H₅), 7.82 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H₃), 7.64 (d, *J* = 16.5 Hz, 2H, H₆), 4.26 (s, 6H, H₉), 3.90 (s, 3H, H₄).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) : δ = 152.4 (C_q), 145.1 (C₈), 139.6 (C_q), 138.8 (C₅), 132.3 (C₂), 131.0 (C₁), 129.4 (C_q), 124.7 (C_q), 123.3 (C₇), 122.6 (C₆), 117.6 (C₃), 47.0 (C₉), 36.0 (C₄).

LC/MS (ES+) : *m/z* = 232.9 ([M-2I]²⁺), *tr* = 5.20 min

HRMS (ES+) : calculated for C₂₉H₂₇N₃OSI⁺ 592.0914 found 592.0916

Melting point : > 240 °C

Sulfon-Py :

Chemical Formula: $C_{29}H_{27}N_3O_2S^{2+}$
Exact Mass: 481,1813

A large excess of iodomethane (0.48 mL, 7.75 mmol, 100 eq.) was added to a solution of **Sulfonⁿ-Py** (35 mg, 78 μ mol, 1.0 eq.) in a MeOH/DCM (1:1) mixture (4 mL). The reaction was stirred at 45 °C overnight. Et₂O was introduced to increase the amount of precipitate. It was filtered to give the expected product as a red powder

(55 mg, 75 μ mol, η = 96 %).

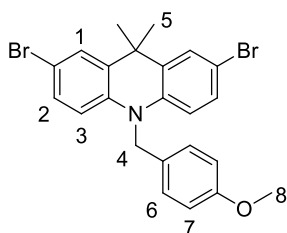
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) : δ = 8.89 (d, J = 6.5 Hz, 4H, H₈), 8.39 (s, 2H, H₁), 8.26 – 8.11 (m, 8H, H₂, H₅, H₇), 7.80 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H₃), 7.67 (d, J = 16.5 Hz, 2H, H₆), 4.27 (s, 6H, H₉), 3.86 (s, 3H, H₄).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) : δ = 152.3 (C_q), 145.2 (C₈), 141.6 (C_q), 138.3 (C₅), 132.5 (C₂), 129.5 (C_q), 123.7 (C_q), 123.5 (C₆/C₇), 123.3 (C₆/C₇), 122.6 (C₁), 118.3 (C₃), 47.0 (C₉), 36.5 (C₄).

LC/MS (ES+) : m/z = 240.9 ([M-2I/2]⁺), t_r = 5.37 min

HRMS (ES+) : calculated for $C_{29}H_{27}N_3O_2SI^+$ 608.0863 found 608.0842

Melting point : > 240 °C

2,7-dibromo-10-[(4-methoxyphenyl)methyl]-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine, 31 :

Chemical Formula: $C_{23}H_{21}Br_2NO$
Exact Mass: 484,9990

Under Ar atmosphere, 2,7-dibromo-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine **17** (500 mg, 1.36 mmol, 1.0 eq.) and sodium hydride 60 % in oil (60 mg, 1.50 mmol, 1.1 eq.) were dissolved in dry DMF (13 mL). After 30 min stirring, 4-methoxybenzylchloride (0.19 mL, 1.43 mmol, 1.05 eq.) was introduced and the solution was stirred at for 3h. Water was added : a precipitate appeared. It was filtered and dissolved in DCM. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. After evaporation, the resulting

solid was filtered and washed with pentane to give the expected product as a white solid (626 mg, 1.29 mmol, η = 94 %).

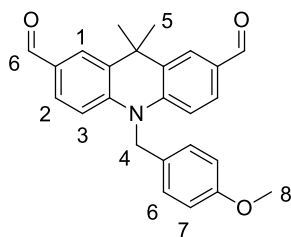
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.50 (d, J = 2.0 Hz, 2H, H₁), 7.17 (dd, J = 8.5 Hz, 2.0 Hz, 2H, H₂), 7.04 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₆), 6.85 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₇), 6.62 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₃), 5.09 (s, 2H, H₄), 3.79 (s, 3H, H₈), 1.55 (s, 6H, H₅).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 158.9 (C_q), 139.6 (C_q), 133.9 (C_q), 129.8 (C₂), 127.6 (C_q), 127.5 (C₁/C₆), 127.4 (C₁/C₆), 115.2 (C₃), 114.5 (C₇), 113.7 (C_q), 55.4 (C₈), 50.7 (C₄), 36.7 (C_q), 29.1 (C₅).

LC/MS (ES+) : m/z = 486.2 ([M+H]⁺), t_r = 8.39 min

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 9:1) = 0.54

Melting point : 128 °C

10-[(4-methoxyphenyl)methyl]-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **32** :

Chemical Formula: $C_{25}H_{23}NO_3$
Exact Mass: 385,1678

At $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ and under Ar atmosphere, *n*-BuLi in hexanes (9.62 mL, 1.60 M, 15.4 mmol, 3.0 eq.) was added dropwise to a solution of bromine derivative **31** (2.50 g, 5.13 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (78 mL). After 15 min, DMF (1.19 mL, 15.4 mmol, 3.0 eq.) was added dropwise. The mixture was then allowed to warm to r.t. and stirred for 1h. Water was introduced dropwise to quench the reaction. The aqueous layer was extracted once with AcOEt. Organic layer was washed twice with brine and dried over Na_2SO_4 . The

resulting solid was washed with pentane and filtered to give the expected product as a pale-yellow powder (1.89 g, 4.89 mmol, $\eta = 95\%$).

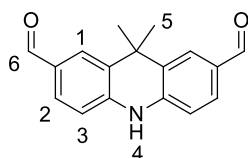
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : $\delta = 9.89$ (s, 2H, H_6), 8.01 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H_1), 7.63 (dd, $J = 8.5$ Hz, 2.0 Hz, 2H, H_2), 7.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_6), 6.93 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_3), 6.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_7), 5.27 (s, 2H, H_4), 3.80 (s, 3H, H_8), 1.68 (s, 6H, H_5).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) : $\delta = 191.0$ (C_6), 159.2 (C_q), 144.8 (C_q), 132.7 (C_q), 130.9 (C_q), 130.4 (C_2), 127.2 (C_6), 126.6 (C_q), 126.4 (C_2), 114.8 (C_7), 114.3 (C_3), 55.5 (C_8), 51.5 (C_4), 36.6 (C_q), 30.0 (C_5).

LC/MS (ES+) : $m/z = 386.4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), $t_r = 7.22$ min

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 7:3) = 0.33

Melting point : $78\text{ }^{\circ}\text{C}$

9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **30** :

Chemical Formula: $C_{17}H_{15}NO_2$
Exact Mass: 265,1103

Under Ar atmosphere, aniline **32** (180 mg, 0.47 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry DCM and TFA (0.17 mL, 2.33 mmol, 5.0 eq.) was added dropwise. After 10 min, solvents were removed under reduced pressure. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 80:20 to 60:40) to give the expected product as an orange powder (85 mg, 0.32 mmol,

$\eta = 69\%$).

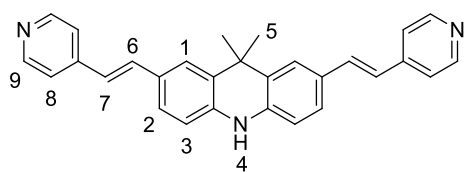
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : $\delta = 9.86$ (s, 2H, H_6), 7.95 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H, H_1), 7.68 (dd, $J = 8.0$ Hz, 1.5 Hz, 2H, H_2), 6.99 (br s, 1H, H_4), 6.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_3), 1.67 (s, 6H, H_5).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) : $\delta = 190.8$ (C_6), 142.0 (C_q), 131.2 (C_q), 130.1 (C_2), 129.9 (C_q), 128.6 (C_1), 114.5 (C_3), 32.0 (C_5).

LC/MS (ES+) : $m/z = 266.3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), $t_r = 6.25$ min

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 6:4) = 0.33

Melting point : $224\text{ }^{\circ}\text{C}$

9,9-dimethyl-2,7-bis[(E)-2-(pyridin-4-yl)ethenyl]-9,10-dihydroacridine, **26** :

Chemical Formula: C₂₉H₂₅N₃
Exact Mass: 415,2048

Under Ar atmosphere, aldehyde **30** (350 mg, 1.32 mmol, 1.0 eq.) and sodium hydride 60 % in oil (211 mg, 0.90 mmol, 4.0 eq.) were dissolved in dry DMF (10 mL). The phosphonate (550 μ L, 2.64 mmol, 2.0 eq.) was then added and the solution was stirred at r.t. for 2h. Water was introduced dropwise to

quench the reaction. The aqueous layer was extracted once with DCM. Organic layers were washed twice with brine and dried over Na₂SO₄. After partial evaporation, pentane was added was added to obtain a precipitate which was filtered to give the expected product as a brown-yellow powder (512 mg, 1.23 mmol, η = 93 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.55 (d, *J* = 6.0 Hz, 4H, H₉), 7.56 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H, H₁), 7.38 - 7.34 (m, 6H, H₈, H₂), 7.29 (d, *J* = 16.0 Hz, 2H, H₇), 6.89 (d, *J* = 16.0 Hz, 2H, H₆), 6.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H₃), 6.48 (s, 1H, H₄), 1.68 (s, 6H, H₅).

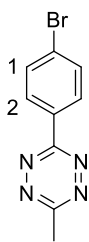
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 150.2 (C₉), 145.3 (C_q), 138.4 (C_q), 133.4 (C₇), 129.4 (C_q), 129.3 (C_q), 125.9 (C₁), 125.5 (C₂), 122.8 (C₆), 120.7 (C₈), 114.3 (C₃), 36.7 (C_q), 31.5 (C₅).

LC/MS (ES+) : *m/z* = 416.3 ([M+H]⁺), *tr* = 4.81 min

TLC : R_f (DCM/EtOH, 95:5) = 0.17

HRMS (ES+) : calculated for C₂₉H₂₆N₃⁺ 416.2121 found 416.2136

Melting point : > 240 °C

3-(4-bromophenyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine, **p-27** :

Chemical Formula: C₉H₇BrN₄
Exact Mass: 249,9854

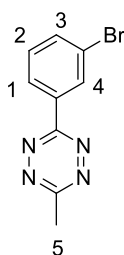
Under Ar atmosphere, a solution of 4-bromobenzonitrile (1.5 g, 8.24 mmol, 1.0 eq.), ACN (3.47 mL, 65.9 mmol, 8.0 eq.), EtOH (1.44 mL, 24.7 mmol, 3.0 eq.) and 3-mercaptopropionic acid (0.72 mL, 8.24 mmol, 1.0 eq.) was cooled to 0 °C. Hydrazine hydrate (4.8 mL, 98.9 mmol, 12.0 eq.) was then added dropwise. The solution was then stirred at r.t. for 15h. A saturated aqueous solution of sodium nitrite (8.53 g, 123 mmol, 15 eq.) was added into the reaction mixture, which was cooled to 0 °C. A solution of HCl 1 M was then added dropwise until gas release ceased. The pink aqueous layer was extracted with DCM. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/DCM, 100:0 to 70:30) to give the expected product as a pink solid (940 mg, 3.74 mmol, η = 45 %).

CAS number [56108-00-0]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.47 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₂), 7.74 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₁), 3.10 (s, 3H, H₃).

LC/MS (ES+) : *m/z* = 253.3 ([M+H]⁺), *tr* = 7.64 min

TLC : R_f (Petroleum ether/DCM, 7:3) = 0.47

3-(3-bromophenyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine, **m-27** :

Chemical Formula: $C_9H_7BrN_4$
Exact Mass: 249,9854

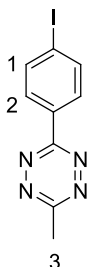
Under Ar atmosphere, a solution of 3-bromobenzonitrile (300 mg, 1.65 mmol, 1.0 eq.), ACN (0.69 mL, 13.2 mmol, 8.0 eq.), EtOH (0.29 mL, 4.94 mmol, 3.0 eq.) and 3-mercaptopropionic acid (0.14 mL, 1.65 mmol, 1.0 eq.) was cooled to 0 °C. Hydrazine hydrate (0.96 mL, 19.8 mmol, 12.0 eq.) was then added dropwise. The solution was then stirred at r.t. for 15h. A saturated aqueous solution of sodium nitrite (1.71 g, 24.7 mmol, 15 eq.) was added into the reaction mixture, which was cooled to 0 °C. A solution of HCl 1 M was then added dropwise until gas release ceased. The pink aqueous layer was extracted with DCM. The organic layer was washed with brine and dried over Na_2SO_4 . The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/DCM, 100:0 to 70:30) to give the expected product as a pink solid (151 mg, 0.60 mmol, $\eta = 36\%$).

CAS number [56107-98-3]

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 8.74$ (s, 1H, H_4), 8.52 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_1/H_3), 7.74 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_1/H_3), 7.46 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_2), 3.11 (s, 3H, H_5).

LC/MS (ES+) : $m/z = 253.2$ ($[M+H]^+$), $tr = 6.76$ min

TLC : R_f (Petroleum ether/DCM, 7:3) = 0.47

3-(4-iodophenyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine :

Chemical Formula: $C_9H_7IN_4$
Exact Mass: 297,9715

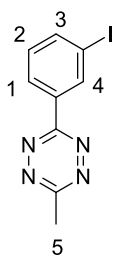
Under Ar atmosphere, a solution of 4-iodobenzonitrile (2.0 g, 8.73 mmol, 1.0 eq.), ACN (3.67 mL, 69.9 mmol, 8.0 eq.), EtOH (1.50 mL, 25.7 mmol, 3.0 eq.) and 3-mercaptopropionic acid (0.76 mL, 8.73 mmol, 1.0 eq.) was cooled to 0 °C. Hydrazine hydrate (5.08 mL, 105 mmol, 12.0 eq.) was then added dropwise. The solution was then stirred at r.t. for 72h. A saturated aqueous solution of sodium nitrite (9.04 g, 123 mmol, 15 eq.) was added into the reaction mixture, which was cooled to 0 °C. A solution of HCl 1 M was then added dropwise until gas release ceased. The pink aqueous layer was extracted once with DCM. The organic layer was washed with brine and dried over Na_2SO_4 . The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/DCM, 100:0 to 70:30) to give the expected product as a pink solid (853 mg, 2.86 mmol, $\eta = 33\%$).

CAS number [56108-04-4]

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 8.32$ (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_2), 7.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_1), 3.10 (s, 3H, H_3).

LC/MS (ES+) : $m/z = 299.3$ ($[M+H]^+$), $tr = 7.82$ min

TLC : R_f (Petroleum ether/DCM, 7:3) = 0.47

3-(3-iodophenyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine :

Chemical Formula: $C_9H_7IN_4$
Exact Mass: 297,9715

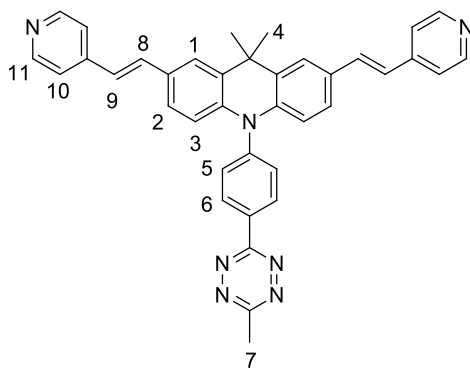
Under Ar atmosphere, a solution of 4-iodobenzonitrile (2.0 g, 8.73 mmol, 1.0 eq.), ACN (3.67 mL, 69.9 mmol, 8.0 eq.), EtOH (1.50 mL, 25.7 mmol, 3.0 eq.) and 3-mercaptopropionic acid (0.76 mL, 8.73 mmol, 1.0 eq.) was cooled to 0 °C. Hydrazine hydrate (5.08 mL, 105 mmol, 12.0 eq.) was then added dropwise. The solution was then stirred at r.t. for 16h. A saturated aqueous solution of sodium nitrite (9.04 g, 123 mmol, 15 eq.) was added into the reaction mixture, which was cooled to 0 °C. A solution of HCl 1 M was then added dropwise until gas release ceased. The pink aqueous layer was extracted once with DCM. The organic layer was washed with brine and dried over Na_2SO_4 . The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/DCM, 100:0 to 70:30) to give the expected product as a pink solid (896 mg, 3.01 mmol, $\eta = 34\%$).

CAS number [56108-02-2]

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 8.96$ (t, $J = 1.5$ Hz, 1H, H_4), 8.60 – 8.53 (m, 1H, H_1/H_3), 8.00 – 7.93 (m, 1H, H_1/H_3), 7.33 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_2), 3.12 (s, 3H, H_5).

LC/MS (ES+) : $m/z = 299.3$ ($[M+H]^+$), $t_r = 7.82$ min

TLC : R_f (Petroleum ether/DCM, 7:3) = 0.47

9,9-dimethyl-10-[4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl]-2,7-bis[(E)-2-(pyridin-4-yl)ethenyl]-9,10-dihydroacridine, **p-28** :

Chemical Formula: $C_{38}H_{31}N_7$
Exact Mass: 585,2641

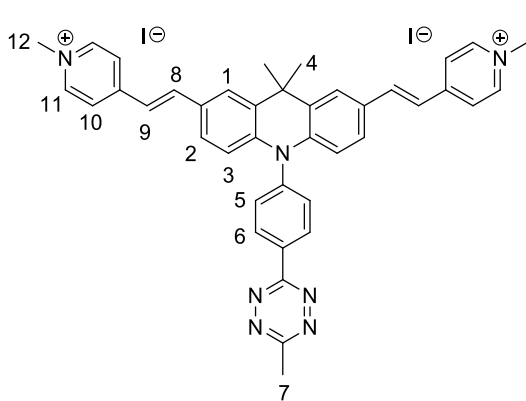
Under Ar atmosphere, aniline **26** (60 mg, 0.14 mmol, 1.0 eq.), tetrazine **p-27** (54 mg, 0.22 mmol, 1.5 eq.) and Cs_2CO_3 (94 mg, 0.29 mmol, 2.0 eq.) were dissolved in dry toluene (7 mL). The solution was degassed by Ar bubbling for 15 min under vigorous stirring, $Pd_2(dba)_3$ (7.9 mg, 8.7 μ mol, 0.06 eq.) and Xantphos (20 mg, 35 μ mol, 0.24 eq.) were then added. The solution was degassed once again during 15 min and was stirred at 110 °C for 2h30. DCM was introduced. The organic layer was washed once with water, once with brine and dried over Na_2SO_4 . The crude was purified by preparative TLC (Thickness : 2 mm, DCM/EtOH 90:10) to give the expected product as a red solid (48 mg, 82 μ mol, $\eta = 57\%$).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 8.89$ (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_6), 8.53 (d, $J = 6.0$ Hz, 4H, H_{11}), 7.66 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H_1), 7.60 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_5), 7.34 (d, $J = 6.0$ Hz, 4H, H_{10}), 7.28 (d, $J = 16.5$ Hz, 2H, H_9), 7.21 (dd, $J = 8.5$ Hz, 2.0 Hz, 2H, H_2), 6.88 (d, $J = 16.5$ Hz, 2H, H_8), 6.36 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_3), 3.15 (s, 3H, H_7), 1.81 (s, 6H, H_4).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 167.7 (C_q), 163.7 (C_q), 150.1 (C₁₁), 145.1 (C_q), 144.7 (C_q), 140.5 (C_q), 133.0 (C₉), 132.3 (C_q), 132.0 (C₅), 130.8 (C₆), 130.5 (C_q), 129.6 (C_q), 125.5 (C₂), 125.0 (C₁), 123.4 (C₈), 120.7 (C₁₀), 114.8 (C₃), 36.3 (C_q), 31.8 (C₄), 21.4 (C₇).

LC/MS (ES+) : m/z = 586.4 ([M+H]⁺), tr = 5.32 min

Fluorogenic probe **C** :



Chemical Formula: C₄₀H₃₇N₇²⁺
Exact Mass: 615,3099

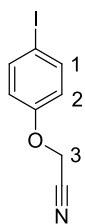
6H, H₁₂), 3.08 (s, 3H, H₇), 1.82 (s, 6H, H₄).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) : δ = 167.4 (C_q), 162.9 (C_q), 152.9 (C_q), 144.8, 143.1 (C_q), 140.8 (C_q), 140.7 (C₈), 132.6 (C_q), 131.8 (C₅), 130.6 (C₆), 130.5 (C_q), 128.7 (C_q), 127.6 (C₂), 126.7 (C₁), 122.9 (C₁₀), 120.3 (C₉), 114.8 (C₃), 46.7 (C₁₂), 35.9 (C_q), 32.2 (C₄), 21.0 (C₇).

LC/MS (ES+) : m/z = 307.8 ([M-2I⁻/2]⁺), tr = 5.22 min

HRMS (ES+) : calculated for C₄₀H₃₇N₇I⁺ 742.2150 found 742.2162

2-(4-iodophenoxy)acetonitrile, **33** :



Chemical Formula: C₈H₆INO
Exact Mass: 258,9494

Under Ar atmosphere, 4-iodophenol (1.50 g, 6.82 mmol, 1.0 eq.) and Cs₂CO₃ (3.33 g, 10.2 mmol, 1.5 eq.) were dissolved in dry DMF (30 mL). After 5 min, bromoacetonitrile (0.57 mL, 8.18 mmol, 1.2 eq.) was added and the solution was stirred at r.t. overnight. Water and AcOEt were introduced. The organic layer was washed three times with water, two times with brine and dried over Na₂SO₄.

After evaporation, the resulting solid was filtered and washed with pentane to give the expected product as a brown solid (1.69 g, 6.52 mmol, η = 96 %).

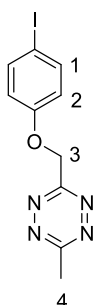
CAS number [243657-95-6]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.65 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H₁), 6.77 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H₂), 4.75 (s, 2H, H₃).

LC/MS (ES+) : m/z = 259.2 ([M+H]⁺), tr = 7.48 min

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 9:1) = 0.22

Melting point : 60 °C

3-(4-iodophenoxy)methyl-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine, **34** :

Chemical Formula: C₁₀H₉IN₄O
Exact Mass: 327,9821

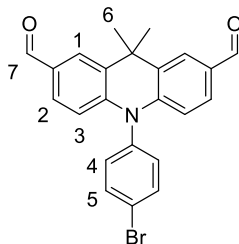
Under Ar atmosphere, a solution of 2-(4-iodophenoxy)acetonitrile **33** (1.65 g, 6.37 mmol, 1.0 eq.), ACN (2.68 mL, 51.0 mmol, 8.0 eq.), EtOH (1.09 mL, 18.8 mmol, 3.0 eq.) and 3-mercaptopropionic acid (0.56 mL, 6.37 mmol, 1.0 eq) was cooled to 0 °C. Hydrazine hydrate (3.71 mL, 76.4 mmol, 12.0 eq.) was then added dropwise. The solution was then stirred at r.t. for 72h. A saturated aqueous solution of sodium nitrite (6.59 g, 95.5 mmol, 15 eq.) was added into the reaction mixture, which was cooled to 0 °C. A solution of HCl 1 M was then added dropwise until gas release ceased. The pink aqueous layer was extracted once with DCM. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/DCM, 100:0 to 50:50) to give the expected product as a pink solid (451 mg, 1.37 mmol, η = 22 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.57 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₁), 6.82 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₂), 5.61 (s, 2H, H₃), 3.10 (s, 3H, H₄).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 168.9 (C_q), 165.5 (C_q), 157.9 (C_q), 138.6 (C₁), 117.5 (C₂), 84.5 (C_q), 67.9 (C₃), 21.5 (C₄).

LC/MS (ES+) : m/z = 329.1 ([M+H]⁺), t_r = 6.69 min

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 8:2) = 0.32

10-(4-bromophenyl)-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **p-36** :

Chemical Formula: C₂₃H₁₈BrNO₂
Exact Mass: 419,0521

Under Ar atmosphere and at 0 °C, POCl₃ (17.9 mL, 192 mmol, 100 eq.) was added dropwise to dry DMF (30 mL). After 1h stirring at 0 °C, 10-(4-bromophenyl)-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine (700 mg, 1.92 mmol, 1.0 eq.) was introduced. The solution was stirred at 95 °C overnight. The dark mixture was poured into an ice bath and this solution was quenched by NaOH 3 M. The aqueous layer was extracted four times with AcOEt. Organic layers were combined, washed with brine and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 80:20) to give the expected product as a yellow solid (666 mg, 1.58 mmol, η = 82 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 9.87 (s, 2H, H₇), 8.02 (d, J = 1.5 Hz, 2H, H₁), 7.84 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₄/H₅), 7.51 (dd, J = 8.5 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₂), 7.23 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₄/H₅), 6.39 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₃), 1.76 (s, 6H, H₆).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 190.8 (C₇), 144.4 (C_q), 138.6 (C_q), 134.9 (C₄/C₅), 132.2 (C₄/C₅), 131.0 (C_q), 130.8 (C_q), 129.7 (C₂), 127.6 (C₁), 123.6 (C_q), 115.0 (C₃), 36.3 (C_q), 32.0 (C₆).

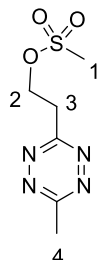
LC/MS (ES+) : m/z = 422.2 ([M+H]⁺), t_r = 7.66 min

HRMS (ES+) : calculated for C₂₃H₁₉BrNO₂⁺ 420.0594 found 420.0589

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 7:3) = 0.55

Melting point : 191 °C

3-(2-methanesulfonylethyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine, **39** :



Chemical Formula: $C_6H_{10}N_4O_3S$
Exact Mass: 218,0474

Under Ar atmosphere, a solution of 3-hydroxypropionitrile (1.50 mL, 22.0 mmol, 1.0 eq.), ACN (9.23 mL, 176 mmol, 8.0 eq.), EtOH (3.77 mL, 64.7 mmol, 3.0 eq.) and 3-mercaptopropionic acid (1.91 mL, 22.0 mmol, 1.0 eq) was cooled to 0 °C. Hydrazine hydrate (9.23 mL, 263 mmol, 12.0 eq.) was then added dropwise. The solution was then stirred at r.t. for 16h. A saturated aqueous solution of sodium nitrite (12.8 g, 329 mmol, 15 eq.) was added into the reaction mixture, which was cooled to 0 °C. A solution of HCl

1 M was then added dropwise until gas release ceased. The pink aqueous layer was extracted once with DCM. The organic layer was washed with brine. Et_3N (3.27 mL, 23.6 mmol, 1.1 eq.) and methanesulfonyl chloride (1.82 mL, 23.6 mmol, 1.1 eq.) were added and the solution was stirred at r.t. for 10 min. The organic layer was washed once with water. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 90:10 to 50:50) to give the expected product as a pink solid (970 mg, 4.44 mmol, $\eta = 21 \%$).

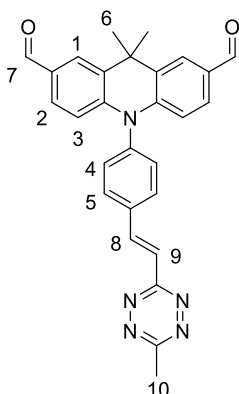
CAS number [1616736-04-9]

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 4.87$ (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, H_2), 3.77 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, H_3), 3.08 (s, 3H, H_4), 3.02 (s, 3H, H_1).

LC/MS (ES+) : $m/z = 219.2$ ($[M+H]^+$), $tr = 4.53$ min

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 1:1) = 0.27

9,9-dimethyl-10-{4-[(E)-2-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)ethenyl]phenyl}-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **p-37** :



Chemical Formula: $C_{28}H_{23}N_5O_2$
Exact Mass: 461,1852

Under Ar atmosphere, bromine derivative **p-36** (250 mg, 0.59 mmol, 1.0 eq.), tetrazine **39** (162 mg, 0.74 mmol, 1.25 eq.), $Pd_2(dba)_3$ (27 mg, 30 μ mol, 0.05 eq.) and QPhos (21 mg, 30 μ mol, 0.05 eq.) were solubilized in dry DMF (4 mL). The solution was degassed for 5 min, *N,N*-dicyclohexylmethylamine (315 μ L, 1.49 mmol, 2.5 eq.) was then added. The solution was stirred at 100 °C for 1h. AcOEt was introduced. The organic layer was washed with brine and dried over Na_2SO_4 . During evaporation, a precipitate appeared. It was filtered and washed with Et_2O to give the expected product as a red solid (241 mg, 0.52 mmol, $\eta = 88 \%$).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 9.88$ (s, 2H, H_7), 8.43 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H, H_9), 8.04 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H, H_1), 8.01 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_5), 7.60 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H, H_8), 7.53 (dd, $J = 8.5$ Hz, 1.5 Hz, 2H, H_2), 7.43 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_4), 6.45 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_3), 3.10 (s, 3H, H_{10}), 1.78 (s, 6H, H_6).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 190.8 (C₇), 166.9 (C_q), 164.6 (C_q), 144.4 (C_q), 141.0 (C_q), 139.2 (C₉), 136.4 (C_q), 131.2 (C₅), 131.0 (C₄), 131.0 (C_q), 130.9 (C_q), 129.7 (C₂), 127.7 (C₁), 122.8 (C₈), 115.1 (C₃), 36.3 (C_q), 32.1 (C₆), 21.4 (C₁₀).

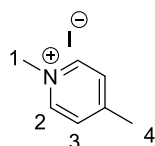
LC/MS (ES+) : m/z = 462.3 ([M+H]⁺), t_r = 7.43 min

HRMS (ES+) : calculated for C₂₈H₂₄N₅O₂⁺ 462.1925 found 462.1909

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 7:3) = 0.23

1,4-dimethylpyridinium iodide, 41 :

Compound synthesized by Delphine Naud



Chemical Formula: C₇H₁₀I⁺N⁻
Exact Mass: 234,9858

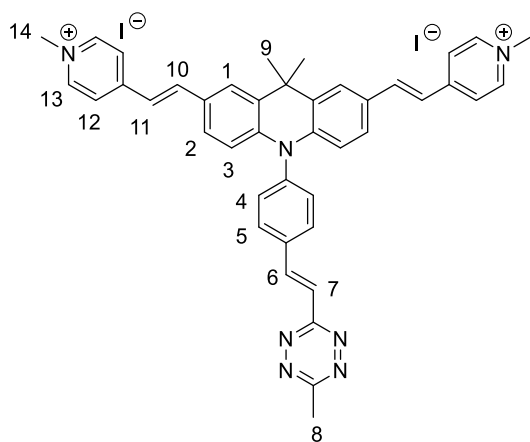
A large excess of iodomethane (5.0 mL, 80.3 mmol, 8.3 eq.) was added to a solution of 4-methylpyridine (0.95 mL, 903 mg, 9.69 mol, 1.0 eq.) in DCM (4 mL). The reaction was stirred at r.t for 4h. Petroleum ether was added to get a precipitate which was filtered to give the expected product as a white powder (2.28 g, 9.78 mmol, **quantitative**).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 8.82 (d, J = 6.5 Hz, 2H, H₂), 7.95 (d, J = 6.5 Hz, 2H, H₃), 4.27 (s, 3H, H₁), 2.59 (s, 3H, H₄).

LC/MS (ES+) : m/z = 108.1 ([M-I]⁺), t_r = 0.95 min

Melting point : > 240 °C

Fluorogenic probe F :



Chemical Formula: C₄₂H₃₉N₇²⁺
Exact Mass: 641,3256

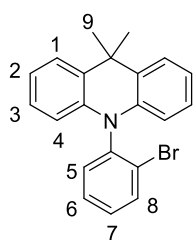
Aldehyde **p-37** (25 mg, 54 μ mol, 1.0 eq.) was solubilized in dry DMF (1 mL). This solution was cooled to 0 °C and pyrrolidine (9.3 μ L, 0.11 mmol, 2.1 eq.) was then added. After 15 min stirring, AcOH (31 μ L, 0.54 mmol, 10 eq.) and 1,4-dimethylpyridinium iodide **41** (24 mg, 0.10 mmol, 1.9 eq.) were introduced. The resulting mixture was stirred at 4 °C for 16h. Diethyl ether (3 mL) was added to get a precipitate which was filtered to give the expected product as a red solid (22 mg, 25 μ mol, η = 45 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) : δ = 8.80 (d, J = 6.5 Hz, 4H, H₁₃), 8.41 (d, J = 16.5 Hz, 1H, H₆/H₇), 8.27 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₅), 8.15 (d, J = 6.5 Hz, 4H, H₁₂), 8.07 – 7.95 (m, 4H, H₁, H₁₀), 7.81 (d, J = 16.5 Hz, 1H, H₆/H₇), 7.57 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₄), 7.49 – 7.36 (m, 4H, H₂, H₁₁), 6.33 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₃), 4.22 (s, 6H, H₁₄), 3.00 (s, 3H, H₈), 1.81 (s, 6H, H₉).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) : δ = 166.4 (C_q), 164.1 (C_q), 152.9 (C_q), 144.8 (C₁₃), 141.0 (C_q), 140.8 (C₁₀), 140.7 (C_q), 138.6 (C₆/C₇), 135.8 (C_q), 131.2 (C₄/C₅), 131.1 (C₄/C₅), 130.4 (C_q), 128.6 (C_q), 127.6 (C₂), 126.6 (C₁), 122.8 (C₆/C₇/C₁₂), 122.6 (C₆/C₇/C₁₂), 120.2 (C₁₁), 114.8 (C₃), 46.7 (C₁₄), 35.9 (C_q), 32.3 (C₉), 21.0 (C₈).

LC/MS (ES+) : m/z = 320.9 ([M-2I/2]⁺), t_r = 6.35 min

HRMS (ES+) : calculated for C₄₂H₃₉N₇⁺ 768.2306 found 768.2335

10-(2-bromophenyl)-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine, **o-38** :

Chemical Formula: $C_{21}H_{18}BrN$
Exact Mass: 363,0623

Under Ar atmosphere, 9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine **17** (100 mg, 0.48 mmol, 1.0 eq.), 2-bromiodobenzene (0.25 mL, 1.91 mmol, 4.0 eq.), NaO^tBu (92 mg, 0.96 mmol, 2.0 eq.), Pd₂(dba)₃ (9 mg, 10 μmol, 0.02 eq.) and XPhos (14 mg, 29 μmol, 0.06 eq.) were dissolved in freshly degassed (by Ar bubbling for 15 min) dry toluene (4.8 mL). The solution was stirred at 110 °C overnight. The crude was filtered through a Celite pad and purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane) to give the expected product as a white solid (129 mg, 0.35 mmol, $\eta = 74 \%$).

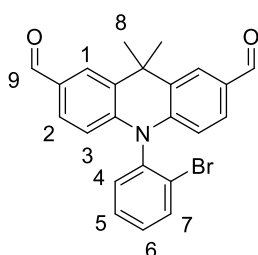
CAS number [2142571-63-7]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : $\delta = 7.89$ (dd, $J = 8.5$ Hz, 1.5 Hz, 1H, H₈), 7.57 (td, $J = 8.0$ Hz, 1.5 Hz, 1H, H₆/H₇), 7.50 (dd, $J = 7.5$, 2.0 Hz, 2H, H₁), 7.44 – 7.36 (m, 2H, H₅, H₆/H₇), 7.03 – 6.92 (m, 4H, H₂, H₃), 6.13 (dd, $J = 8.0$ Hz, 1.5 Hz, 2H, H₄), 1.79 (s, 3H, H₉), 1.69 (s, 3H, H₉).

LC/MS (ES+) : $m/z = 364.2$ ([M+H]⁺), tr = 8.03 min

TLC : R_f (Cyclohexane) = 0.26

Melting point : 176 °C

10-(2-bromophenyl)-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **o-36** :

Chemical Formula: $C_{23}H_{18}BrNO_2$
Exact Mass: 419,0521

Under Ar atmosphere and at 0 °C, POCl₃ (2.69 mL, 28.8 mmol, 70 eq.) was added dropwise to dry DMF (5 mL). After 1h stirring at 0 °C, compound **o-38** (150 mg, 0.41 mmol, 1.0 eq.) was introduced. The solution was stirred at 95 °C overnight. The dark mixture was poured into an ice bath and this solution was quenched by NaOH 3 M. The aqueous layer was extracted three times with AcOEt. Organic layers were combined, washed with brine and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by flash chromatography on

silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 70:30) to give the expected product as a yellow solid (97 mg, 0.23 mmol, $\eta = 56 \%$).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : $\delta = 9.87$ (s, 2H, H₉), 8.05 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H, H₁), 7.93 (dd, $J = 8.0$ Hz, 1.0 Hz, 1H, H₇), 7.65 (td, $J = 7.5$ Hz, 1.0 Hz, 1H, H₅/H₆), 7.56 – 7.47 (m, 3H, H₂, H₅/H₆), 7.41 (dd, $J = 8.0$ Hz, 1.5 Hz, 1H, H₄), 6.26 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H₃), 1.84 (s, 3H, H₈), 1.76 (s, 3H, H₈).

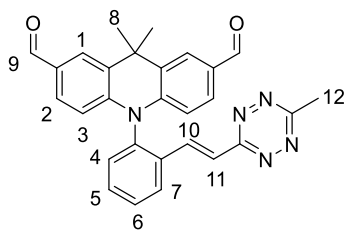
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : $\delta = 190.8$ (C₉), 143.2 (C_q), 138.2 (C_q), 135.5 (C₇), 132.5 (C₄), 131.2 (C₅/C₆), 131.1 (C_q), 130.7 (C_q), 130.4 (C₅/C₆), 129.8 (C₂), 128.0 (C₁), 125.4 (C_q), 114.5 (C₃), 36.7 (C_q), 33.8 (C₈), 31.8 (C₈).

LC/MS (ES+) : $m/z = 422.4$ ([M+H]⁺), tr = 7.30 min

HRMS (ES+) : calculated for C₂₃H₁₉BrNO₂⁺ 420.0594 found 420.0612

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 7:3) = 0.49

Melting point : 185 °C

9,9-dimethyl-10-{2-[(E)-2-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)ethenyl]phenyl}-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **o-37** :

Chemical Formula: $C_{28}H_{23}N_5O_2$
Exact Mass: 461,1852

Under Ar atmosphere, bromine derivative **o-36** (60 mg, 0.14 mmol, 1.0 eq.), tetrazine **39** (39 mg, 0.18 mmol, 1.25 eq.), $Pd_2(dba)_3$ (7 mg, 7 μ mol, 0.05 eq.) and QPhos (5 mg, 7 μ mol, 0.05 eq.) were solubilized in dry DMF (1 mL). The solution was degassed for 5 min, *N,N*-dicyclohexylmethylamine (76 μ L, 0.36 mmol, 2.5 eq.) was then added. The solution was stirred at 100 °C for 1h30. AcOEt was introduced. The organic layer was washed with brine and dried over Na_2SO_4 . The crude was

purified by preparative TLC (Thickness : 2 mm, Cyclohexane/AcOEt 60:40) to give the expected product as a red solid (41 mg, 89 μ mol, η = 62 %).

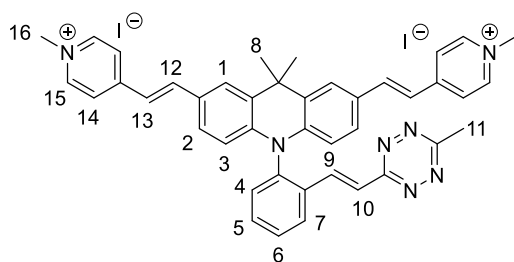
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ = 9.85 (s, 2H, H_9), 8.20 – 8.16 (m, 1H, H_7), 8.11 (d, J = 16.5 Hz, 1H, H_{10}), 8.05 (d, J = 1.5 Hz, 2H, H_1), 7.77 – 7.71 (m, 2H, H_5 , H_6), 7.52 – 7.46 (m, 3H, H_2 , H_{11}), 7.39 – 7.34 (m, 1H, H_4), 6.31 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H_3), 2.95 (s, 3H, H_{12}), 1.88 (s, 3H, H_8), 1.82 (s, 3H, H_8).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ = 190.8 (C_1), 166.7 (C_q), 164.2 (C_q), 144.0 (C_q), 138.8 (C_q), 135.3 (C_q), 134.3 (C_{10}), 133.0 (C_5/C_6), 131.6 (C_4), 131.1 (C_q), 130.9 (C_q), 130.4 (C_5/C_6), 129.8 (C_2), 128.9 (C_7), 128.2 (C_1), 124.5 (C_{11}), 115.0 (C_3), 36.3 (C_q), 34.1 (C_8), 31.8 (C_8), 21.3 (C_{12}).

LC/MS (ES+) : m/z = 462.4 ($[M+H]^+$), t_r = 7.30 min

HRMS (ES+) : calculated for $C_{28}H_{24}N_5O_2^+$ 462.1925 found 462.1925

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 7:3) = 0.26

Fluorogenic probe **D** :

Chemical Formula: $C_{42}H_{39}N_7^{2+}$
Exact Mass: 641,3256

Aldehyde **o-37** (25 mg, 54 μ mol, 1.0 eq.) was solubilized in dry DMF (1 mL). This solution was cooled to 0 °C and pyrrolidine (9.3 μ L, 0.11 mmol, 2.1 eq.) was then added. After 15 min stirring, AcOH (31 μ L, 0.54 mmol, 10 eq.) and 1,4-dimethylpyridinium iodide **41** (24 mg, 0.10 mmol, 1.9 eq.) were introduced. The resulting mixture was stirred at 4 °C for 17h. Diethyl ether (3 mL) was added to get a precipitate which was filtered to give the expected product as a red solid (31 mg, 35 μ mol, η = 64 %).

1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) : δ = 8.78 (d, J = 6.5 Hz, 4H, H_{15}), 8.53 (dd, J = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1H, H_7), 8.12 (d, J = 6.5 Hz, 4H, H_{14}), 8.05 – 7.90 (m, 5H, H_1 , H_{12} , H_9), 7.88 – 7.73 (m, 3H, H_5 , H_6 , H_{10}), 7.54 (dd, J = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1H, H_4), 7.42 – 7.37 (m, 4H, H_2 , H_{13}), 6.17 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H_3), 4.21 (s, 6H, H_{16}), 2.82 (s, 3H, H_{11}), 1.91 (s, 3H, H_8), 1.84 (s, 3H, H_8).

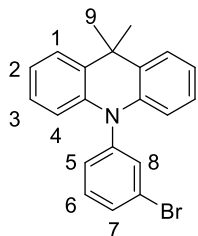
^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$) : δ = 166.3 (C_q), 163.7 (C_q), 152.9 (C_q), 144.8 (C_{15}), 140.6 (C_{12}), 140.5 (C_q), 138.4 (C_q), 134.2 (C_q), 133.2 (C_9), 132.8 (C_5/C_6), 131.6 (C_4), 130.3 (C_q), 130.2 (C_5/C_6), 129.2 (C_7), 128.7 (C_q), 127.9 (C_2), 127.1 (C_1), 124.1 (C_{10}), 122.8 (C_{14}), 120.4 (C_{13}), 114.6 (C_3), 46.7 (C_{16}), 35.9 (C_q), 34.5 (C_8), 32.2 (C_8), 20.8 (C_{11}).

LC/MS (ES+) : m/z = 320.9 ($[M-2I/2]^+$), t_r = 6.10 min

HRMS (ES+) : calculated for C₄₂H₃₉N₇⁺ 768.2306 found 768.2289

10-(3-bromophenyl)-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine, **m-38** :

Synthesized by Matthieu Poulain during his master internship



Chemical Formula: C₂₁H₁₈BrN
Exact Mass: 363,0623

Under Ar atmosphere, 9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine **17** (300 mg, 1.43 mmol, 1.0 eq.), 3-bromiodobenzene (0.55 mL, 4.30 mmol, 3.0 eq.), NaO^tBu (275 mg, 2.87 mmol, 2.0 eq.), Pd₂(dba)₃ (26 mg, 29 μmol, 0.02 eq.) and XPhos (41 mg, 86 μmol, 0.06 eq.) were dissolved in freshly degassed (by Ar bubbling for 15 min) dry toluene (13.5 mL). The solution was stirred at 110 °C overnight. The crude was filtered through a Celite pad and purified by flash chromatography on silica gel to give the expected product as a white

solid (197 mg, 0.54 mmol, η = **38 %**).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.63 – 7.61 (m, 1H, H₅/H₇), 7.54 – 7.41 (m, 4H, H₁, H₆, H₈), 7.30 – 7.27 (m, 1H, H₅/H₇), 7.00 – 6.89 (m, 4H, H₂, H₃), 6.25 (dd, J = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₄), 1.67 (s, 6H, H₉).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 142.7 (C_q), 140.6 (C_q), 134.7 (C₆/C₈), 132.2 (C₆/C₈), 131.6 (C₅/C₇), 130.4 (C₅/C₇), 130.2 (C_q), 126.6 (C₂/C₃), 125.4 (C₁), 124.0 (C_q), 121.0 (C₂/C₃), 114.1 (C₄), 36.1 (C_q), 31.4 (C₉).

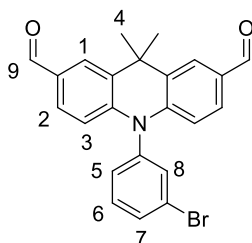
LC/MS (ES+) : m/z = 366.3 ([M+H]⁺), tr = 8.48 min

TLC : R_f (Cyclohexane) = 0.35

Melting point : 156 °C

10-(3-bromophenyl)-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **m-36** :

Synthesized by Matthieu Poulain during his master internship



Chemical Formula: C₂₃H₁₈BrNO₂
Exact Mass: 419,0521

Under Ar atmosphere and at 0 °C, POCl₃ (12.5 mL, 134 mmol, 250 eq.) was added dropwise to dry DMF (20 mL). After 1h stirring at 0 °C, 10-(3-bromophenyl)-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine **m-38** (197 mg, 0.54 mmol, 1.0 eq.) was introduced. The solution was stirred at 95 °C overnight. The dark mixture was poured into an ice bath and this solution was quenched by NaOH 3 M. The aqueous layer was extracted three times with AcOEt. Organic layers were combined, washed with brine and dried

over Na₂SO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 70:30) to give the expected product as a yellow solid (179 mg, 0.44 mmol, η = **82 %**).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 9.87 (s, 2H, H₉), 8.03 (d, J = 1.5 Hz, 2H, H₁), 7.80 – 7.74 (m, 1H, H₅/H₇), 7.61 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H₆), 7.56 – 7.50 (m, 3H, H₂, H₈), 7.33 (m, 1H, H₅/H₇), 6.40 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₃), 1.77 (s, 6H, H₄).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 190.7 (C₉), 144.2 (C_q), 140.9 (C_q), 133.6 (C₈), 132.8 (C₅/C₆/C₇), 132.7 (C₅/C₆/C₇), 131.0 (C_q), 130.7 (C_q), 129.7 (C₂), 129.3 (C₅/C₇), 127.6 (C₁), 124.6 (C_q), 115.0 (C₃), 36.2 (C_q), 32.0 (C₄).

LC/MS (ES+) : $m/z = 422.2$ ($[M+H]^+$), $t_r = 8.05$ min

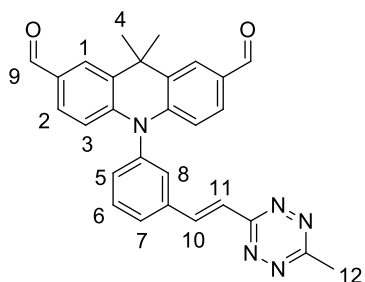
TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 7:3) = 0.51

HRMS (ES+) : calculated for $C_{23}H_{19}BrNO_2^+$ 420.0594 found 420.0613

Melting point : 188 °C

9,9-dimethyl-10-{3-[(E)-2-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)ethenyl]phenyl}-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **m-37** :

Synthesized by Matthieu Poulain during his master internship



Chemical Formula: $C_{28}H_{23}N_5O_2$
Exact Mass: 461,1852

Under Ar atmosphere, bromine derivative **m-36** (115 mg, 0.59 mmol, 1.0 eq.), tetrazine **39** (75 mg, 0.34 mmol, 1.25 eq.), $Pd_2(dba)_3$ (13 mg, 14 μ mol, 0.05 eq.) and QPhos (10 mg, 14 μ mol, 0.05 eq.) were solubilized in dry DMF (2 mL). The solution was degassed for 5 min, *N,N*-dicyclohexylmethylamine (150 μ L, 0.68 mmol, 2.5 eq.) was then added. The solution was stirred at 100 °C for 1h. AcOEt was introduced. The organic layer was washed with brine and dried over Na_2SO_4 . During evaporation, a precipitate appeared. It was filtered and washed with

Et_2O to give the expected product as a red solid (103 mg, 0.22 mmol, $\eta = 82\%$).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 9.88$ (s, 2H, H_9), 8.37 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H, H_{10}/H_{11}), 8.05 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H, H_1), 7.93 (dd, $J = 8.0$ Hz, 0.5 Hz, 1H, H_5/H_7), 7.80 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H_6), 7.66 (s, 1H, H_8), 7.57 – 7.49 (m, 3H, $H_2, H_{10}/H_{11}$), 7.43 – 7.38 (m, 1H, H_5/H_7), 6.44 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_3), 3.07 (s, 3H, H_{12}), 1.80 (s, 6H, H_4).

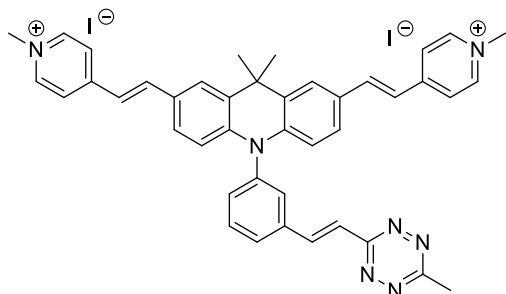
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 190.8$ (C_9), 166.8 (C_q), 164.5 (C_q), 144.5 (C_q), 140.5 (C_q), 139.0 (C_{10}/C_{11}), 138.9 (C_q), 132.2 (C_5/C_7), 132.0 (C_8), 131.0 (C_q), 130.8 (C_q), 129.7 ($C_2/C_{10}/C_{11}$), 129.0 (C_5/C_7), 127.7 (C_1), 122.7 ($C_2/C_{10}/C_{11}$), 115.1 (C_3), 36.3 (C_q), 32.1 (C_4), 21.4 (C_{12}).

LC/MS (ES+) : $m/z = 462.2$ ($[M+H]^+$), $t_r = 7.91$ min

HRMS (ES+) : calculated for $C_{28}H_{24}N_5O_2^+$ 462.1925 found 462.1913

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 1:1) = 0.67

Fluorogenic probe **E** :



Chemical Formula: $C_{42}H_{39}N_7^{2+}$
Exact Mass: 641,3256

Synthesized by Matthieu Poulain during his master internship

Compound **m-37** (30 mg, 65 μ mol, 1.0 eq.) was solubilized in dry DMF (1,3 mL). This solution was cooled to 0 °C and pyrrolidine (11 μ L, 0.14 mmol, 2.1 eq.) was then added. After 15 min stirring, AcOH (37 μ L, 0.65 mmol, 10 eq.) and 1,4-dimethylpyridinium iodide **41** (39 mg, 0.12 mmol, 1.9 eq.) were introduced. The resulting mixture was stirred

at 4 °C for 20h. Diethyl ether (3 mL) was added to get a precipitate which was filtered to give the expected product as a red solid (30 mg, 33 μ mol, $\eta = 58\%$).

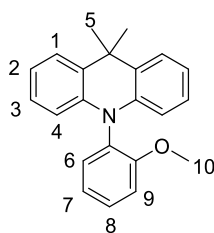
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) : δ = 8.81 (d, J = 3.0 Hz, 4H), 8.35 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 8.25 – 7.75 (m, 12H), 7.55 – 7.40 (m, 5H), 6.32 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 4.22 (s, 6H), 2.96 (s, 3H), 1.82 (s, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) : δ = 166.3 (C_q), 164.1 (C_q), 152.9 (C_q), 144.8 (CH₂), 141.2 (C_q), 140.9 (CH₂), 140.2 (C_q), 138.6 (C_q), 138.5 (CH₂), 132.1 (2 x CH₂), 130.4 (C_q), 130.0 (CH₂), 129.2 (CH₂), 128.5 (C_q), 127.6 (CH₂), 126.5 (CH₂), 122.9 (CH₂), 122.7 (CH₂), 120.2 (CH₂), 114.9 (CH₂), 46.7 (CH₃), 35.9 (C_q), 32.3 (CH₃), 20.9 (CH₃).

LC/MS (ES+) : m/z = 320.9 ([M-2H/2]⁺), t_r = 6.14 min

HRMS (ES+) : calculated for C₄₂H₃₉N₇⁺ 768.2306 found 768.2326

10-(2-methoxyphenyl)-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine, **o-45** :



Chemical Formula: C₂₂H₂₁NO
Exact Mass: 315,1623

Under Ar atmosphere, 9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine **17** (300 mg, 1.43 mmol, 1.0 eq.), 2-iodoanisole (0.28 mL, 2.15 mmol, 1.5 eq.), NaO^tBu (413 mg, 4.30 mmol, 3.0 eq.), Pd₂(dba)₃ (131 mg, 0.14 mmol, 0.1 eq.) and P(^tBu)₃.HBF₄ (125 mg, 0.43 mmol, 0.3 eq.) were dissolved in freshly degassed (by Ar bubbling for 15 min) dry toluene (8 mL). The solution was stirred at 110 °C overnight. AcOEt was introduced. The organic layer was washed once with brine and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 90:10) to give the expected product as a white solid (400 mg, 1.27 mmol, η = 88 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.52 – 7.44 (m, 3H, H₁, H₆/H₉), 7.29 (dd, J = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 1H, H₆/H₉), 7.18 – 7.13 (m, 2H, H₇, H₈), 6.97 (td, J = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₂/H₃), 6.91 (td, J = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₂/H₃), 6.26 (dd, J = 8.0 Hz, 1.0 Hz, 2H, H₄), 3.70 (s, 3H, H₁₀), 1.69 (s, 6H, H₅).

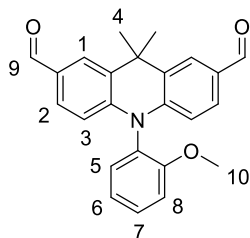
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 157.7 (C_q), 140.5 (C_q), 132.9 (C₆/C₉), 130.3 (C_q), 129.9 (C₆/C₉), 129.0 (C_q), 126.5 (C₂/C₃), 125.1 (C₁), 122.1 (C₇/C₈), 120.5 (C₂/C₃), 113.7 (C₇/C₈), 113.1 (C₄), 55.8 (C₁₀), 36.1 (C_q), 31.1 (C₅).

LC/MS (ES+) : m/z = 316.3 ([M+H]⁺), t_r = 7.93 min

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 9:1) = 0.59

Melting point : 112 °C

10-(2-methoxyphenyl)-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **o-42** :



Chemical Formula: C₂₄H₂₁NO₃
Exact Mass: 371,1521

Under Ar atmosphere and at 0 °C, POCl₃ (7.39 mL, 79.3 mmol, 50 eq.) was added dropwise to dry DMF (20 mL). After 1h stirring at 0 °C, compound **o-45** (500 mg, 1.59 mmol, 1.0 eq.) was introduced. The solution was stirred at 95 °C for 24h. The dark mixture was poured into an ice bath and this solution was quenched by NaOH 3 M. The aqueous layer was extracted three times with AcOEt. Organic layers were combined, washed with brine and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel

(Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 70:30) to give the expected product as a pale-yellow solid (513 mg, 1.38 mmol, η = 87 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 9.86 (s, 2H, H₉), 8.01 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H, H₁), 7.58 (td, *J* = 8.0 Hz, 2.0 Hz, 1H, H₅/H₈), 7.51 (dd, *J* = 8.5 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₂), 7.29 (td, *J* = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1H, H₅/H₈), 7.20 (m, 2H, H₆, H₇), 6.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₃), 3.72 (s, 3H, H₁₀), 1.79 (s, 3H, H₄), 1.74 (s, 3H, H₄).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 190.9 (C₉), 156.7 (C_q), 144.5 (C_q), 131.7 (C₆/C₇), 131.2 (C₆/C₇), 131.0 (C_q), 130.8 (C_q), 129.7 (C₂), 127.5 (C₁), 127.3 (C_q), 122.4 (C₅/C₈), 114.7 (C₃), 113.3 (C₅/C₈), 55.9 (C₁₀), 36.3 (C_q), 31.8 (C₄), 31.4 (C₄).

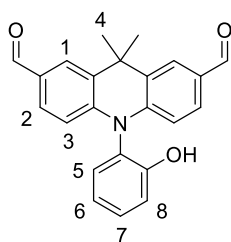
LC/MS (ES+) : *m/z* = 372.3 ([M+H]⁺), *tr* = 7.21 min

HRMS (ES+) : calculated for C₂₄H₂₂NO₃⁺ 372.1594 found 372.1590

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 7:3) = 0.43

Melting point : 105 °C

10-(2-hydroxyphenyl)-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **o-43** :



Chemical Formula: C₂₃H₁₉NO₃
Exact Mass: 357,1365

At 0 °C and under Ar atmosphere, ether **o-42** (340 mg, 0.92 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry DCM (10 mL) and BBr₃ (0.43 mL, 4.58 mmol, 5.0 eq.) was added dropwise. The solution was then stirred for 3h. Water was introduced. The aqueous layer was extracted once with DCM. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 90:10 to 50:50) to give the expected product as a yellow solid (217 mg, 0.61 mmol, **η** = 66 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 9.80 (s, 2H, H₉), 7.99 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H, H₁), 7.55 – 7.47 (m, 3H, H₂, H₅/H₆/H₇/H₈), 7.26 – 7.15 (m, 3H, H₅/H₆/H₇/H₈), 6.47 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₃), 5.89 (s, 1H, OH), 1.81 (s, 3H, H₄), 1.69 (s, 3H, H₄).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 191.0 (C₉), 153.6 (C_q), 143.9 (C_q), 131.5 (C₅/C₆/C₇/C₈), 131.2 (C_q), 131.1 (C_q), 130.8 (C₂/C₅/C₆/C₇/C₈), 130.2 (C₂/C₅/C₆/C₇/C₈), 127.8 (C₁), 125.6 (C_q), 123.0 (C₅/C₆/C₇/C₈), 118.1 (C₅/C₆/C₇/C₈), 114.9 (C₃), 36.3 (C_q), 33.2 (C₄), 30.8 (C₄).

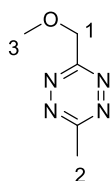
LC/MS (ES+) : *m/z* = 358.2 ([M+H]⁺), *tr* = 6.73 min

HRMS (ES+) : calculated for C₂₃H₂₀NO₃⁺ 358.1438 found 358.1451

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 1:1) = 0.56

Melting point : > 240 °C

3-(methoxymethyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine, **46** :



Chemical Formula: C₅H₈N₄O
Exact Mass: 140,0698

Under Ar atmosphere, a solution of 2-methoxyacetonitrile (1.0 mL, 6.37 mmol, 1.0 eq.), ACN (5.66 mL, 108 mmol, 8.0 eq.), EtOH (2.31 mL, 39.6 mmol, 3.0 eq.) and 3-mercaptopropionic acid (1.17 mL, 13.5 mmol, 1.0 eq) was cooled to 0 °C. Hydrazine hydrate (7.83 mL, 161 mmol, 12.0 eq.) was then added dropwise. The solution was then stirred at r.t. for 72h. A saturated aqueous solution of sodium nitrite (13.9 g, 202 mmol, 15 eq.) was added into the reaction mixture, which was cooled to 0 °C. A solution of HCl 1 M was then added dropwise until gas release ceased. The pink aqueous layer was extracted three times with DCM. Organic layers were washed with brine and dried over

Na₂SO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 70:30) to give the expected product as a pink solid (620 mg, 4.42 mmol, η = 33 %).

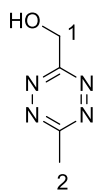
CAS number [2067322-21-6]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5.05 (s, 2H, H₁), 3.61 (s, 3H, H₃), 3.10 (s, 3H, H₂).

LC/MS (ES+) : m/z = 141.3 ([M+H]⁺), tr = 2.31 min

TLC : R_f (Pentane/Et₂O, 1:1) = 0.51

(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)methanol, 47 :



Chemical Formula: C₄H₆N₄O
Exact Mass: 126,0542

At -78 °C and under Ar atmosphere, ether **46** (2.0 g, 14.3 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry DCM (85 mL) and BBr₃ (4.06 mL, 42.8 mmol, 3.0 eq.) was added dropwise. The solution was then stirred at -78 °C for 3h. MeOH (3 mL) was added at 0 °C to quench the reaction. Water and DCM were then introduced.

The aqueous layer was extracted three times with DCM. Organic layers were combined and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Pentane/Et₂O 100:0 to 0:100) to give the expected product as a pink solid (1.12 g, 8.88 mmol, η = 62 %).

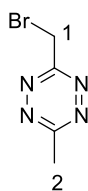
CAS number [2067322-22-7]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5.27 (s, 2H, H₁), 3.11 (s, 3H, H₂).

LC/MS (ES+) : m/z = 127.0 ([M+H]⁺), tr = 1.11 min

TLC : R_f (Et₂O) = 0.48 ; R_f (Cyclohexane/AcOEt, 1:1) = 0.32

3-(bromomethyl)- 6-methyl-1,2,4,5-tetrazine, 48 :



Chemical Formula: C₄H₅BrN₄
Exact Mass: 187,9698

Under Ar atmosphere, PPh₃ (3.12 g, 11.9 mmol, 3.0 eq.) was dissolved in dry DCM (20 mL) and cooled to 0 °C. A solution of CBr₄ (2.63 g, 7.93 mmol, 2.0 eq.) in dry DCM (5 mL) was then added dropwise. After 30 min stirring, alcohol **47** (500 mg, 3.96 mmol, 1.0 eq.) in dry DCM (5 mL) was added. The ice bath was removed and the solution was stirred at r.t. for 2h. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Pentane/DCM 100:0 to 50:50) to give

the expected product as a highly volatile pink liquid (636 mg, 3.36 mmol, η = 85 %).

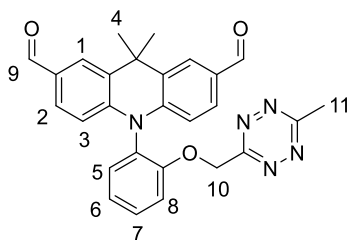
CAS number [2067322-24-9]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 4.94 (s, 2H, H₁), 3.11 (s, 3H, H₂).

LC/MS (ES+) : m/z = 191.1 ([M+H]⁺), tr = 4.51 min

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 8:2) = 0.39

9,9-dimethyl-10-{2-[(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3yl)methoxy]phenyl}-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **o-44** :



Chemical Formula: C₂₇H₂₃N₅O₃
Exact Mass: 465,1801

Under Ar atmosphere, phenol **o-43** (110 mg, 0.31 mmol, 1.0 eq.) and tetrazine **48** (116 mg, 0.62 mmol, 2.0 eq.) were dissolved in dry THF/DMF 1:1 mixture (12 mL). This solution was cooled to 0 °C and Cs₂CO₃ (150 mg, 0.46 mmol, 1.5 eq.) was added. This solution was then stirred at 50 °C for 4h. A saturated NH₄Cl aqueous solution was introduced. The aqueous layer was extracted twice with AcOEt. Organic layers were combined, washed with brine and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by preparative TLC (2 * Thickness : 0.5 mm, Cyclohexane/AcOEt, 50:50) to give the expected product as a red solid (101 mg, 0.22 mmol, η = 70 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 9.84 (s, 2H, H₉), 7.97 (d, J = 1.5 Hz, 2H, H₁), 7.61 – 7.53 (m, 1H, H₆/H₇), 7.48 (dd, J = 8.5 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₂), 7.38 – 7.26 (m, 3H, H₅/H₆/H₇/H₈), 6.40 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₃), 5.60 (s, 2H, H₁₀), 2.99 (s, 3H, H₁₁), 1.72 (s, 3H, H₄), 1.68 (s, 3H, H₄).

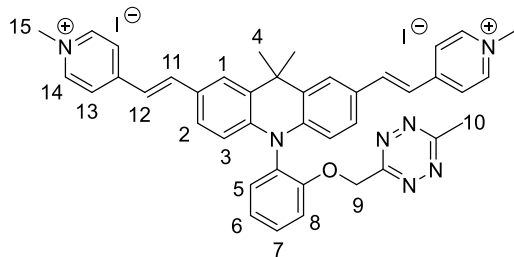
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 190.9 (C₉), 168.8 (C_q), 165.0 (C_q), 155.0 (C_q), 144.2 (C_q), 132.3 (C₅/C₆/C₇/C₈), 131.1 (C₅/C₆/C₇/C₈), 130.9 (C_q), 130.8 (C_q), 129.6 (C₂), 128.2 (C_q), 127.5 (C₁), 123.9 (C₅/C₆/C₇/C₈), 115.2 (C₅/C₆/C₇/C₈), 114.8 (C₃), 68.1 (C₁₀), 36.2 (C_q), 31.7 (C₄), 31.6 (C₄), 21.4 (C₁₁).

LC/MS (ES+) : m/z = 466.4 ([M+H]⁺), tr = 6.99 min

HRMS (ES+) : calculated for C₂₇H₂₄N₅O₃⁺ 466.1874 found 466.1867

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 1:1) = 0.50

Fluorogenic probe **G** :



Chemical Formula: C₄₁H₃₉N₇O₂⁺
Exact Mass: 645,3205

Aldehyde **o-44** (25 mg, 54 μ mol, 1.0 eq.) was solubilized in dry DMF (1 mL). This solution was cooled to 0 °C and pyrrolidine (9.3 μ L, 0.11 mmol, 2.1 eq.) was then added. After 15 min stirring, AcOH (31 μ L, 0.54 mmol, 10 eq.) and 1,4-dimethylpyridinium iodide **41** (24 mg, 0.10 mmol, 1.9 eq.) were introduced. The resulting mixture was stirred at 4 °C for 18h. Diethyl ether (3 mL) was added to get a precipitate which was filtered to give the expected product as a red solid (28 mg, 31 μ mol, η = 64 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) : δ = 8.79 (d, J = 6.5 Hz, 4H, H₁₄), 8.15 (d, J = 6.5 Hz, 4H, H₁₃), 8.00 (d, J = 16.0 Hz, 2H, H₁₁), 7.94 (d, J = 1.0 Hz, 2H, H₁), 7.66 – 7.57 (m, 2H, H₅/H₆/H₇/H₈), 7.47 – 7.31 (m, 6H, H₂, H₁₂, H₅/H₆/H₇/H₈), 6.25 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₃), 5.72 (s, 2H, H₉), 4.22 (s, 6H, H₁₅), 2.90 (s, 3H, H₁₀), 1.74 (s, 3H, H₄), 1.68 (s, 3H, H₄).

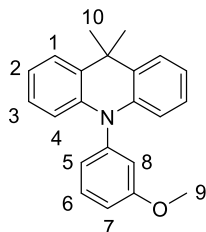
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) : δ = 168.1 (C_q), 164.7 (C_q), 154.9 (C_q), 153.0 (C_q), 144.8 (C₁₄), 140.9 (C₁₁), 140.8 (C_q), 131.9 (C₅/C₆/C₇/C₈), 130.9 (C₅/C₆/C₇/C₈), 130.5 (C_q), 128.3 (C_q), 127.6 (C_q), 127.5 (C₂), 126.3 (C₁), 123.5 (C₅/C₆/C₇/C₈), 122.8 (C₁₃), 119.9 (C₁₂), 116.0 (C₅/C₆/C₇/C₈), 114.5 (C₃), 67.8 (C₉), 46.7 (C₁₅), 35.8 (C_q), 32.0 (C₄), 31.7 (C₄), 21.0 (C₁₀).

LC/MS (ES+) : 322.9 ([M-2I⁻/2]⁺), tr = 5.30 min

HRMS (ES+) : calculated for $C_{41}H_{39}N_7O_1^+$ 772.2255 found 772.2278

10-(3-methoxyphenyl)-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine, **m-45** :

Synthesized by Matthieu Poulain during his master internship



Chemical Formula: $C_{22}H_{21}NO$
Exact Mass: 315,1623

Under Ar atmosphere, 9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine **17** (500 mg, 2.39 mmol, 1.0 eq.), 3-bromoanisole (0.46 mL, 3.58 mmol, 1.5 eq.), NaO^tBu (689 mg, 7.17 mmol, 3.0 eq.), $Pd_2(dba)_3$ (219 mg, 0.24 mmol, 0.1 eq.) and $P^tBu_3 \cdot HBF_4$ (208 mg, 0.72 mmol, 0.3 eq.) were dissolved in freshly degassed (by Ar bubbling for 15 min) dry toluene (25 mL). The solution was stirred at 110 °C overnight. AcOEt was introduced. The organic layer was washed once with brine and dried over Na_2SO_4 . The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 90:10) to give the expected product as a white solid (650 mg, 2.06 mmol, $\eta = 86\%$).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 7.53$ (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_6), 7.46 (dd, $J = 7.5$ Hz, 1.5 Hz, 2H, H_1), 7.08 – 7.04 (m, 1H, H_5/H_7), 7.03 – 6.89 (m, 5H, $H_2, H_3, H_5/H_7$), 6.89 – 6.86 (m, 1H, H_8), 6.33 (dd, $J = 8.0$ Hz, 1.5 Hz, 2H, H_4), 3.83 (s, 3H, H_9), 1.70 (s, 6H, H_{10}).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 161.9$ (C_q), 142.4 (C_q), 140.9 (C_q), 131.6 (C_8), 130.0 (C_q), 126.5 ($C_2/C_3/C_5/C_7$), 125.4 (C_1), 123.4 ($C_2/C_3/C_5/C_7$), 120.6 ($C_2/C_3/C_5/C_7$), 116.2 ($C_2/C_3/C_5/C_7$), 114.5 (C_5/C_7), 114.2 (C_4), 55.6 (C_9), 36.1 (C_q), 31.6 (C_{10}).

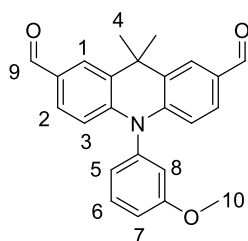
LC/MS (ES+) : $m/z = 316.4$ ($[M+H]^+$), $tr = 8.50$ min

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 9:1) = 0.83, R_f (Cyclohexane) = 0.14

Melting point : 96 °C

10-(3-methoxyphenyl)-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **m-42** :

Synthesized by Matthieu Poulain during his master internship



Chemical Formula: $C_{24}H_{21}NO_3$
Exact Mass: 371,1521

Under Ar atmosphere and at 0 °C, $POCl_3$ (5.0 mL, 53.9 mmol, 25 eq.) was added dropwise to dry DMF (15 mL). After 1h stirring at 0 °C, compound **m-45** (680 mg, 2.16 mmol, 1.0 eq.) was introduced. The solution was stirred at 95 °C for 24h. The dark mixture was poured into an ice bath and this solution was quenched by NaOH 3M. The aqueous layer was extracted three times with AcOEt. Organic layers were combined, washed with brine and dried over Na_2SO_4 . The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt 100:0 to 70:30) to give the expected product as a pale-yellow solid (435 mg, 1.17 mmol, $\eta = 54\%$).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 9.86$ (s, 2H, H_9), 8.02 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H, H_1), 7.60 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_6), 7.51 (dd, $J = 8.5, 1.5$ Hz, 2H, H_2), 7.14 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H, H_5/H_7), 6.92 – 6.90 (m, 1H, H_5/H_7), 6.84 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H, H_8), 6.46 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_3), 3.87 (s, 3H, H_{10}), 1.77 (s, 6H, H_4).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 190.9 (C₉), 162.2 (C_q), 144.5 (C_q), 140.7 (C_q), 132.2 (C₆), 130.8 (C_q), 130.6 (C_q), 129.7 (C₂), 127.6 (C₁), 122.1 (C₅/C₇), 115.5 (C₅/C₇/C₈), 115.3 (C₅/C₇/C₈), 115.2 (C₃), 55.7 (C₁₀), 36.2 (C_q), 32.2 (C₄).

LC/MS (ES+) : m/z = 372.3 ([M+H]⁺), tr = 7.93 min

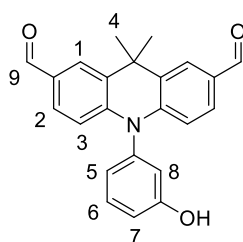
HRMS (ES+) : calculated for C₂₄H₂₂NO₃⁺ 372.1594 found 372.1593

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 7:3) = 0.45

Melting point : 180 °C

10-(3-hydroxyphenyl)-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **m-43** :

Synthesized by Matthieu Poulain during his master internship



Chemical Formula: C₂₃H₁₉NO₃
Exact Mass: 357,1365

At 0 °C and under Ar atmosphere, ether **m-42** (340 mg, 1.13 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry DCM (10 mL) and BBr₃ (1.32 mL, 14.0 mmol, 12.0 eq.) was added dropwise. The solution was then stirred for 3h. Water was introduced. The aqueous layer was extracted once with DCM. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 90:10 to 50:50) to give the expected product as a yellow solid (352 mg, 0.98 mmol, η = **87** %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 9.85 (s, 2H, H₉), 8.00 (d, *J* = 1.0 Hz, 2H, H₁), 7.56 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₆), 7.50 (dd, *J* = 8.5 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₂), 7.09 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 1H, H₅/H₇), 6.89 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₅/H₇), 6.82 (s, 1H, H₈), 6.47 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₃), 5.73 (s, 1H, OH), 1.74 (s, 6H, H₄).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 191.0 (C₉), 158.4 (C_q), 144.6 (C_q), 140.8 (C_q), 132.5 (C₆), 130.8 (C_q), 130.7 (C_q), 129.7 (C₂), 127.7 (C₁), 122.2 (C₅/C₇), 117.2 (C₈), 116.8 (C₅/C₇), 115.3 (C₃), 36.3 (C_q), 32.1 (C₄).

LC/MS (ES+) : m/z = 358.3 ([M+H]⁺), tr = 7.10 min

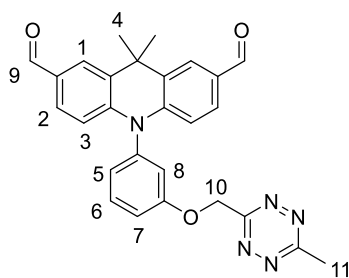
HRMS (ES+) : calculated for C₂₃H₂₀NO₃⁺ 358.1438 found 358.1450

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 1:1) = 0.50

Melting point : 208 °C

9,9-dimethyl-10-{2-[(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)methoxy]phenyl}-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **m-44** :

Synthesized by Matthieu Poulain during his master internship



Chemical Formula: C₂₇H₂₃N₅O₃
Exact Mass: 465,1801

Under Ar atmosphere, phenol **m-43** (100 mg, 0.28 mmol, 1.0 eq.) and tetrazine **48** (106 mg, 0.56 mmol, 2.0 eq.) were dissolved in dry THF (5.5 mL). This solution was cooled to 0 °C and Cs₂CO₃ (137 mg, 0.42 mmol, 1.5 eq.) was added. This solution was then stirred at r.t. for 3h. A saturated NH₄Cl aqueous solution was introduced. The aqueous layer was extracted twice with AcOEt. Organic layers were combined, washed with brine and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by flash chromatography on

silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 50:50) and then by preparative TLC (Thickness : 2.0 mm, Cyclohexane/AcOEt 40:60) to give the expected product as a red solid (80 mg, 0.17 mmol, η = 62 %).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : δ = 9.87 (s, 2H, H₉), 8.01 (d, J = 1.5 Hz, 2H, H₁), 7.65 (t, J = 8.5 Hz, 1H, H₆), 7.51 (dd, J = 8.5 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₂), 7.30 (dd, J = 8.5 Hz, 1.5 Hz, 1H, H₅/H₇), 7.05 – 6.96 (m, 2H, H₈, H₅/H₇), 6.42 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₃), 5.71 (s, 2H, H₁₀), 3.12 (s, 3H, H₁₁), 1.76 (s, 6H, H₄).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) : δ = 190.9 (C₉), 169.1 (C_q), 165.3 (C_q), 160.4 (C_q), 144.4 (C_q), 140.9 (C_q), 132.6 (C₆), 130.9 (C_q), 130.7 (C_q), 129.7 (C₂), 127.6 (C₁), 123.6 (C₅/C₇/C₈), 117.0 (C₅/C₇/C₈), 116.1 (C₅/C₇), 115.2 (C₃), 68.3 (C₁₀), 36.3 (C_q), 32.1 (C₄), 21.5 (C₁₁).

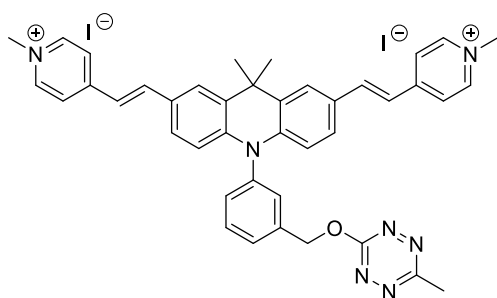
LC/MS (ES+) : m/z = 466.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), t_r = 7.68 min

HRMS (ES+) : calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_3^+$ 466.1874 found 466.1872

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 1:1) = 0.51

Fluorogenic probe **H** :

Synthesized by Matthieu Poulain during his master internship



Chemical Formula: $\text{C}_{41}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}^{2+}$
Exact Mass: 645,3205

Aldehyde **m-44** (26 mg, 57 μmol , 1.0 eq.) was solubilized in dry DMF (1 mL). This solution was cooled to 0 °C and pyrrolidine (12 μL , 0.15 mmol, 2.6 eq.) was then added. After 15 min stirring, AcOH (41 μL , 0.71 mmol, 12 eq.) and 1,4-dimethylpyridinium iodide **41** (32 mg, 0.14 mmol, 2.5 eq.) were introduced. The resulting mixture was stirred at 4 °C for 18h. Diethyl ether (3 mL) was added to get a precipitate which was filtered to give the expected product as a red solid

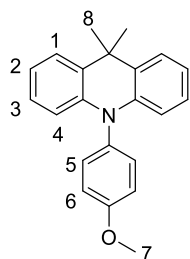
(21 mg, 23 μmol , η = 41 %).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, MeOD-d_4) : δ = 8.62 (d, J = 6.5 Hz, 4H), 8.08 (d, J = 6.5 Hz, 4H), 7.94 – 7.89 (m, 4H), 7.69 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.45 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.38 (dd, J = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 16.0 Hz, 2H), 7.11 (s, 1H), 7.01 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.38 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.75 (s, 2H), 4.27 (s, 6H), 3.04 (s, 3H), 1.81 (s, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}/\text{MeOD}$ 1:1) : δ = 169.7 (C_q), 166.3 (C_q), 161.4 (C_q), 155.0 (C_q), 145.3 (CH₂), 142.6 (C_q), 142.3 (CH₂), 142.0 (C_q), 133.1 (CH₂), 131.6 (C_q), 129.4 (C_q), 128.1 (CH₂), 127.7 (CH₂), 124.1 (CH₂), 124.0 (CH₂), 123.9 (CH₂), 120.5 (CH₂), 117.7 (CH₂), 116.9 (CH₂), 116.1 (CH₂), 68.8 (C_q), 47.5 (CH₃), 36.8 (C_q), 32.4 (CH₃), 21.2 (CH₃).

LC/MS (ES+) : m/z = 323.0 ($[\text{M}/2]^+$), t_r = 5.18 min

HRMS (ES+) : calculated for $\text{C}_{41}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}^+$ 772.2255 found 772.2296

10-(4-methoxyphenyl)-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine, **p-45** :

Chemical Formula: C₂₂H₂₁NO
Exact Mass: 315,1623

Under Ar atmosphere, 9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine **17** (500 mg, 2.39 mmol, 1.0 eq.), 4-bromoanisole (0.45 mL, 3.58 mmol, 1.5 eq.), NaO^tBu (689 mg, 7.17 mmol, 3.0 eq.), Pd₂(dba)₃ (137 mg, 0.24 mmol, 0.1 eq.) and P(^tBu)₃.HBF₄ (208 mg, 0.72 mmol, 0.3 eq.) were dissolved in freshly degassed (by Ar bubbling for 15 min) dry toluene (13.5 mL). The solution was stirred at 110 °C overnight. AcOEt was introduced. The organic layer was washed once with brine and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt 100:0 to 90:10) to give the expected product as a white solid (720 mg, 2.28 mmol, η = 96 %).

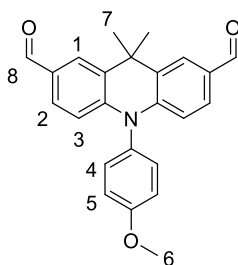
CAS number [2095203-20-4]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7.44 (dd, J = 7.5, 1.5 Hz, 2H, H₁), 7.22 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H₅), 7.12 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H₆), 7.00 – 6.94 (m, 2H, H₃), 6.91 (td, J = 7.5, 1.5 Hz, 2H, H₂), 6.30 (dd, J = 8.0, 1.0 Hz, 2H, H₄), 3.91 (s, 3H, H₇), 1.68 (s, 6H, H₈).

LC/MS (ES+) : m/z = 316.4 ([M+H]⁺), t_r = 8.67 min

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 9:1) = 0.66

Melting point : 145 °C

10-(4-methoxyphenyl)-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **p-42** :

Chemical Formula: C₂₄H₂₁NO₃
Exact Mass: 371,1521

Under Ar atmosphere and at 0 °C, POCl₃ (21.3 mL, 228 mmol, 100 eq.) was added dropwise to dry DMF (35 mL). After 1h stirring at 0 °C, compound **p-45** (720 mg, 2.28 mmol, 1.0 eq.) was introduced. The solution was stirred at 95 °C for 72h. The dark mixture was poured into an ice bath and this solution was quenched by a 3M NaOH aqueous solution. The aqueous layer was extracted four times with AcOEt. Organic layers were combined, washed with brine and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 70:30) to give the expected product as a yellow solid (667 mg, 1.80 mmol, η = 79 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 9.86 (s, 2H, H₈), 8.01 (d, J = 1.5 Hz, 2H, H₁), 7.51 (dd, J = 8.5 Hz, 1.5 Hz, 2H, H₂), 7.22 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H₄/H₅), 7.18 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H₄/H₅), 6.45 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₃), 3.94 (s, 3H, H₆), 1.76 (s, 6H, H₇).

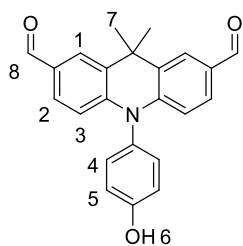
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 190.9 (C₈), 160.1 (C_q), 145.1 (C_q), 132.0 (C_q), 131.3 (C₄/C₅), 130.7 (C_q), 129.6 (C₂), 127.6 (C₁), 116.6 (C₄/C₅), 115.3 (C₃), 55.8 (C₆), 36.2 (C_q), 32.0 (C₇).

LC/MS (ES+) : m/z = 372.3 ([M+H]⁺), t_r = 7.30 min

HRMS (ES+) : calculated for C₂₄H₂₂NO₃⁺ 372.1594 found 372.1613

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 7:3) = 0.42

Melting point : 165 °C

10-(4-hydroxyphenyl)-9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **p-43** :

Chemical Formula: $C_{23}H_{19}NO_3$
Exact Mass: 357,1365

At 0 °C and under Ar atmosphere, ether **p-42** (665 mg, 1.79 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry DCM (12 mL) and BBr_3 (0.85 mL, 8.95 mmol, 5.0 eq.) was added dropwise. The solution was then stirred for 3h. Water was introduced. The aqueous layer was extracted once with DCM. The organic layer was washed with brine and dried over Na_2SO_4 . The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt 90:10 to 50:50) to give the expected product as a yellow solid (485 mg, 8.88 mmol, $\eta = 76\%$).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 9.86$ (s, 2H, H_8), 8.01 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H_1), 7.52 (dd, $J = 8.5$ Hz, 2.0 Hz, 2H, H_2), 7.19 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H_4/H_5), 7.13 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H_4/H_5), 6.46 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_3), 5.64 (s, 1H, OH), 1.75 (s, 6H, H_7).

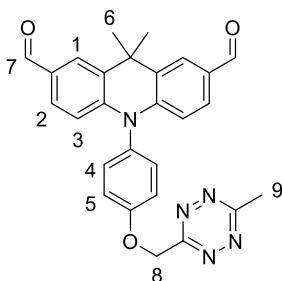
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 191.1$ (C_8), 156.5 (C_9), 145.2 (C_9), 132.0 (C_9), 131.5 (C_4/C_5), 130.8 (C_9), 130.7 (C_9), 129.7 (C_2), 127.7 (C_1), 118.2 (C_4/C_5), 115.3 (C_3), 36.2 (C_9), 32.0 (C_7).

LC/MS (ES+) : $m/z = 358.3$ ($[M+H]^+$), $tr = 6.64$ min

HRMS (ES+) : calculated for $C_{23}H_{20}NO_3^+$ 358.1438 found 358.1441

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 1:1) = 0.53

Melting point : 217 °C

9,9-dimethyl-10-{4-[(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)methoxy]phenyl}-9,10-dihydroacridine-2,7-dicarbaldehyde, **p-44** :

Chemical Formula: $C_{27}H_{23}N_5O_3$
Exact Mass: 465,1801

Under Ar atmosphere, phenol **p-43** (100 mg, 0.28 mmol, 1.0 eq.) and tetrazine **48** (178 mg, 0.84 mmol, 3.0 eq.) were dissolved in dry THF (4 mL). This solution was cooled to 0 °C and Cs_2CO_3 (137 mg, 0.42 mmol, 1.5 eq.) was added. This solution was then stirred at r.t. for 4h. A saturated NH_4Cl aqueous solution was introduced. The aqueous layer was extracted three times with AcOEt. Organic layers were combined, washed with brine and dried over Na_2SO_4 . The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 50:50) to give the expected product as a red solid (62 mg, 0.13 mmol, $\eta = 48\%$).

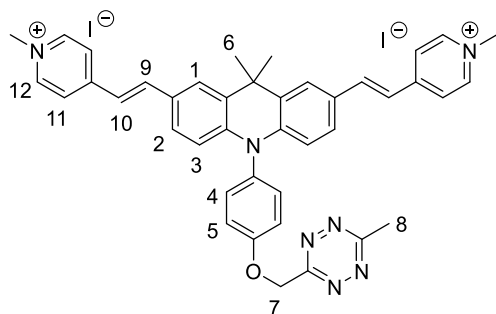
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 9.87$ (s, 2H, H_7), 8.01 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H, H_1), 7.51 (dd, $J = 8.5$ Hz, 1.5 Hz, 2H, H_2), 7.36 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H_4/H_5), 7.28 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H_4/H_5), 6.43 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_3), 5.78 (s, 2H, H_8), 3.17 (s, 3H, H_9), 1.76 (s, 6H, H_6).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 190.9$ (C_7), 169.2 (C_9), 165.4 (C_9), 158.4 (C_9), 144.9 (C_9), 133.3 (C_9), 131.7 (C_4/C_5), 130.9 (C_9), 130.8 (C_9), 129.7 (C_2), 127.6 (C_1), 117.6 (C_4/C_5), 115.2 (C_3), 68.2 (C_8), 36.2 (C_9), 32.0 (C_6), 21.6 (C_9).

LC/MS (ES+) : $m/z = 466.3$ ($[M+H]^+$), $tr = 7.11$ min

HRMS (ES+) : calculated for $C_{27}H_{24}N_5O_3^+$ 466.1874 found 466.1866

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 1:1) = 0.53

Fluorogenic probe I :

Chemical Formula: $C_{41}H_{39}N_7O^{2+}$
Exact Mass: 645,3205

Aldehyde **p-44** (25 mg, 54 μ mol, 1.0 eq.) was solubilized in dry DMF (1 mL). This solution was cooled to 0 °C and pyrrolidine (9.3 μ L, 0.11 mmol, 2.1 eq.) was then added. After 15 min stirring, AcOH (31 μ L, 0.54 mmol, 10 eq.) and 1,4-dimethylpyridinium iodide **41** (24 mg, 0.10 mmol, 1.9 eq.) were introduced. The resulting mixture was stirred at 4 °C for 19h. Diethyl ether (3 mL) was added to get a precipitate which was filtered to give the expected product as a red solid

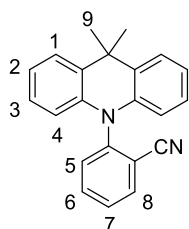
(22 mg, 24 μ mol, η = 51 %).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) : δ = 8.79 (d, J = 6.5 Hz, 4H, H_{12}), 8.13 (d, J = 6.5 Hz, 4H, H_{11}), 8.03 – 7.93 (m, 4H, H_1 , H_9), 7.48 – 7.36 (m, 8H, H_2 , H_4 , H_5 , H_{10}), 6.30 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H_3), 5.85 (s, 2H, H_7), 4.22 (s, 6H, H_{13}), 3.04 (s, 3H, H_8), 1.78 (s, 6H, H_6).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) : δ = 168.4 (C_q), 165.1 (C_q), 158.0 (C_q), 152.9 (C_q), 144.8 (C_{12}), 141.5 (C_q), 140.9 (C_9), 132.7 (C_q), 131.6 (C_4/C_5), 130.4 (C_q), 128.4 (C_q), 127.5 (C_2), 126.5 (C_1), 122.8 (C_{11}), 120.1 (C_{10}), 117.5 (C_4/C_5), 114.8 (C_3), 67.8 (C_7), 46.7 (C_{13}), 35.8 (C_q), 32.3 (C_6), 21.1 (C_8).

LC/MS (ES+) : m/z = 322.9 ($[M-2I/2]^+$), t_r = 5.48 min

HRMS (ES+) : calculated for $C_{41}H_{39}N_7O^+$ 772.2255 found 772.2257

2-(9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridin-10-yl)benzonitrile, o-49 :

Chemical Formula: $C_{22}H_{18}N_2$
Exact Mass: 310,1470

Under Ar atmosphere, 9,9-dimethyl-9,10-dihydroacridine **17** (100 mg, 0.48 mmol, 1.0 eq.), 2-bromobenzonitrile (130 mg, 0.72 mmol, 1.5 eq.), NaO^tBu (91 mg, 0.96 mmol, 2.0 eq.), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (9 mg, 10 μ mol, 0.02 eq.) and $\text{P}^t\text{Bu}_3 \cdot \text{HBF}_4$ (5 mg, 19 μ mol, 0.04 eq.) were dissolved in freshly degassed (by Ar bubbling for 15 min) dry toluene (5 mL). The solution was stirred at 110 °C for 22h. The crude was filtered through a Celite pad and purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/DCM, 100:0 to 50:50) to give the expected product as a white solid (101 mg, 0.33 mmol,

η = 68 %).

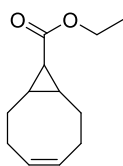
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : δ = 7.96 (dd, J = 7.5 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.88 (td, J = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.65 (td, J = 7.5 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.56 – 7.47 (m, 3H), 7.03 – 6.94 (m, 4H), 6.14 – 6.06 (m, 2H), 1.74 (s, 6H, H_9).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) : δ = 144.4 (C_q), 140.1 (C_q), 135.5 (CH), 135.0 (CH), 133.6 (CH), 130.7 (C_q), 129.1 (CH), 126.7 (CH), 125.7 (CH), 121.6 (CH), 116.3 (C_q), 116.3 (C_q), 113.4 (CH), 36.3 (C_q), 31.1 (C_9).

LC/MS (ES+) : m/z = 311.4 ($[M+H]^+$), t_r = 7.75 min

TLC : R_f (Cyclohexane/DCM, 1:1) = 0.53

Melting point : 220 °C

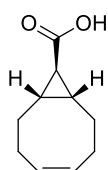
Ethylbicyclo[6.1.0]nonane-9-carboxylate, 52 :

Chemical Formula: C₁₂H₁₈O₂
Exact Mass: 194,1307

Under Ar atmosphere, Rh₂(OAc)₄ (55 mg, 0.12 mmol, 0.01 eq.) was solubilized in cycloocta-1,5-diène (7.63 mL, 62.0 mmol, 5.0 eq.). Ethyl 2-diazoacetate (1.50 mL, 12.4 mmol, 1.0 eq.) was then added dropwise in the solution over 1h (the gas production was controlled thanks to a bubbler). After 6h, a TLC (Eluent : Cyclohexane/Et₂O, 95:5, stain : KMnO₄) shows two spots (that might correspond to the two isomers). The crude was filtered over a small pad of celite (eluent : Et₂O). Solvent was removed under vacuum and the crude was directly used in the following reaction.

Bicyclo[6.1.0]nonane-9-carboxylic acid, 53 :

The crude of **52** was dissolved in Et₂O (50 mL). ^tBuOK (4.18 g, 37.2 mmol, 3.0 eq.) and H₂O (0.34 mL, 18.6 mmol, 1.5 eq.) were introduced and the mixture was stirred at r.t. for 2 days. As no reaction occurs a large excess of NaOH 2 M was introduced (30 mL). The mixture was stirred at r.t. for 72h. The aqueous layer was acidified to pH = 1 thanks to HCl 1 M and was extracted three times with DCM. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 80:20) to get the expected products as white solids (1.08 g, 3.47 mmol, η = 52 %).



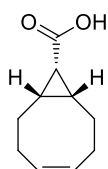
Chemical Formula: C₁₀H₁₄O₂
Exact Mass: 166,0994

CAS number [79616-90-3]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5.68 – 5.58 (m, 2H), 2.34 – 2.01 (m, 6H), 1.68 – 1.60 (m, 2H), 1.56 – 1.44 (m, 2H), 1.19 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H).

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 7:3) = 0.53

Melting point : 83 °C



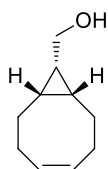
Chemical Formula: C₁₀H₁₄O₂
Exact Mass: 166,0994

CAS number [178602-79-4]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5.69 – 5.55 (m, 2H), 2.58 – 2.41 (m, 2H), 2.27 – 2.14 (m, 2H), 2.12 – 1.99 (m, 2H), 1.93 – 1.80 (m, 2H), 1.74 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 1.54 – 1.43 (m, 2H).

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 7:3) = 0.38

Melting point : 107 °C

(1R,4Z,8S,9R)-4,5-dibromobicyclo[6.1.0]non-4-en-9-ylmethanol, 54 :

Chemical Formula: C₁₀H₁₆O
Exact Mass: 152,1201

Under Ar atmosphere, carboxylic acid **53** (440 mg, 2.65 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry THF (23 mL). This solution was cooled to 0 °C and LiAlH₄ 1 M (10.5 mL, 10.5 mmol, 4.0 eq.) was added dropwise (the gas production was controlled thanks to a bubbler). The mixture was stirred at r.t. overnight. The crude was poured into an ice bath and filtered through a Celite pad. The aqueous layer was extracted three times with DCM. Organic layers were

combined and dried over Na₂SO₄. Solvents were removed under vacuum to get the expected product as a colorless oil (350 mg, 2.30 mmol, η = 87 %).

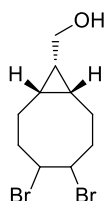
*The starting material that did not react can be recovered following this procedure : Acidified the aqueous layer until pH = 1 thanks to HCl 1 M and extracted three times with DCM.

CAS number [374898-56-3]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 5.73 – 5.51 (m, 2H), 3.71 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.42 – 2.29 (m, 2H), 2.17 – 2.05 (m, 2H), 2.04 – 1.93 (m, 2H), 1.65 – 1.49 (m, 2H), 1.19 – 0.95 (m, 4H).

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 7:3) = 0.31

(1R,8S,9R)-4,5-dibromobicyclo[6.1.0]nonan-9-ylmethanol, **55** :



Chemical Formula: C₁₀H₁₆Br₂O
Exact Mass: 309,9568

Under Ar atmosphere, alkene **54** (330 mg, 1.83 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry DCM (17 mL). This solution was cooled to 0 °C and protected from light. Br₂ (99 μL, 1.92 mmol, 1.05 eq.) was then added dropwise until the persistence of a yellow/red color. A saturated Na₂S₂O₃ aqueous solution was subsequently introduced. The aqueous layer was extracted three times with DCM. Organic layers were combined and dried over Na₂SO₄. Solvents were

removed under vacuum to get the expected product as a white solid (590 mg, 1.73 mmol, η = 95 %).

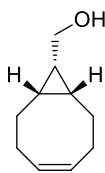
CAS number [1334173-51-1]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 4.89 – 4.75 (m, 2H), 3.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.78 – 2.59 (m, 2H), 2.26 – 2.13 (m, 2H), 2.01 – 1.85 (m, 2H), 1.26 – 1.09 (m, 4H).

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 7:3) = 0.39

Melting point : 105 °C

(1R,8S,9R)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethanol, **55** :



Chemical Formula: C₁₀H₁₄O
Exact Mass: 150,1045

Under Ar atmosphere, compound **54** (580 mg, 1.86 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry THF (20 mL). This solution was cooled to 0 °C and 'BuOK (1.04 g, 9.29 mmol, 5.0 eq.) was added. The mixture was stirred at 0 °C for 1h and then refluxed for 2h. Water was introduced. The aqueous layer was extracted three times with DCM. Organic layers were combined and dried over MgSO₄. The crude was purified by flash chromatography on silica gel

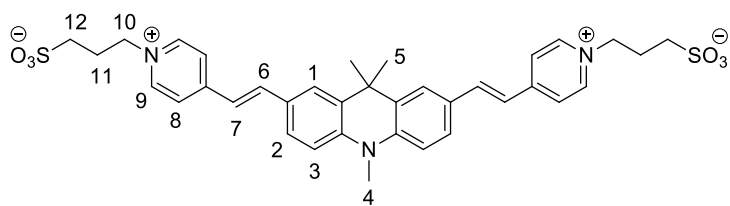
(Cyclohexane/AcOEt 100:0 to 70:30) to give the expected product as a white solid (155 mg, 1.03 mmol, η = 56 %).

CAS number [1263166-90-0]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 3.73 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.38 – 2.15 (m, 6H), 1.67 – 1.53 (m, 2H), 1.41 – 1.27 (m, 1H), 1.17 (br s, 1H), 1.01 – 0.87 (m, 2H).

TLC : R_f (Cyclohexane/AcOEt, 7:3) = 0.26

This compound must be stored at -20 °C.

Acrid-Py-sulfo:

Chemical Formula: $C_{36}H_{39}N_3O_6S_2$
Exact Mass: 673,2280

Under Ar atmosphere, **Acridⁿ-Py** (50 mg, 0.12 mmol, 1.0 eq.) and 3-bromopropanesulfonate de sodium (52 mg, 0.23 mmol, 2.0 eq.) were dissolved in dry DMF (3.7 mL). This solution was heated at 90 °C for 50h : a

precipitate was obtained. It was filtered and washed with Et₂O to give the expected product as a red powder (31 mg, 46 μmol, η = 40 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) : δ = 8.88 (d, J = 6.5 Hz, 4H, H₉), 8.16 (d, J = 6.5 Hz, 4H, H₈), 8.05 (d, J = 16.0 Hz, 2H, H₆), 7.87 (s, 2H, H₁), 7.68 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₂), 7.45 (d, J = 16.0 Hz, 2H, H₇), 7.23 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₃), 4.61 (t, J = 6.5 Hz, 4H, H₁₀), 3.55 (s, 3H, H₄), 2.43 (t, J = 7.0 Hz, 4H, H₁₂), 2.28 – 2.16 (m, 4H, H₁₁), 1.60 (s, 6H, H₅).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) : δ = 153.4 (C_q), 144.1 (C₉), 142.6 (C_q), 141.4 (C₆), 132.2 (C_q), 128.3 (C_q), 127.8 (C₂), 124.6 (C₁), 123.1 (C₈), 120.1 (C₇), 113.8 (C₃), 58.3 (C₁₀), 47.1 (C₁₂), 36.2 (C_q), 34.0 (C₄), 28.3 (C₅), 27.2 (C₁₁).

LC/MS (ES+) : m/z = 674.7 ([M+H]⁺), t_r = 4.98 min

HRMS (ES+) : calculated for C₃₆H₄₀N₃O₆S₂⁺ 674.2353 found 674.2339

Melting point : > 240 °C

II. Photophysical experiments

Stock solutions were prepared in DMSO for all compounds, except for fluorogenic dyes (ACN/MeOH 1:1) and stored at -20 °C.

Measurements were performed in 0.5 or 1 mL Hellma quartz cuvette (material code QS blue, 200–2000 nm). Fluorescence and UV–visible spectra were respectively recorded using Spex FluoroMax-3 Jobin-Yvon Horiba and Hitachi U-2900 apparatus. Measurements were performed at room temperature with solutions of $A < 0.1$ to avoid re-absorption of the emitted light, and data were corrected with a blank and from the variations of the detector with the emitted wavelength. Fluorescence quantum yield were measured according to the Crosby method using quinine sulfate in H_2SO_4 0.5 M ($\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm, $\Phi = 0.546$) of Rhodamine 6G in EtOH ($\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, $\Phi = 0.94$) as reference.²¹⁴

III. Two-photon excitation spectra

The two-photon excitation spectra were measured by the fluorescence method by using a Ti:sapphire femtosecond laser Insight DS (680–1300 nm) with pulse width < 120 fs and a repetition rate of 80 MHz (Spectra-Physics). The excitation beam was collimated over the cell length (Hellma fluorescence semi-micro 10×4 mm) and the fluorescence, collected at 90° of the excitation beam, was focused into an optical fibre connected to a spectrometer (AvaSpec ULS from Avantes). The incident beam intensity was adjusted to ensure an intensity-squared dependence of the fluorescence over the whole spectral range reported. To avoid reabsorption of emitted light, micro cells are used and the focal point is very close to the edge of the cuvette. This allows elimination of second order filter effects. Calibration of the spectra was performed by comparison with the published Rhodamine B in MeOH in the 750–880 and 930–1000 nm range, Fluorescein in 0.1 N NaOH solution in the 880–930 nm range and Styryl 9M in chloroform in the 930–1000 nm range.^{35,36}

IV. Molecular Modeling

Geometry optimizations of the ground state were carried out at the B3LYP/6-31G(d) level of theory. A frequency calculation was done in all cases to confirm the true minimum nature (no imaginary frequency) of the converged geometry. TD-DFT calculations were done at the M06-2X/6-311+G(d,p) level of theory using IEFPCM model to include solvent (water) effect. All calculations were done with Gaussian 09 software from Gaussian Inc. and orbitals were plotted with Avogadro. Transition dipole moments were computed thanks to Multiwfn software from the .out and .chk files obtained after calculations.²¹⁵

V. MTT Assay

A549 lung carcinoma cells were seeded in 24-well plates from TPP (50 000 cells/well). After 24h, cells were incubated with solutions of various concentrations of both probes (for 0.313–10 μM) for 24h. Afterwards, 50 μL of MTT solution (previously sterilized with a 0.22 μm filter, 5 mg/mL in PBS) were added in each well. After 1h, the medium was removed and 600 μL of DMSO were added to dissolve MTT formazan. Optical densities were then measured at 562 nm with a FLUOStar Omega plate reader from BMG Labtech. Every experiment was conducted in duplicate and reproduced three times. Results are represented as means \pm SD.

VI. Confocal Microscopy

A549 lung carcinoma cells were cultured in Dulbecco's modified eagle media (DMEM, GIBCO) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, GIBCO) and 1% Penicillin/Streptomycin (Life Technologies) at 37 °C under 5% CO_2 , 95% air and 100% humidity. Cells were seeded on a 8-well μ -slide

²¹⁴ A. M. Brouwer, *Pure Appl. Chem.* **2011**, 83 (12), 2213-2228. DOI : [10.1351/PAC-REP-10-09-31](https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-09-31)

²¹⁵ T. Lu and F. Chen, *J. Comput. Chem.* **2012**, 33 (5), 580-592. DOI : [10.1002/jcc.22885](https://doi.org/10.1002/jcc.22885)

from Ibidi (20 000 cells/well). After 24h, cells were incubated 2h with the desired compound, washed with PBS once, and observed in Opti-MEM (GIBCO) medium.

For colocalization experiments, cells were seeded on a 8-well μ -slide from Ibidi (20 000 cells/well). After 24h, cells were incubated 2h with the studied compound at 2 μ M, washed with PBS once, incubated 15 min with Mitotracker[®] Deep Red at 100 nM (or 25 min with DRAQ5[®] at 5 μ M), washed with PBS once, and observed in Opti-MEM (GIBCO) medium.

The fluorescence imaging (confocal and biphotonic) was performed using a confocal laser scanning microscope DMI 6000 with a SP5-AOBS unit (both Leica) equipped with a 63x (NA = 1.4) objective (oil immersion), an argon gas laser, a 405 nm diode and helium neon gas laser (633 nm) for one-photon excitation and a Chameleon Ti:Saph laser (Coherent) delivering pulses in the 100 to 200 fs range at an 80 MHz repetition rate with a tunability ranging from 705 to 980 nm for two-photon excitation. The excitation laser power was measured after the objective by a thermal head laser power meter (PM100 S302 ThorLabs). The images were visualized and processed using Image J software (Rasband W.S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

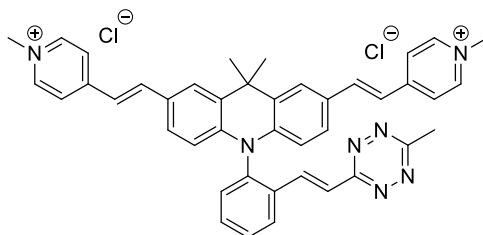
VII. Preparative HPLC

Before HPLC investigations the samples were solubilized in a 1:1 ACN/MeOH mixture and filtered with a 0.45 μ m Nylon syringe filter. Preparative HPLC were performed with a quaternary gradient module Waters 2525 coupled with a Sample Manager Injector/Collector (Water W2767, Waters, USA). The W2996 PDA Detector record spectrum between 200 to 500 nm at 20Hz with resolution at 2.4 nm. A XBridge Prep C18 column (30 x 150 mm, 5 μ m Waters) was used for the separation with the following gradient (Solvent A : H₂O + 0.1% TFA, Solvent B : ACN + 0.1% TFA, Flow : 40 mL/min) :

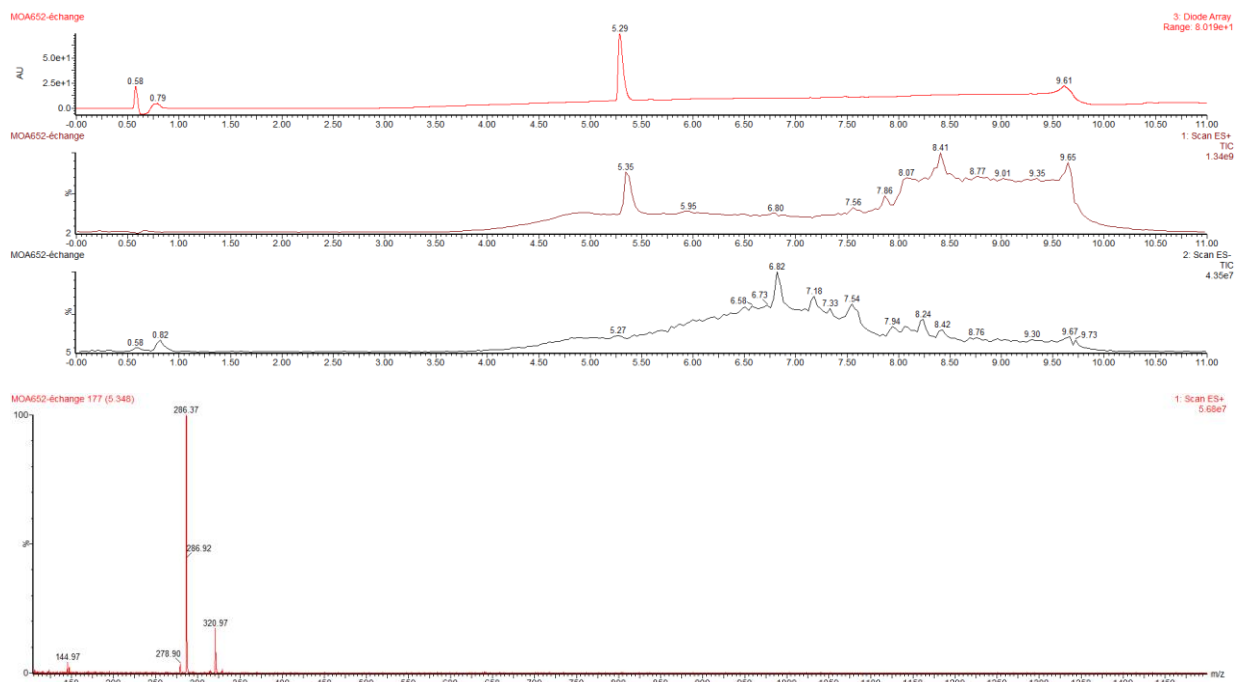
Time (min)	A (%)	B (%)
0	98	2
2	98	2
15	0	100
20	0	100
20.5	98	2
22.5	98	2

After purification, solvents were removed under vacuum (with a rotary evaporator, keeping the bath at room temperature). Compounds were then solubilized in a ACN/MeOH mixture (1:1) and eluted through a small column containing Amberlite IRA402-Cl to give the expected product with chloride counter ions.

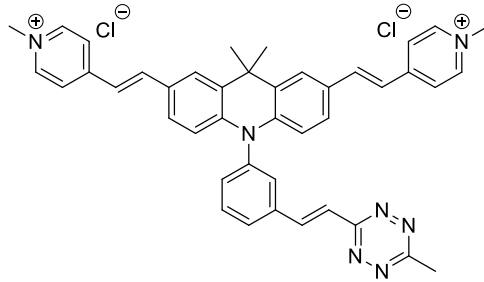
VIII. LC/MS of purified compounds before and after IEDDA with BCN



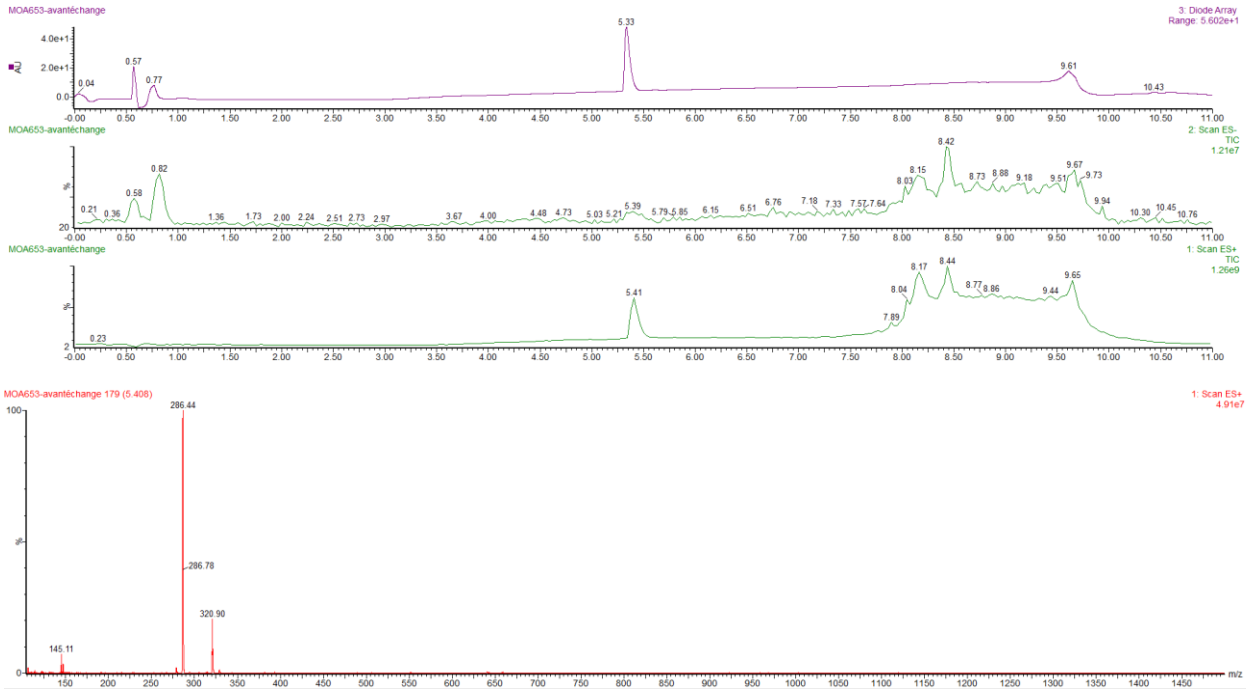
Chemical Formula: $C_{42}H_{39}N_7^{2+}$
 m/z: 320.6628



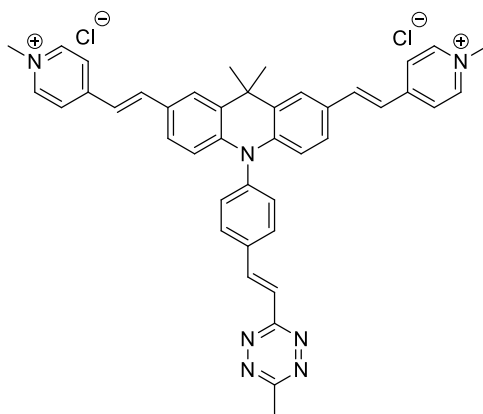
Partie expérimentale



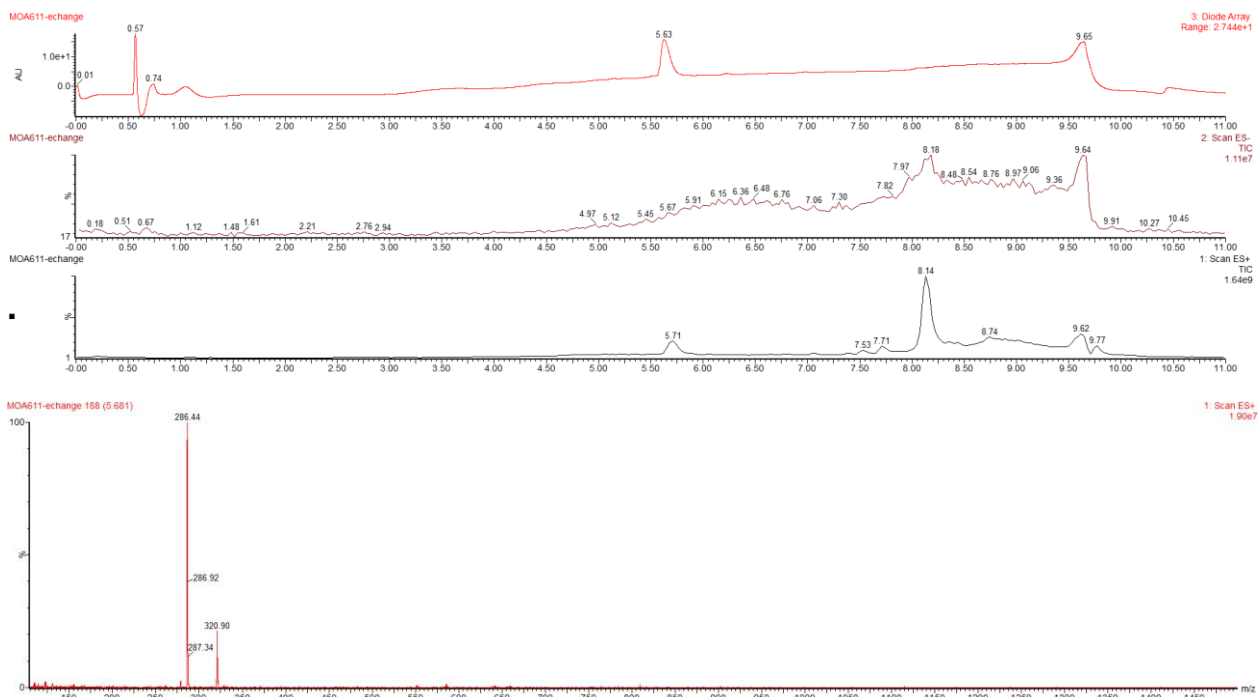
Chemical Formula: $C_{42}H_{39}N_7^{2+}$
m/z: 320.6628



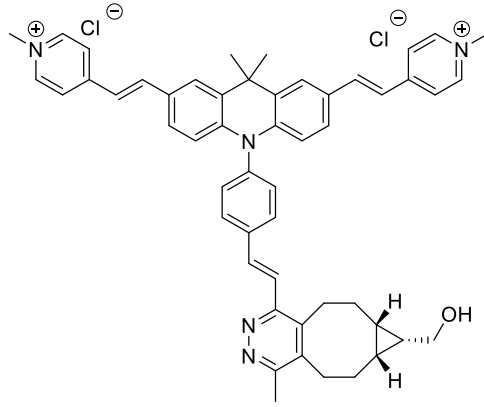
Partie expérimentale



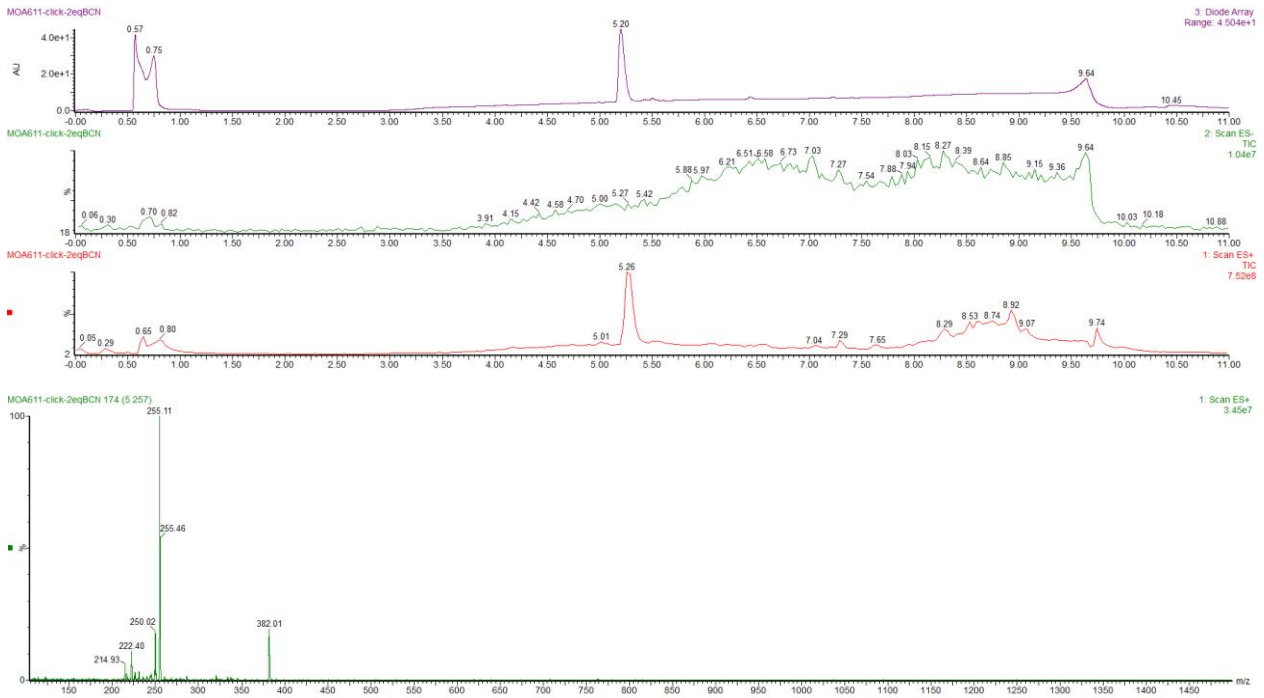
Chemical Formula: $C_{42}H_{39}N_7^{2+}$
m/z: 320.6628



Partie expérimentale



Chemical Formula: $C_{52}H_{53}N_5O^{2+}$
 m/z: 381.7120



BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Weissleder, R.; Pittet, M. J., Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* **2008**, *452* (7187), 580-589.
- [2] Wu, D.; Sedgwick, A. C.; Gunnlaugsson, T.; Akkaya, E. U.; Yoon, J.; James, T. D., Fluorescent chemosensors: the past, present and future. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (23), 7105-7123.
- [3] Zhang, J.; Campbell, R. E.; Ting, A. Y.; Tsien, R. Y., Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2002**, *3* (12), 906-918.
- [4] Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third edition **2006**, Springer, Boston, MA.
- [5] Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N., *Molecular Fluorescence - Principles and Applications*. Second Edition **2013**, Wiley.
- [6] Delaire, J.; Piard, J.; Méallet-Renault, R.; Clavier, G., *Photophysique et photochimie - Des fondements aux applications*. **2016**, edpsciences.
- [7] Kasha, M., Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of the Faraday Society* **1950**, *9* (0), 14-19.
- [8] Binsch, G.; Heilbronner, E.; Jankow, R.; Schmidt, D., On the fluorescence anomaly of azulene. *Chem. Phys. Lett.* **1967**, *1* (4), 135-138.
- [9] He, T.; Ren, C.; Luo, Y.; Wang, Q.; Li, J.; Lin, X.; Ye, C.; Hu, W.; Zhang, J., Water-soluble chiral tetrazine derivatives: towards the application of circularly polarized luminescence from upper-excited states to photodynamic therapy. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (15), 4163-4168.
- [10] Lavis, L. D., Teaching Old Dyes New Tricks: Biological Probes Built from Fluoresceins and Rhodamines. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86* (1), 825-843.
- [11] Grimm, J. B.; Muthusamy, A. K.; Liang, Y.; Brown, T. A.; Lemon, W. C.; Patel, R.; Lu, R.; Macklin, J. J.; Keller, P. J.; Ji, N.; Lavis, L. D., A general method to fine-tune fluorophores for live-cell and in vivo imaging. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 987-994.
- [12] Wu, L.; Huang, C.; Emery, B. P.; Sedgwick, A. C.; Bull, S. D.; He, X. P.; Tian, H.; Yoon, J.; Sessler, J. L.; James, T. D., Förster resonance energy transfer (FRET)-based small-molecule sensors and imaging agents. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49* (15), 5110-5139.
- [13] Jiao, G.-S.; Thoresen, L. H.; Burgess, K., Fluorescent, Through-Bond Energy Transfer Cassettes for Labeling Multiple Biological Molecules in One Experiment. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (48), 14668-14669.
- [14] Jiao, G.-S.; Thoresen, L. H.; Kim, T. G.; Haaland, W. C.; Gao, F.; Topp, M. R.; Hochstrasser, R. M.; Metzker, M. L.; Burgess, K., Syntheses, Photophysical Properties, and Application of Through-Bond Energy-Transfer Cassettes for Biotechnology. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12* (30), 7816-7826.
- [15] Speiser, S., Photophysics and Mechanisms of Intramolecular Electronic Energy Transfer in Bichromophoric Molecular Systems: Solution and Supersonic Jet Studies. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (6), 1953-1976.
- [16] Kim, T. G.; Castro, J. C.; Loudet, A.; Jiao, J. G. S.; Hochstrasser, R. M.; Burgess, K.; Topp, M. R., Correlations of Structure and Rates of Energy Transfer for Through-Bond Energy-Transfer Cassettes. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110* (1), 20-27

Bibliographie

- [17] Meimetis, L. G.; Carlson, J. C.; Giedt, R. J.; Kohler, R. H.; Weissleder, R., Ultrafluorogenic coumarin-tetrazine probes for real-time biological imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (29), 7531-7534.
- [18] Cao, D.; Zhu, L.; Liu, Z.; Lin, W., Through bond energy transfer (TBET)-based fluorescent chemosensors. *J. Photochem. Photobiol. C* **2020**, *44*, 100371.
- [19] Dexter, D. L., A Theory of Sensitized Luminescence in Solids. *J. Chem. Phys.* **1953**, *21* (5), 836-850
- [20] Mei, J.; Leung, N. L.; Kwok, R. T.; Lam, J. W.; Tang, B. Z., Aggregation-Induced Emission: Together We Shine, United We Soar! *Chem. Rev.* **2015**, *115* (21), 11718-940.
- [21] Cai, X.; Liu, B., Aggregation-Induced Emission: Recent Advances in Materials and Biomedical Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (25), 9868-9886.
- [22] Chen, Y.; Lam, J. W. Y.; Kwok, R. T. K.; Liu, B.; Tang, B. Z., Aggregation-induced emission: fundamental understanding and future developments. *Mater. Horiz.* **2019**, *6* (3), 428-433.
- [23] Gao, C.; Hossain, M. K.; Wahab, M. A.; Xiong, J.; Qiu, B.-M.; Luo, H.; Li, W., Understanding the details of aggregation-induced emission (AIE) effect in D- π -A type imidazolium-based compounds through the stepwise change of rotatable moieties. *Dyes Pigm.* **2019**, *160*, 909-914.
- [24] Li, X.; Gao, X.; Shi, W.; Ma, H., Design Strategies for Water-Soluble Small Molecular Chromogenic and Fluorogenic Probes. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (1), 590-659.
- [25] Grimm, J. B.; Heckman, L. M.; Lavis, L. D., Chapter One - The Chemistry of Small-Molecule Fluorogenic Probes. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Morris, M. C., Ed. Academic Press: **2013**; Vol. 113, pp 1-34.
- [26] Minta, A.; Kao, J. P.; Tsien, R. Y., Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (14), 8171-8178.
- [27] Lavis, L. D.; Chao, T.-Y.; Raines, R. T., Fluorogenic Label for Biomolecular Imaging. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1* (4), 252-260.
- [28] Zhu, H.; Fan, J.; Du, J.; Peng, X., Fluorescent Probes for Sensing and Imaging within Specific Cellular Organelles. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49* (10), 2115-2126.
- [29] Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y., New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2620-2640.
- [30] Frangioni, J. V., In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7* (5), 626-634.
- [31] Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J., Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: Cancer J. Clin.* **2011**, *61* (4), 250-281.
- [32] Li, L.; Dong, X.; Li, J.; Wei, J., A short review on NIR-II organic small molecule dyes. *Dyes Pigm.* **2020**, *183*, 108756.
- [33] Göppert-Mayer, M., Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik* **1931**, *401* (3), 273-294.
- [34] Kaiser, W.; Garrett, C. G. B., Two-Photon Excitation in CaF₂:Eu²⁺. *Phys. Rev. Lett.* **1961**, *7* (6), 229-231.

Bibliographie

- [35] Xu, C.; Webb, W. W., Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *J. Opt. Soc. Am. B* **1996**, *13*, 481-491.
- [36] Makarov, N. S.; Drobizhev, M.; Rebane, A., Two-photon absorption standards in the 550-1600 nm excitation wavelength range. *Opt. Express* **2008**, *16* (6), 4029-4047.
- [37] Abbe, E., Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* **1873**, *9* (1), 413-468.
- [39] Rayleigh, R. S., On the theory of optical images, with special reference to the microscope. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1896**, *42* (255), 167-195.
- [40] Hell, S. W.; Wichmann, J., Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **1994**, *19* (11), 780-782.
- [41] Schermelleh, L.; Heintzmann, R.; Leonhardt, H., A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J. Cell. Biol.* **2010**, *190* (2), 165-175.
- [42] Sheppard, C. J. R.; Wilson, T., Image Formation in Scanning Microscopes with Partially Coherent Source and Detector. *Optica Acta: International Journal of Optics* **1978**, *25* (4), 315-325.
- [43] Schermelleh, L.; Ferrand, A.; Huser, T.; Eggeling, C.; Sauer, M.; Biehlmaier, O.; Drummen, G. P. C., Super-resolution microscopy demystified. *Nat. Cell. Biol.* **2019**, *21* (1), 72-84.
- [44] White, J. G.; Amos, W. B.; Fordham, M., An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J. Cell Biol.* **1987**, *105* (1), 41-48.
- [45] Helmchen, F.; Denk, W., Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* **2005**, *2* (12), 932-940.
- [46] Denk, W.; Strickler, J. H.; Webb, W. W., Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **1990**, *248* (4951), 73-76.
- [47] Masters, B. R.; So, P. T.; Gratton, E., Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin. *Biophys. J.* **1997**, *72* (6), 2405-2412.
- [49] Blab, G. A.; Lommerse, P. H. M.; Cognet, L.; Harms, G. S.; Schmidt, T., Two-photon excitation action cross-sections of the autofluorescent proteins. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *350* (1), 71-77.
- [50] Huang, S.; Heikal, A. A.; Webb, W. W., Two-Photon Fluorescence Spectroscopy and Microscopy of NAD(P)H and Flavoprotein. *Biophys. J.* **2002**, *82* (5), 2811-2825.
- [51] Aoyagi, Y.; Kawakami, R.; Osanai, H.; Hibi, T.; Nemoto, T., A rapid optical clearing protocol using 2,2'-thiodiethanol for microscopic observation of fixed mouse brain. *PLoS One* **2015**, *10* (1), e0116280.
- [52] Kawakami, R.; Sawada, K.; Sato, A.; Hibi, T.; Kozawa, Y.; Sato, S.; Yokoyama, H.; Nemoto, T., Visualizing hippocampal neurons with in vivo two-photon microscopy using a 1030 nm picosecond pulse laser. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1014.
- [53] Kubitscheck, U., Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications. Second Edition **2017**, Wiley.
- [54] Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Webb, W. W., Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (11), 1369-1377.

Bibliographie

- [55] Centonze, V. E.; White, J. G., Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging. *Biophys. J.* **1998**, *75* (4), 2015-2024.
- [56] Wang, B. G.; König, K.; Halhuber, K. J., Two-photon microscopy of deep intravital tissues and its merits in clinical research. *J. Microsc.* **2010**, *238* (1), 1-20.
- [57] Li, D.; Zhang, H.; Streich, L. L.; Wang, Y.; Lu, P.; Wang, L.; Prevedel, R.; Qian, J., AIE-nanoparticle assisted ultra-deep three-photon microscopy in the in vivo mouse brain under 1300 nm excitation. *Mater. Chem. Front.* **2021**, *5* (7), 3201-3208.
- [58] Smeenk, M.; Agramunt, J.; Bongers, K. M., Recent developments in bioorthogonal chemistry and the orthogonality within. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2021**, *60*, 79-88.
- [59] Scinto, S. L.; Bilodeau, D. A.; Hincapie, R.; Lee, W.; Nguyen, S. S.; Xu, M.; am Ende, C. W.; Finn, M. G.; Lang, K.; Lin, Q.; Pezacki, J. P.; Prescher, J. A.; Robillard, M. S.; Fox, J. M., Bioorthogonal chemistry. *Nat. Rev. Met. Primers* **2021**, *1* (1), 30.
- [60] Rigolot, V.; Biot, C.; Lion, C., To view your biomolecule, click inside the cell. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 2-24.
- [61] Oliveira, B. L.; Guo, Z.; Bernardes, G. J. L., Inverse electron demand Diels-Alder reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (16), 4895-4950.
- [62] Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R., Chemistry in living systems. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1* (1), 13-21.
- [63] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004-2021.
- [64] Hang, H. C.; Yu, C.; Kato, D. L.; Bertozzi, C. R., A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100* (25), 14846-14851.
- [65] Kenry; Liu, B., Bio-orthogonal Click Chemistry for in vivo Bioimaging. *Trends Chem.* **2019**, *1* (8), 763-778.
- [66] Porte, K.; Riberaud, M.; Chatre, R.; Audisio, D.; Papot, S.; Taran, F., Bioorthogonal Reactions in Animals. *ChemBioChem* **2021**, *22* (1), 100-113.
- [67] Rebelein, J. G.; Ward, T. R., In vivo catalyzed new-to-nature reactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *53*, 106-114.
- [68] Devaraj, N. K., The Future of Bioorthogonal Chemistry. *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4* (8), 952-959.
- [69] Row, R. D.; Prescher, J. A., Constructing New Bioorthogonal Reagents and Reactions. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51* (5), 1073-1081.
- [70] Schafer, R. J. B.; Monaco, M. R.; Li, M.; Tirla, A.; Rivera-Fuentes, P.; Wennemers, H., The Bioorthogonal Isonitrile-Chlorooxime Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (47), 18644-18648.
- [71] Kang, D.; Kim, J., Bioorthogonal Retro-Cope Elimination Reaction of N,N-Dialkylhydroxylamines and Strained Alkynes. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (15), 5616-5621.
- [72] Lavis, L. D.; Raines, R. T., Bright Building Blocks for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (4), 855-866.
- [73] Colas, K.; Doloczki, S.; Posada Urrutia, M.; Dyrager, C., Prevalent Bioimaging Scaffolds: Synthesis, Photophysical Properties and Applications. *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, *2021* (15), 2133-2144.

Bibliographie

- [74] Tian, X.; Murfin, L. C.; Wu, L.; Lewis, S. E.; James, T. D., Fluorescent small organic probes for biosensing. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 3406-3426.
- [75] Barros, L. W. T.; Cardoso, T. A. S.; Bihlmeier, A.; Wagner, D.; Kolmel, D. K.; Horner, A.; Brase, S.; Brito Cruz, C. H.; Padilha, L. A., Two-photon absorption in a series of 2,6-disubstituted BODIPY dyes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19* (32), 21683-21690.
- [76] Demirhan, K.; Angela, W.; Chris, B. S.; Chris, X., Comparison of two-photon imaging depths with 775 nm excitation and 1300 nm excitation. *Proc.SPIE* **2009**, *7183*.
- [77] Demchenko, A. P., Photobleaching of organic fluorophores: quantitative characterization, mechanisms, protection. *Methods Appl. Fluoresc.* **2020**, *8* (2), 022001.
- [79] Rumi, M.; Ehrlich, J. E.; Heikal, A. A.; Perry, J. W.; Barlow, S.; Hu, Z.; McCord-Maughon, D.; Parker, T. C.; Röckel, H.; Thayumanavan, S.; Marder, S. R.; Beljonne, D.; Brédas, J.-L., Structure–Property Relationships for Two-Photon Absorbing Chromophores: Bis-Donor Diphenylpolyene and Bis(styryl)benzene Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (39), 9500-9510.
- [80] Albota, M.; Beljonne, D.; Bredas, J. L.; Ehrlich, J. E.; Fu, J. Y.; Heikal, A. A.; Hess, S. E.; Kogej, T.; Levin, M. D.; Marder, S. R.; McCord-Maughon, D.; Perry, J. W.; Rockel, H.; Rumi, M.; Subramaniam, G.; Webb, W. W.; Wu, X. L.; Xu, C., Design of organic molecules with large two-photon absorption cross sections. *Science* **1998**, *281* (5383), 1653-1656.
- [81] Chung, S.-J.; Kim, K.-S.; Lin, T.-C.; He, G. S.; Swiatkiewicz, J.; Prasad, P. N., Cooperative Enhancement of Two-Photon Absorption in Multi-branched Structures. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (49), 10741-10745.
- [82] Katan, C.; Terenziani, F.; Mongin, O.; Werts, M. H. V.; Porrès, L.; Pons, T.; Mertz, J.; Tretiak, S.; Blanchard-Desce, M., Effects of (Multi)branching of Dipolar Chromophores on Photophysical Properties and Two-Photon Absorption. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109* (13), 3024-3037.
- [83] He, G. S.; Tan, L.-S.; Zheng, Q.; Prasad, P. N., Multiphoton Absorbing Materials: Molecular Designs, Characterizations, and Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (4), 1245-1330.
- [84] Pawlicki, M.; Collins, H. A.; Denning, R. G.; Anderson, H. L., Two-photon absorption and the design of two-photon dyes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (18), 3244-66.
- [85] Myung Kim, H.; Rae Cho, B., Two-photon materials with large two-photon cross sections. Structure–property relationship. *Chem. Commun.* **2009**, (2), 153-164.
- [86] Pascal, S.; David, S.; Andraud, C.; Maury, O., Near-infrared dyes for two-photon absorption in the short-wavelength infrared: strategies towards optical power limiting. *Chemical Society Reviews* **2021**, *50* (11), 6613-6658.
- [87] Ahn, H.-Y.; Yao, S.; Wang, X.; Belfield, K. D., Near-Infrared-Emitting Squaraine Dyes with High 2PA Cross-Sections for Multiphoton Fluorescence Imaging. *ACS. Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4* (6), 2847-2854.
- [88] Sun, C.-L.; Lv, S.-K.; Liu, Y.-P.; Liao, Q.; Zhang, H.-L.; Fu, H.; Yao, J., Benzoindolic squaraine dyes with a large two-photon absorption cross-section. *J. Mater. Chem. C* **2017**, *5* (5), 1224-1230.
- [89] Dou, Y.; Zhu, Q.; Du, K., Recent Advances in Two-Photon AIEgens and Their Application in Biological Systems. *ChemBioChem* **2021**, *22* (11), 1871-1883.
- [90] Yao, S.; Belfield, K. D., Two-Photon Fluorescent Probes for Bioimaging. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012* (17), 3199-3217.

- [91] Xu, L.; Zhang, J.; Yin, L.; Long, X.; Zhang, W.; Zhang, Q., Recent progress in efficient organic two-photon dyes for fluorescence imaging and photodynamic therapy. *J. Mater. Chem. C* **2020**, *8* (19), 6342-6349.
- [92] Kim, H. M.; Cho, B. R., Small-molecule two-photon probes for bioimaging applications. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (11), 5014-5055.
- [93] Wu, L.; Liu, J.; Li, P.; Tang, B.; James, T. D., Two-photon small-molecule fluorescence-based agents for sensing, imaging, and therapy within biological systems. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50* (2), 702-734.
- [94] Wang, X.; Li, P.; Ding, Q.; Wu, C.; Zhang, W.; Tang, B., Observation of Acetylcholinesterase in Stress-Induced Depression Phenotypes by Two-Photon Fluorescence Imaging in the Mouse Brain. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (5), 2061-2068.
- [95] Allain, C.; Schmidt, F.; Lartia, R.; Bordeau, G.; Fiorini-Debuisschert, C.; Charra, F.; Tauc, P.; Teulade-Fichou, M. P., Vinyl-pyridinium triphenylamines: novel far-red emitters with high photostability and two-photon absorption properties for staining DNA. *ChemBioChem* **2007**, *8* (4), 424-433.
- [96] Dumat, B.; Bordeau, G.; Aranda, A. I.; Mahuteau-Betzer, F.; Harfouch, Y. E.; Metgé, G.; Charra, F.; Fiorini-Debuisschert, C.; Teulade-Fichou, M.-P., Vinyl-triphenylamine dyes, a new family of switchable fluorescent probes for targeted two-photon cellular imaging: from DNA to protein labeling. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (30), 6054-6061.
- [97] Dumat, B. Sondes fluorescentes vinyl-triphénylaminés optimisées pour la microscopie biphotonique : Etude des interactions non covalentes avec l'ADN et la HSA et application à l'imagerie cellulaire. **2012** Université Paris Sud - Paris XI, NNT : 2012PA112319.
- [98] Dumat, B.; Bordeau, G.; Faurel-Paul, E.; Mahuteau-Betzer, F.; Saettel, N.; Metge, G.; Fiorini-Debuisschert, C.; Charra, F.; Teulade-Fichou, M. P., DNA switches on the two-photon efficiency of an ultrabright triphenylamine fluorescent probe specific of AT regions. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (34), 12697-12706.
- [99] Chennoufi, R.; Bougherara, H.; Gagey-Eilstein, N.; Dumat, B.; Henry, E.; Subra, F.; Mahuteau-Betzer, F.; Tauc, P.; Teulade-Fichou, M. P.; Deprez, E., Differential behaviour of cationic triphenylamine derivatives in fixed and living cells: triggering and imaging cell death. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (80), 14881-14884.
- [100] Fourmois, L.; Poyer, F.; Sourdon, A.; Naud-Martin, D.; Nagarajan, S.; Chennoufi, R.; Deprez, E.; Teulade-Fichou, M.-P.; Mahuteau-Betzer, F., Modulation of Cellular Fate of Vinyl Triarylamines through Structural Fine Tuning: To Stay or Not To Stay in the Mitochondria? *ChemBioChem* **2021**, *22* (14), 2457-2467.
- [101] Yamaguchi, S.; Tamao, K., Silole-containing σ - and π -conjugated compounds. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1998**, (22), 3693-3702.
- [102] Novel organic dye and preparation thereof. KR20120120906, **2012**.
- [103] Mitchell, R. H.; Lai, Y.-H.; Williams, R. V., N-Bromosuccinimide-dimethylformamide: a mild, selective nuclear monobromination reagent for reactive aromatic compounds. *J. Org. Chem.* **1979**, *44* (25), 4733-4735.
- [104] Toyama, H.; Nakamura, M.; Hashimoto, Y.; Fujii, S., Design and synthesis of novel ROR inverse agonists with a dibenzosilole scaffold as a hydrophobic core structure. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (13), 2982-2988.

Bibliographie

- [105] Mita, Y.; Dodo, K.; Noguchi-Yachide, T.; Miyachi, H.; Makishima, M.; Hashimoto, Y.; Ishikawa, M., LXXLL peptide mimetics as inhibitors of the interaction of vitamin D receptor with coactivators. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20* (5), 1712-1717.
- [106] Bergström, M.; Suresh, G.; Naidu, V. R.; Unelius, C. R., N-Iodosuccinimide (NIS) in Direct Aromatic Iodination. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017* (22), 3234-3239.
- [107] Chan, K. L.; Watkins, S. E.; Mak, C. S.; McKiernan, M. J.; Towns, C. R.; Pascu, S. I.; Holmes, A. B., Poly(9,9-dialkyl-3,6-dibenzosilole)--a high energy gap host for phosphorescent light emitting devices. *Chem. Commun.* **2005**, (46), 5766-5768.
- [108] Suzuki, Y.; Tenma, Y.; Nishioka, Y.; Kamada, K.; Ohta, K.; Kawamata, J., Efficient Two-Photon Absorption Materials Consisting of Cationic Dyes and Clay Minerals. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115* (42), 20653-20661.
- [109] Dumat, B.; Bordeau, G.; Faurel-Paul, E.; Mahuteau-Betzer, F.; Saettel, N.; Bombled, M.; Metge, G.; Charra, F.; Fiorini-Debuisschert, C.; Teulade-Fichou, M. P., N-phenyl-carbazole-based two-photon fluorescent probes: strong sequence dependence of the duplex vs quadruplex selectivity. *Biochimie* **2011**, *93* (8), 1209-18.
- [110] Jacquemin, D.; Perpète, E. A.; Ciofini, I.; Adamo, C., Accurate Simulation of Optical Properties in Dyes. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (2), 326-334.
- [111] Laurent, A. D.; Adamo, C.; Jacquemin, D., Dye chemistry with time-dependent density functional theory. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (28), 14334-14356.
- [112] Zhao, Y.; Truhlar, D. G., The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *120* (1-3), 215-241.
- [113] Sacconi, L.; Dombeck, D. A.; Webb, W. W., Overcoming photodamage in second-harmonic generation microscopy: Real-time optical recording of neuronal action potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103* (9), 3124-3129.
- [114] Dunn, K. W.; Kamocka, M. M.; McDonald, J. H., A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2011**, *300* (4), C723-C742.
- [115] Bolte, S.; Cordelières, F. P., A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **2006**, *224* (3), 213-232.
- [116] Manders, E. M. M.; Verbeek, F. J.; Aten, J. A., Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J. Microsc.* **1993**, *169*, 375-382.
- [117] Auvray, M.; Bolze, F.; Clavier, G.; Mahuteau-Betzer, F., Silafluorene as a promising core for cell-permeant, highly bright and two-photon excitable fluorescent probes for live-cell imaging. *Dyes Pigm.* **2021**, *187*, 109083.
- [118] Hung Lin, H.; Chung Chang, C., Spectroscopic investigations of vinyl-substituted 10H-phenothiazine. *Dyes Pigm.* **2009**, *83* (2), 230-236.
- [119] D. Wasserman, R. E. J., S. A. Robinson, J. D. Garber, A New Synthesis of 5,10-Dihydrophenazasilines. *J. Org. Chem.* **1965**, *30* (9), 3248-3250.
- [120] Nakao, H.; Hayashi, H.; Okita, K., Preparation and Reactivity of Poly [N-(arylmethyl)phenazasiline]s. Effects of Substituent on the N Atom on Poly(phenazasiline). *Polym. J.* **2001**, *33*, 498-501.

Bibliographie

- [121] Hayashi, H.; Nakao, H.; Miyabayashi, T.; Murase, M., Preparation and Properties of Poly(phenazasiline) with Various Substituents. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2013**, *52* (5S1), 05DA13.
- [122] Fang, Y.; Good, G. N.; Zhou, X.; Stains, C. I., Phosphinate-containing rhodol and fluorescein scaffolds for the development of bioprobes. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (42), 5962-5965.
- [123] Fukazawa, A.; Suda, S.; Taki, M.; Yamaguchi, E.; Grzybowski, M.; Sato, Y.; Higashiyama, T.; Yamaguchi, S., Phospha-fluorescein: a red-emissive fluorescein analogue with high photobleaching resistance. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (6), 1120-1123.
- [124] Cui, J.; Zhang, S., Synthesis and application of a novel, triphendioxazine-based, phosphorus-containing acid dye for wool. *Color. Technol.* **2018**, *134* (5), 381-389.
- [127] Dilek, O.; Bane, S. L., Synthesis of boron dipyrromethene fluorescent probes for bioorthogonal labeling. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49* (8), 1413-1416.
- [128] Shieh, P.; Bertozzi, C. R., Design strategies for bioorthogonal smart probes. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (46), 9307-20.
- [129] Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596-2599.
- [130] Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057-3064.
- [131] Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q., A Fluorogenic 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction of 3-Azidocoumarins and Acetylenes. *Org. Lett.* **2004**, *6* (24), 4603-4606.
- [132] Le Droumaguet, C.; Wang, C.; Wang, Q., Fluorogenic click reaction. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1233-1239.
- [133] Zhou, Z.; Fahrni, C. J., A Fluorogenic Probe for the Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Ligation Reaction: Modulation of the Fluorescence Emission via $3(n,\pi^*)-(\pi,\pi^*)$ Inversion. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (29), 8862-8863.
- [134] Friscourt, F.; Fahrni, C. J.; Boons, G.-J., A Fluorogenic Probe for the Catalyst-Free Detection of Azide-Tagged Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (45), 18809-18815.
- [135] Hong, V.; Steinmetz, N. F.; Manchester, M.; Finn, M. G., Labeling Live Cells by Copper-Catalyzed Alkyne-Azide Click Chemistry. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21* (10), 1912-1916.
- [136] Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R., Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (38), 6974-98.
- [137] Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Org. Lett.* **2004**, *6* (17), 2853-2855.
- [138] Presolski, S. I.; Hong, V.; Cho, S.-H.; Finn, M. G., Tailored Ligand Acceleration of the Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction: Practical and Mechanistic Implications. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (41), 14570-14576.
- [139] Bevilacqua, V.; King, M.; Chaumontet, M.; Nothisen, M.; Gabillet, S.; Buisson, D.; Puente, C.; Wagner, A.; Taran, F., Copper-chelating azides for efficient click conjugation reactions in complex media. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (23), 5872-5876.

Bibliographie

- [140] Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R., A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046-15047.
- [141] Chang, P. V.; Prescher, J. A.; Sletten, E. M.; Baskin, J. M.; Miller, I. A.; Agard, N. J.; Lo, A.; Bertozzi, C. R., Copper-free click chemistry in living animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107* (5), 1821-1826.
- [142] Tian, H.; Sakmar, T. P.; Huber, T., A simple method for enhancing the bioorthogonality of cyclooctyne reagent. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (31), 5451-5454.
- [143] King, M.; Wagner, A., Developments in the field of bioorthogonal bond forming reactions-past and present trends. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (5), 825-39.
- [144] Dommerholt, J.; Rutjes, F.; van Delft, F. L., Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides. *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374* (2), 16.
- [145] Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Lo, A.; Bertozzi, C. R., A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1* (10), 644-648.
- [146] Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R., Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104* (43), 16793-16797.
- [147] Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J., Visualizing Metabolically Labeled Glycoconjugates of Living Cells by Copper-Free and Fast Huisgen Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (12), 2253-2255.
- [148] Sletten, E. M.; Nakamura, H.; Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R., Difluorobenzocyclooctyne: Synthesis, Reactivity, and Stabilization by β -Cyclodextrin. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (33), 11799-11805.
- [149] Dones, J. M.; Abularrage, N. S.; Khanal, N.; Gold, B.; Raines, R. T., Acceleration of 1,3-Dipolar Cycloadditions by Integration of Strain and Electronic Tuning. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (25), 9489-9497.
- [150] de Almeida, G.; Sletten, E. M.; Nakamura, H.; Palaniappan, K. K.; Bertozzi, C. R., Thiacycloalkynes for copper-free click chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (10), 2443-2447.
- [151] Warther, D.; Dursun, E.; Recher, M.; Ursuegui, S.; Mosser, M.; Sobska, J.; Krezel, W.; Chaubet, G.; Wagner, A., Plasma induced acceleration and selectivity in strain-promoted azide-alkyne cycloadditions. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19* (23), 5063-5067.
- [152] Kolodych, S.; Rasolofonjatovo, E.; Chaumontet, M.; Nevers, M. C.; Creminon, C.; Taran, F., Discovery of chemoselective and biocompatible reactions using a high-throughput immunoassay screening. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (46), 12056-12060.
- [153] Decuypère, E.; Riomet, M.; Sallustrau, A.; Bregant, S.; Thai, R.; Pieters, G.; Clavier, G.; Audisio, D.; Taran, F., Sydnone-coumarins as clickable turn-on fluorescent sensors for molecular imaging. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (76), 10758-10761.
- [154] Plougastel, L.; Pattanayak, M. R.; Riomet, M.; Bregant, S.; Sallustrau, A.; Nothisen, M.; Wagner, A.; Audisio, D.; Taran, F., Sydnone-based turn-on fluorogenic probes for no-wash protein labeling and in-cell imaging. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (31), 4582-4585.
- [155] Wu, H.; Devaraj, N. K., Advances in Tetrazine Bioorthogonal Chemistry Driven by the Synthesis of Novel Tetrazines and Dienophiles. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51* (5), 1249-1259.

- [156] Knall, A. C.; Slugovc, C., Inverse electron demand Diels-Alder (IEDDA)-initiated conjugation: a (high) potential click chemistry scheme. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (12), 5131-5142.
- [157] Deb, T.; Tu, J.; Franzini, R. M., Mechanisms and Substituent Effects of Metal-Free Bioorthogonal Reactions. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (12), 6850-6914.
- [158] Chen, W.; Wang, D.; Dai, C.; Hamelberg, D.; Wang, B., Clicking 1,2,4,5-tetrazine and cyclooctynes with tunable reaction rates. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (12), 1736-1738.
- [159] Darko, A.; Wallace, S.; Dmitrenko, O.; Machovina, M. M.; Mehl, R. A.; Chin, J. W.; Fox, J. M., Conformationally Strained trans-Cyclooctene with Improved Stability and Excellent Reactivity in Tetrazine Ligation. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (10), 3770-3776.
- [160] Sun, J.; Li, J.; Sun, H.; Li, C.; Wu, H., Concise Synthesis of Functionalized Cyclobutene Analogues for Bioorthogonal Tetrazine Ligation. *Molecules* **2021**, *26* (2), 276.
- [161] Eising, S.; Lelivelt, F.; Bongers, K. M., Vinylboronic Acids as Fast Reacting, Synthetically Accessible, and Stable Bioorthogonal Reactants in the Carboni-Lindsey Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (40), 12243-12247.
- [162] Knall, A. C.; Hollauf, M.; Slugovc, C., Kinetic studies of inverse electron demand Diels-Alder reactions (IEDDA) of norbornenes and 3,6-dipyridin-2-yl-1,2,4,5-tetrazine. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55* (34), 4763-4766.
- [163] Zawada, Z.; Guo, Z.; Oliveira, B. L.; Navo, C. D.; Li, H.; Cal, P. M. S. D.; Corzana, F.; Jiménez-Osés, G.; Bernardes, G. J. L., Arylethynyltrifluoroborate Dienophiles for on Demand Activation of IEDDA Reactions. *Bioconjug. Chem.* **2021**, *32* (8), 1812-1822.
- [164] Devaraj, N. K.; Hilderbrand, S.; Upadhyay, R.; Mazitschek, R.; Weissleder, R., Bioorthogonal turn-on probes for imaging small molecules inside living cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (16), 2869-2872.
- [165] Devaraj, N. K.; Weissleder, R., Biomedical Applications of Tetrazine Cycloadditions. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 816-827.
- [166] Dumas-Verdes, C.; Miomandre, F.; Lépicier, E.; Galangau, O.; Vu, T. T.; Clavier, G.; Méallet-Renault, R.; Audebert, P., BODIPY-Tetrazine Multichromophoric Derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010* (13), 2525-2535.
- [167] Carlson, J. C.; Meimetis, L. G.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R., BODIPY-tetrazine derivatives as superbright bioorthogonal turn-on probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (27), 6917-6920.
- [168] Wiczorek, A.; Werther, P.; Euchner, J.; Wombacher, R., Green- to Far-Red-Emitting Fluorogenic Tetrazine Probes -Synthetic Access and No-Wash Protein Imaging inside Living Cells. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (2), 1506-1510.
- [169] Kushida, Y.; Nagano, T.; Hanaoka, K., Silicon-substituted xanthene dyes and their applications in bioimaging. *Analyst* **2015**, *140* (3), 685-695.
- [170] Kozma, E.; Estrada Girona, G.; Paci, G.; Lemke, E. A.; Kele, P., Bioorthogonal double-fluorogenic siliconrhodamine probes for intracellular super-resolution microscopy. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (50), 6696-6699.
- [171] Lukinavičius, G.; Umezawa, K.; Olivier, N.; Honigsmann, A.; Yang, G.; Plass, T.; Mueller, V.; Reymond, L.; Corrêa Jr, I. R.; Luo, Z.-G.; Schultz, C.; Lemke, E. A.; Heppenstall, P.; Eggeling, C.; Manley, S.;

- Johnsson, K., A near-infrared fluorophore for live-cell super-resolution microscopy of cellular proteins. *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 132-139.
- [172] Wu, D.; O'Shea, D. F., Fluorogenic NIR-probes based on 1,2,4,5-tetrazine substituted BF₂-azadipyrromethenes. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (78), 10804-10807.
- [173] Chen, L.; Li, F.; Nandi, M.; Huang, L.; Chen, Z.; Wei, J.; Chi, W.; Liu, X.; Yang, J., Towards tetrazine-based near-infrared fluorogenic dyes: Is there a wavelength limit? *Dyes Pigm.* **2020**, *177*, 108313.
- [174] Werther, P.; Yserentant, K.; Braun, F.; Großmayer, K.; Navikas, V.; Yu, M.; Zhang, Z.; Ziegler, M. J.; Mayer, C.; Gralak, A. J.; Busch, M.; Chi, W.; Rominger, F.; Radenovic, A.; Liu, X.; Lemke, E. A.; Buckup, T.; Herten, D.-P.; Wombacher, R., Bio-orthogonal Red and Far-Red Fluorogenic Probes for Wash-Free Live-Cell and Super-resolution Microscopy. *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7* (9), 1561-1571.
- [175] Galeta, J.; Dzijak, R.; Oboril, J.; Dracinsky, M.; Vrabel, M., A Systematic Study of Coumarin-Tetrazine Light-Up Probes for Bioorthogonal Fluorescence Imaging. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26* (44), 9945-9953.
- [176] Graziotto, M. E.; Adair, L. D.; Kaur, A.; Vérité, P.; Ball, S. R.; Sunde, M.; Jacquemin, D.; New, E. J., Versatile naphthalimide tetrazines for fluorogenic bioorthogonal labelling. *RSC Chem. Biol.* **2021**, *2* (5), 1491-1498.
- [177] Nemeth, E.; Knorr, G.; Nemeth, K.; Kele, P., A Bioorthogonally Applicable, Fluorogenic, Large Stokes-Shift Probe for Intracellular Super-Resolution Imaging of Proteins. *Biomolecules* **2020**, *10* (3), 396.
- [178] Lee, Y.; Cho, W.; Sung, J.; Kim, E.; Park, S. B., Monochromophoric Design Strategy for Tetrazine-Based Colorful Bioorthogonal Probes with a Single Fluorescent Core Skeleton. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *140* (3), 974-983.
- [179] Choi, S. K.; Kim, J.; Kim, E., Overview of Syntheses and Molecular-Design Strategies for Tetrazine-Based Fluorogenic Probes. *Molecules* **2021**, *26* (7), 1868.
- [180] Kim, D.; Lee, J.-H.; Koo, J. Y.; Kim, H. M.; Park, S. B., Two-Photon and Multicolor Fluorogenic Bioorthogonal Probes Based on Tetrazine-Conjugated Naphthalene Fluorophores. *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31* (5), 1545-1550.
- [181] Mao, W.; Tang, J.; Dai, L.; He, X.; Li, J.; Cai, L.; Liao, P.; Jiang, R.; Zhou, J.; Wu, H., A General Strategy to Design Highly Fluorogenic Far-Red and Near-Infrared Tetrazine Bioorthogonal Probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60* (5), 2393-2397.
- [182] Karver, M. R.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A., Synthesis and evaluation of a series of 1,2,4,5-tetrazines for bioorthogonal conjugation. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (11), 2263-2270.
- [183] Miomandre, F.; Audebert, P., 1,2,4,5-Tetrazines: An intriguing heterocycles family with outstanding characteristics in the field of luminescence and electrochemistry. *J. Photochem. Photobiol. C* **2020**, *44*, 100372.
- [184] Clavier, G.; Audebert, P., s-Tetrazines as Building Blocks for New Functional Molecules and Molecular Materials. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (6), 3299-3314.
- [185] Pinner, A., *Chem. Ber.* **1893**, (26), 2126-2135.
- [186] Abdel, N. O.; Kira, M. A.; Tolba, M. N., A direct synthesis of dihydrotetrazines. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9* (35), 3871-3872.

- [187] Audebert, P.; Sadki, S.; Miomandre, F.; Clavier, G.; Claude Vernières, M.; Saoud, M.; Hapiot, P., Synthesis of new substituted tetrazines: electrochemical and spectroscopic properties. *New J. Chem.* **2004**, *28* (3), 387-392.
- [188] Yang, J.; Karver, M. R.; Li, W.; Sahu, S.; Devaraj, N. K., Metal-catalyzed one-pot synthesis of tetrazines directly from aliphatic nitriles and hydrazine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (21), 5222-5225.
- [189] Mao, W.; Shi, W.; Li, J.; Su, D.; Wang, X.; Zhang, L.; Pan, L.; Wu, X.; Wu, H., Organocatalytic and Scalable Syntheses of Unsymmetrical 1,2,4,5-Tetrazines by Thiol-Containing Promoters. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (4), 1106-1109.
- [190] Xie, Y.; Fang, Y.; Huang, Z.; Tallon, A. M.; am Ende, C. W.; Fox, J. M., Divergent Synthesis of Monosubstituted and Unsymmetrical 3,6-Disubstituted Tetrazines from Carboxylic Ester Precursors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (39), 16967-16973.
- [191] Corey, E. J.; Raju, N., A new general synthetic route to bridged carboxylic ortho esters. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24* (50), 5571-5574.
- [192] Qu, Y.; Pander, P.; Vybornyi, O.; Vasylieva, M.; Guillot, R.; Miomandre, F.; Dias, F. B.; Skabara, P.; Data, P.; Clavier, G.; Audebert, P., Donor-Acceptor 1,2,4,5-Tetrazines Prepared by the Buchwald-Hartwig Cross-Coupling Reaction and Their Photoluminescence Turn-On Property by Inverse Electron Demand Diels-Alder Reaction. *J. Org. Chem.* **2020**, *85* (5), 3407-3416.
- [194] Yuguang, M.; Dehua, H.; Lei, Y.; Ting, G. D-A type light-emitting small molecule containing acridine and phenanthroimidazole and application thereof in electroluminescent device, CN111675693, 2020.
- [195] Liu, X. Y.; Liang, F.; Cui, L. S.; Yuan, X. D.; Jiang, Z. Q.; Liao, L. S., Effective host materials for blue/white organic light-emitting diodes by utilizing the twisted conjugation structure in 10-phenyl-9,10-dihydroacridine block. *Chem. Asian J.* **2015**, *10* (6), 1402-1409.
- [196] Surry, D. S.; Buchwald, S. L., Dialkylbiaryl Phosphines in Pd-Catalyzed Amination: A User's Guide. *Chem. Sci.* **2011**, *2* (1), 27-50.
- [197] Wu, H.; Yang, J.; Seckute, J.; Devaraj, N. K., In situ synthesis of alkenyl tetrazines for highly fluorogenic bioorthogonal live-cell imaging probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (23), 5805-5809.
- [198] Bojtar, M.; Nemeth, K.; Domahidy, F.; Knorr, G.; Verkman, A.; Kallay, M.; Kele, P., Conditionally Activatable Visible-Light Photocages. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (35), 15164-15171.
- [199] Ryabukhin, S. V.; Plaskon, A. S.; Volochnyuk, D.N.; Pipko, S. E.; Shivanyuk, A. N.; Tolmachev, A. T., Combinatorial Knoevenagel Reactions. *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 1073-1078.
- [202] Buss, B. L.; Lim, C. H.; Miyake, G. M., Dimethyl Dihydroacridines as Photocatalysts in Organocatalyzed Atom Transfer Radical Polymerization of Acrylate Monomers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (8), 3209-3217.
- [203] Noda, H.; Kabe, R.; Adachi, C., Blue Thermally Activated Delayed Fluorescence Molecule Having Acridane and Cyanobenzene Units. *Chem. Lett.* **2016**, *45* (12), 1463-1466.
- [204] Lambert, W. D.; Fang, Y.; Mahapatra, S.; Huang, Z.; am Ende, C. W.; Fox, J. M., Installation of Minimal Tetrazines through Silver-Mediated Liebeskind-Srogl Coupling with Arylboronic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (43), 17068-17074.

Bibliographie

- [205] Yun, M. S.; Hee, L. S.; Cheol, P. J.; Sung, K. D.; Sung, L. B.; Pil, H. S. Compound for electronic element, organic element using the same, and an electronic device thereof. KR20150051662, **2015**.
- [206] Guangyan, M.; Shaoqing, Z.; Chunting, R. 1, 2, 4-thiadazoles compound and preparation method and application thereof CN109438435, **2019**.
- [207] Zhu, Z.; Glinkerman, C. M.; Boger, D. L., Selective N1/N4 1,4-Cycloaddition of 1,2,4,5-Tetrazines Enabled by Solvent Hydrogen Bonding. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (49), 20778-20787.
- [208] Pinto-Pacheco, B.; Carbery, W. P.; Khan, S.; Turner, D. B.; Buccella, D., Fluorescence Quenching Effects of Tetrazines and Their Diels-Alder Products: Mechanistic Insight Toward Fluorogenic Efficiency. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (49), 22140-22149.
- [209] Siegl, S. J.; Galeta, J.; Dzajak, R.; Vazquez, A.; Del Rio-Villanueva, M.; Dracinsky, M.; Vrabel, M., An Extended Approach for the Development of Fluorogenic trans-Cyclooctene-Tetrazine Cycloadditions. *ChemBioChem* **2019**, *20* (7), 886-890.
- [210] Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J.; Rutjes, F. P.; van Hest, J. C.; Lefeber, D. J.; Friedl, P.; van Delft, F. L., Readily accessible bicyclononynes for bioorthogonal labeling and three-dimensional imaging of living cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (49), 9422-9425.
- [211] O'Brien, J. G. K.; Chintala, S. R.; Fox, J. M., Stereoselective Synthesis of Bicyclo[6.1.0]nonene Precursors of the Bioorthogonal Reagents s-TCO and BCN. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (14), 7500-7503.
- [212] Ravasco, J. M.; Coelho, J. A. S.; Trindade, A. F.; Afonso, C. A. M., Synthesis and reactivity/stability study of double-functionalizable strained trans-cyclooctenes for tetrazine bioorthogonal reactions. *Pure Appl. Chem.* **2020**, *92* (1), 15-23.
- [213] Suffert, J., Simple direct titration of organolithium reagents using N-pivaloyl-o-toluidine and/or N-pivaloyl-o-benzylaniline. *J. Org. Chem.* **1989**, *54* (2), 509-510.
- [214] Brouwer, A. M., Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83* (12), 2213-2228.
- [215] Lu, T.; Chen, F., Multiwfn: a multifunctional wavefunction analyzer. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33* (5), 580-592.

ANNEXES

ANNEXES

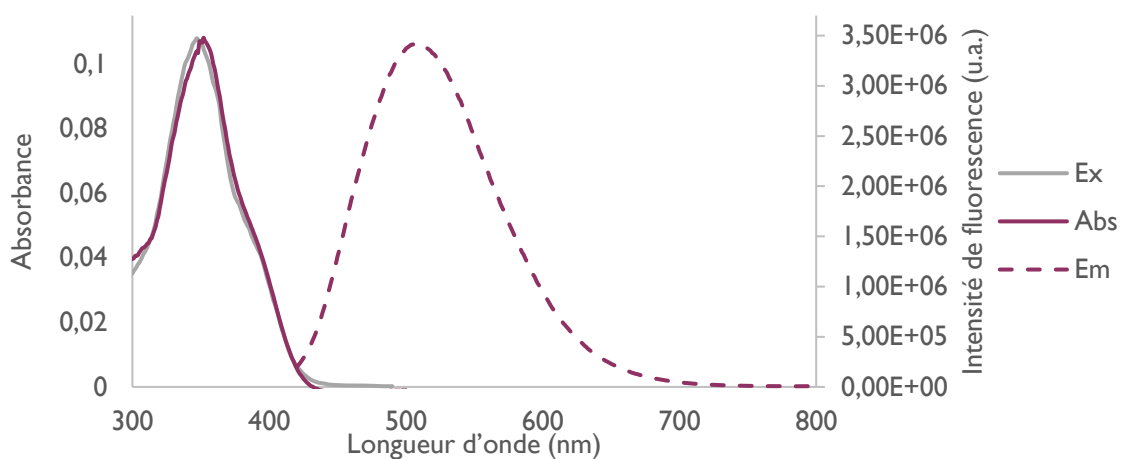


Figure 208 : Spectres d'absorption, d'excitation et d'émission de fluorescence de **SiFluo-V** dans le glycérol ($2 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$)

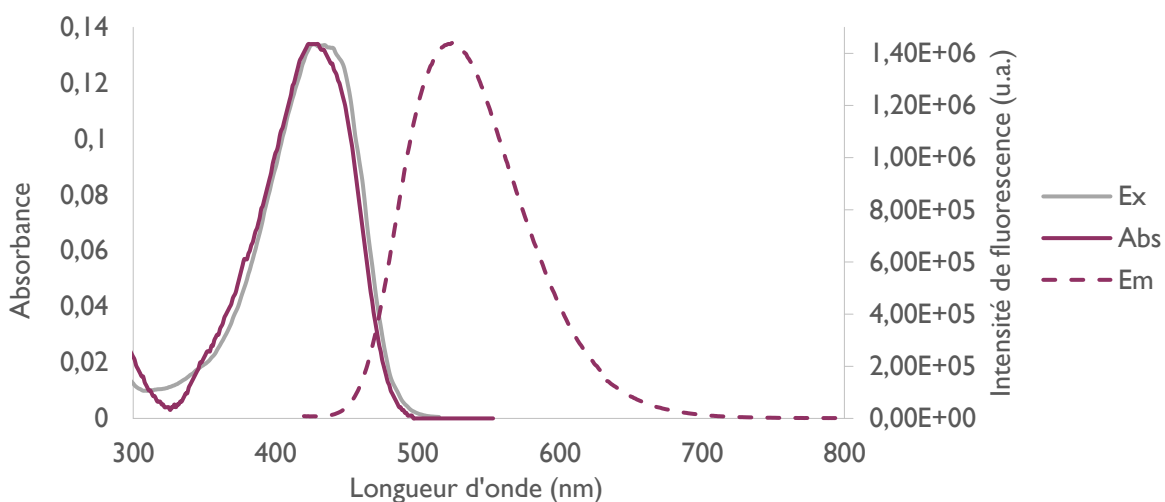


Figure 209 : Spectres d'absorption, d'excitation et d'émission de fluorescence de **SiFluo-L** dans le glycérol ($2 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$)

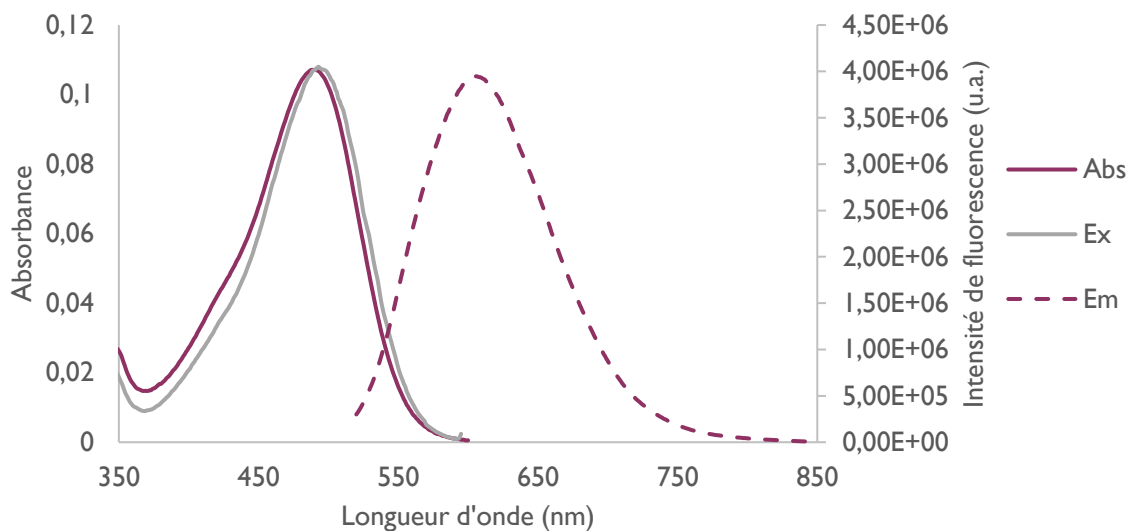


Figure 210 : Spectres d'absorption, d'excitation et d'émission de fluorescence de **Phenaz-Py** dans le glycérol ($2 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$)

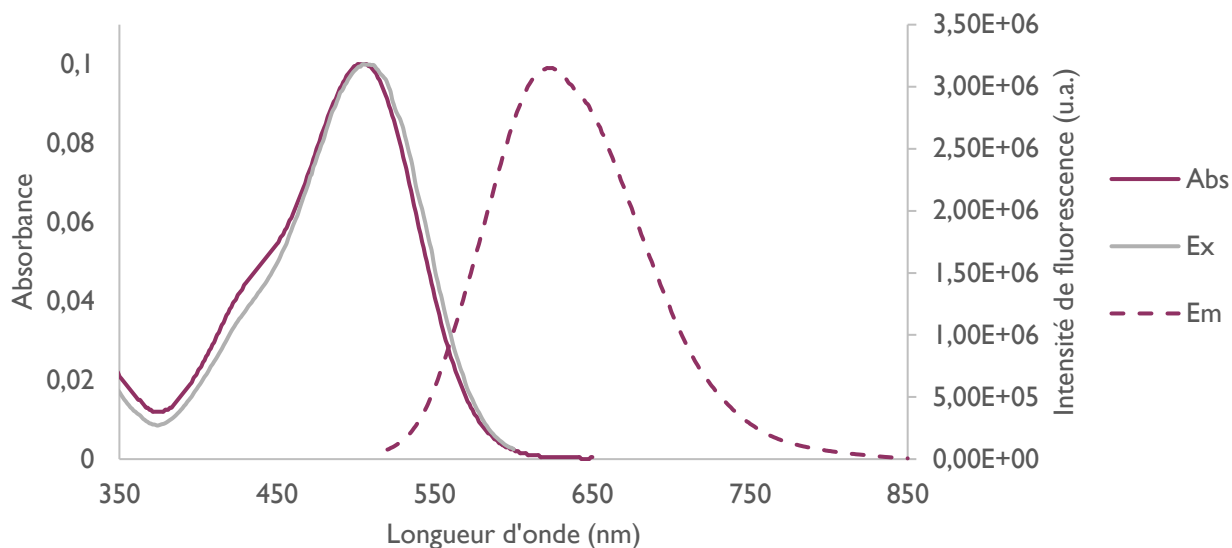


Figure 211 : Spectres d'absorption, d'excitation et d'émission de fluorescence d'**Acrid-Py** dans le glycérol ($2 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$)

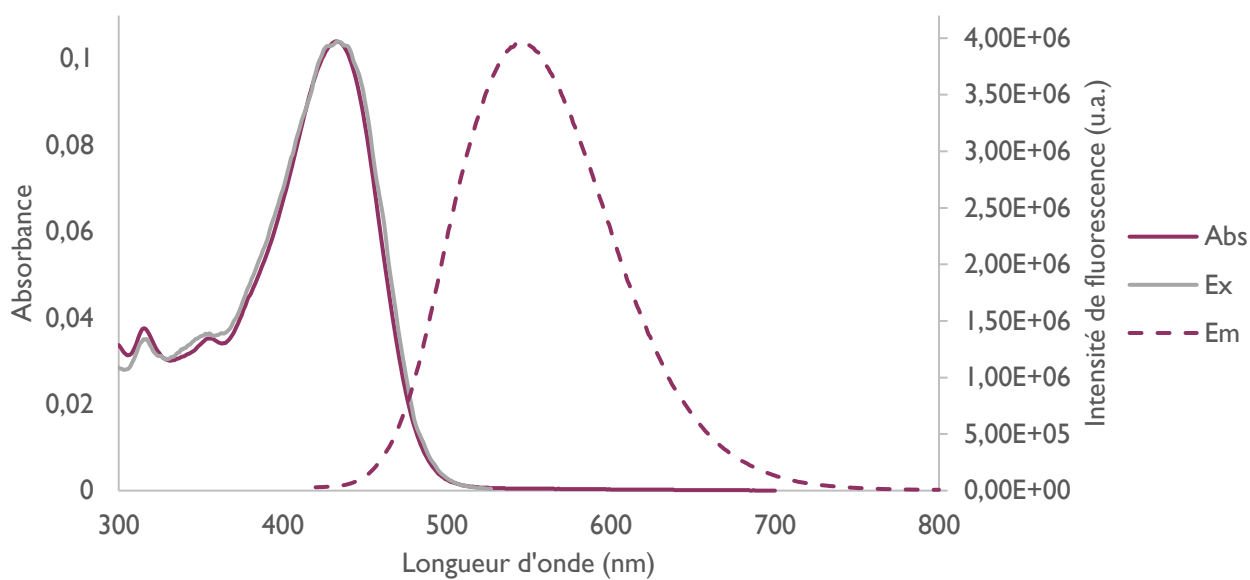


Figure 212 : Spectres d'absorption, d'excitation et d'émission de fluorescence de **Sulfon-Py** dans le glycérol ($2 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$)

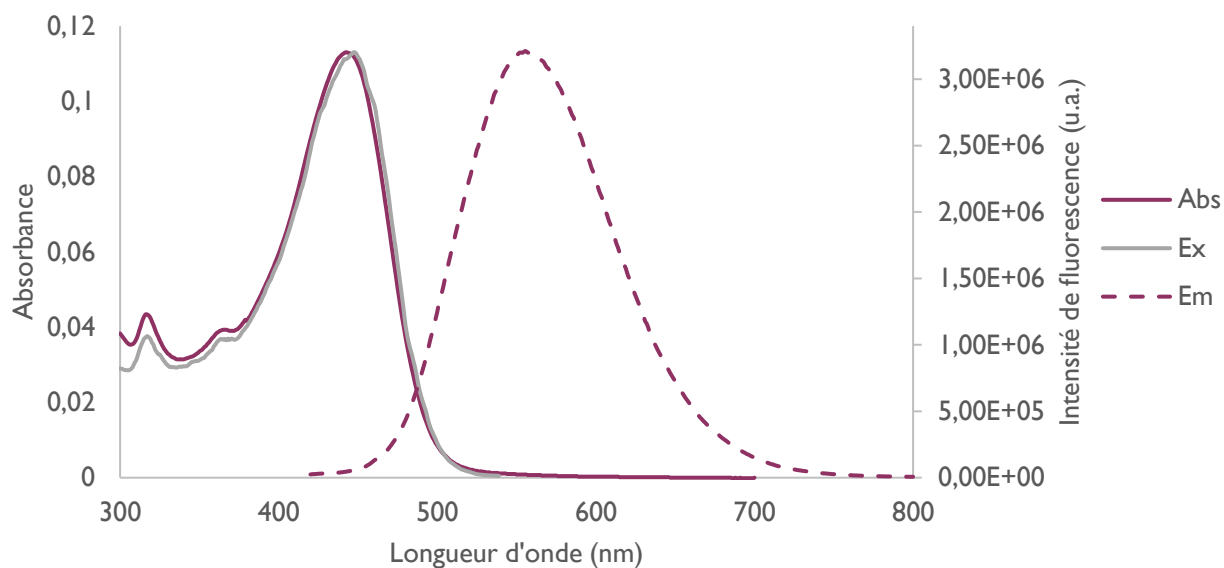


Figure 213 : Spectres d'absorption, d'excitation et d'émission de fluorescence de **Sulfox-Py** dans le glycérol ($2 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$)

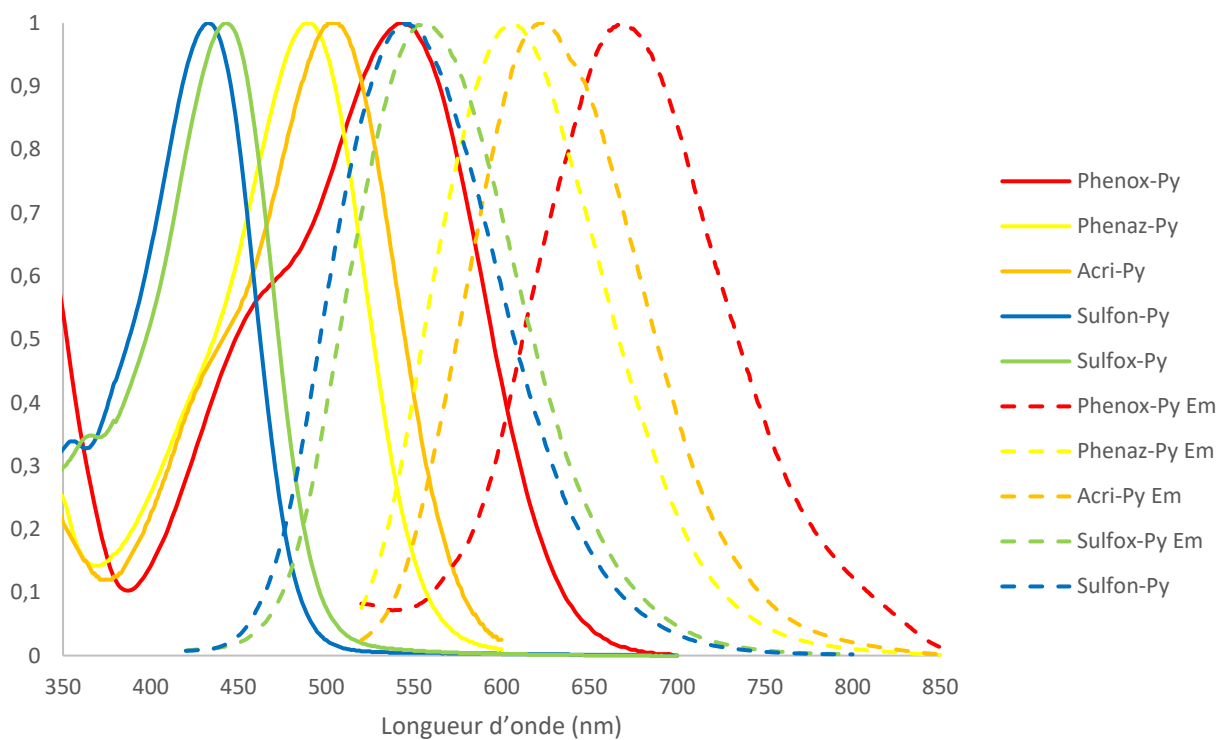


Figure 214 : Spectres d'absorption et d'émission normalisés de **Sulfox-Py**, **Phenaz-Py**, **Acri-Py** et **Pheno-Py** dans le glycérol

Titre : Design et synthèse de sondes fluorogéniques excitables à deux photons pour la chimie bioorthogonale

Mots clés : Chémobiologie, Chimie bioorthogonale, Sondes fluorescentes, Microscopie biphotonique

Résumé : Pour mieux comprendre le vivant, la modification des protéines est devenue un outil précieux, notamment afin de sonder leur activité et de la moduler. Dans cette démarche, la chimie bioorthogonale, c'est-à-dire le développement de réactions compatibles avec les milieux biologiques, est actuellement en plein essor. Par ailleurs, les sondes fluorescentes constituent un outil précieux pour sonder le vivant. Un processus élégant consiste ainsi à utiliser une sonde fluorescente qui s'allume uniquement lorsque la réaction a eu lieu, elle est alors qualifiée de fluorogénique. Dans le but de limiter la dégradation des tissus et d'avoir une meilleure pénétration du rayonnement dans ces derniers, il est primordial d'utiliser des fluorophores excitables et qui émettent dans le proche IR.

Pour atteindre un tel objectif, il est possible de concevoir des sondes qui peuvent absorber simultanément deux photons. Elles peuvent ainsi être excitées avec un rayonnement d'énergie environ deux fois moindre que lors d'une excitation à un photon.

La première partie de cette thèse est ainsi consacrée au développement de sondes aux propriétés photophysiques et physico-chimiques optimisées pour la microscopie biphotonique en cellules vivantes. Le fluorophore le plus prometteur a ensuite été utilisé dans la seconde partie afin de concevoir une sonde fluorogénique excitable à deux photons pour la chimie bioorthogonale.

Title : Design and synthesis of two-photon excitable fluorogenic probes for bioorthogonal chemistry

Keywords : Chemical biology, Bioorthogonal chemistry, Fluorescent probes, Two-photon microscopy

Abstract : The emergence of bioorthogonal chemistry, that is the development of reactions which do not interfere with biological processes, enables to better understand living organisms. In fact, thanks to biocompatible reactions, protein modification allows to probe and modulate their activity. In this context, fluorescent probes are widely used to label and track biomolecules in their native environment. A smart process consists in using a fluorogenic probe, that becomes fluorescent only once it has reacted with its biological target. In addition, studies in living organisms requires probes which absorb and emit in the NIR window where the absorption and diffusion of light by biological samples are minimized.

To achieve this goal, it is possible to design probes that can absorb simultaneously two photons. As consequence, they can be excited with about half the energy of single-photon excitation.

The first part of this thesis is thus devoted to the development of probes with optimised photophysical and physicochemical properties for biphoton microscopy in living cells. The most promising fluorophore was then used in the second part to design a two-photon excitable fluorogenic probe for bioorthogonal chemistry.