(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
24 janvier 2013 (24.01.2013)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2013/011242 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C09B 69/10 (2006.01) *G01N 33/532* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2012/051711

(22) Date de dépôt international :
19 juillet 2012 (19.07.2012)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1156599 21 juillet 2011 (21.07.2011) FR

(71) Déposants *(pour tous les États désignés sauf US)* : **ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON** [FR/FR]; 15 Parvis Rene Descartes, BP 7000, F-69342 Lyon Cedex 07 (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3 Rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **MONNEREAU, Cyrille** [FR/FR]; 269 Chemin des Princes, F-38300 Maubec (FR). **ANDRAUD, Chantal** [FR/FR]; 8, rue des sports, F-69740 Genas (FR). **MAURY, Olivier** [FR/FR]; 53B Chemin de la Grand Cour, F-69126 Brindas (FR).

(74) Mandataire : **SARLIN, Laure**; Cabinet Beau De Lomenie, 51 Avenue Jean Jaures, BP7073, F-69301 Lyon Cedex 07 (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

WO 2013/011242 A1

(54) **Title** : NOVEL WATER-SOLUBLE CHROMOPHORE

(54) **Titre** : NOUVEAU CHROMOPHORE HYDROSOLUBLE

(57) **Abstract** : The present invention concerns a water-soluble chromophoric entity comprising at least one lipophilic chromophore bonded covalently to at least two water-soluble polymer chains, characterised in that each water-soluble polymer chain is only covalently bonded to one single lipophilic chromophore, and each polymer chain bears several hydroxy functions and is obtained by polymerisation of one or more monomers, at least one of which is chosen from those defined in claim 1; it also concerns a method for preparing such chromophoric entities.

(57) **Abrégé** : La présente invention concerne une entité chromophorique hydrosoluble comportant au moins un chromophore lipophile lié de façon covalente à au moins deux chaînes de polymère hydrosoluble caractérisée en ce que; chaque chaîne de polymère hydrosoluble n'est liée de façon covalente qu'à un seul chromophore lipophile, et chaque chaîne de polymère porte plusieurs fonctions hydroxy et est obtenue par polymérisation d'un ou plusieurs monomères, dont l'un au moins est choisi parmi ceux définis à la revendication 1, ainsi que le procédé de préparation de telles entités chromophoriques.

NOUVEAU CHROMOPHORE HYDROSOLUBLE

L'invention concerne le domaine technique de la biophotonique. Plus précisément, la présente invention propose une stratégie originale, simple à mettre en œuvre, efficace et adaptable aux principales familles de composés présentant un intérêt dans ce cadre, permettant la solubilisation de ces composés tout en assurant une bonne biocompatibilité de ces derniers en milieu cellulaire.

La biophotonique est définie comme « l'utilisation des rayons visibles, des rayons ultra-violets, des rayons infrarouges, voire des rayons X pour l'analyse ou la modification d'objets biologiques, par nature, complexes. Cette science est actuellement en plein développement, avec en particulier l'émergence de microscopies nouvelles, telles que les microscopies de fluorescence bi-photoniques, qui permettent l'obtention d'images de résolution très supérieure aux techniques de fluorescence classiques. De plus, la biophotonique permet d'envisager un grand nombre d'autres applications, dont une liste non exhaustive recouvre : la photothérapie dynamique (à un ou deux photons), les sondes fluorescentes pour la détection et la reconnaissance de molécules d'intérêt biologiques, les sondes fluorescentes de pH, les sondes de pression partielle d'oxygène…

Dans ce cadre, l'utilisation de molécules pouvant interagir avec les rayons visibles, UV, IR… afin de produire la réponse attendue, est nécessaire et primordiale. Ces molécules peuvent être des molécules du vivant, modifiées par voie génétique (cas de l'approche « Protéine verte fluorescente », dont la découverte a donné lieu au prix Nobel de Shimomura, Chalfie et Tien en 2008) ou des molécules synthétiques, appelées chromophores (du latin « chromos phorus », « qui apporte la couleur »).

L'utilisation de chromophores de synthèse nécessite d'apporter à ces derniers des modifications chimiques permettant de les rendre compatibles au milieu physiologique, à savoir :

i/Hydrosolubles : la plupart des chromophores, et particulièrement les chromophores à deux photons, étant intrinsèquement hydrophobes, il est

nécessaire d'incorporer au système une ou plusieurs fonctions solubilisantes. Tout en étant hydrosoluble, il est nécessaire que l'objet obtenu incorporant le chromophore, une fois solubilisé, conserve les propriétés spectroscopiques nécessaires à l'application cible, tel que son rendement quantique de fluorescence, par exemple.

ii/Biodisponibles : Pour les applications *in vivo* notamment, il est nécessaire que le chromophore ait la capacité de franchir les différentes barrières biologiques conduisant à l'organe/tissus cible. La biodisponibilité va dépendre de plusieurs facteurs dont les principaux sont l'indice de lipophilie (logP) et la taille de l'objet. In-vitro, la problématique est simplifiée, et va se limiter à la capacité de l'objet à diffuser dans le tissu étudié ou à pénétrer dans le compartiment cellulaire cible.

iii/Biosélectifs : il est important que l'objet incorporant le chromophore puisse être acheminé vers un organe cible donné, de préférence sélectivement, idéalement exclusivement.

iv/ non-toxiques : Il faut également que l'objet présente la plus faible toxicité, ou, en ce qui concerne les objets destinés à la thérapie, la plus faible toxicité hors de la cellule / organe cible, ou en l'absence du stimulus nécessaire à son activation.

Parmi ces contraintes, la problématique d'hydrosolubilisation de chromophores, et particulièrement de fluorophores, est sans doute celle qui a mobilisé le plus grand nombre de travaux de recherche. Cette thématique est par ailleurs en pleine expansion depuis une quinzaine d'années : une recherche par mots clés sur le moteur ISI Web Of Knowledge, en utilisant les entrées « water-soluble » et « fluorescent » indique que le nombre de publications sur le sujet est en constante progression d'une année sur l'autre depuis 1995, passant de 37 publications (1995) à plus de 240 pour l'année 2010. De nombreuses stratégies ont été suggérées pour permettre d'obtenir les propriétés d'hydrosolubilité désirées. Si l'on s'intéresse aux chromophores à propriétés optiques non linéaires, qui d'une part sont les plus intéressants en terme de propriétés, et d'autre part présentent une structure avec un squelette carboné d'une grande longueur de conjugaison en général, les

rendant particulièrement lipophiles et difficiles à hydrosolubiliser, les stratégies d'hydrosolubilisation peuvent se diviser en plusieurs catégories :

- celles impliquant l'introduction de groupes fonctionnels solubilisants sur la molécule fluorescente, tels que des groupements anioniques ou cationiques des fonctions alcool, ou des dérivés oligo- ou polyéthylène glycol (OEG ou PEG). Un exemple d'entités cationiques est décrit par Prasad *et al.* (J. Phys. Chem., 1996, 100, 4521-4525), avec des fluorophores à deux photons portant un groupement pyridinium. Bazan *et al.* (J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 820-821) ont développé une stratégie similaire avec des ammoniums quaternaires comme groupements solubilisants. Dans ces deux exemples une forte chute du rendement quantique de fluorescence des objets en milieu aqueux est observée. Nicoud *et al.* (Photochemical and Photobiological Sciences, 2006, 5, 102-106) ont , quant à eux, décrit la synthèse de deux structures de chromophores symétriques fluorescents à deux photons, l'un possédant un cœur bi-phényle l'autre un coeur bis-butylfluorène, chacun de ces chromophores présentant une substitution sur les 1,2,3-benzène triol terminaux par des groupements éther méthyliques d'oligoéthylène glycol possédant 1,2 ou 3 unités éthylène glycol. Les structures synthétisées présentent des hydrosolubilités variables qui diminuent très fortement lorsque le nombre d'unités éthylène glycol est réduit. Sur les cinq structures synthétisées, trois seulement présentent des hydrosolubilités acceptables, et cette hydrosolubilité est même excellente pour deux des composés. Les propriétés de fluorescence dans l'eau sont relativement bien conservées, par rapport au même chromophore dans le dichlorométhane : il est divisé environ par un facteur deux pour les composés à cœur biphényle hydrosolubles, pour s'établir à 39-45% environ, et est de 72% environ pour le composé à cœur fluorènyle. Toutefois, les composés étudiés présentent des propriétés d'absorption à deux Photons dans la fenêtre d'intérêt biologique (entre 750 et 950 nm) relativement modestes, en raison de l'absence de groupement fortement donneur d'électrons. Ces chromophores absorbent dans le proche UV et le bleu à un photon, et pas assez dans le rouge à deux photons et ne sont donc pas

adaptés au travail en milieu biologique. Cette absence de transfert de charge peut expliquer pourquoi le rendement quantique de fluorescence est relativement mieux conservé. Ce dernier point est corroboré par des travaux d'Ogilby *et al.* (J. Org. Chem. 2005, 70, 7065-7079) mettant en œuvre une stratégie analogue sur des chromophores à transfert de charge, et qui ont permis de mettre en évidence une chute du rendement quantique de l'objet dans l'eau (Q= 0,04) par rapport à son analogue dans le toluène (Q = 0,17). De plus, des travaux des inventeurs réalisés sur des chromophores pour l'imagerie biphotonique décrits par Andraud *et al.* (Org. Biomol. Chem., 2010, **8**, 142–150) a mis en évidence que l'utilisation de chaînes PEG courtes, si elle permettait une dissolution relativement efficace de l'objet en milieu biologique et sa vectorisation en cellule, conduit à une diminution drastique du rendement quantique de fluorescence de l'objet dans l'eau par rapport au dichlorométhane, pouvant aller d'un facteur 5 à un facteur 10. De plus, dans tous les exemples cités, malgré la taille modeste des objets, la synthèse des objets hydrosolubilisés est relativement complexe, avec, pour les objets les plus simples un minimum de 6 étapes à partir des produits commerciaux, et 15 étapes au minimum pour les chromophores de Andraud et al.

- celles impliquant la dispersion du chromophore au sein d'un système micellaire. Cette stratégie nécessite généralement la synthèse d'un copolymère amphiphile à block, et une étape de préparation des micelles, dans un mélange de solvants aqueux et organique permettant l'incorporation du chromophore au sein du système micellaire en formation. Les travaux de Jen *et al.* (Advanced Functional Materials 2007, 17, 1691-1697), par exemple, décrivent des chromophores fluorescents à deux photons qui sont incorporés dans un copolymère à block polystyrène/poly(acide acrylique), synthétisé par des méthodes ATRP sous forme protégée de l'acide (ter-butyl ester). Les objets obtenus présentent une forte brillance, due au grand nombre de fluorophores présents dans chaque objet. Néanmoins, les résultats montrent que, suivant la méthode de préparation utilisée pour la préparation des micelles, les rendements quantiques obtenus peuvent être

sévèrement affectés, cette diminution pouvant aller jusqu'à un facteur 14 par rapport au chromophore seul dans le toluène. Les auteurs attribuent logiquement cette diminution à l'agrégation du chromophore. Cet effet est pratiquement systématiquement rencontré dans les chromophores à intérêt biologique (principalement à propriété non-linéaires), excepté dans de rares exemples paradoxaux d'émission *induite* par agrégation (Prasad *et al.*, Advanced Materials, 2007 ,19,3791-3795), et est donc une limitation quasi systématique des systèmes micellaires, comme récemment montré (Andraud *et al.* Photochem. Photobiol. Sci. 2011, 10, 1216), avec un chromophore à transfert de charge.

- celles impliquant l'utilisation de polymères. Les polymères peuvent être soit obtenus par copolymérisation de deux monomères, l'un apportant l'hydrosolubilité et l'autre incorporant le chromophore (où une fonction qui pourra permettre le greffage ultérieur du chromophore), soit obtenus en modifiant un polymère synthétisé par méthodes contrôlées sur les extrémités alpha ou omega. Une revue récente Charreyre *et al.* (Prog. Polym. Sci, 2011, 36, 568-602) liste les exemples de la littérature issues de ces deux approches, par des techniques de polymérisations anioniques, RAFT, ATRP, ou NMP, dans le cadre d'applications en partie liées aux polymères fluorescent à visées biomédicales. Parmi les monomères utilisés dans les quelques systèmes hydrosolubles décrits, la quasi exclusivité concerne des espèces porteuses de groupements anioniques (sulfonates) ou cationiques (ammonium quaternaires), ou alternativement sur des monomères porteurs de groupements de type PEG ou OEG. Les auteurs de cette revue pointent par ailleurs que le caractère amphiphile des espèces formées, dans lesquelles le chromophore terminal constitue une tête lipophile, résulte très souvent en la formation de systèmes micellaires, avec extinction de l'émission ou apparition de bandes excimères.

- celles dans lesquels le chromophore est incorporé de manière covalente au sein d'un système dendritique, soit en périphérie du dendrimère, soit au centre de dendrimère. Dans un article de 2008, Frechet *et al.* (J.Am.Chem.Soc, 2008, 130,644-645) ont montré que des fluorophores

situés en périphérie interagissent pour former des agrégats-J, ce qui modifie leur signal de fluorescence. Cette propriété est utilisée dans le cadre de la réalisation de senseurs de pH, le lien ester unissant le fluorophore au polymère pouvant être hydrolysé par immersion en milieu acide (pH=4) pendant quelques heures, ce qui permet de restaurer la fluorescence de l'objet individuel en solution. Dans un article de 2007, Jang *et al.* (Chem. Mater., 2007, 19, 5557) ont mesuré les cinétiques de déclin de fluorescence de porphyrines situées au cœur de dendrimères de générations différentes et ont montré que cette cinétique diminuait avec l'augmentation de générations de dendrimère. Autrement dit, le dendrimère forme une « coque » protectrice autour du fluorophore, ce qui lui permet de conserver de bonnes propriétés d'émission.

De manière générale, l'effet délétère de solvants polaires protiques, particulièrement de solvants aqueux, sur les rendements quantiques de nombreux fluorophores, et principalement de fluorophores émettant à partir d'un état excité de type CT (« à transfert de charge »), soit par le biais d'agrégation des entités fluorophores (généralement lipophiles, voir De Schyver *et al.* Chem. Rev. *1993, 93,* 189-221), soit par des interactions dipolaires avec les fonctions O-H du solvant (voir Zachariasse *et al.* J. Phys. Chem. *1992, 96,* 10809-10819), conduisant dans les deux cas à une désactivation du fluorophore par voie non-radiative. Andraud *et al.* (Photochem. Photobiol. Sci. 2011, 10, 1216), par le passé, été confronté à des difficultés similaires, avec des fluorophores de même type que ceux exemplifiés dans notre invention, dispersé soit en systèmes micellaires, soit rattachés « par grappes » en chaines latérales de polymères hydrosolubilisant.

Les points, ii/ (biodisponibilité), iii/ (biosélectivité) et iv/(absence de toxicité) ont moins spécifiquement été étudiés dans le cadre des chromophores/fluorophores que dans le cadre plus général de la vectorisation de molécules à intérêt thérapeutique. En ce qui concerne les dendrimères, Fréchet *et al. supra* ont listé les différents paramètres des systèmes dendritiques pouvant avoir une influence sur les caractéristiques

pharmacologiques ii, iii/ et iv/de l'objet mentionnées plus haut, et dont le contrôle permet *in fine* d'obtenir un vecteur idéal.

-La faible polydispersité de l'objet, c'est-à-dire son homogénéité de taille, permettant une pharmacocinétique reproductible,

-L'absence de groupements ioniques, connus pour s'accumuler dans le foie et présenter une forte toxicité,

-La taille de l'objet, qui peut, particulièrement dans le cas du traitement des tumeurs, favoriser la vectorisation du produit par transport passif jusqu'à l'organe à traiter. Cependant l'étude de Jang *et al. supra*, indique que la taille de l'objet peut également constituer un obstacle à sa vectorisation, probablement dans les cas où un transport actif est impliqué.

-La possibilité d'inclure sur la périphérie de la structure, des « unités de ciblage actif » (active targeting units), permettant d'induire une sélectivité de l'objet pour des cellules portant des récepteurs spécifiques.

-La possibilité pour l'objet d'être éliminé du corps après traitement, par les voies naturelles (avec ou sans biodégradation), ce qui peut être favorisé par la présence de groupements hydrosolubilisants en périphérie.

A l'heure actuelle, d'après les auteurs, seuls les dendrimères présentent des caractéristiques permettant d'envisager un tel contrôle. Cependant, la synthèse de dendrimères, particulièrement de dendrimères de générations élevées, est un processus qui peut s'avérer long, difficile et peu pratique à mettre en œuvre dès lors que l'on vise des générations élevées.

Dans ce contexte, la présente invention propose de nouvelles entités chromophoriques solubles dans l'eau qui puissent être au moins aussi intéressantes que les solutions de l'art antérieur, mais qui puissent présenter l'une et/ou l'autre des caractéristiques suivantes :

- Une facilité de préparation,
- Une bonne conservation des propriétés de luminescence dans l'eau,

- Une biodisponibilité satisfaisante, leur permettant une bonne internalisation dans des cellules vivantes, au moins *in vitro*.

La présente invention concerne des entités chromophoriques, et notamment des entités fluorescentes, hydrosolubles comportant au moins un chromophore lipophile lié de façon covalente à au moins deux chaines de polymère hydrosoluble caractérisée en ce que :

- chaque chaine de polymère hydrosoluble n'est liée de façon covalente qu'à un seul chromophore lipophile,
- et chaque chaîne de polymère porte plusieurs fonctions hydroxy.

De manière avantageuse, le polymère selon l'invention est constitué d'au moins une unité monomérique itérative porteuse d'une fonction hydroxy.

Dans le cadre de l'invention, les chaines de polymères appartiennent de préférence à la famille des polyacrylamides, polyméthaacrylamides, polyméthacrylates, des polyacrylates ou des polyallylesters, sous forme homopolymères ou copolymères.

Dans le cadre de l'invention, le chromophore est solubilisé par liaison covalente à au moins 2 chaînes de polymères hydrosolubles porteurs de liaisons OH. Notamment, le chromophore pourra, par exemple, être lié à un nombre allant de 2 à 10 et par exemple à 2, 3, 4, 5 ou 6 chaînes de polymère définies dans le cadre de l'invention.

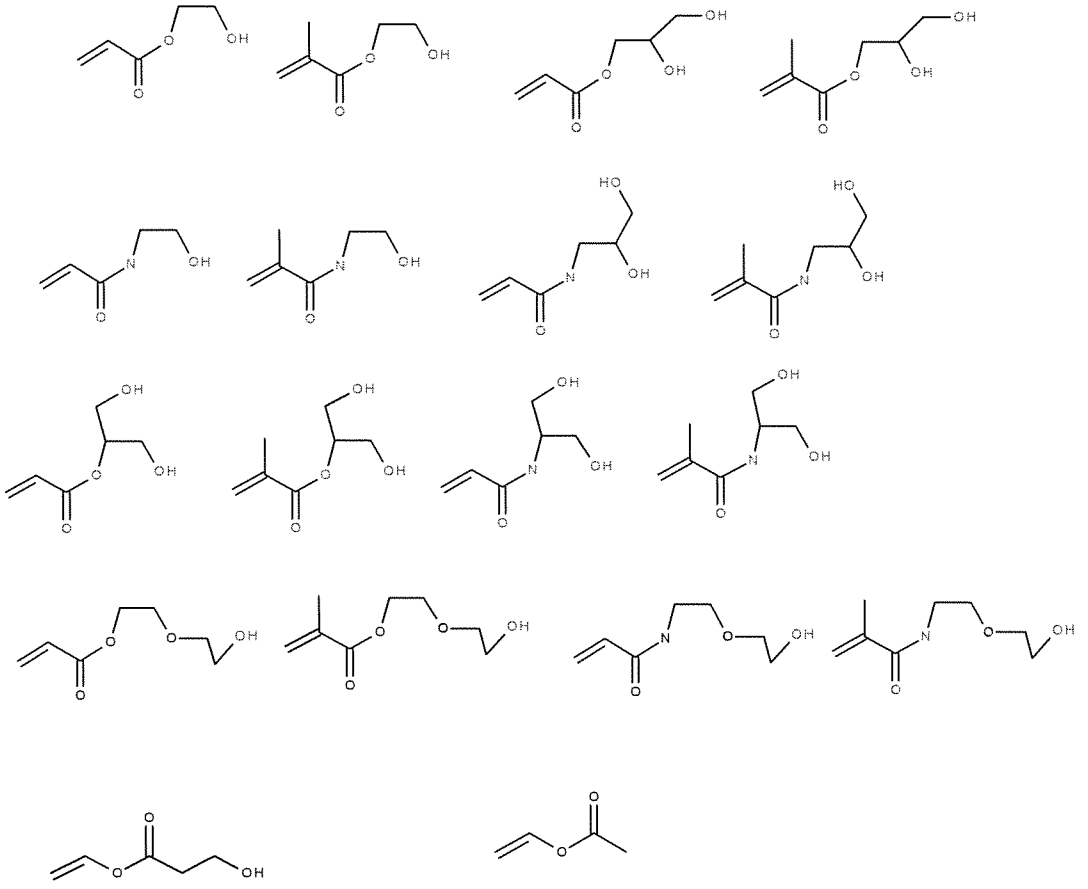
On entend par « polymère » une espèce possédant au moins un motif itératif (également nommé unité monomérique) au sein de sa structure, et dont la synthèse (ou croissance) s'effectue par une suite de réactions identiques. Cette suite de réactions identiques intervient au cours d'une même étape de synthèse, c'est-à-dire sans traitement intermédiaire au cours de la réaction de croissance, ce qui exclut donc le fait que les polymères englobent les dendrimères. Dans le cadre de l'invention, les chaines polymères comportent, par exemple, de 4 à 100 unités monomériques par chaîne polymère. La notion de polymère englobe donc celle d'oligomère.

On entend par « homopolymère » un polymère constitué d'une seule unité monomérique répétée et dont la croissance n'implique donc qu'un seul monomère.

On entend par « copolymère », un polymère formé par au moins deux entités monomériques différentes répétées et dont la croissance implique donc au moins deux monomères. Ces deux entités monomériques peuvent soit être organisées en segments successifs (« copolymère à blocs »), où distribués aléatoirement au sein de la chaîne polymère (« copolymères aléatoires ou statistiques »).

Les chaines de polymères peuvent être obtenues à partir d'au moins un monomère ci-dessous comportant une fonction hydroxy pendante présente sur une chaine latérale ou une fonction qui après traitement conduit à une fonction hydroxy, ce qui permet l'introduction répétée de fonctions OH.

Les chaines de polymère peuvent être obtenues à partir d'un ou plusieurs monomères, un au moins des monomères utilisés, voire tous, étant choisis parmi :



Dans le cas du dernier monomère, une hydrolyse basique après polymérisation permet d'obtenir les fonctions –OH souhaités. Les polymères selon l'invention résultant sont donc des homopolymères ou des copolymères comportant au moins une unité monomérique itérative porteuse d'au moins une fonction OH qui correspond à un des monomères ci-dessus, ou dans le cas du dernier monomère, audit monomère ayant subi une hydrolyse basique. Plus généralement, et de manière analogue, les chaines de polymères liées au chromophore peuvent être obtenues à partir d'au moins un monomère comportant une fonction hydroxy pendante présente sur une chaine latérale. Les groupements hydroxy pendants seront, de préférence, séparés de la chaine principale du polymère par 0 à 10 atomes, et préférentiellement par 2 à 7 atomes, de préférence choisis parmi les atomes de carbone, oxygène ou azote.

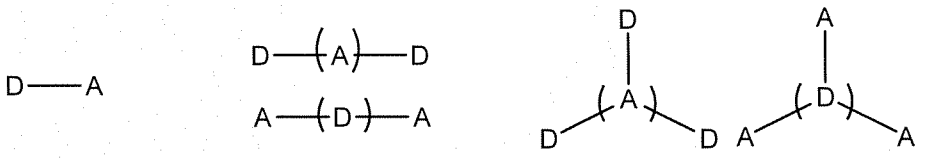
De façon avantageuse, chaque chaine de polymère présente sur l'entité chromophorique comprendra de 4 à 50 unités monomériques, voire de 4 à

30 unités, et de préférence de 10 à 15 unités monomériques, ce qui permet d'obtenir une meilleure conservation de la luminescence en milieu aqueux. Le temps de réaction et les conditions de polymérisations seront adaptés par l'homme du métier pour obtenir une telle longueur de chaine.

Par « chromophore», on entend toute espèce chimique pouvant transformer un influx lumineux (Ultra-Violet, Visible, Infrarouge, X). Cette transformation peut être détectée par méthode spectroscopique, ou produire une modification identifiable du milieu dans lequel se trouve le chromophore. Les entités chromophore selon l'invention sont capables d'absorber au moins un photon, et d'atteindre par un processus de conversion interne d'énergie, un état excité métastable à partir duquel le processus physicochimique désiré peut avoir lieu (par exemple émission d'un photon par fluorescence ou phosphorescence, génération d'oxygène singulet...).

De manière préférée, les chromophores lipophiles utilisés dans le cadre de l'invention sont des chromophores à transfert de charge, c'est-à-dire des chromophores conjugués présentant une délocalisation électronique entre l'état fondamental et l'état excité. De tels chromophores présentent des états excités photoinduits de type transfert de charge, c'est-à-dire donnant lieu à une délocalisation du nuage électronique résultant de l'absorption d'un ou plusieurs photons. Dans le cadre de l'invention, les chromophores à propriétés optiques non-linéaires sont préférés, ces derniers étant intéressants pour des applications liées à la fluorescence à deux photons, l'imagerie de processus membranaires, les sondes fluorescentes de pH, les sondes anioniques. De tels chromophores se présentent, notamment, sous la forme de dipôles, quadripôles ou octupôles et peuvent être représentés schématiquement par :

dipôle Quadrupôle Octupôle



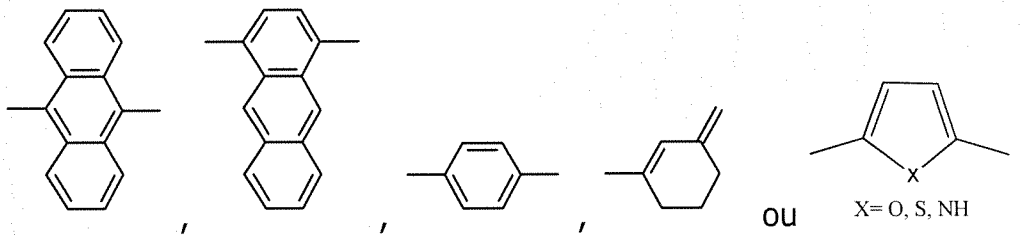
avec D qui est un groupement donneur d'électrons, par exemple de type aniline N substituées, éther de phénol ou éther de thiophénol,

et A qui est un groupement accepteur, par exemple de type nitro ou cyano,

et le bras de connexion symbolisée par la ligne pleine est un enchaînement conjugué ininterrompu,

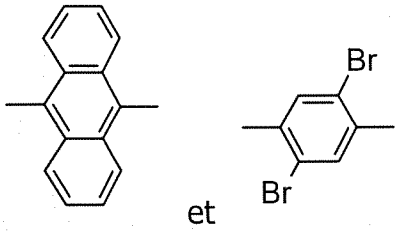
l'utilisation de parenthèse signifiant que la présence du groupe figurant entre ces parenthèses est accessoire à la définition.

L'enchainement conjugué ininterrompu est, en particulier, un enchainement hydrocarboné pouvant être substitué ou non substitué, dans lequel alternent des liaisons saturées et des liaisons insaturées choisies parmi les double et les triple liaisons. Les liaisons insaturées, et en particulier les doubles liaisons, peuvent être intégrées à un cycle, de préférence à un cycle hydrocarboné, par exemple choisi parmi :



ou

Les deux chromophores utilisés dans les exemples répondent à cette définition, les groupes anilines N substitués jouant le rôle de groupe donneur d'électrons et les groupe :



et

de groupe accepteur d'électrons.

Les chromophores utilisés dans le cadre de l'invention peuvent également appartenir à la famille des cyanines ou des merocyanines, qui peuvent être considérées comme des cas particuliers de composés à transfert de charge. De tels chromophores sont notamment décrits par Maury *et al.* dans J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 4328, ou par Bouit *et al.* dans Chem. Mater. 2007, 19 (22), 5325-5335. On pourra également se référer à Chem. Rev. 2008, 108, 1245-1330 et 1994, 94, 195-242 qui

dressent une liste de chromophores lipophiles qui peuvent être hydrosolubilisés dans les entités chromophoriques selon l'invention.

La luminescence est le phénomène par lequel un chromophore, après absorption d'un photon, va émettre à partir d'un état excité, un photon d'énergie inférieure (éventuellement égal) au photon incident par un processus de conversion interne d'énergie. Si l'état excité émissif possède la même multiplicité de spin que l'état fondamental, on parle de fluorescence, si cette multiplicité est différente, on parle de phosphorescence.

On entend par « entité hydrosoluble », une entité soluble dans l'eau pure à 25°C à une concentration au moins égale à 10^{-5} mol.L^{-1}, préférentiellement à une concentration de 10^{-3} mol.L^{-1}, et idéalement à une concentration de 10^{-1} mol.L^{-1}. Par « soluble », on entend que la solution résultante doit être limpide, homogène, et sans précipitation visible à l'œil nu.

On entend par « lipophile », dans le cadre de l'invention, le fait pour une molécule d'être soluble dans des solvants organiques exclusivement, de préférence dans des solvants autres que des solvants polaires protiques, et préférentiellement soluble principalement dans des solvants de type hydrocarbures. La solubilité dans les solvants organiques ainsi que la non solubilité peut notamment être observé à 25°C à une concentration au moins égale à 10^{-5} mol.L^{-1}, préférentiellement à une concentration de 10^{-3} mol.L^{-1}, et idéalement à une concentration de 10^{-1} mol.L^{-1}.

Dans les entités chromophoriques selon l'invention, chaque chaine de polymère hydrosoluble peut être obtenue par polymérisation radicalaire contrôlée.

La polymérisation radicalaire comporte trois étapes : l'amorçage (création de radicaux libres et réaction avec la première unité de monomère), la propagation (additions successives d'unités monomères sur la chaîne en croissance ((macro)radical)) et la terminaison (arrêt de la chaîne) par couplage ou dismutation entre deux chaînes en croissance ou par transfert d'un proton sur une chaîne en croissance. Les réactions de terminaison et de transfert affectant les (macro)radicaux sont responsables

de la perte de contrôle de la polymérisation (chaînes polymères de masse non prévisible, polymolécularité élevée).

Par « polymérisation contrôlée », on entend un processus dans lequel la réaction de polymérisation procède sans réactions parasites (terminaisons, réactions de couplage inter-chaîne, réactions de transfert), et avec une cinétique constante et homogène tout au long de la réaction de polymérisation, donnant lieu à la formation de chaînes de longueur homogène et contrôlée. Cette homogénéité est caractérisée par l'indice de polymolécularité, rapport de la masse moléculaire en poids sur la masse moléculaire moyenne en nombre de chaînes de polymère obtenues :

$$I = \frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n}$$

Avec les termes M_w et M_n définis par :

$$\bar{M}_w = \frac{\sum n_x M_x^2}{\sum n_x M_x} \quad \bar{M}_n = \frac{\sum n_x M_x}{\sum n_x}$$

Avec M_x la masse molaire considérée et n_x, le nombre de chaînes possédant cette masse molaire M_x.

L'indice de polymolécularité est forcément supérieur à 1. Plus l'indice de polymolécularité est faible, plus l'objet est uniforme.

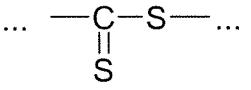
L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'une entité chromophorique telle que définie dans le cadre de l'invention dans lequel chaque chaine de polymère hydrosoluble est obtenue par polymérisation contrôlée d'au moins un des monomères précédemment définis.

En utilisant une telle stratégie de polymérisation radicalaire contrôlée basée sur une croissance contrôlée de chaines hydrosolubilisantes de polymère, il est possible à la fois d'induire une bonne hydrosolubilité, tout en exerçant un contrôle sur les facteurs mentionnés aux points ii/, iii/ et iv/ précédemment. Cette stratégie offre une efficacité et une versatilité proche de celles obtenues dans les systèmes dendrimères, mais avec une mise en œuvre beaucoup plus simple. Il peut être considéré que dans les entités chromophoriques selon l'invention, le chromophore est situé au cœur de

chaines polymériques de taille contrôlée. De préférence, l'indice de polymolécularité des chaînes de polymère est inférieur à 1,5, de préférence inférieur à 1,3, idéalement inférieur à 1,1.

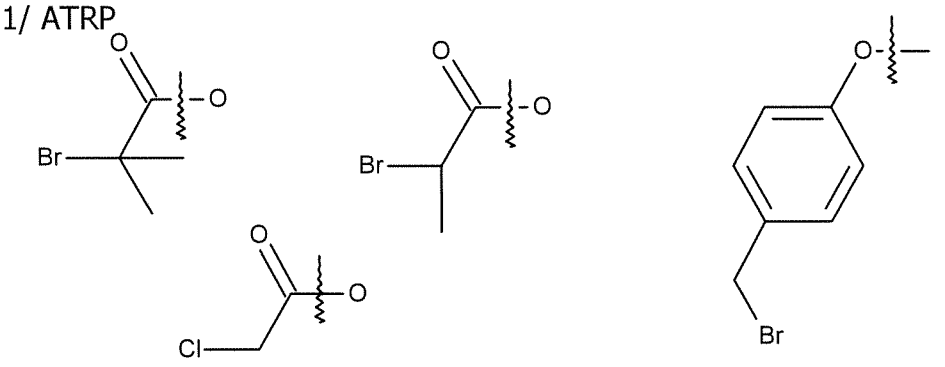
En particulier, chaque chaine de polymère peut être obtenue par polymérisation ATRP, RAFT ou NMP. Les techniques ATRP et NMP utilisent la terminaison réversible, soit par couplage avec un agent initiateur comportant un nitroxyde dans le cas de la NMP (Nitroxyde Mediated Polymerization), soit par couplage d'un agent initiateur comportant un atome d'halogène dans le cas de l'ATRP (Atom Transfer Radical Polymerisation) (Wang J. S. *et al.*, 1995, Macromol., 28,7901).

La technique RAFT utilise le transfert réversible de chaîne, avec un agent initiateur comportant le motif suivant :



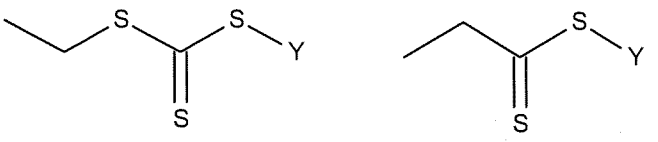
Dans le cadre de l'invention, il est possible d'utiliser tout type d'agents initiateurs utilisés dans les techniques ATRP, RAFT ou NMP. A titre d'exemple, on peut citer les agents initiateurs, par exemple, choisis parmi :

1/ ATRP



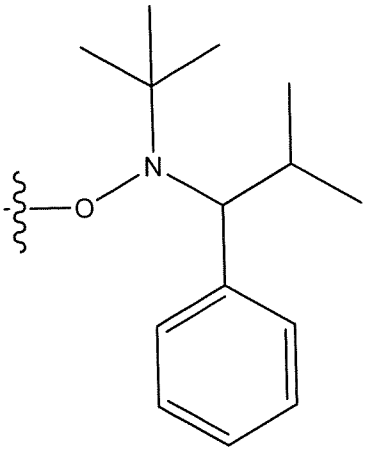
Le dernier agent initiateur est occasionnellement utilisé comme initiateur ATRP, mais la présence d'un chlore en fin de chaine du polymère alors obtenu, est plus difficilement substituable par un groupe de type N_3 notamment.

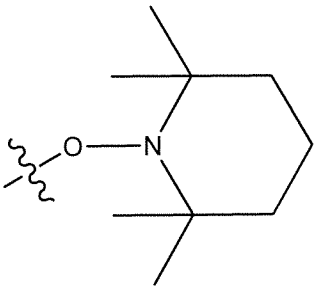
2/ RAFT



avec Y qui représente, par exemple, une fonctionnalisation permettant la liaison au chromophore, du type ester activé ou acétylène pour un couplage au chromophore par click-chemistry. La notion d'ester activé est bien connue de l'homme de l'art. Une fonction ester activé peut être définie comme un ester dont la partie « alcool » est un bon groupe partant vis-à-vis de réactions de substitutions nucléophiles. De tels esters activés ont, par exemple, été décrits par W. Anderson *et al*, dans American Society, 1964, 46, 1839-1842 et par R. Arshady dans Advances in Polymer Science, 1994, 111, 1-41.

3/ NMP





Ces différents modes de polymérisation contrôlée se caractérisent par le fait qu'on retrouve, après réaction de polymérisation, à l'une ou l'autre des extrémités de la chaîne polymère, l'agent de transfert de polymérisation : un brome pour l'ATRP, un thioester ou thiocarbonate pour la RAFT, un nitroxyde pour la NMP. Aussi, dans le cadre de l'invention, selon certains modes de réalisation, l'entité chromophorique comporte, à l'extrémité Ω d'au moins une chaine polymérique, voire de toutes les chaines polymériques présentes, un brome, un dithioester (-C(S)-S-) ou un nitroxyde (-O-N-). A titre d'exemple

d'enchainement dithioester, on peut citer $-CH_2-C(S)-S-$ ou les trithiocarbonates (-S-C(S)-S-).

Dans le cas des procédés RAFT et NMP, on peut en théorie envisager de rattacher le chromophore d'un côté ou de l'autre de l'agent initiateur (côté transférant ou côté transféré). Il est préférable que ce rattachement soit fait côté transférant comme illustré ci-dessus, car ceci permet de cliver la fonction de transfert : dithioester ou trithiocarbonate pour la RAFT, qui devient une fonction thiol après clivage, et nitroxyde pour la NMP, qui devient une fonction hydroxy après hydrolyse, sans éliminer le chromophore de la chaîne polymère. Il est à noter que, pour les agents initiateur utilisés dans les procédés RAFT et NMP, il existe une multitude de possibilité pour raccorder les groupements nitroxyde ou dithioester ou trithiocarbonate au chromophore, mais les techniques sont plus complexes que celles utilisées pour l'ATRP. A titre d'exemple de technique de fonctionnalisation pouvant être mise en œuvre, on pourra se référer notamment à Liangliang Qiang *et al.* dans Macromol. Rapid. Commun. 2006, 27, 1779-1786, à Charreyre *et al.* dans Prog. Polym. Sci, 2011, 36, 568-602 et les publications citées dans cette dernière publication. L'homme du métier sera à même d'apporter les modifications adéquates au chromophore utilisé pour permettre sa liaison covalente avec l'agent initiateur envisagé.

Selon certains modes de réalisation, chaque chaine de polymère est liée au chromophore lipophile de façon covalente par l'intermédiaire d'une liaison -O-C(O)- ou -O- ou –NH-C(O)- (dans le sens chromophore-polymère).

Pour plus de détails sur les conditions à mettre en œuvre pour chacune des techniques de polymérisation contrôlée à envisager, on pourra se référer aux revues très détaillées disponibles listant les principales techniques opératoires mises en œuvre dans la réalisation de polymérisation contrôlées en fonction des réactifs à disposition: K. Matyjaszewski dans le livre « Controlled Living Radical Polymerization, Progress in ATRP, NMP and RAFT, vol. 768 (Ed. K. Matyjaszewski), ACS Symposium Series, 2000, p2 ; pour l'ATRP, voir Matyjaszewski *et al.* Adv. Mater. 1998, 10, 901–915 et Chem. Rev., 2001, 101 (9), 2921–2990 et la thèse de l'Université du Maine de David

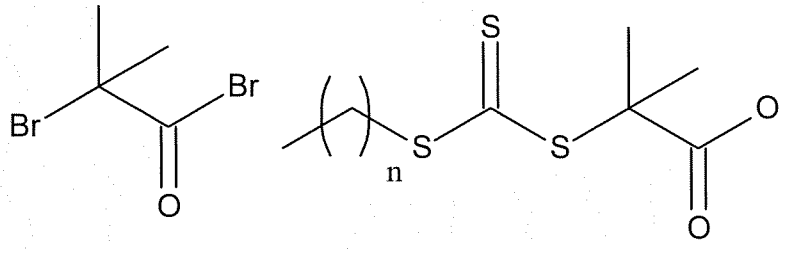
Fournier, soutenue le 6 décembre 2005 « Polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome (ATRP) de la diméthylvinylazlactone – Application à l'élaboration de supports réactifs » et en particulier au tableau page 17 ; pour la RAFT voir Charreyre *et al.* Macromol. Rapid Commun. 2006, 27, 653–692, pour la NMP voir Detrembleur *et al.* Chem. Rev. **2008,** 108, 1104-1126.

Selon des modes de réalisation préférés des entités chromophoriques et du procédé selon l'invention, chaque chaine de polymère hydrosoluble est obtenue par polymérisation radicalaire contrôlée par réaction du chromophore lipophile fonctionnalisé avec un initiateur de polymérisation et au moins un monomère. Il est également possible de réaliser la polymérisation radicalaire contrôlée avec un agent initiateur et de greffer au final le chromophore sur une fonction présente à l'extrémité α du polymère provenant de l'agent initiateur. Les chromophores utilisés pour le couplage à l'agent initiateur ou au polymère comporteront, par exemple, un minimum de deux, idéalement de quatre, fonctions hydroxy ou amine primaires non impliquées dans la conjugaison du système. De telles fonctions hydroxy pourront alors être estérifiées par des groupements de type bromure de 2-bromoalkyle.

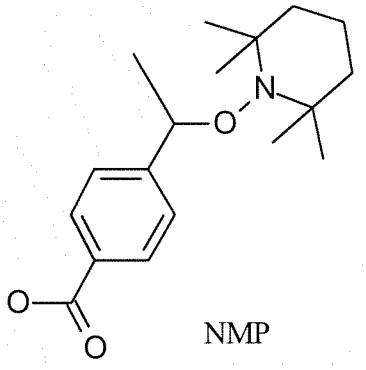
Les agents initiateurs ci-dessus pourront donc être greffés soit, selon un mode préféré, sur le chromophore pour réaliser la réaction de polymérisation, soit sous forme libre, éventuellement protégée. Dans ce dernier cas, le polymère obtenu sera ensuite couplé à un chromophore porteur d'au moins deux fonctions réactives permettant de greffer le chromophore à l'extrémité alpha d'au moins deux chaines de polymère.

Une manière simple d'envisager le greffage de la fonction initiatrice de polymérisation sur le chromophore consiste en une réaction d'estérification [-(CO)-O-] ou de formation d'amide (couplage peptidique -(CO)-NH-) entre un initiateur fonctionnalisé par un groupement acide carboxylique ou un carboxylate activé (carboxylate de N-hydroxysuccinimide, ou halogénure d'acyle), sur un chromophore, fonctionnalisé en autant de positions que le nombre de chaînes souhaité, par une fonction de type alcool ou amine (éventuellement aniline ou phénol). L'initiateur pourra donc comporter une

fonction acide carboxylique ou halogénure d'acyle, et pourra en particulier être choisi parmi les produits disponibles commercialement, en ce qui concerne les exemples ATRP et RAFT, synthétisables en 3 étapes pour l'exemple NMP (Studer *et al.* Org. Biomol. Chem., 2011, **9**, 2403–2412), représentés ci-dessous :



ATRP n = 2,10 RAFT



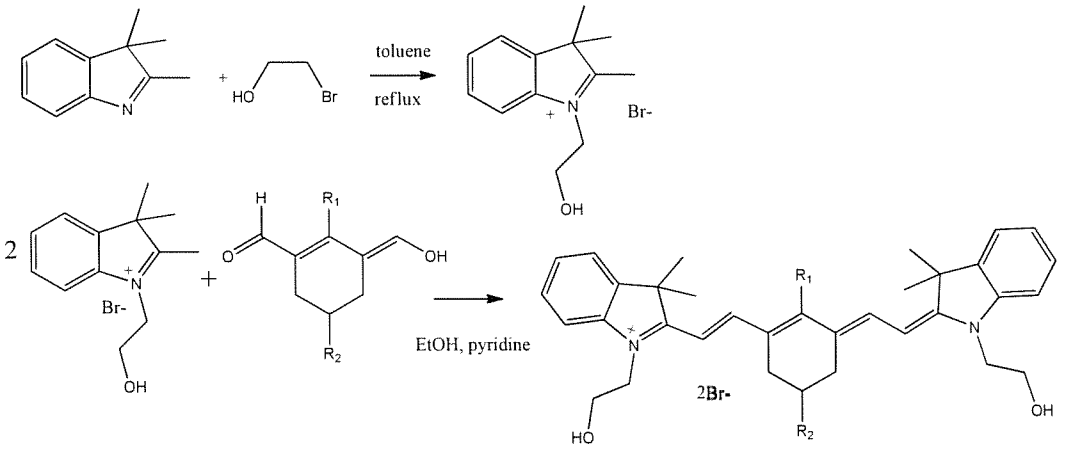
NMP

Afin de perturber le moins possible les propriétés spectroscopiques du chromophore, il est préférable que la fonction alcool ou amine utilisée pour le couplage ne soit pas impliquée dans la transition électronique de type CT photoinduite, et donc ne soit pas située sur l'enchainement pi-conjugué du chromophore. Il pourra donc en particulier s'agir d'alcool ou d'amines primaires aliphatiques. Par exemple, dans le cas de chromophores de type dipôles, quadripôles ou octupôles tels que décrits dans la figure page 9, si le groupement donneur d'électrons D est un dérivé d'aniline, on peut envisager une fonctionnalisation de type N,N-dihydroxyéthyl. De même si le groupement D est un dérivé de phénol, benzènediol ou benzènetriol (O-hydroxyéthyl) ou thiophénol(S-hydroxyéthyl). La N,N-dihydroxyéthylaniline, ainsi que son équivalent para aldéhyde, sont commerciales, et les réactions permettant d'obtenir à partir de ces structures une grande diversité de

chromophores cibles potentielles par diverses réactions (halogénation, couplages croisés organométalliques de type Sonogashira, Sille, Heck, Suzuki, Negishi..., condensations de Knoevenagel) sont bien connues de l'homme du métier. A partir des fonctions hydroxy terminales, les fonctions amines sont accessibles en trois étapes simples clairement décrites par Jung *et al.* (Chem. Mater. 2006, 18, 4713-4715).

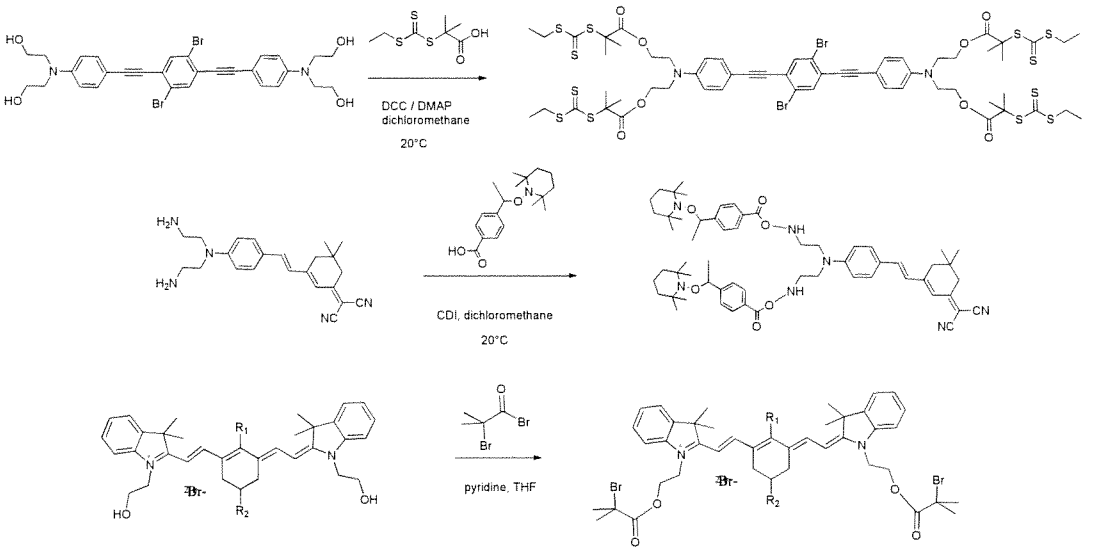
Pour les chromophores de type cyanine, la fonctionnalisation par N-alkylation des cycles indolinium est bien connue. Les procédés de préparation de cyanines N-substituées sur l'indolinium ont été décrits dans différents documents brevets dont DE 3721850.

De manière générale, de tels dérivés peuvent être obtenus par réaction de 2-bromohydroxyéthyl sur la 2,3,3-triméthylindoline à reflux du toluène pendant 15H, le sel d'indolium résultant étant obtenu par filtration du précipité formé, et mis à réagir dans une réaction de type condensation de Knoevenagel avec un dérivé de 5-hydroxypenta-2,4-diénal ou de 3-(hydroxyméthylène)cyclohex-1-ènecarbaldéhyde (Andraud *et al.* Chem. Mater. 2007, 19, 5325-5335). La voie de synthèse est décrite ci-dessous.



Les différents chromophores peuvent être engagés dans des réactions d'estérification ou de couplage peptidiques. Des revues détaillées et critiques sont disponibles concernant les différentes méthodologies d'activation de la fonction carbonyle développées pour la réalisation de couplages peptidiques (Montalbeni *et al.* Tetrahedron 61 (2005) 10827–10852) ou la formation d'esters (Haslam, Tetrahedron 36 (1980) 2409-2433). A titre d'exemples

illustrant la variété de chromophores fonctionnalisés par un groupement initiateur que l'on peut envisager, les trois cas suivant sont détaillés :

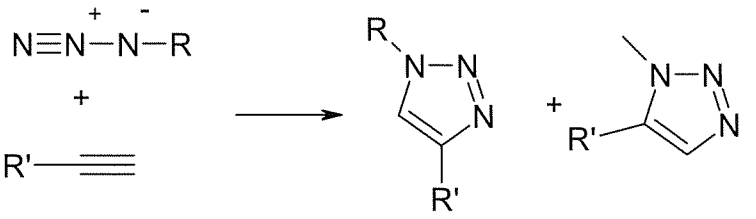


Selon un mode de réalisation préféré des entités chromophoriques et du procédé selon l'invention pouvant être combiné aux précédents, chaque chaine de polymère hydrosoluble est non chargée.

Selon des modes de réalisation préférés des entités chromophoriques et du procédé selon l'invention pouvant être combinés aux précédents, l'entité chromophorique comporte à l'extrémité Ω d'au moins une chaine polymérique, voire de toutes les chaines polymériques présentes :

- une fonctionnalisation permettant le greffage ultérieur de ligands biologiques ou d'autres molécules d'intérêt, notamment par « click chemistry ». En particulier, une telle fonctionnalisation peut correspondre à une fonction N_3 ou $-C\equiv X'$ avec X' = N ou CH. La fonction $-N_3$, par exemple, peut être facilement obtenue à partir d'un brome présent à l'extrémité Ω du polymère et provenant de l'agent initiateur, par action de NaN_3 (par exemple, comme décrit dans J. Am. Chem. Soc., v 129, n 13, Apr 4, 2007, 3979-3988).
- ou bien un ligand biologique lié de façon covalente à l'extrémité d'au moins une chaine polymérique. Dans ce cas les ligands biologiques pourront être greffés par réaction de « click chemistry » sur une fonction de type $-N_3$ ou $-C\equiv X'$ avec X' = N ou CH. Le mécanisme de

liaison chimique dénommé "click chemistry" (ou chimie click) ou réaction de Huisgen a été décrit pour la première fois par Huisgen et Szeimies dans Chem. Ber. 1967, 100, 2494 et Ber. 1965, 98, 4014. Ces publications décrivent une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire d'un dérivé azido sur un dérivé alcyne à haute température, selon le schéma ci-dessous :



De telles réactions seront réalisées avec une catalyse par le cuivre (I) pour contrôler la régiosélectivité de la cycloaddition entre un dérivé alcyne et un dérivé azoture comme décrit dans l'art antérieur (H. Kolb, M. Finn, K. Sharpless. Angew. Chem. Int. Ed. (2001), 40, 2004 notamment) ou encore activées thermiquement, ou activées par relâchement de tension de cycle. Pour plus de détails, on pourra également se référer à Chem. Soc. Rev., 2007, 36, 1249-1262 et à Macromol. Rapid. Commun. 2007, 28, 15-54.

Par "ligand biologique", on entend dans le cadre de l'invention un composé qui possède au moins un site de reconnaissance lui permettant de réagir avec une molécule cible d'intérêt biologique, par exemple du type protéines, protéines membranaires, enzymes, polypeptides, polynucléotides, polysaccharides, ADNs, ARNs...). A titre d'exemple de ligands biologiques, on peut citer les mono ou polysaccarides, les polynucléotides du type ADN ou ARN, les polypeptides, les anticorps, les antigènes, les protéines ...

En tant que monosaccharide, on peut citer, par exemple, le glucose, le galactose, le mannose, le fructose, et en tant que polysaccharide, par exemple, le sucrose, le lactose, le maltose.

Le terme "polynucléotide" signifie un enchaînement d'au moins 2 désoxyribonucléotides ou ribonucléotides comprenant éventuellement au moins un nucléotide modifié. Le polynucléotide peut être un oligonucléotide, un acide nucléique naturel ou son fragment comme un ADN, un ARN

ribosomique, un ARN messager, un ARN de transfert, un acide nucléique obtenu par une technique d'amplification enzymatique.

Par "polypeptide", on entend un enchaînement d'au moins deux acides aminés. Par acides aminés, on entend les acides aminés primaires qui codent pour les protéines, les acides aminés dérivés après action enzymatique comme la *trans*-4-hydroxyproline et les acides aminés naturels mais non présents dans les protéines comme la norvaline, la *N*-méthyl-L-leucine, la staline (Hunt S. dans Chemistry and Biochemistry of the amino acides, Barett G.C., ed., Chapman and Hall, London, 1985), les acides aminés protégés par des fonctions chimiques utilisables en synthèse sur support solide ou en phase liquide et les acides aminés non naturels.

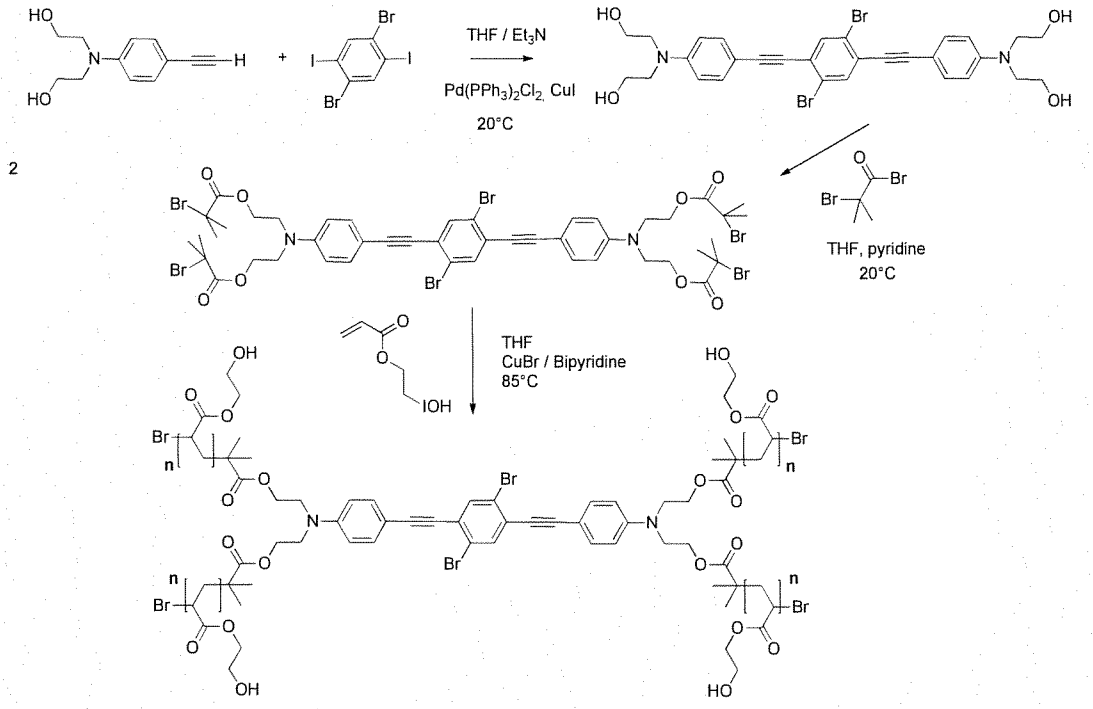
Le terme "anticorps" inclut les anticorps polyclonaux ou monoclonaux, les anticorps obtenus par recombinaison génétique et des fragments d'anticorps. Le terme "antigène" désigne un composé susceptible d'être reconnu par un anticorps dont il a induit la synthèse par une réponse immune. Le terme "protéine" inclut les holoprotéines et les hétéroprotéines comme les nucléoprotéines, les lipoprotéines, les phosphoprotéines, les métalloprotéines et les glycoprotéines aussi bien fibreuses que globulaires.

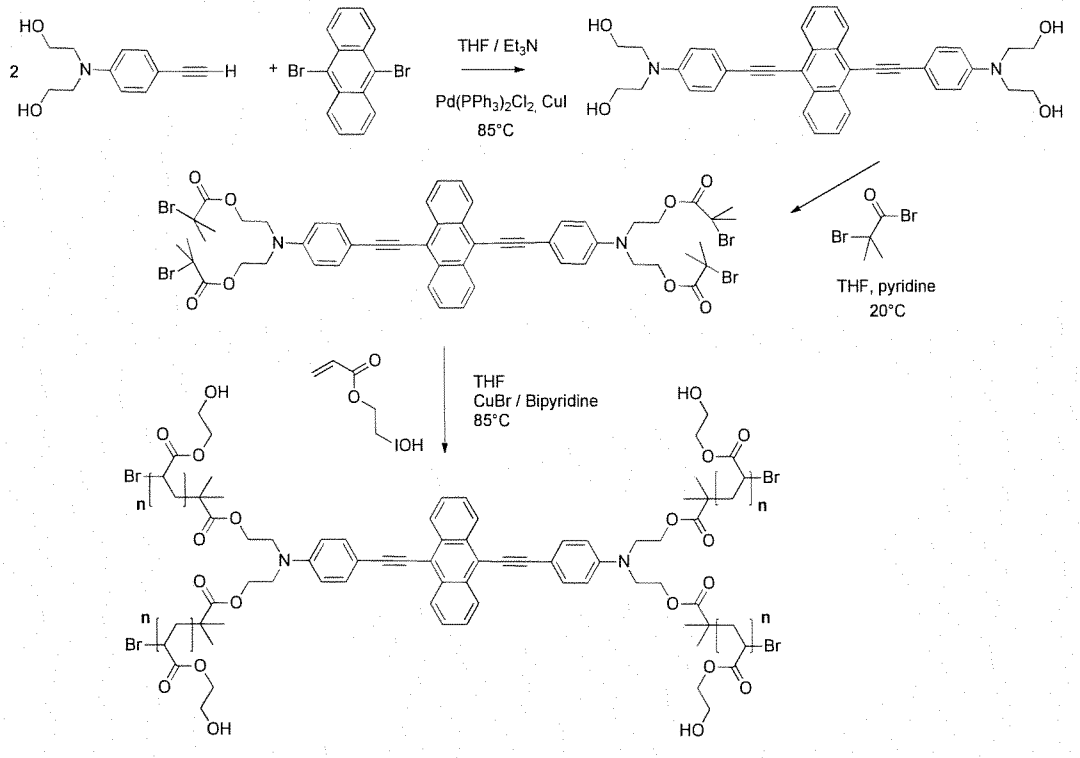
Dans le cadre de l'invention, et comme cela ressort des exemples ci-après, il a été démontré qu'il était possible d'hydrosolubiliser un chromophore lipophile, tout en préservant sa luminescence en milieu aqueux, avec une chute de la luminescence inférieure à 40% notamment, tout en maintenant une lipophilie suffisante pour maintenir l'internalisation des entités chromophoriques obtenues. On entend par « conservation de la luminescence en milieu aqueux», le fait pour une entité chromophorique hydrosoluble selon l'invention de posséder un rendement quantique dans l'eau proche de celui dans un solvant organique de référence, en particulier le dichlorométhane, du chromophore parant, c'est-à-dire du chromophore utilisé pour mener la polymérisation. Par « proche », on entend au moins égal à 50%, préférentiellement à 75%, idéalement égal à 100% du rendement quantique du chromophore parent dans le dichlorométhane. On entend par « rendement quantique de luminescence », le rapport entre le

nombre de photons émis par une quantité donnée de chromophores et le nombre de photons absorbés par cette même quantité de chromophores. Ce rapport est inférieur ou égal à 1, plus il est élevé, plus la molécule est luminescente.

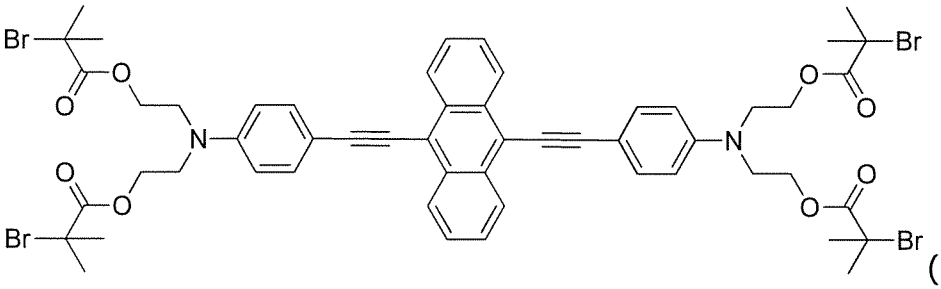
La solution proposée repose sur le choix des polymères utilisés qui comportent des fonctions hydroxy, en particulier des fonctions hydroxy pendantes présentes sur les chaines latérales des monomères utilisés. Le procédé selon l'invention est simple et permet d'obtenir des entités chromophoriques qui ne précipitent pas en cours de préparation. Il conduit à des entités chromophoriques très homogènes.

Les exemples ci-dessous permettent d'illustrer l'invention, mais n'ont aucun caractère limitatif.


THF / Et3N
Pd(PPh3)2Cl2, CuI
20°C
THF, pyridine
20°C
THF
CuBr / Bipyridine
85°C


THF / Et3N
Pd(PPh3)2Cl2, CuI
85°C
THF, pyridine
20°C
THF
CuBr / Bipyridine
85°C

- ***Synthèse de Ant-In de formule (1):***

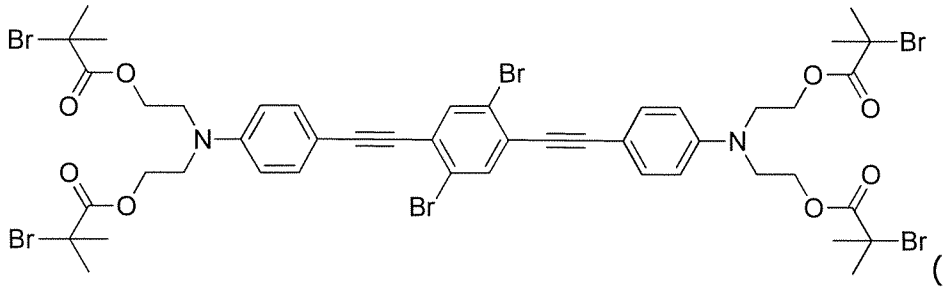


(1)

A une solution désoxygénée par bullage d'argon de 1,8-dibromoanthracène (100mg ; 0,3 mmol) and 4-éthynyl-N,N(bishydroxyéthyl)aniline (125 mg ; 0,6 mmol) dans le THF (3mL) et la triéthylamine (1mL) sont ajoutés $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (10mg ; 0,014mmol) et CuI (5mg ; 0,027 mmol). Le mélange est agité pendant 16H à 70°C, donnant lieu à la précipitation d'un solide rouge sombre. Les solvants sont évaporés, et le résidu est mis en suspension dans 10 mL de dichlorométhane puis filtré. Le solide obtenu est de nouveau mis en suspension dans 10 mL de dichlorométhane puis filtré. Le solide recueilli est dissout dans environ 10 mL de pyridine, filtré sur papier, et le papier filtre est lavé avec un grand volume de THF jusqu'à ce que ne subsiste plus qu'un résidu brun sur le papier. Le filtrat est isolé, et les solvants sont éliminés sous pression réduite, puis le solide est séché sous vide poussé. Le solide est ensuite dissout dans un mélange de THF (5mL) et de pyridine (80µL). Du bromure de bromoisobutyryle (340 mg, 5eq.) est ensuite ajouté à la solution rouge sombre. La solution d'un orange brillant ainsi obtenue est agitée à température ambiante pendant une heure, puis versée dans 50 mL d'un mélange 1 / 1 glace / HCl aq. 0,5M. Du dichlorométhane est ajouté, la phase organique est extraite, puis lavée de nouveau avec HCl aq. 0,5M. La phase organique est collectée, séchée sur sulfate de sodium, et les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le produit est chromatographié sur colonne de silice, avec élution au dichlorométhane. La bande orange est collectée, et 215 mg, d'un solide huileux orange foncé sont obtenus après évaporation (0,18mmol ; 60% sur deux étapes).

^{1}H NMR (200 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 8.68 (dd, *J* = 3.2 Hz, *J* = 6.6 Hz, 4H), 7.65 (m, 8H), 6.85 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 4.41 (t, *J* = 6 Hz, 8H), 3.80 (t, *J* = 6 Hz, 8H), 1.92 (s, 24H). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 171.2, 147.7, 133.2, 131.9, 127.4, 126.5, 118.5, 112.2, 111.7, 103.2, 85.5, 63.0, 55.5, 49.3, 30.8. HRMS calculé pour $[C_{54}H_{57}Br_4N_2O_8 + H]^+$ 1177.0843, trouvé 1177.0812. UV-vis (CH_2Cl_2) : λ_{max}(nm) [logε($M^{-1}.cm^{-1}$)] = 474 [4,38]

- ***Synthèse de DBB-In de formule (2):***



(2)

A une solution désaérée de 1,4-diiodo-2,5-dibromobenzene (120 mg, 0,245 mmol) (200mg ; 0,6 mmol) et de 4-éthynyl-N,N(bishydroxyéthyl)aniline (100mg ; 0,49 mmol) dans le THF (3mL) et la triéthylamine (1mL) sont ajoutés $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (7 mg ; 0,010mmol) et CuI (3,8mg ; 0,02 mmol). Le mélange est agité pendant 16H à 70°C, donnant lieu à la précipitation d'un solide orange ocre. Les solvants sont évaporés, et le résidu est mis en suspension dans 10 mL de dichlorométhane puis filtré. Le solide recueilli est dissout dans environ 10 mL de pyridine, filtré sur papier, et le papier filtre est lavé avec un grand volume de THF jusqu'à ce que ne subsiste plus qu'un résidu brun sur le papier. Le filtrat est isolé, et les solvants sont éliminés sous pression réduite, puis le solide est séché sous vide poussé. Le solide est ensuite dissout dans un mélange de THF (5mL) et de pyridine (150µL). Du bromure de bromoisobutyryle (285mg ; 1,25 mmol ; 5eq.) est ensuite ajouté à la solution orange. La solution d'un jaune brillant ainsi obtenue est agitée à température ambiante pendant une heure, puis versée dans 50 mL d'un mélange 1 / 1 glace / HCl aq. 0,5M. Du dichlorométhane est ajouté, la phase organique est extraite, puis lavée de nouveau avec HCl aq. 0,5M. La phase organique est collectée, séchée sur

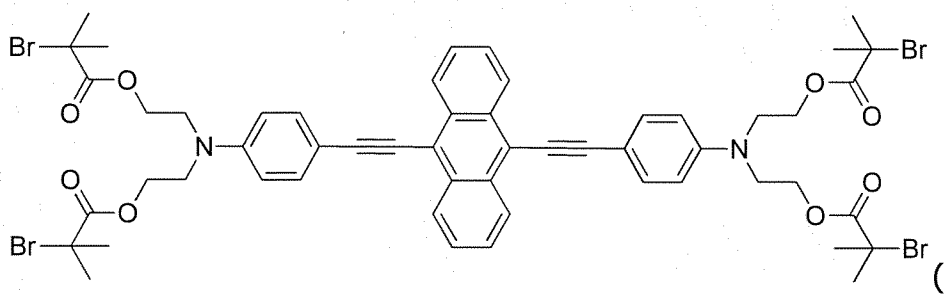
sulfate de sodium, et les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le produit est chromatographié sur colonne de silice, avec élution au dichlorométhane. La bande orange est collecté, et 140 mg, d'un solide jaune sombre sont obtenus après évaporation (0,12mmol ; 45% sur deux étapes). ^{1}H NMR (200 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 7.71 (s, 2H), 7.43 (d, *J* = 8.6 Hz, 4H), 6.75 (d, *J* = 8.6 Hz, 4H), 4.36 (t, *J* = 5.6 Hz, 8H), 3.75 (t, *J* = 5.6 Hz, 8H), 1.90 (s, 24H). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 171.7, 147.6, 135.5, 133.4, 126.3, 123.3, 111.9, 110.4, 97.6, 85.9, 62.9, 55.5, 49.1, 30.8. HRMS calculé pour $[C54H57Br4N2O8 + H]^+$ 1234.8720, trouvé 1234.8665 UV-vis (CH_2Cl_2) : λ_{max}(nm) [logε($M^{-1}.cm^{-1}$)] = 387 [4,68]

Procédure générale de polymérisation

0,02 mmol d'initiateur DBB-In or Ant-In précédemment préparé sont dissous dans un mélange de THF (1 mL) et de d'acrylate de 2-(2-hydroxyéthoxy)éthyle (HEA, 1mL) dans un tube. Le mélange est ensuite intensément désoxygéné par bullage d'azote pendant 15 mn, puis CuBr (12 mg, 0,085 mmol) et de la 2,2'-bipyridine (25mg, 0,016 mmol) et ajouté et le bullage d'azote maintenu pendant 1 minute. Le tube est alors scellé et chauffé à 85°C pendant 20 min. Le tube est ouvert et le mélange est versé sur de l'eau distillée (10 mL). La solution résultante est place dans un sac de dialyse est dialysée contre l'eau (le sac de dialyse est agité pendant 48h dans un bécher de 10 L plein d'eau distillée, dont le contenu est régulièrement remplacé par de l'eau fraiche). La solution jaune clair est transférée du sac de dialyse vers un ballon de 100 mL, et lyophilisée pendant 24h, donnant 100 mg d'une poudre fibreuse.

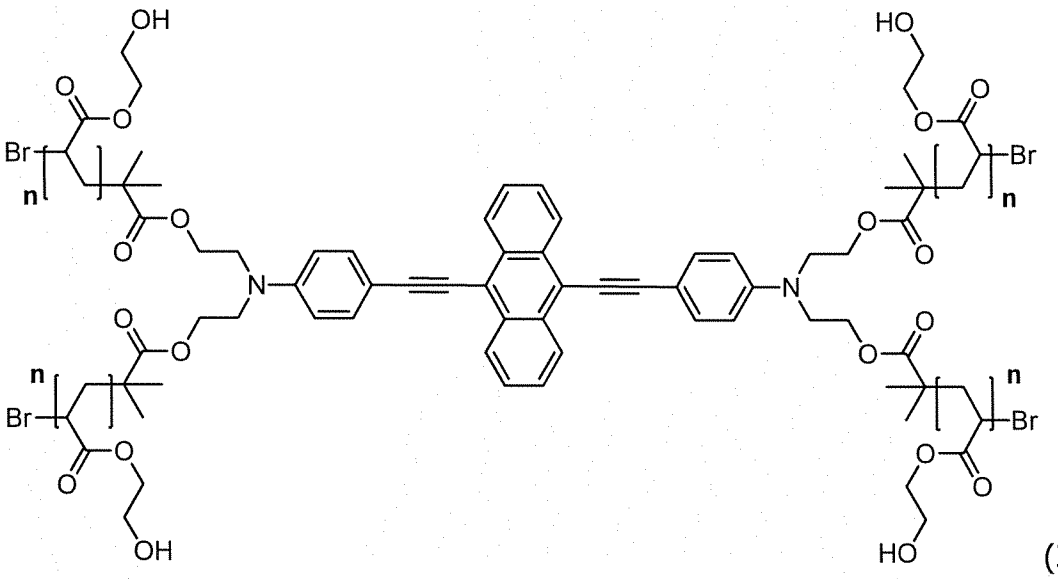
Selon une telle procédure, différents objets sont préparés, en réalisant la polymérisation avec l'hydroxyéthylacrylate (HEA) :

- avec l'initiateur Ant-In de formule (1):



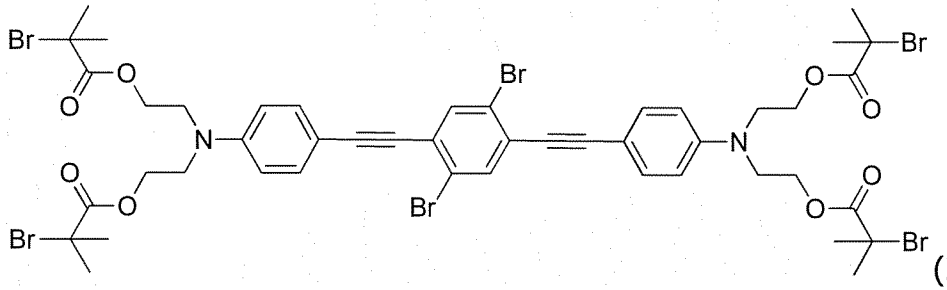
(1)

on obtient l'entité fluorescente Ant-PHEA de formule (3) :



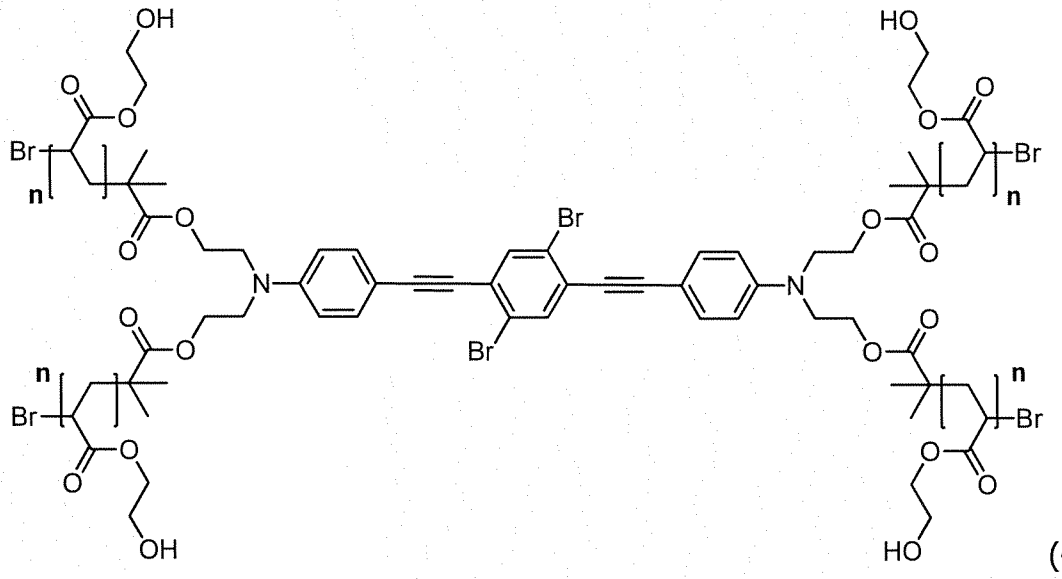
(3)

- avec l'initiateur DBB-In de formule (2):



(2)

on obtient l'entité fluorescente DBB-PHEA de formule (4) :



(4)

Ant-PHEA:

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD, ppm): δ 8.7 (b, 4H), 7.7 (m, 8H), 7.03(b, 4H), 4.2 (b, ≈110H), 3.80 (b, ≈110H), 2.45(b, ≈50H), 1.8 (b, ≈100H), 1.22 (b, 24H) ^{13}C NMR (50 MHz, CD_3OD, ppm): δ 177.1, 175.7, 169.6, 142.3, 132.8, 131.1, 127.5, 126.6, 118.2, 112.0, 110.3, 106.2, 86.1, 71.8, 67.2, 66.8, 62.1, 60.1, 59.8, 41.2, 34.7, 24.4.

DBB-PHEA:

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD, ppm): δ 7.79 (b, 2H), 7.46 (b, 4H), 6.93 (b, 4H), 4.6 (b, ≈50H), 4.2 (b, ≈110H), 3.80 (b, ≈110H), 2.45(b, ≈50H), 1.8 (b, ≈100H), 1.18 (b, 24H). δ 177.6, 175.7, 169.6, 148.5, 135.1, 133.1, 131.1, 126.3, 122.9, 112.1, 109.2, 86.4, 73.2, 66.1, 62.9, 60.1, 59.8, 41.2, 34.7, 24.4.

Leurs caractéristiques de fluorescence sont données dans le **TABLEAU 1** ci-après.

TABLEAU 1

Entité fluorescente	Solvant	Absorption maximale (nm)	Emission maximale (nm)	Déplacement de Stokes (nm)	Rdt Qf
DBB-In	toluène	386	425	256	0.25
	CH_2Cl_2	387	456	69	0.24
	MeOH	387	475	88	0.14
Ant-In	toluène	474	526	52	>1
	CH_2Cl_2	474 (500)	547	73 (47)	>1
	MeOH	494	556	62	0.95
DBB-PHEA	CH_2Cl_2	410	464	54	0.18
	MeOH	387	480	93	0.20
	H_2O	390	484	94	0.22
Ant-PHEA	CH_2Cl_2	500	554	54	0.97
	MeOH	500	564	64	0.95
	H_2O	512	575	63	0.62

Les spectres UV visible ont été enregistrés avec un spectrophotomètre UV-Visible JASCO 670. Les spectres de luminescence ont été mesurés avec un spectrophotomètre -Jobin Yvon Fluorolog-3. La luminescence est induite, sur des échantillons en solutions diluées placées dans des cuvettes de quartz quatre faces polies, d'une épaisseur de 10mm, par lumière non-polarisée provenant d'une lampe CW xenon 450W, et détectée à un angle de 90% par un photomultiplicateur Hamamatsu R928. Les spectres sont corrigés par rapport à un signal de référence pour compenser les fluctuations d'intensité de la lumière incidente (dues à la lampe et au monochromateur) et de réponse spectrale à la longueur d'onde d'émission (due au détecteur et monochromateur). Les rendements quantiques de fluorescence Qx_f sont mesurés en solution diluée (avec une densité optique inférieure à 0,1, correspondant à une concentration inférieure à environ 2 µM), en utilisant la méthode de Stern-Volmer basée sur l'équation suivante

$$Q_x/Q_r = [A_r(\lambda)/A_x(\lambda)][n_x^2/n_r^2][D_x/D_r]$$

Avec A l'absorbance de la solution à la longueur d'onde d'excitation (λ), n l'indice de réfraction et D l'intégrale du signal de luminescence mesuré. "r" and "x" signifiant respectivement « de la référence » et « de l'échantillon ».

Ici, les références utilisées sont la coumarine 153 dans le méthanol (Qr= 0.45) à 417 nm pour **DBB-In** et **DBB-PHEA** et la fluorescéine en solution aqueuse de soude 1M (Qr = 0,92) à 470 nm pour **Ant-In** et **Ant-PHEA**. L'excitation de la référence et de l'échantillon est réalisée à longueur d'onde identique.

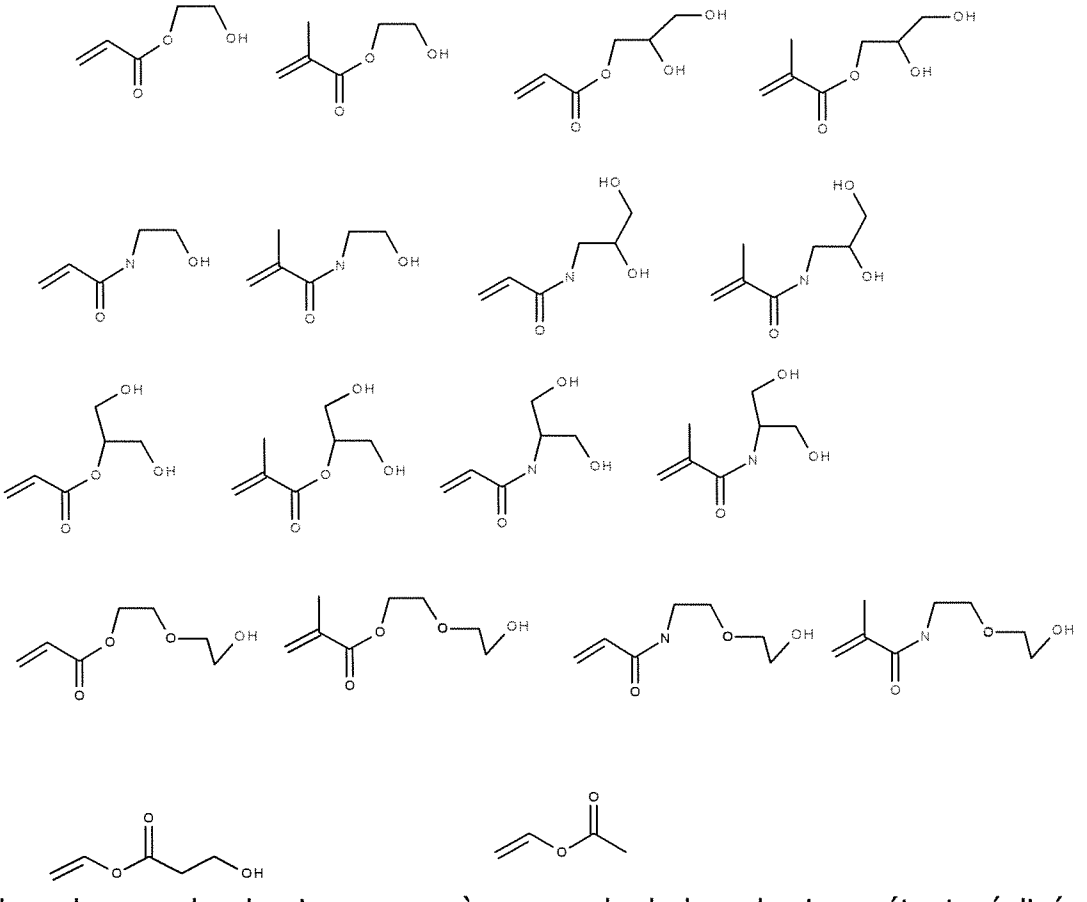
Dans le cas de DBB-PHEA, la conservation de la fluorescence est de 92% et de 62% dans le cas Ant-PHEA.

Des expériences d'incorporation réalisées par cytométrie en flux indiquent que le DBB-PHEA s'incorpore mieux dans les lignées cellulaires testées (baf-3 et B16-F10) que leurs analogues non-oligomérisés solubilisés en DMSO et au moins de manière équivalente à DBB dans un système micellaire de type Pluronic (c). La possibilité d'utiliser ces composés pour des applications en imagerie à un ou deux photons, et des applications de thérapie photodynamique, a pu, par ailleurs, être établie par des mesures de microscopie et de mort cellulaire après irradiation, pour Ant-PHEA et DBB-PHEA respectivement.

REVENDICATIONS

1 - Entité chromophorique hydrosoluble comportant au moins un chromophore lipophile lié de façon covalente à au moins deux chaines de polymère hydrosoluble caractérisée en ce que :

- chaque chaine de polymère hydrosoluble n'est liée de façon covalente qu'à un seul chromophore lipophile,
- et chaque chaîne de polymère porte plusieurs fonctions hydroxy et est obtenue par polymérisation d'un ou plusieurs monomères, un au moins des monomères utilisés étant choisis parmi :



dans le cas du dernier monomère, une hydrolyse basique étant réalisée avant polymérisation pour obtenir les fonctions hydroxy souhaitées.

2 - Entité chromophorique hydrosoluble selon la revendication 1 caractérisée en ce que chaque chaine de polymère hydrosoluble est obtenue par polymérisation radicalaire contrôlée.

3 - Entité chromophorique hydrosoluble selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que chaque chaine de polymère est obtenue par polymérisation ATRP, RAFT ou NMP.

4 - Entité chromophorique hydrosoluble selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que chaque chaine de polymère hydrosoluble est obtenue par polymérisation radicalaire contrôlée par réaction d'au moins un monomère avec le chromophore lipophile fonctionnalisé avec un initiateur de polymérisation.

5 - Entité chromophorique hydrosoluble selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'indice de polymolécularité des chaînes de polymère est inférieur à 1,5, de préférence inférieur à 1,3, idéalement inférieur à 1,1.

6 - Entité chromophorique hydrosoluble selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que chaque chaine de polymère est liée au chromophore lipophile de façon covalente par l'intermédiaire d'une liaison -O-C(O)- ou –O- ou –NH-C(O)-.

7 - Entité chromophorique hydrosoluble selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que chaque chaine de polymère hydrosoluble est non chargée.

8 - Entité chromophorique hydrosoluble selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle comporte, à l'extrémité Ω d'au moins une chaine polymérique, voire de toutes les chaines polymériques présentes, un brome, un thioester (-C(S)-S-) ou un nitroxyde (-O-N-).

9 - Entité chromophorique hydrosoluble selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisée en ce qu'elle comporte, à l'extrémité Ω d'au moins une chaine polymérique, voire de toutes les chaines polymériques présentes, une fonctionnalisation permettant le greffage ultérieur de ligands biologiques ou d'autres molécules d'intérêt, notamment par « click chemistry ».

10 - Entité chromophorique selon la revendication 9 caractérisée en ce que la fonctionnalisation correspond à une fonction N_3 ou $-C\equiv X$ avec X = N ou CH.

11 - Entité chromophorique hydrosoluble selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisée en ce qu'un ligand biologique est lié de façon covalente à l'extrémité Ω d'au moins une chaine polymérique, voire de toutes les chaines polymériques présentes.

12 - Entité chromophorique hydrosoluble selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que les chaines de polymères sont des polyacrylamides, des polyméthaacrylamides, des polymétacrylates, des polyacrylates ou des polyallylesters, sous forme homopolymères ou copolymères.

13 - Entité chromophorique hydrosoluble selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que chaque chaine de polymères comprend de 4 à 30 unités monomériques.

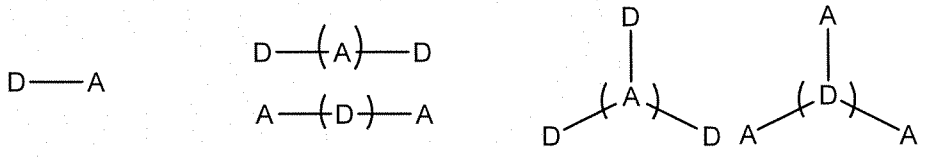
14 - Entité chromophorique hydrosoluble selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que les chromophores lipophiles sont des chromophores à propriétés optiques non linéaires.

15 - Entité chromophorique hydrosoluble selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que les chromophores lipophiles sont des fluorophores.

16 - Entité chromophorique hydrosoluble selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que les chromophores lipophiles sont choisis parmi les dipôles, quadripôles ou octupôles.

17 - Entité chromophorique hydrosoluble selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que les chromophores lipophiles sont choisis parmi les dipôles, quadripôles ou octupôles représentés schématiquement par :

dipôle Quadrupôle Octupôle



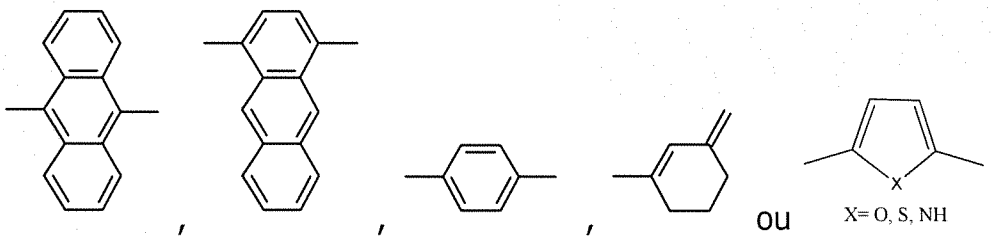
avec D qui est un groupement donneur d'électrons, par exemple de type aniline N substituées, éther de phénol ou éther de thiophénol,

et A qui est un groupement accepteur, par exemple de type nitro ou cyano,

et le bras de connexion symbolisée par la ligne pleine est un enchaînement conjugué ininterrompu,

l'utilisation de parenthèse signifiant que la présence du groupe figurant entre ces parenthèses est accessoire à la définition.

18 - Entité chromophorique hydrosoluble selon la revendication 17 caractérisée en ce que l'enchainement conjugué ininterrompu est un enchainement hydrocarboné pouvant être substitué ou non substitué, dans lequel alternent des liaisons saturées et des liaisons insaturées choisies parmi les double et les triple liaisons, les liaisons insaturées, et en particulier les doubles liaisons, pouvant être intégrées à un cycle, de préférence à un cycle hydrocarboné, par exemple choisi parmi :



19 - Entité chromophorique hydrosoluble selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que les chromophores lipophiles appartiennent à la famille des cyanines ou des mérocyanines.

20 - Procédé de préparation d'une entité chromophorique selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que chaque chaine de polymère hydrosoluble est obtenue par polymérisation radicalaire contrôlée.

21 - Procédé selon la revendication 20 caractérisé en ce que chaque chaine de polymère est obtenue par polymérisation ATRP, RAFT ou NMP.

22 - Procédé selon la revendication 20 ou 21 caractérisé en ce que chaque chaine de polymère est obtenue par polymérisation radicalaire contrôlée par réaction du chromophore lipophile fonctionnalisé avec un initiateur de polymérisation et au moins un monomère.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2012/051711

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C09B69/10 G01N33/532
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C09B G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SI KYUNG YANG ET AL: "Monovalent, Clickable, Uncharged, Water-Soluble Perylenediimide-Cored Dendrimers for Target-Specific Fluorescent Biolabeling", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 133, no. 26, 6 July 2011 (2011-07-06) , pages 9964-9967, XP55020706, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja2009136 page 9964; figure 1; compound 3 the whole document	1-22
A	US 2010/022737 A1 (TAKEUCHI TAKAYUKI [JP] ET AL) 28 January 2010 (2010-01-28) the whole document	1-22
A	US 6 022 944 A (WEAVER MAX ALLEN [US] ET AL) 8 February 2000 (2000-02-08) the whole document	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 September 2012	17/10/2012

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Durand-Oral, Ilknur

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2012/051711

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010022737 A1	28-01-2010	JP 4377446 B2	02-12-2009
		JP 2009108333 A	21-05-2009
		US 2010022737 A1	28-01-2010
		WO 2008069274 A1	12-06-2008
US 6022944 A	08-02-2000	US 6022944 A	08-02-2000
		US 6426416 B1	30-07-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2012/051711

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C09B69/10 G01N33/532
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C09B G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SI KYUNG YANG ET AL: "Monovalent, Clickable, Uncharged, Water-Soluble Perylenediimide-Cored Dendrimers for Target-Specific Fluorescent Biolabeling", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 133, no. 26, 6 juillet 2011 (2011-07-06), pages 9964-9967, XP55020706, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja2009136 page 9964; figure 1; composé 3 le document en entier	1-22
A	US 2010/022737 A1 (TAKEUCHI TAKAYUKI [JP] ET AL) 28 janvier 2010 (2010-01-28) le document en entier	1-22
A	US 6 022 944 A (WEAVER MAX ALLEN [US] ET AL) 8 février 2000 (2000-02-08) le document en entier	1-22

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
10 septembre 2012	17/10/2012

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Durand-Oral, Ilknur

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/FR2012/051711

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2010022737 A1	28-01-2010	JP 4377446 B2	02-12-2009
		JP 2009108333 A	21-05-2009
		US 2010022737 A1	28-01-2010
		WO 2008069274 A1	12-06-2008
US 6022944 A	08-02-2000	US 6022944 A	08-02-2000
		US 6426416 B1	30-07-2002