



(51) Classification internationale des brevets :
C09K 11/06 (2006.01) **C08G 83/00** (2006.01)
A61N 5/06 (2006.01) **C07D 333/06** (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2016/053198

(22) Date de dépôt international :
2 décembre 2016 (02.12.2016)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1561898 4 décembre 2015 (04.12.2015) FR

(71) Déposants : **UNIVERSITE DE RENNES 1** [FR/FR]; 2, rue du Thabor, 35065 Rennes (FR). **UNIVERSITE DE MONTPELLIER** [FR/FR]; 163, rue Auguste Broussonnet, 34090 Montpellier (FR). **UNIVERSITE DE BORDEAUX** [FR/FR]; 35, place Pey Berland, 33000 Bordeaux (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris (FR). **BORDEAUX INP** [FR/FR]; Avenue des Facultés, CS 60099, Talence Cedex 33405 (FR).

(72) Inventeurs : **SOURDON, Aude**; 47B Avenue St-Laurent, 91400 Orsay (FR). **MONGIN, Olivier**; 21, Square Antoine de Condorcet, 35700 Rennes (FR). **BLANCHARD-DESCE, Mireille**; 2, Place Etienne Dolet, 33130 Begles (FR). **GARY-BOBO, Magali**; 14, rue Romani, 34170 Castelnau-le-lez (FR). **GARCIA, Marcel**; 79b, rue de

l'Occitanie, 34730 Prades-le-lez (FR). **MAYNADIER, Marie**; Chemin des Oliviers, Route de Montlong, 34800 Ceyras (FR).

(74) Mandataires : **GROSSET-FOURNIER, Chantal** et al.; Grosset-Fournier & Demachy, 54, rue Saint-Lazare, F-75009 Paris (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.

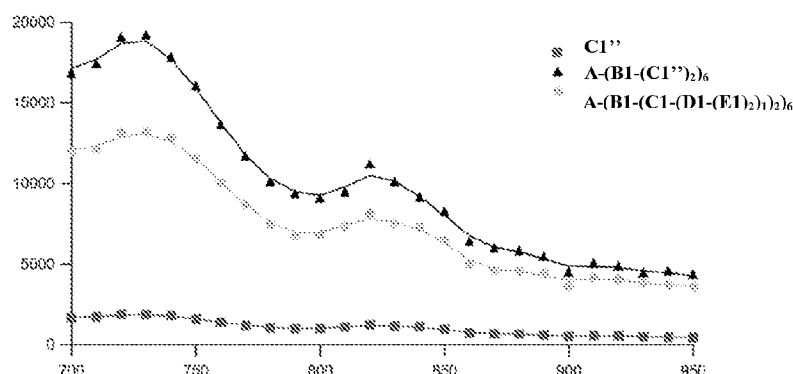
(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : BIPHOTONIC PHOTOSENSITIZING DENDRIMERS, MANUFACTURING METHOD AND USES

(54) Titre : DENDRIMERES PHOTOSENSIBILISATEURS BIPHOTONIQUES, PROCEDE DE FABRICATION ET UTILISATIONS

Figure 4



(57) Abstract : The present invention relates to a biphotonic photosensitizing chemical compound made up of a dendrimer, the manufacturing method thereof and the use thereof, in particular in fluorescence imaging and/or for two-photon dynamic phototherapy.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère, son procédé de fabrication et son utilisation, en particulier en imagerie de fluorescence et/ou pour la photothérapie dynamique à deux photons.



Publiée :

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

DENDRIMERES PHOTOSENSIBILISATEURS BIPHOTONIQUES, PROCEDE DE FABRICATION ET UTILISATIONS

L'invention concerne des dendrimères photosensibilisateurs biphotoniques, leur procédé de fabrication et leur utilisation.

La présente invention concerne plus particulièrement des dendrimères photosensibilisateurs biphotoniques, leur procédé de fabrication et leur utilisation en imagerie de fluorescence ou pour la photothérapie dynamique à deux photons.

La photothérapie dynamique est une technique douce pouvant être utilisée, par exemple, dans le traitement de cancers, par l'injection d'une substance non toxique en l'absence de lumière qui a la propriété, une fois soumise à une excitation lumineuse, de se transformer en poison par la formation de radicaux libres.

Des photosensibilisateurs pour la thérapie photodynamique sont aujourd'hui commercialisés, tels que le Photofrin® de PINNACLE BIOLOGICS, le Foscan® (Temoporfin ou M-THPC) de BIOLITEC PHARMA ITD., ou la Visudyne® (Verteporfin) de NOVARTIS EUROPHARM LTD. D'autres comme le Photosense® ont obtenu une autorisation de mise sur le marché. Tous ces composés sont des dérivés porphyriniques et possèdent des rendements quantiques d'oxygène singulet élevés ainsi que des rendements de fluorescence raisonnables. Cependant, les patients ayant été traités en thérapie photodynamique avec les photosensibilisateurs monophotoniques, tels que le Photofrin, restent photosensibles plusieurs jours (voire plusieurs semaines) après le traitement, et doivent éviter pendant cette période toute exposition de la peau et des yeux à la lumière du soleil ou aux lumières intérieures vives (ampoules sans abat-jour, lumières des néons...). Le non-respect de ces précautions peut entraîner des érythèmes, des œdèmes et/ou la formation de cloques.

L'absorption biphotonique est un processus d'optique non-linéaire permettant l'absorption simultanée de deux photons. L'excitation biphotonique, dépendant de manière quadratique de l'intensité lumineuse, ne se produit en pratique qu'au point où celle-ci est maximale, c'est-à-dire au point focal. Cette propriété de localisation de l'excitation permet d'accéder à des résolutions tridimensionnelles intrinsèques impossibles à obtenir avec une absorption monophotonique. Cette technique présente également l'avantage de pénétrer plus en profondeur dans les tissus biologiques.

Des dendrimères fluorescents ont été décrits précédemment [*“Dendrimeric fluorescent compounds and use of such compounds in multi-photon devices or processes”*, M. Blanchard-Desce, M. Werts, O. Mongin, J. P. Majoral, A. M. Caminade, R. Thataverthy, *PCT Int. Appl.* **2007**, WO 2007080176]. L’innocuité de la plateforme dendrimérique utilisée pour former ces dendrimères a été démontrée. De plus, ces dendrimères présentent une réponse biphotonique très élevée pouvant atteindre jusqu’à environ 56 000 GM pour un dendrimère de génération 4. Cependant ces dendrimères ne possèdent pas la capacité de générer des radicaux libres sous excitation biphotonique.

Des photosensibilisateurs biphotoniques quadripolaires ont été incorporés dans des nanoparticules de silice mésoporeuses et ont montré une efficacité *in vitro* et *in vivo* vis-à-vis de la thérapie photodynamique [*“Biphotonic photosensitizers, nanoparticles containing the same and their use as drugs”*, D. Brevet, L. Raehm, M. Blanchard-Desce, O. Mongin, M. Gary-Bobo, M. Garcia, A. Morère, J.-O. Durand, *PCT Int. Appl.*, **2011**, WO 2011073054]. L’incorporation de photosensibilisateurs quadripolaires symétriques dans des nanoparticules de silice mésoporeuses permet d’accéder à des systèmes efficaces sous excitation biphotonique. Cependant, ces nanoparticules de silice sont des particules globalement polydisperses dont le diamètre peut être compris de 30 à 300 nm. Les nanoparticules de silice sont, de plus, des particules « dures » dont la toxicité est mal connue ce qui exclut un passage aux essais cliniques.

Il existe donc un besoin en composés non toxiques pour le vivant avec une brillance à deux photons (produit de la section efficace à deux photons par le rendement quantique de fluorescence) élevée.

Il existe également un besoin en composés non toxiques pour le vivant capables d’être utilisés en imagerie de fluorescence par absorption mono- ou biphotonique.

Il existe également un besoin en composés non toxiques pour le vivant avec une brillance à deux photons élevée capables d’être utilisés en thérapie photodynamique induite à deux photons et non phototoxiques à la lumière du jour.

C’est pourquoi l’un des buts de l’invention est la formation de dendrimères photosensibilisateurs biphotoniques.

Un autre but de l’invention est de fournir un procédé de fabrication de tels dendrimères.

Un autre but de l'invention est l'utilisation de dendrimères photosensibilisateurs biphotoniques en thérapie photodynamique induite à deux photons.

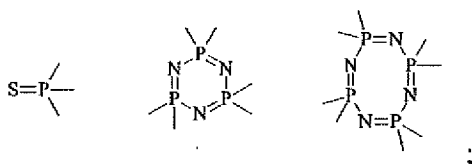
Un autre but de l'invention est l'utilisation de photosensibilisateurs biphotoniques en imagerie de fluorescence induite à un ou deux photons.

La présente invention concerne ainsi un composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale



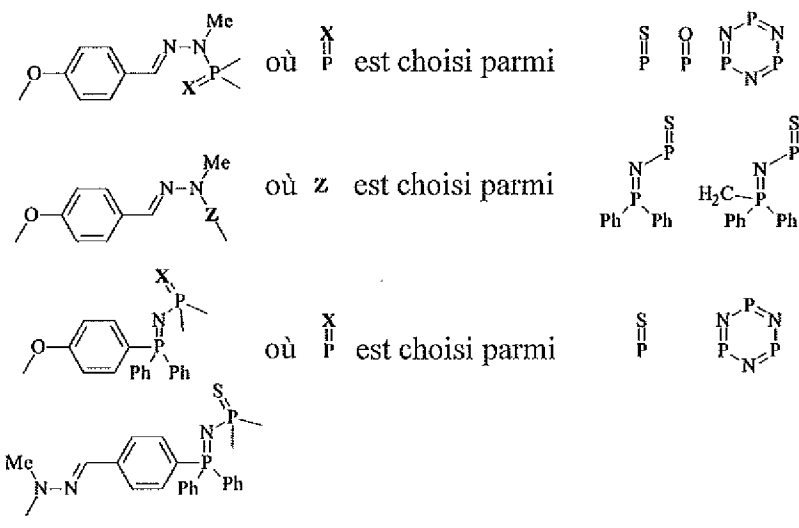
où :

- A représente un cœur phosphoré choisi parmi



m correspondant à la valence du cœur phosphoré A et étant un entier non nul compris de 3 à 8;

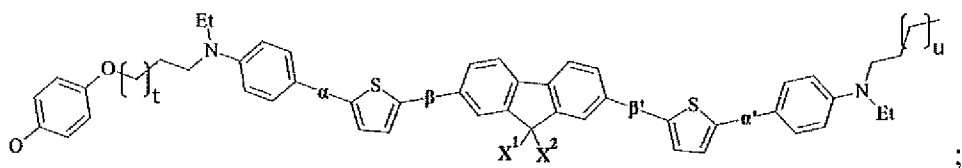
- B représente un premier motif, non chromophorique, directement lié m fois audit cœur phosphoré et choisi parmi



n correspondant à la valence du premier motif B et étant un entier non nul compris de 2 à 5 ; i représentant le nombre d'unités de répétition successives du premier motif B greffée sur une branche et étant égal à 0 ou étant un entier compris de 1 à 10, notamment de 1 à 4 ;

- C représente un second motif, chromophorique, présentant des propriétés d'absorption à deux photons, et étant lié n fois directement audit premier motif B lorsque i est différent de 0 ou étant lié m fois directement audit cœur phosphoré A lorsque i est égal à 0 ;

ledit second motif C étant de formule

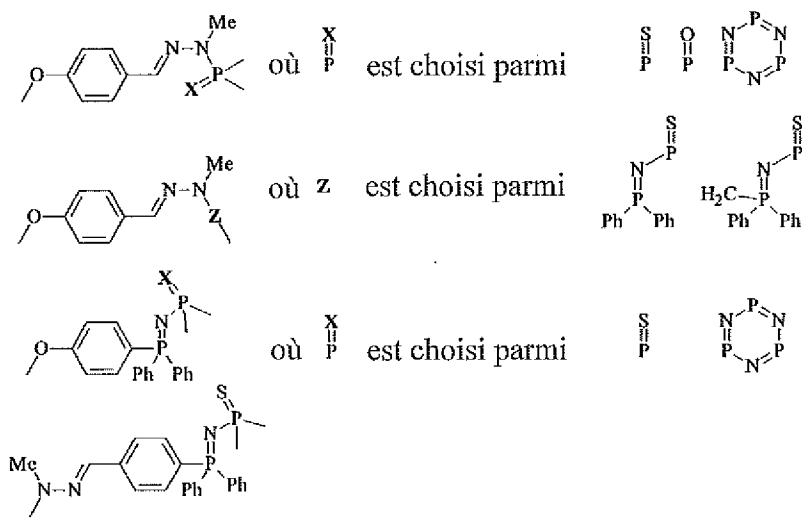


α , β , α' et β' représentant indépendamment les uns des autres soit un groupement $-\text{CH}=\text{CH}-$ soit un groupement $-\text{C}\equiv\text{C}-$;

t et u représentant indépendamment l'un de l'autre un entier compris de 0 à 9 ;

X_1 et X_2 , identiques ou différents, représentant chacun un groupement alkyle en C_1 à C_{25} , avantageusement en C_1 à C_{12} , de préférence en C_4 , $(\text{CH}_2)_x\text{-SO}_3\text{M}$, $(\text{CH}_2)_x\text{NAlk}_3^+$, $(\text{CH}_2)_x\text{-(OCH}_2\text{-CH}_2)_y\text{-OH}$, M étant un métal alcalin et x étant égal à 0 ou étant un entier compris de 1 à 12, préférentiellement de 1 à 6, y étant un entier compris de 1 à 25 ; q correspondant à la valence du second motif C et étant un entier non nul, notamment égal à 1 ;

- D représente un appendice d'agrafage rattaché q fois directement audit second motif C, et choisi parmi



p correspondant à la valence de l'appendice d'agrafage D et étant un entier non nul compris de 2 à 5, notamment égal à 2 ; j représentant le nombre d'unités de répétition

successives de l'appendice d'agrafage D greffée sur une branche et étant égal à 0 ou étant un entier compris de 1 à 5 ; notamment de 1 à 2 ;

- E représente un groupement hydrosolubilisant et/ou une fonction de ciblage, l'ensemble de ces groupements hydrosolubilisants et/ou fonctions de ciblage formant une couche périphérique sur le dendrimère ; ledit groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage étant directement liés p fois audit appendice d'agrafage D lorsque j est différent de 0 ou étant directement liés q fois audit second motif C lorsque j est égal à 0.

Les « dendrimères » sont des polymères fonctionnels hautement ramifiés de structure définie présentant une construction en arborescence. Ces macromolécules sont des polymères puisqu'elles sont basées sur la répétitivité d'un ou plusieurs motifs. Cependant, les dendrimères diffèrent fondamentalement des polymères classiques dans la mesure où ils ont des propriétés propres dues à leur construction en arborescence. Le poids moléculaire et la forme des dendrimères peuvent être contrôlés précisément. Ils peuvent être dotés de fonctions terminales situées à la terminaison des arborescences, formant une couche périphérique, en surface, rendant ces fonctions terminales facilement accessibles.

Les dendrimères sont construits étape par étape, en partant d'un noyau, par la répétition d'une séquence de réactions permettant la multiplication de chaque motif de façon répétitive et des fonctions terminales. Chaque séquence de réaction forme ce qui est appelé une nouvelle « génération ».

Les dendrimères photosensibilisateurs biphotoniques de la présente invention sont également notés nano-objets.

Dans la présente invention, le diamètre des dendrimères est compris de 5 nm à 20 nm. Or la taille du photosensibilisateur va, entre autres paramètres, conditionner son comportement dans les milieux biologiques. Ainsi les photosensibilisateurs d'une taille supérieure à 100 nm sont susceptibles de s'accumuler et de boucher les capillaires. En effet, ces petits vaisseaux ont un diamètre de 4 µm chez l'homme et 3 µm chez la souris. A l'inverse, les marqueurs de petite taille (inférieure à 1 ou 2 nm de diamètre) diffusent à travers les parois des tissus biologiques (comme la paroi endothéliale, ce qui présente des inconvénients pour une utilisation en angiographie).

Au sens de la présente invention, le terme « chromophore » désigne un composé chimique possédant une absorption non négligeable de la lumière dans la gamme de l'UV-

visible, c'est-à-dire dans une gamme comprise de 250 à 700 nm. Une absorption non négligeable de la lumière s'entend d'un coefficient d'extinction molaire (ϵ) supérieur à $1\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Le terme « photosensibilisateur » désigne une substance capable d'absorber la lumière pour initier une réaction photochimique ou photophysique dans une autre molécule, sans être structuellement affectée au cours de la réaction. Dans la présente invention, la réaction photochimique initiée est la génération d'oxygène singulet et/ou d'autres espèces oxygénées réactives. Les molécules de dioxygène singulet ($^1\text{O}_2$) sont obtenues à partir du dioxygène triplet ($^3\text{O}_2$) par un transfert de l'énergie d'excitation du photosensibilisateur excité au dioxygène à l'état électronique triplet (état fondamental).

Le terme « biphotonique » fait référence à une absorption à deux photons. L'« absorption à deux photons » correspond à une absorption simultanée de deux photons de fréquence identique dans le but d'exciter une molécule d'un état électronique (en général l'état fondamental) à un état électronique de plus haute énergie. La différence d'énergie entre les deux états électroniques impliqués de la molécule est égale à la somme des énergies de chacun des deux photons. L'absorption à deux photons est plus faible de plusieurs ordres de magnitude que l'absorption linéaire et est ainsi un phénomène rare. Elle diffère de l'absorption linéaire par sa dépendance au carré de l'intensité lumineuse, rendant ce phénomène un processus d'optique non linéaire.

L'absorption à deux photons est caractérisée et quantifiée par sa section efficace d'absorption à deux photons notée σ_2 . Le terme « GM » correspond à l'unité de la section efficace à deux photons. « GM » signifie Göppert-Mayer et 1 GM correspond à $10^{-50}\text{ cm}^4\cdot\text{s}\cdot\text{photon}^{-1}$.

Selon un mode de réalisation de l'invention, ledit dendrimère possède une section efficace d'absorption à deux photons supérieure à 5 000 GM, avantageusement supérieure à 10 000 GM, plus avantageusement supérieure à 15 000 GM, de préférence supérieure à 20 000 GM pour au moins une valeur de longueurs d'ondes comprise de 700 à 900 nm, en particulier à 730 nm.

Les sections efficaces d'absorption à deux photons de la présente invention sont déterminées par la technique de fluorescence par excitation à deux photons (TPEF ; *vide infra*). Les mesures sont effectuées à l'aide d'un laser titane:saphir délivrant des impulsions de 150 femtosecondes, en utilisant le protocole expérimental de Xu et Webb. [C. Xu, W. W. Webb, "Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm", *J. Opt. Soc. Am. B: Opt. Phys.* **1996**, *13*, 481-491].

Selon un mode de réalisation de l'invention, ledit dendrimère présente un rendement quantique de production d'oxygène singulet compris de 5 à 30 %, de préférence compris de 10 à 20 %.

Le rendement quantique de production d'oxygène singulet (Φ_{Δ}) représente le nombre de molécules d'oxygène singulet générées par rapport au nombre de photons absorbés par le photosensibilisateur, et est déterminé par comparaison entre la luminescence de l'oxygène singulet produit par le photosensibilisateur à 1272 nm et celle produite par un photosensibilisateur de référence à la même longueur d'onde dans les mêmes conditions. (*vide infra* « Méthode de quantification de la production d'oxygène singulet »).

Selon un mode de réalisation de l'invention, ledit dendrimère présente un rendement quantique de fluorescence supérieur à 10 %, avantageusement supérieur ou égal à 15 %, de préférence supérieur ou égal à 30 %.

Le rendement quantique de fluorescence (Φ_F) représente le nombre de photons émis directement par le dendrimère par rapport au nombre de photons absorbés et est déterminé par comparaison à une référence. Ce rendement correspond à la fraction de molécules excitées dont le retour à l'état fondamental est accompagné de l'émission de photons.

Selon un mode de réalisation de l'invention, ledit dendrimère présente une brillance d'absorption à deux photons supérieure à 500 GM, avantageusement supérieure à 1 000 GM, plus avantageusement supérieure à 1 500 GM, de préférence supérieure à 2 000 GM pour au moins une valeur de longueurs d'ondes comprise de 700 à 900 nm, en particulier à 730 nm. La « brillance d'absorption à deux photons » est définie comme le produit de la section efficace à deux photons et du rendement quantique de fluorescence.

Selon un mode de réalisation de l'invention, ledit dendrimère n'est pas phototoxique sous une excitation comprise de 400 à 700 nm avec un éclairage compris de 200 à 3 000 lx, avantageusement de 1 000 à 2 000 lx, de préférence de 1 000 lx.

Le lux, unité de mesure de l'éclairage, caractérise le flux lumineux par unité de surface et 1 lx correspond à $1 \text{ cd} \cdot \text{sr} \cdot \text{m}^{-2}$.

Au sens de l'invention, un composé « phototoxique » désigne un composé rendu nocif pour son environnement par une excitation lumineuse. Plus précisément, dans la présente invention, les dendrimères sont rendus nocifs sous excitation biphotonique par leur capacité à générer de l'oxygène singulet mais, à la lumière du jour telle que définie par une excitation comprise de 400 à 700 nm avec un éclairage compris de 200 à 3 000 lx, les dendrimères de l'invention ne génèrent pas d'oxygène singulet.

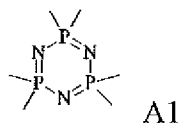
Une absence de phototoxicité à la lumière du jour est généralement due à un effet écran de molécules absorbant fortement la lumière UV-visible telle que des squarates (phenylaminocyclobutenedione) ou à la diffusion de la lumière par des particules dont le diamètre est de l'ordre de quelques centaines de nanomètres. La présente invention repose cependant sur l'observation inattendue, par les Inventeurs, de l'absence de phototoxicité à la lumière du jour malgré l'omission, dans la structure des dendrimères, de groupements squarates (phenylaminocyclobutenedione) et en absence de diffusion de la lumière.

Cette caractéristique peut s'expliquer, *a posteriori*, d'une part de la présence de nombreuses sous-unités absorbant dans l'UV dans le squelette dendrimérique faisant ainsi écran à l'excitation à un photon et permettant de remplacer efficacement les groupements squarates et d'autre part à une efficacité de production d'oxygène singulet plus élevée à deux photons ($\sigma_2 \cdot \Phi_A$) qu'à un photon ($\varepsilon \cdot \Phi_A$). Cette différence d'efficacité se traduit d'une section efficace élevée (supérieure à 5 000 GM, avantageusement supérieure à 10 000 GM, plus avantageusement supérieure à 15 000 GM, de préférence supérieure à 20 000 GM) et d'un rendement quantique d'oxygène singulet modéré compris de 5 à 30 %, de préférence compris de 10 à 20 %.

Les dendrimères de la présente invention présentent aussi l'avantage, par rapport aux nanoparticules de silice mésoporeuses de l'art antérieur [*"Biphotonic photosensitizers, nanoparticles containing the same and their use as drugs"*, D. Brevet, L. Raehm, M. Blanchard-Desce, O. Mongin, M. Gary-Bobo, M. Garcia, A. Morère, J.-O. Durand, *PCT Int. Appl.*, **2011**, WO 2011073054], d'être des nano-objets plus petits (diamètre), de taille unique et monodisperses, purement organiques et parfaitement caractérisés. Ces caractéristiques permettent d'obtenir des composés parfaitement reproductibles et dont l'innocuité de la plateforme dendrimérique a été démontrée.

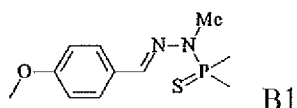
De plus, en comparaison des photosensibilisateurs actuellement commercialisés pour des applications en photothérapie dynamique, les dendrimères de la présente invention permettent de traiter des tumeurs avec une résolution spatiale élevée tout en réduisant les effets secondaires non désirés liés à la photosensibilisation des patients à la lumière du jour.

Selon un mode de réalisation avantageux, le cœur phosphoré A de valence m du composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$ de l'invention est de formule A1, m étant égal à 6.



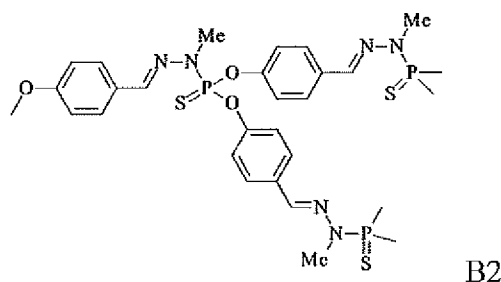
Ce cœur phosphoré présente une valence de 6 qui permet d'accéder en peu d'étapes de synthèse à des dendrimères possédant un nombre élevé de chromophores tout en évitant un encombrement stérique trop important.

Selon un mode de réalisation avantageux, le premier motif B de valence n répété i fois, est de formule B1, n étant égal à 2 et i étant égal à 1.

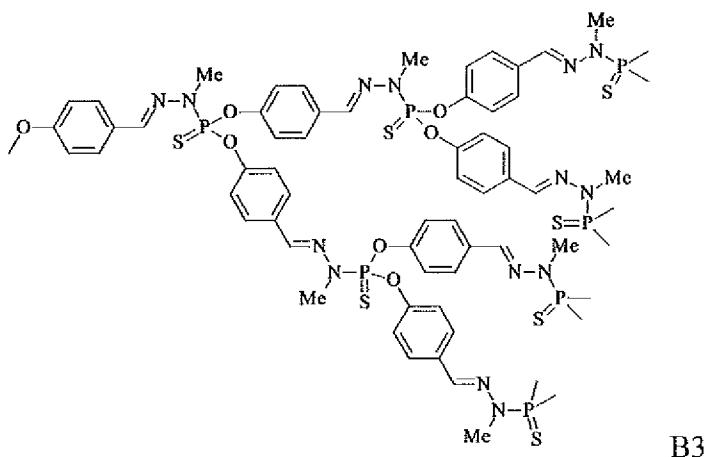


Le premier motif B de formule B1 permet de former un dendrimère de première génération, G1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, le premier motif B de valence n répété i fois, n étant égal à 2 et i étant égal à 2, est de formule B2.



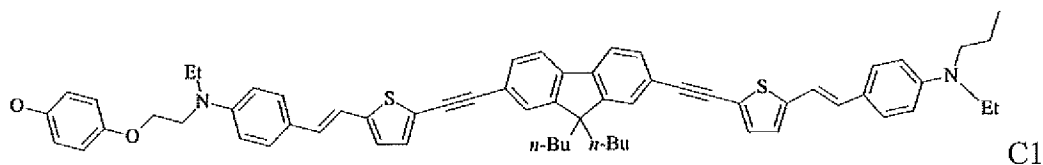
Selon un autre mode de réalisation avantageux, le premier motif B de valence n répété i fois, n étant égal à 2 et i étant égal à 3, est de formule B3.



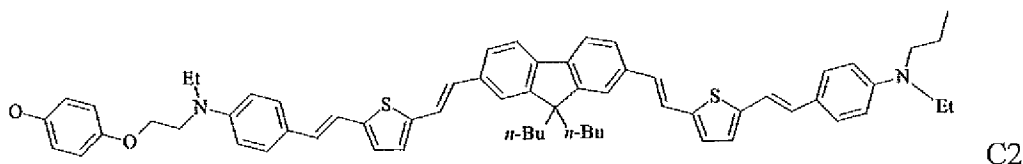
Les premiers motifs B de formule B2 et B3 permettent d'augmenter l'ordre générationnel des dendrimères pour former des dendrimères G2 et G3 respectivement. L'augmentation de

l'ordre générationnel a pour effet d'augmenter le nombre de premiers motifs B disponibles en périphérie pour le greffage du second motif C.

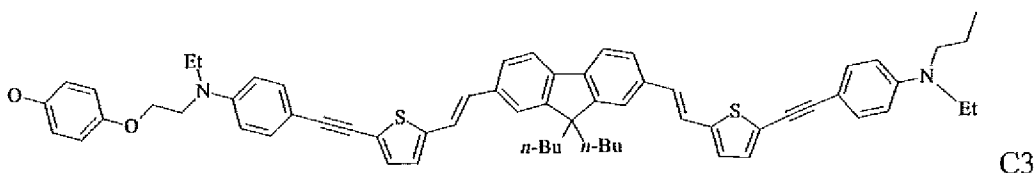
Le second motif C selon l'invention est constitué d'un groupement conjugué central lié par un espaceur saturé ($-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_r-$ et $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_u-$) à des groupements en périphérie. Ce second motif C présente des propriétés d'absorption à deux photons directement liées à la nature quadripolaire du groupement conjugué central. La présente invention repose néanmoins également sur l'augmentation inattendue de la section efficace d'absorption à deux photons du second motif C, dissymétrique, d'au moins 20 %, avantageusement d'au moins 40 % par rapport à son analogue symétrique (*vide infra*). Cette caractéristique peut être liée aux effets de polarité/polarisabilité des groupements en périphérie. Bien que ceux-ci soient liés par un espaceur saturé au groupement conjugué et ne sont donc pas impliqués dans la délocalisation électronique, ils modifient l'environnement du chromophore, probablement par interactions dipôle-dipôle, ce qui peut expliquer, *a posteriori*, le phénomène observé. Cette propriété accrue du second motif C est presque entièrement conservée dans le dendrimère. Selon un mode de réalisation avantageux, le second motif C de valence q, q étant égal à 1, est de formule C1.



Selon un autre mode de réalisation avantageux, le second motif C de valence q, q étant égal à 1, est de formule C2.



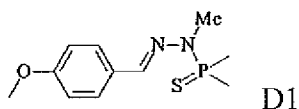
Selon un autre mode de réalisation avantageux, le second motif C de valence q, q étant égal à 1, est de formule C3.



Les motifs de formule générale C combinent des absorptions à deux photons élevées, un rendement de production d'oxygène singulet significatif, tout en conservant un rendement

quantique de fluorescence important. Par rapport à la structure générale C, les motifs C1, C2 et C3 sont les plus accessibles synthétiquement. Les doubles liaisons permettent une meilleure conjugaison que les triples, et conduisent généralement à des sections efficaces d'absorption à deux photons plus élevées, mais les triples donnent des structures plus rigides ce qui conduit souvent à des rendements de fluorescence plus élevés et permet de mieux contrôler les interactions interchromophoriques.

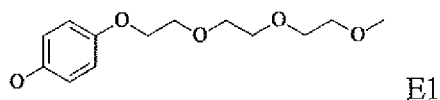
L'« appendice d'agrafage » de la présente invention, permet en augmentant l'ordre générationnel du dendrimère, de lier le second motif à l'ensemble des groupements hydrosolubilisants et/ou fonctions de ciblage. Cet appendice d'agrafage peut être absent. Selon un mode de réalisation avantageux, l'appendice d'agrafage D de valence p répété j fois, p étant égal à 2 et j étant égal à 1, est de formule D1.



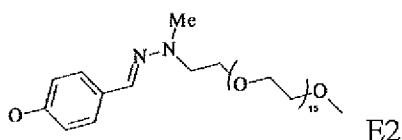
Selon un autre mode de réalisation avantageux, l'appendice d'agrafage D répété j fois, j étant égal à 0, est absent et est de formule D2.

Au sens de la présente invention, le terme « groupement hydrosolubilisant » désigne toute fonction chimique susceptible d'apporter de la solubilité aux dendrimères de l'invention dans l'eau ou les milieux biologiques. Le groupement hydrosolubilisant est de préférence choisi parmi des dérivés de l'éthylène glycol. Les polyéthylènes glycols, PEG, ne sont généralement ni toxiques ni immunogènes, ce qui les rend particulièrement adaptés pour des applications biologiques.

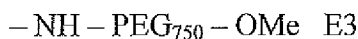
Selon un mode de réalisation avantageux, ledit ensemble des groupements hydrosolubilisants et/ou fonctions de ciblage E est tel que tous les E sont identiques et est de formule E1.



Selon un autre mode de réalisation avantageux, ledit ensemble des groupements hydrosolubilisants et/ou fonctions de ciblage E est tel que tous les E sont identiques et est de formule E2.

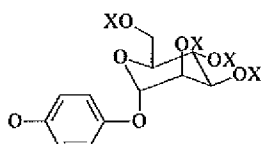


Selon un autre mode de réalisation avantageux, ledit ensemble des groupements hydrosolubilisants et/ou fonctions de ciblage E est tel que tous les E sont identiques et est de formule E3.



La « fonction de ciblage », permettant de cibler sélectivement les cellules cancéreuses, améliore le potentiel thérapeutique des dendrimères de l'invention, en ajoutant à la sélectivité spatiale de l'activation biphotonique, une affinité élevée pour les cellules cancéreuses. Les termes « cellules cancéreuses » désignent un groupe de cellules présentant une croissance incontrôlée (division au-delà de la limite normale), une invasion (intrusion dans ou destruction des tissus adjacents), et parfois des métastases (propagation à d'autres endroits du corps *via* la lymphe ou le sang).

Selon un mode de réalisation avantageux, ledit ensemble des groupements hydrosolubilisants et/ou fonctions de ciblage E est tel que tous les E sont identiques et est de formule E4.



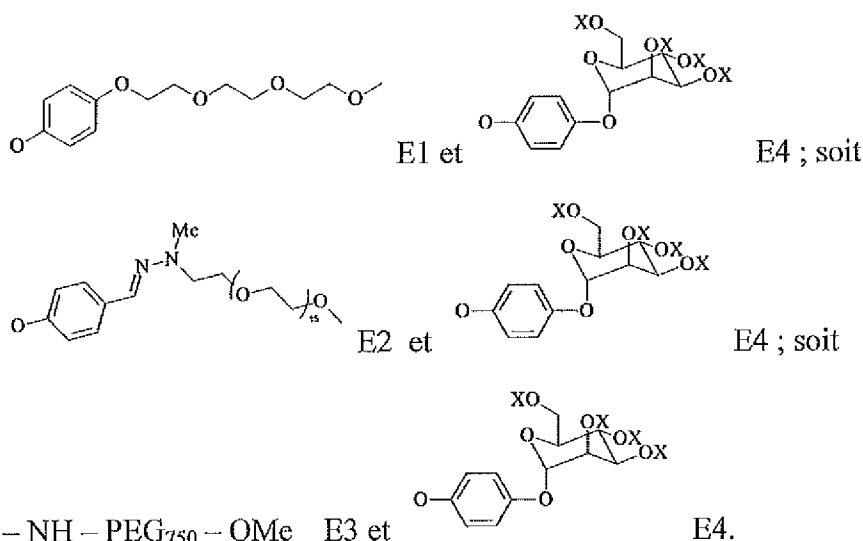
E4 ; X étant égal à H ou Ac.

Lorsque X est un hydrogène, l'ensemble E4 est noté E4_H tandis que l'ensemble E4 est noté E4_{Ac} lorsque X est un groupement acétate.

Les fonctions mannose permettent de cibler spécifiquement les lectines dans et à la surface des cellules cancéreuses. Les lectines sont des protéines qui reconnaissent spécifiquement certains mono- ou oligosaccharides et sont capables de se lier à eux de façon réversible. Il ne s'agit pas d'enzymes ni d'anticorps, car les lectines ne présentent pas d'activité catalytique et ne sont pas impliquées dans la réponse immunitaire classique. Lors de cancers, les lectines s'agglutinent majoritairement sur les cellules cancéreuses. L' α -D-mannose, telle qu'apparaissant dans l'ensemble E4, notamment dans l'ensemble E4_H, est l'un des sucres majoritairement reconnus par les lectines, permettant ainsi de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, ledit ensemble des groupements hydrosolubilisants et/ou fonctions de ciblage E est tel que tous les E ne sont pas identiques et est de formule E5.

E5



Selon un mode de réalisation préféré, ledit ensemble des groupements hydrosolubilisants et/ou fonctions de ciblage E est de formule E5 et le rapport E1/E4 est de 1,4. Dans ce cas, lorsque E4 comprend le mannose protégé, c'est-à-dire lorsque X est un groupement acétate, l'ensemble E est noté E5_{E1/E4Ac} tandis que lorsque E4 comprend le mannose déprotégé, c'est-à-dire lorsque X est un hydrogène, l'ensemble E est noté E5_{E1/E4H}.

Cette combinaison de l'ensemble E comportant à la fois des groupements hydrosolubilisants et des fonctions de ciblage permet d'améliorer la solubilité des dendrimères dans l'eau et les milieux biologiques et de favoriser la sélectivité des dendrimères pour les cellules cancéreuses.

Selon un mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m, le cœur phosphoré A est de formule A1 et le premier motif B est de formule B1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m, le cœur phosphoré A est de formule A1 et le premier motif B est de formule B2.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m, le cœur phosphoré A est de formule A1 et le premier motif B est de formule B3.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1 et le second motif C est de formule C1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1 et le second motif C est de formule C2.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1 et le second motif C est de formule C3.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1 et l'appendice d'agrafage D est de formule D1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1 et l'appendice d'agrafage D est de formule D2.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E2.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E3.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E4.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E5.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le premier motif B est de formule B1 et le second motif C est de formule C1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le premier motif B est de formule B2 et le second motif C est de formule C1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le premier motif B est de formule B3 et le second motif C est de formule C1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le premier motif B est de formule B1 et l'appendice d'agrafage D est de formule D1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le premier motif B est de formule B1 et l'appendice d'agrafage D est de formule D2.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le premier motif B est de formule B1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le premier motif B est de formule B1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E2.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le premier motif B est de formule B1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E3.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le premier motif B est de formule B1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E4.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le premier motif B est de formule B1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E5.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le second motif C est de formule C1 et l'appendice d'agrafage D est de formule D1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le second motif C est de formule C1 et l'appendice d'agrafage D est de formule D2.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le second motif C est de formule C1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le second motif C est de formule C1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E2.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le second motif C est de formule C1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E3.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le second motif C est de formule C1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E4.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-$

$(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le second motif C est de formule C1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E5.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, l'appendice d'agrafage D est de formule D1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, l'appendice d'agrafage D est de formule D1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E2.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, l'appendice d'agrafage D est de formule D1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E3.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, l'appendice d'agrafage D est de formule D1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E4.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, l'appendice d'agrafage D est de formule D1 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E5.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, l'appendice d'agrafage D est de formule D2 et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E2.

Selon un mode de réalisation préféré, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1, le premier motif B est de formule B1, le second motif C est de formule C1, l'appendice d'agrafage D est de formule D1, et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E1.

Selon un autre mode de réalisation préféré, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-$

$(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1, le premier motif B est de formule B2, le second motif C est de formule C1, l'appendice d'agrafage D est de formule D1, et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E1.

Selon un autre mode de réalisation préféré, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1, le premier motif B est de formule B3, le second motif C est de formule C1, l'appendice d'agrafage D est de formule D1, et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E1.

Selon un autre mode de réalisation préféré, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1, le premier motif B est de formule B1, le second motif C est de formule C2, l'appendice d'agrafage D est de formule D1, et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E1.

Selon un autre mode de réalisation préféré, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1, le premier motif B est de formule B1, le second motif C est de formule C3, l'appendice d'agrafage D est de formule D1, et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E1.

Selon un autre mode de réalisation préféré, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1, le premier motif B est de formule B1, le second motif C est de formule C1, l'appendice d'agrafage D est de formule D1, et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E3.

Selon un autre mode de réalisation préféré, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1, le premier motif B est de formule B1, le second motif C est de formule C2, l'appendice d'agrafage D est de formule D1, et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E3.

Selon un autre mode de réalisation préféré, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1, le premier motif B est de formule B1, le second motif C est de formule C3, l'appendice d'agrafage D est de formule D1, et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E3.

Selon un autre mode de réalisation préféré, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1, le premier motif B est de formule B1, le second motif C est de formule C1, l'appendice d'agrafage D est de formule D1, et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E4.

Selon un autre mode de réalisation préféré, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1, le premier motif B est de formule B2, le second motif C est de formule C1, l'appendice d'agrafage D est de formule D1, et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E4.

Selon un autre mode de réalisation préféré, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1, le premier motif B est de formule B3, le second motif C est de formule C1, l'appendice d'agrafage D est de formule D1, et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E4.

Selon un autre mode de réalisation préféré, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1, le premier motif B est de formule B1, le second motif C est de formule C2, l'appendice d'agrafage D est de formule D1, et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E4.

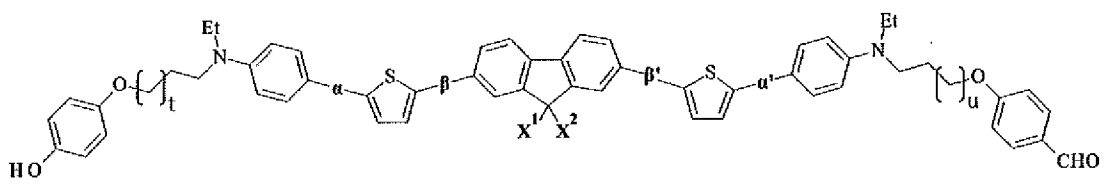
Selon un autre mode de réalisation préféré, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1, le premier motif B est de formule B1, le second motif C est de formule C3, l'appendice d'agrafage D est de formule D1, et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E4.

Selon un autre mode de réalisation préféré, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1, le premier motif B est de formule B1, le second motif C est de formule C1, l'appendice d'agrafage D est de formule D1, et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E5.

Selon un autre mode de réalisation préféré, dans le composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, le cœur phosphoré A est de formule A1, le premier motif B est de formule B1,

le second motif C est de formule C1, l'appendice d'agrafage D est de formule D2, et le groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E est de formule E2.

L'invention concerne également l'utilisation d'un chromophore dissymétrique C'' pour la mise en œuvre du procédé de fabrication du dendrimère de l'invention ; C'' étant de formule



α , β , α' et β' représentant indépendamment les uns des autres soit un groupement $-\text{CH}=\text{CH}-$ soit un groupement $-\text{C}\equiv\text{C}-$;

t et u représentant indépendamment l'un de l'autre un entier compris de 0 à 9 ;

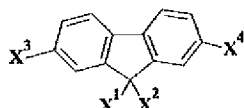
X^1 et X^2 , identiques ou différents, représentant chacun un groupement alkyle en C_1 à C_{25} , avantageusement en C_1 à C_{12} , de préférence en C_4 , $(\text{CH}_2)_x\text{-SO}_3\text{M}$, $(\text{CH}_2)_x\text{NAlk}_3^+$, $(\text{CH}_2)_x\text{-(OCH}_2\text{-CH}_2)_y\text{-OH}$, M étant un métal alcalin et x étant égal à 0 ou étant un entier compris de 1 à 12, préférentiellement de 1 à 6, y étant un entier compris de 1 à 25.

Au sens de la présente invention, le terme « chromophore » désigne un composé chimique possédant une absorption non négligeable de la lumière dans la gamme de l'UV-visible, c'est-à-dire dans une gamme comprise de 250 à 700 nm. Une absorption non négligeable de la lumière s'entend d'un coefficient d'extinction molaire (ϵ) supérieur à $1\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Le terme « dissymétrique » se rapporte aux fonctions terminales de C'', l'une de ces fonctions étant un groupement phénol et l'autre un groupement benzaldéhyde.

Selon un mode de réalisation de l'invention, lors de l'utilisation décrite précédemment, la synthèse du chromophore dissymétrique C'' comprend deux couplages carbone-carbone, simultanés ou séquentiels, de préférence séquentiels, entre

a. un motif fluorène c de formule

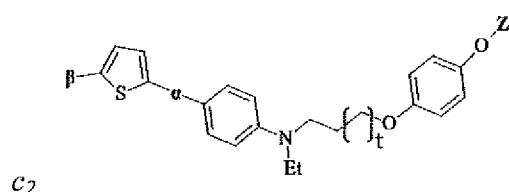
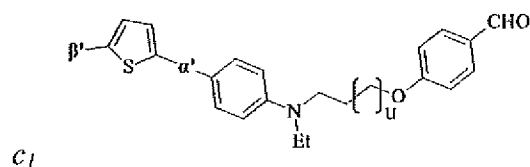


X^1 et X^2 , identiques ou différents, représentant chacun un groupement alkyle en C_1 à C_{25} , avantageusement en C_1 à C_{12} , de préférence en C_4 , $(\text{CH}_2)_x\text{-SO}_3\text{M}$, $(\text{CH}_2)_x\text{NAlk}_3^+$, $(\text{CH}_2)_x\text{-(OCH}_2\text{-CH}_2)_y\text{-OH}$, M étant un métal alcalin et x étant

égal à 0 ou étant un entier compris de 1 à 12, préférentiellement de 1 à 6, y étant un entier compris de 1 à 25 ;

X^3 et X^4 , identiques ou différents, représentant chacun un groupement choisi parmi Cl, Br, I ou CF_3SO_3 , notamment I ; et

b. des fragments c_1 et c_2 de formule

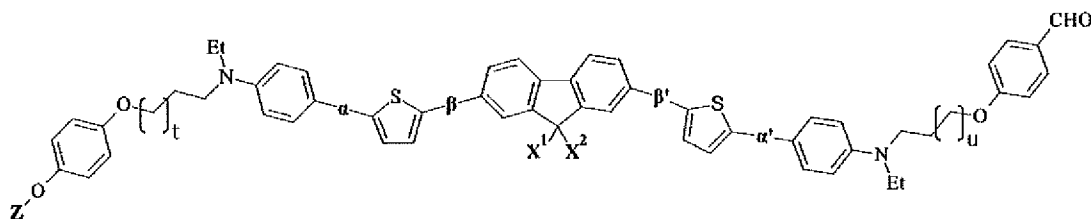


α , β , α' et β' représentant indépendamment les uns des autres soit un groupement $-CH=CH-$ soit un groupement $-C\equiv C-$;

t et u représentant indépendamment l'un de l'autre un entier compris de 0 à 9 ;

Z étant choisi parmi un hydrogène, un groupement acétate, un groupement méthoxyméthyle, un groupement tert-butyldiméthylsilyl éther ou un groupement ((2-triméthylsilyl)ethoxy)méthyl ;

pour former le chromophore dissymétrique C'' lorsque Z représente un hydrogène ou pour former un chromophore dissymétrique protégé C''' lorsque Z n'est pas un hydrogène ; C''' étant de formule

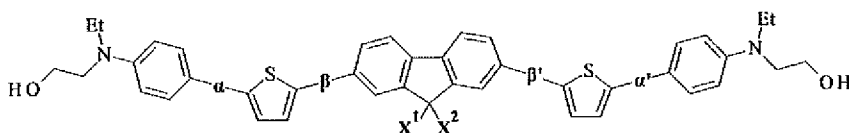


ledit chromophore dissymétrique C'' étant obtenu par déprotection de la fonction phénol dudit chromophore dissymétrique protégé C''' .

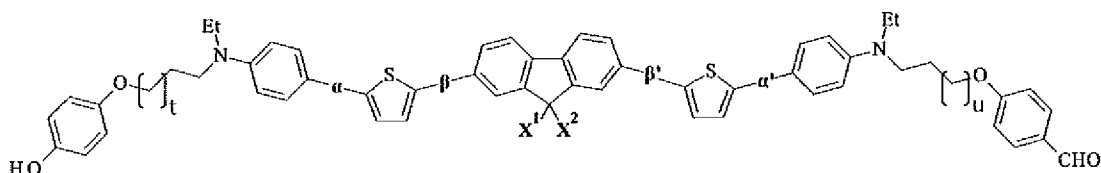
La déprotection de la fonction phénol est réalisée selon toute méthode connue de l'homme de l'art. Selon un mode préféré, la déprotection est réalisée par une hydrolyse en milieu acide, c'est-à-dire à un pH inférieur à 7.

L'invention concerne également un procédé d'obtention du dendrimère de l'invention comprenant

- a. une étape de dissymétrisation du chromophore C' de formule



pour former le chromophore dissymétrique C'' de formule



X¹ et X², identiques ou différents, représentant chacun un groupement alkyle en C₁ à C₂₅, avantageusement en C₁ à C₁₂, de préférence en C₄, (CH₂)_x-SO₃M, (CH₂)_xNAIk₃⁺, (CH₂)_x-(OCH₂-CH₂)_y-OH, M étant un métal alcalin et x étant égal à 0 ou étant un entier de 1 à 12, préférentiellement de 1 à 6, y étant un entier de 1 à 25 ;

ladite étape de dissymétrisation permettant d'augmenter la section efficace d'absorption à deux photons du chromophore dissymétrique C'' d'au moins 20 %, avantageusement d'au moins 40 % par rapport à C' ;

- b. une étape de greffage du chromophore dissymétrique C'' sur une entité centrale A-(B_i')_m de sorte à former un premier dendrimère intermédiaire A-(B_i-(C'')_n)_m ; A-(B_i')_m représentant une espèce réactive correspondant à A-(B_i)_m ; m étant la valence du groupement A et étant un entier non nul compris de 3 à 8 ; n étant la valence de B' dans l'entité centrale A-(B_i')_m et étant un entier non nul compris de 2 à 5 ; i étant le nombre d'unités de répétition successives du premier motif B greffée sur une branche et étant égal à 0 ou étant un entier compris de 1 à 10, notamment de 1 à 4 ;

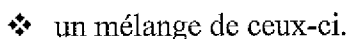
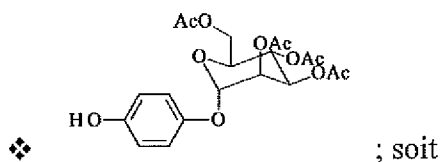
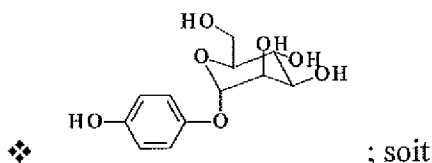
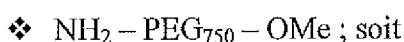
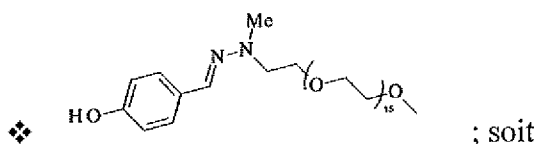
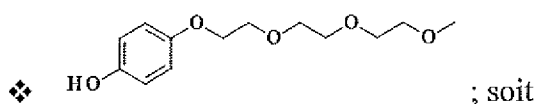
- c. une étape de formation du dendrimère A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m réalisée soit

- i. en plusieurs étapes consistant en :

- une étape de formation d'un second dendrimère intermédiaire A-(B_i-(C-(D_j')_q)_n)_m par la réaction, réalisée q fois, d'un appendice d'agrafage D' sur le premier dendrimère intermédiaire A-(B_i-(C'')_n)_m et réalisée j fois

successivement ; D' correspondant à une première espèce réactive de l'appendice d'agrafage D ; q étant la valence du second motif C et étant un entier non nul, notamment égal à 1 ; j étant le nombre d'unités de répétition successives de l'appendice d'agrafage D greffée sur une branche et étant égal à 0 ou étant un entier compris de 1 à 5, notamment de 1 à 2 ;

- une étape de fonctionnalisation du second dendrimère intermédiaire A-(B_i-(C-(D_j')_q)_n)_m obtenu à l'étape précédente avec un ensemble de groupements hydrosolubilisants et/ou fonctions de ciblage E' pour former le dendrimère A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m, ledit ensemble de groupements hydrosolubilisants et/ou fonctions de ciblage E' représentant une espèce réactive correspondant à E et étant de formule



p étant la valence de l'appendice d'agrafage D et étant un entier non nul compris de 2 à 5, notamment égal à 2 ; soit

- ii. en une étape consistant en une fonctionnalisation du premier dendrimère intermédiaire A-(B-(C'')_n)_m par sa réaction, réalisée q fois, avec une entité D_j'''-(E)_p préformée ; D''' correspondant à une seconde espèce réactive de l'appendice d'agrafage D ; j étant le nombre d'unités de répétition successives de la seconde espèce réactive D''' et étant égal à 0 ou étant un entier compris de 1 à 5, notamment de 1 à 2 ; q étant la

valence du second motif C et étant un entier non nul, notamment égal à 1 ; p étant la valence de l'appendice d'agrafage D et étant un entier non nul compris de 2 à 5, notamment égal à 2.

Une « espèce réactive » est définie selon la présente invention par la présence, dans la structure de cette espèce, d'une fonction chimique contenant au moins un centre nucléophile, tel qu'un atome d'oxygène, en particulier une fonction phénol, ou au moins un centre électrophile, tel qu'un atome de phosphore, en particulier une fonction $R-P(S)Cl_2$.

L'« appendice d'agrafage » de la présente invention, permet en augmentant l'ordre générationnel du dendrimère, de lier le second motif à l'ensemble des groupements hydrosolubilisants et/ou fonctions de ciblage. Cet appendice d'agrafage peut être absent.

Au sens de la présente invention, le terme « groupement hydrosolubilisant » désigne toute fonction chimique susceptible d'apporter de la solubilité aux dendrimères de l'invention dans l'eau ou les milieux biologiques. Le groupement hydrosolubilisant est de préférence choisi parmi des dérivés de l'éthylène glycol. Les polyéthylènes glycols, PEG, ne sont généralement ni toxiques ni immunogènes, ce qui les rend particulièrement adaptés pour des applications biologiques.

La « fonction de ciblage », permettant de cibler sélectivement les cellules cancéreuses, améliore le potentiel thérapeutique des dendrimères obtenus par le procédé de l'invention, en ajoutant à la sélectivité spatiale de l'activation biphotonique, une affinité élevée pour les cellules cancéreuses. Les termes « cellules cancéreuses » désignent un groupe de cellules présentant une croissance incontrôlée (division au-delà de la limite normale), une invasion (intrusion dans ou destruction des tissus adjacents), et parfois des métastases (propagation à d'autres endroits du corps *via* la lymphe ou le sang). Les fonctions mannose permettent de cibler spécifiquement les lectines dans et à la surface des cellules cancéreuses. Les lectines sont des protéines qui reconnaissent spécifiquement certains mono- ou oligosaccharides et sont capables de se lier à eux de façon réversible. Il ne s'agit pas d'enzymes ni d'anticorps, car les lectines ne présentent pas d'activité catalytique et ne sont pas impliquées dans la réponse immunitaire classique. Lors de cancers, les lectines s'agglutinent majoritairement sur les cellules cancéreuses. L' α -D-mannose, telle qu'apparaissant dans les variantes de l'ensemble E ci-dessus, est l'un des sucres majoritairement reconnus par les lectines, permettant ainsi de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses.

Selon un mode de réalisation, le procédé de l'invention permet d'obtenir des dendrimères possédant une section efficace d'absorption à deux photons supérieure à 5 000 GM, avantageusement supérieure à 10 000 GM, plus avantageusement supérieure à 15 000 GM, de

préférence supérieure à 20 000 GM pour au moins une valeur de longueurs d'ondes comprise de 700 à 900 nm, en particulier à 730 nm.

Les sections efficaces d'absorption à deux photons de la présente invention sont déterminées par la technique de fluorescence par excitation à deux photons (TPEF ; *vide infra*). Les mesures sont effectuées à l'aide d'un laser titane:saphir délivrant des impulsions de 150 femtosecondes, en utilisant le protocole expérimental de Xu et Webb. [C. Xu, W. W. Webb, "Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm", *J. Opt. Soc. Am. B: Opt. Phys.* **1996**, 13, 481-491].

Selon un mode de réalisation, le procédé de l'invention permet d'obtenir des dendrimères présentant un rendement quantique de production d'oxygène singulet compris de 5 à 30 %, de préférence compris de 10 à 20 %.

Le rendement quantique de production d'oxygène singulet (Φ_{Δ}) représente le nombre de molécules d'oxygène singulet générées par rapport au nombre de photons absorbés par le photosensibilisateur, et est déterminé par comparaison entre la luminescence de l'oxygène singulet produit par le photosensibilisateur à 1272 nm et celle produite par un photosensibilisateur de référence à la même longueur d'onde dans les mêmes conditions. (*vide infra* « Méthode de quantification de la production d'oxygène singulet »).

Selon un mode de réalisation, le procédé de l'invention permet d'obtenir des dendrimères présentant un rendement quantique de fluorescence supérieur à 10 %, avantageusement supérieur ou égal à 15 %, de préférence supérieur ou égal à 30 %.

Le rendement quantique de fluorescence (Φ_F) représente le nombre de photons émis directement par le dendrimère par rapport au nombre de photons absorbés et est déterminé par comparaison à une référence. Ce rendement correspond à la fraction de molécules excitées dont le retour à l'état fondamental est accompagné de l'émission de photons.

Dans la présente invention, une augmentation surprenante de la section efficace d'absorption à deux photons du chromophore dissymétrique C'', d'au moins 20 %, avantageusement d'au moins 40 % par rapport à son analogue symétrique C' est observée. Cette caractéristique peut être liée aux effets de polarité/polarisabilité des groupements en périphérie. Bien que ceux-ci soient liés par un espaceur saturé au groupement conjugué et ne sont donc pas impliqués dans la délocalisation électronique, ils modifient l'environnement du chromophore, probablement par interactions dipôle-dipôle, ce qui peut expliquer, *a posteriori*, le phénomène observé. Cette propriété accrue du chromophore dissymétrique C'' est presque entièrement conservée dans le dendrimère.

Selon un mode de réalisation, le procédé de l'invention permet d'obtenir des dendrimères présentant une brillance d'absorption à deux photons supérieure à 500 GM, avantageusement supérieure à 1 000 GM, plus avantageusement supérieure à 1 500 GM, de préférence supérieure à 2 000 GM pour au moins une valeur de longueurs d'ondes comprise de 700 à 900 nm, en particulier à 730 nm.

La « brillance d'absorption à deux photons » est définie comme le produit de la section efficace à deux photons et du rendement quantique de fluorescence.

Selon un mode de réalisation, le procédé de l'invention permet d'obtenir des dendrimères n'étant pas phototoxiques sous une excitation comprise de 400 à 700 nm avec un éclairage compris de 200 à 3 000 lx, avantageusement de 1 000 à 2 000 lx, de préférence de 1 000 lx.

Le lux, unité de mesure de l'éclairement, caractérise le flux lumineux par unité de surface et 1 lx correspond à $1 \text{ cd} \cdot \text{sr} \cdot \text{m}^{-2}$.

Au sens de l'invention, un composé « phototoxique » désigne un composé rendu nocif pour son environnement par une excitation lumineuse. Plus précisément, dans la présente invention, les dendrimères sont rendus nocifs sous excitation biphotonique par leur capacité à générer de l'oxygène singulet mais, à la lumière du jour telle que définie par une excitation comprise de 400 à 700 nm avec un éclairage compris de 200 à 3 000 lx, les dendrimères de l'invention ne génèrent pas d'oxygène singulet.

Une absence de phototoxicité à la lumière du jour est généralement due à un effet écran de molécules absorbant fortement la lumière UV-visible telle que des squarates (phenylaminocyclobutenedione) ou à la diffusion de la lumière par des particules dont le diamètre est de l'ordre de quelques centaines de nanomètres. La présente invention repose cependant sur l'observation inattendue, par les Inventeurs, de l'absence de phototoxicité à la lumière du jour malgré l'omission, dans la structure des dendrimères, de groupements squarates (phenylaminocyclobutenedione) et en absence de diffusion de la lumière.

Cette caractéristique peut s'expliquer, *a posteriori*, d'une part de la présence de nombreuses sous-unités absorbant dans l'UV dans le squelette dendrimérique faisant ainsi écran à l'excitation à un photon et permettant de remplacer efficacement les groupements squarates et d'autre part à une efficacité de production d'oxygène singulet plus élevée à deux photons ($\sigma_2 \cdot \Phi_\Delta$) qu'à un photon ($\sigma \cdot \Phi_\Delta$). Cette différence d'efficacité se traduit d'une section efficace élevée (supérieure à 5 000 GM, avantageusement supérieure à 10 000 GM, plus avantageusement supérieure à 15 000 GM, de préférence supérieure à 20 000 GM) et d'un

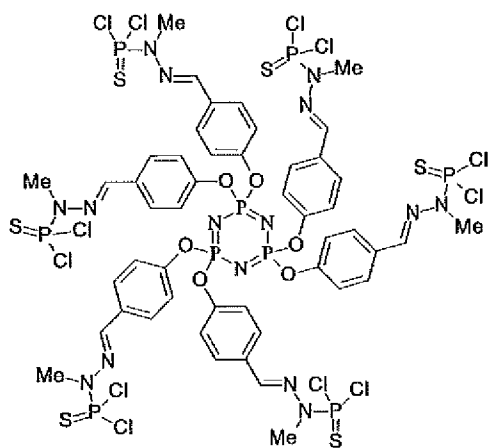
rendement quantique d'oxygène singulet modéré compris de 5 à 30 %, de préférence compris de 10 à 20 %.

Les dendrimères obtenus par le procédé de la présente invention présentent aussi l'avantage, par rapport aux nanoparticules de silice mésoporeuses de l'art antérieur [*"Biphotonic photosensitizers, nanoparticles containing the same and their use as drugs"*, D. Brevet, L. Raehm, M. Blanchard-Desce, O. Mongin, M. Gary-Bobo, M. Garcia, A. Morère, J.-O. Durand, *PCT Int. Appl.*, **2011**, WO 2011073054], d'être des nano-objets plus petits (diamètre), de taille unique et monodisperses, purement organiques et parfaitement caractérisés. Ces caractéristiques permettent d'obtenir des composés parfaitement reproductibles et dont l'innocuité de la plateforme dendrimérique a été démontrée.

De plus, en comparaison des photosensibilisateurs actuellement commercialisés pour des applications en photothérapie dynamique, les dendrimères obtenus par le procédé de la présente invention permettent de traiter des tumeurs avec une résolution spatiale élevée tout en réduisant les effets secondaires non désirés liés à la photosensibilisation des patients à la lumière du jour.

L'invention concerne également les dendrimères tels qu'obtenus directement par le procédé décrit ci-dessus.

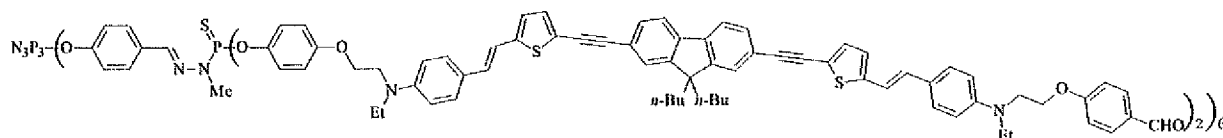
Selon un mode de réalisation préféré, dans le procédé de l'invention, l'entité centrale A-(B_i)_m est de formule



; m étant égal à 6 ; i étant égal à 1.

Selon un mode de réalisation préféré, dans le procédé de l'invention, l'étape de greffage du chromophore dissymétrique C'' sur l'entité centrale A-(B_i)_m est réalisée n fois,

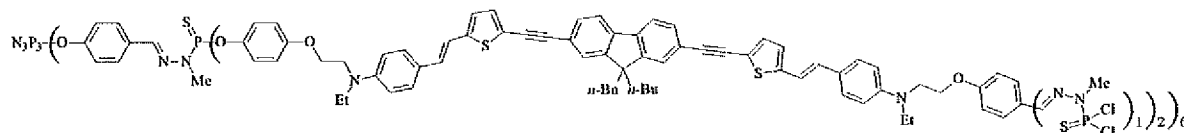
en milieu basique, pour obtenir le premier dendrimère intermédiaire $A-(B_i-(C'')_n)_m$ de formule



n étant égal à 2.

Ce premier dendrimère intermédiaire est noté $A-(B1-(C1'')_2)_6$.

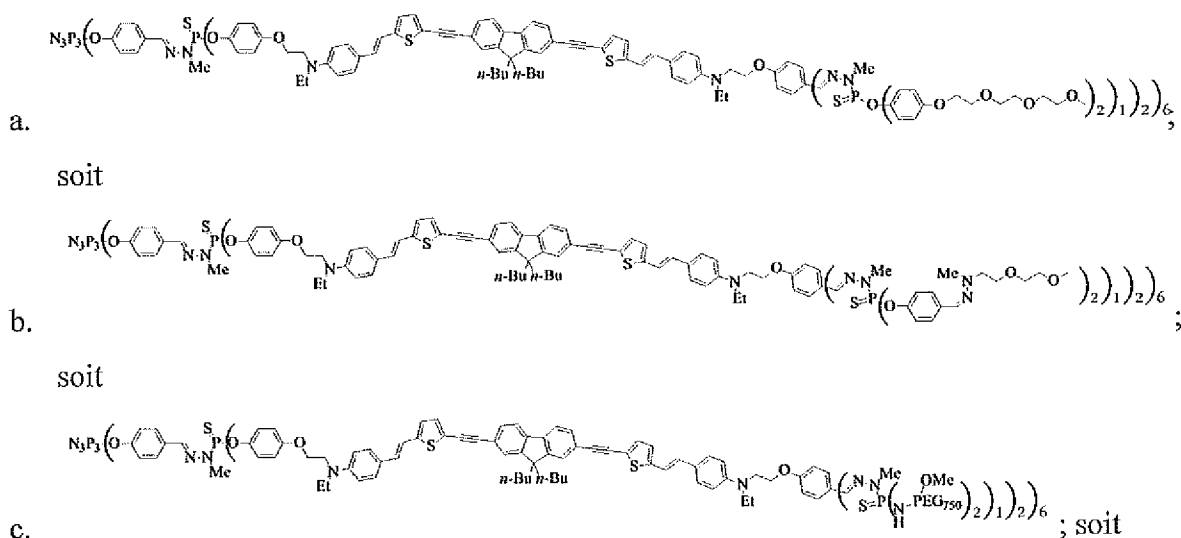
Selon un mode de réalisation préféré, dans le procédé de l'invention, l'étape de formation d'un second dendrimère intermédiaire $A-(B_i-(C-(D_j')_q)_n)_m$ est réalisée q fois par la condensation de l'appendice d'agrafage D' sur le premier dendrimère intermédiaire $A-(B_i-(C'')_n)_m$; le second dendrimère intermédiaire $A-(B_i-(C-(D_j')_q)_n)_m$ étant de formule

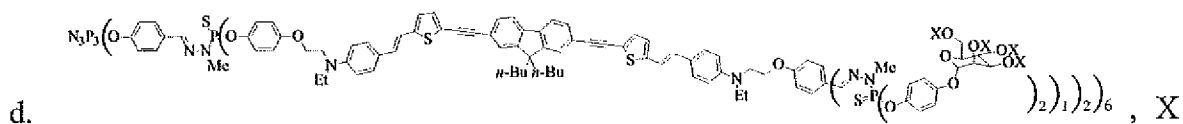


q étant égal à 1 ; j étant égal à 1.

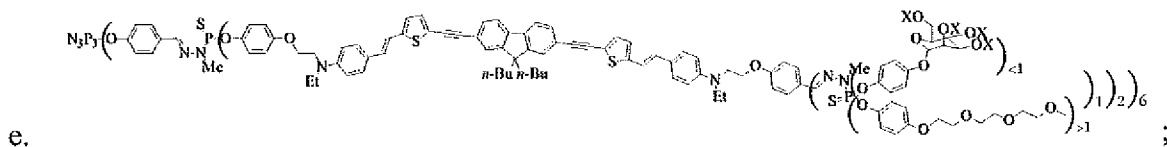
Ce second dendrimère intermédiaire est noté $A-(B1-(C1-(D1')_1)_2)_6$.

Selon un mode de réalisation préféré, dans le procédé de l'invention, l'étape de fonctionnalisation du second dendrimère intermédiaire $A-(B_i-(C-(D_j')_q)_n)_m$ avec un groupement hydrosolubilisant et/ou une fonction de ciblage E' est réalisée p fois, en milieu basique, pour former le dendrimère $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$ de formule





étant égal à H ou Ac ; soit



p étant égal à 2.

Les dendrimères sont alors nommés a. A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆, b. A-(B1-(C1-(D1-(E2)₂)₁)₂)₆, c. A-(B1-(C1-(D1-(E3)₂)₁)₂)₆, d. A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆ lorsque X est un acétate ou A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆ lorsque X est un hydrogène et e. A-(B1-(C1-(D1-(E5)₂)₁)₂)₆.

Le dendrimer A-(B1-(C1-(D1-(E5)₂)₁)₂)₆ se présente préférentiellement sous le forme A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4})₂)₁)₂)₆, notamment A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4Ac})₂)₁)₂)₆ lorsque E5 est un mélange E1/E4 et X étant un acétate, le ratio E1/E4 de l'ensemble E5 étant égal à 1,4, ou A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆ lorsque E5 est un mélange E1/E4 et X étant un hydrogène, le ratio E1/E4 de l'ensemble E5 étant égal à 1,4.

L'invention concerne également l'utilisation du dendrimer de formule A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m tel que défini ci-dessus dans un procédé ou dispositif d'imagerie de fluorescence.

Le terme « imagerie » désigne une technique ou un procédé non-invasif utilisé pour créer des images du corps humain (ou des parties ou fonctions de celui-ci) pour des raisons médicales (procédé médical dans le but de révéler, diagnostiquer ou examiner une maladie) ou pour la science médicale (y compris l'étude de l'anatomie normale et physiologique).

Selon un mode de réalisation avantageux, l'utilisation du dendrimer de l'invention de formule A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m dans un procédé ou dispositif d'imagerie de fluorescence met en œuvre une absorption à un ou à deux photons.

L'utilisation des dendrimères de l'invention pour l'imagerie à un ou deux photons est rendue possible par le rendement quantique de fluorescence non négligeable, c'est-à-dire supérieur à 10 %, avantageusement supérieur ou égal à 15 %, préférentiellement supérieur ou égal à 30 %, de ces composés.

Selon un mode de réalisation avantageux, lors de l'utilisation du dendrimer de formule A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m dans un procédé ou dispositif d'imagerie de fluorescence, la concentration en dendrimer est de 5 à 100 µg/mL, de préférence de 50 µg/mL.

Selon un mode de réalisation avantageux, lors de l'utilisation du dendrimère de formule $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$ dans un procédé ou dispositif d'imagerie de fluorescence, le temps d'incubation des cellules cancéreuses avec ledit dendrimère est de 3 à 20 h.

Les cellules cancéreuses visées par la présente invention sont les cellules de cancer du sein, telles que les cellules MCF-7 et MDA-MB-231, les cellules de cancer du côlon telles que les cellules HCT-116, les cellules du rétinoblastome telles que les cellules Y-79 et les cellules du cancer de la prostate telles que les cellules LNCaP.

L'invention concerne également l'utilisation du dendrimère de formule $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$ tel que défini ci-dessus dans un procédé ou dispositif de thérapie photodynamique.

La thérapie photodynamique est une technique douce pouvant notamment être utilisée, dans le traitement de cancers, par l'injection d'une substance non toxique en l'absence de lumière qui a la propriété, une fois soumise à une excitation lumineuse, de se transformer en poison par la formation de radicaux libres. Dans la présente invention, la réaction photochimique ainsi initiée est la génération d'oxygène singulet et/ou d'autres espèces oxygénées réactives. Les molécules de dioxygène singulet (1O_2) sont obtenues à partir du dioxygène triplet (3O_2) par un transfert de l'énergie d'excitation du photosensibilisateur excité au dioxygène à l'état électronique triplet (état fondamental).

Selon un mode de réalisation avantageux, l'utilisation du dendrimère de formule $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$ dans un procédé ou dispositif de thérapie photodynamique met en œuvre une absorption à deux photons.

Selon un mode de réalisation avantageux, lors de l'utilisation du dendrimère de formule $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$ dans un procédé ou dispositif de thérapie photodynamique mettant en œuvre une absorption à deux photons, la concentration en dendrimère est de 5 à 100 $\mu\text{g/mL}$, de préférence de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Selon un mode de réalisation avantageux, lors de l'utilisation du dendrimère de formule $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$ dans un procédé ou dispositif de thérapie photodynamique mettant en œuvre une absorption à deux photons, le temps d'incubation des cellules cancéreuses avec ledit dendrimère est de 5 à 20 h.

Les cellules cancéreuses visées par la présente invention sont les cellules de cancer du sein, telles que les cellules MCF-7 et MDA-MB-231, les cellules de cancer du côlon telles que les cellules HCT-116, les cellules du rétinoblastome telles que les cellules Y-79 et les cellules du cancer de la prostate telles que les cellules LNCaP.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, l'utilisation du dendrimère A-(B₁-(C1-(D₁-(E_{4H})₂)₁)₂)₆ après 5h d'incubation d'une solution à 100 µg/mL dudit dendrimère avec des cellules du cancer de sein MCF-7 dans un procédé ou dispositif de thérapie photodynamique mettant en œuvre une absorption à deux photons permet d'atteindre une mort cellulaire de 75 % par excitation biphotonique à 760 nm.

L'invention concerne également un composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale A-(B₁-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m tel que défini précédemment destiné à être utilisé dans le traitement de cancers en association avec une excitation biphotonique.

Les cancers visés par l'invention sont les cancers du sein, du côlon, de la prostate et le rétinoblastome.

Méthode de quantification de l'absorption à deux photons par la mesure de la fluorescence induite à deux photons

Les sections efficaces d'ADP ont été déterminées par mesure de la fluorescence induite par excitation à deux photons (TPEF) en régime femtoseconde et du rendement quantique de fluorescence. Le principe de cette technique et le protocole expérimental utilisé sont décrits en détail par Werts, Blanchard-Desce et coll. [M. H. V. Werts, N. Nerambourg, D. Pélégry, Y. Le Grand, M. Blanchard-Desce, "Action cross sections of two-photon excited luminescence of some Eu(III) and Tb(III) complexes", *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 531-538]. Ce protocole est adapté du protocole expérimental original décrit par Xu et Webb [C. Xu, W. W. Webb, "Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm", *J. Opt. Soc. Am. B: Opt. Phys.* **1996**, *13*, 481-491], et prend en compte les corrections des indices de réfraction des solvants. Les brillances d'absorption à deux photons ($\sigma_2 \cdot \Phi_F$) pour des solutions de concentration 10⁻⁴ M (par chromophore) ont été mesurées en utilisant comme référence la fluorescéine (qualité spectroscopique) dans une solution de soude 0.01 M (qualité spectroscopique) pour la gamme de 700 à 980 nm [C. Xu, W. W. Webb, "Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm", *J. Opt. Soc. Am. B: Opt. Phys.* **1996**, *13*, 481-491]. Les valeurs de références de la fluorescéine utilisées de 700 à 715 nm sont celles déterminées par Blanchard-Desce et coll. [C. Katan, S. Tretiak, M. H. V. Werts, A. J. Bain, R. J. Marsh, N. Leonczek, N. Nicolaou, E. Badaeva, O. Mongin, M. Blanchard-

Desce, "Two-Photon Transitions in Quadrupolar and Branched Chromophores: Experiment and Theory", *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 9468-9483] tandis qu'au-delà de 715 nm, les valeurs de référence de Xu et Webb ont été utilisées [C. Xu, W. W. Webb, "Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm", *J. Opt. Soc. Am. B: Opt. Phys.* **1996**, *13*, 481-491].

Tableau 1 : Valeurs de références de $\sigma_2 \cdot \Phi_F$ (fluorescéine dans NaOH 0.01 M).

	$\sigma_2 \cdot \Phi_F$ (GM)
λ (nm)	Blanchard-Desce et coll.
700	11.3
705	11.7
710	12.7
715	14.3

Montage optique

Un laser Ti:saphir large bande "mode-locked" de type MIRA-900F (Coherent) pompé par un laser continu de type Verdi (Nd:YLF Coherent également et émettant 5 W à 532 nm) a été utilisé, permettant ainsi d'accéder à des impulsions de 150 fs avec une fréquence de 76 MHz, et dont la longueur d'onde est accordable entre 700 et 980 nm. En sortie, une partie du faisceau laser est prélevée par une lame de verre et envoyée sur un spectromètre afin de vérifier la longueur d'onde. L'axe optique du faisceau est ajusté à l'aide de 2 miroirs par rapport à l'axe des deux diaphragmes. La puissance et l'angle de polarisation du faisceau laser sont réglés par deux lames demi-onde ainsi que par un polariseur. La puissance du faisceau laser incident est mesurée directement sur le trajet optique du faisceau par un puissance-mètre. L'intensité lumineuse du faisceau incident est ajustée à l'aide d'une roue à filtres comprenant plusieurs densités optiques afin de s'assurer d'être bien en régime d'ADP pure : la puissance du faisceau incident sur la cuve est ainsi de l'ordre de 50 mW.

Le faisceau lumineux est focalisé dans la cuve contenant l'échantillon à l'aide d'un objectif à air Olympus (10×, ouverture numérique de 0.25). L'intensité d'émission de fluorescence est récoltée en retour par ce même objectif puis séparée du faisceau incident à l'aide d'une lame dichroïque (Chroma 675dcxr) et d'un jeu de filtres (Chroma e650sp-2p)

avant d'être détectée par un spectromètre CCD (BW Tek BTC112E). L'intensité de fluorescence totale est obtenue par intégration du spectre d'émission corrigé mesuré par ce spectromètre.

Méthode de quantification de la production d'oxygène singulet

Les rendements quantiques de production d'oxygène singulet ont été mesurés sur un Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon) en excitant à l'aide d'une lampe Xénon de 450 W. La luminescence de l'oxygène singulet est mesurée à 1272 nm grâce à un détecteur de la société North Coast Scientific refroidi à l'azote liquide (modèle EO-817L). La tetraphenylporphyrine (TPP) est utilisée comme molécule de référence dans le dichlorométhane ($\Phi_{\Delta}[TPP] = 0,60$) afin de déterminer les rendements quantiques de formation d'oxygène singulet des photosensibilisateurs dans le même solvant.

L'invention, ainsi que les différents avantages qu'elle présente, seront plus facilement compris grâce à la description qui va suivre des modes non limitatifs de réalisation de celle-ci donnés en référence aux figures, dans lesquelles :

- la Figure 1 représente les spectres d'absorption et d'émission normalisés du chromophore **C1''** dans des solvants de différentes polarités. L'axe des abscisses correspond à la longueur d'onde en nm. L'axe gauche des ordonnées correspond à l'absorption normalisée et l'axe droit des ordonnées correspond à l'intensité normalisée de fluorescence en unité arbitraire.
- la Figure 2 représente les spectres d'absorption à deux photons de **C1'** et **C1''**. L'axe des abscisses correspond à la longueur d'onde en nm et l'axe des ordonnées correspond à la section efficace d'absorption à deux photons en GM.
- la Figure 3 représente la solvatochromie du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** avec les spectres d'absorption et d'émission du dendrimère dans le toluène, le dichlorométhane, le THF et le DMSO. L'axe des abscisses correspond à la longueur d'onde en nm, l'axe gauche des ordonnées correspond à l'absorption normalisée en unité arbitraire et l'axe droit des ordonnées correspond à l'intensité normalisée de fluorescence en unité arbitraire.
- la Figure 4 représente les spectres d'absorption à deux photons de **C1''** et des dendrimères **A-(B1-(C1'')₂)₆** et **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** dans le THF. L'axe des

- abscisses correspond à la longueur d'onde en nm et l'axe des ordonnées correspond à la section efficace d'absorption à deux photons en GM.
- la Figure 5 représente le spectre de fluorescence du **C1''** avec différentes concentrations de mannose. L'axe des abscisses correspond à la longueur d'onde en nm et l'axe des ordonnées correspond à l'intensité relative de fluorescence en unité arbitraire.
 - la Figure 6 représente les spectres d'absorption à deux photons de **C1''** et des dendrimères **A-(B1-(C1'')₂)₆** et **A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆** dans le THF. L'axe des abscisses correspond à la longueur d'onde en nm et l'axe des ordonnées correspond à la section efficace d'absorption à deux photons en GM.
 - la Figure 7 représente les spectres d'absorption à deux photons de **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆** dans le DMF et de **C1''** et **A-(B1-(C1'')₂)₆** dans le THF. L'axe des abscisses correspond à la longueur d'onde en nm et l'axe des ordonnées correspond à la section efficace d'absorption à deux photons en GM.
 - la Figure 8 représente les spectres d'absorption à deux photons du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆** et **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆** dans le DMF. L'axe des abscisses correspond à la longueur d'onde en nm et l'axe des ordonnées correspond à la section efficace d'absorption à deux photons en GM.
 - la Figure 9 représente la viabilité cellulaire des cellules de cancer du sein MCF-7 incubées 4 jours avec différentes concentrations de **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆**. L'axe des ordonnées correspond au pourcentage de survie cellulaire et l'axe des abscisses correspond à la concentration en **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** en µg/mL.
 - la Figure 10 représente le principe du test au MTT.
 - la Figure 11 représente les images en microscopie confocale monophotonique de cellules MCF-7 avec A) marqueur nucléaire excité à 405 nm, B) **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** excité à 458 nm et C) superposition.
 - la Figure 12 représente une image en microscopie confocale multiphotonique de cellules MCF-7 marquées par le CellMask (marqueur membranaire) et incubées avec du **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** après excitation à 750 nm.
 - la Figure 13 représente sous forme d'histogramme l'efficacité de la thérapie photodynamique à deux photons sur des cellules MCF-7 incubées 5h avec le dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆**. L'axe des ordonnées correspond au pourcentage de survie cellulaire et chaque rectangle correspond à une concentration en

A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ en µg/mL. A) Contrôle, B) 5 µg/mL, C) 50 µg/mL, D) 100 µg/mL.

- la Figure 14 représente sous forme d'histogramme l'efficacité de la thérapie photodynamique à deux photons sur les cellules MCF-7 incubées 20 h avec le dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆**. L'axe des ordonnées correspond au pourcentage de survie cellulaire et chaque rectangle correspond à une expérience : A) contrôle (absence d'irradiation à deux photons et d'incubation avec un dendrimère), B) irradiation à deux photons uniquement, C) incubation avec le dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** uniquement et D) irradiation à deux photons après incubation avec le dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆**.
- la Figure 15 représente des images de microscopie en transmission de cellules MCF-7 incubées avec **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** A) non irradiées et B) après irradiation à deux photons.
- la Figure 16 représente la phototoxicité sur les cellules MCF-7 du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** en lumière naturelle. L'axe des ordonnées correspond au pourcentage de survie cellulaire et chaque rectangle correspond à une expérience : A) exposition à la lumière naturelle en absence d'incubation avec un dendrimère, B) exposition à la lumière naturelle après incubation avec le dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** (incubation 5 h avec du **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** à 20 µg/mL), C) absence d'exposition à la lumière naturelle en absence d'incubation avec un dendrimère, et D) absence d'exposition à la lumière naturelle après incubation avec le dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** (incubation 5 h avec du **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** à 20 µg/mL)
- la Figure 17 représente sous la forme d'un histogramme l'efficacité de la thérapie photodynamique à deux photons sur des cellules de MCF-7 incubées 5h à une concentration en dendrimères de 5µg/mL. L'axe des ordonnées correspond au pourcentage de survie cellulaire et chaque rectangle correspond à un dendrimère : A) contrôle (absence d'incubation avec un dendrimère), B) **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆**, C) **A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆**, D) **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆** et E) **A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆**.
- la Figure 18 représente l'efficacité de la thérapie photodynamique à deux photons sur des cellules de MCF-7 incubées 5h à des concentrations en dendrimères de 50 µg/mL et 100 µg/mL. L'axe des ordonnées correspond au pourcentage de survie cellulaire et chaque groupe de rectangle correspond à un dendrimère : A) contrôle (absence

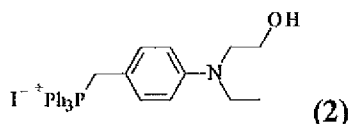
d'incubation avec un dendrimère), B) A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆, C) A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆, D) A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆ et E) A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆.

- la Figure 19 représente l'efficacité de la thérapie photodynamique à deux photons sur des cellules de MCF-7 incubées 20h à une concentration en dendrimères de 50 µg/mL. L'axe des ordonnées correspond au pourcentage de survie cellulaire et chaque rectangle correspond à un dendrimère : A) contrôle (absence d'incubation avec un dendrimère), B) A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆, C) A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆, D) A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆ et E) A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆.

1. Synthèse du chromophore / des dendrimères

Exemple 1 :

Iodure de [[4-[éthyl[(2-hydroxyéthyl)amino]phényl]méthyl]triphénylphosphonium (2)



A une solution de 2-(éthylphénylamino)éthanol **1** (3 g, 18.07 mmol), de triphénylphosphine (4.76 g, 18.07 mmol) et de paraformaldéhyde (0.488 g, 5.42 mmol) dans le chloroforme (25 mL), on ajoute du NaI (3.36 g, 18.07 mmol), de l'eau (1.28 mL) et de l'acide acétique (3.6 mL). Le mélange est chauffé à reflux pendant 68 h. De l'eau (40 mL) est ajoutée et le mélange est agité pendant 10 min. La phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂ et lavée avec du NaHCO₃ (25 mL) puis de l'eau (25 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le résidu est lavé à l'éther pour obtenir des cristaux blancs de **2** (9.88 g).

Rendement: 93%

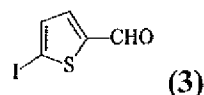
Point de fusion: 165-170 °C

RMN ¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ (ppm) 7.79 (m, 15H), 6.78 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 2H), 6.48 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.81 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H), 3.71 (m, 2H), 3.42 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.35 (m, 2H), 2.70 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 1.06 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75.47 MHz): δ (ppm) 147.3 (d, *J* = 2.6 Hz), 134.4 (d, *J* = 2.3 Hz), 133.3, (d, *J* = 9.6 Hz), 131.8 (d, *J* = 5.1 Hz), 129.5 (d, *J* = 12.3 Hz), 115.3 (d, *J* = 85.0 Hz), 111.4, 110.3 (d, *J* = 8.7 Hz), 58.1, 51.4, 44.4, 29.8 (d, *J* = 46.3 Hz), 11.2.

RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121.58 MHz): δ (ppm) 20.42.

Exemple 2 : 5-Iodo-2-thiophènecarboxaldéhyde (3)



A un mélange de 2-thiophènecarboxaldéhyde (1.79 g, 15.92 mmol) et de diiode (2.00 g, 7.96 mmol) dans le tétrachlorure de carbone (4 mL), on ajoute de l'acide iodique (0.70 g, 3.98 mmol), de l'eau distillée (3 mL), de l'acide acétique (8 mL) et de l'acide sulfurique concentré (0.12 mL). Le mélange est agité à 80°C pendant 1h puis à température ambiante pendant 12h. Les phases sont séparées, puis la phase organique est lavée avec une solution à 2% de NaHCO_3 puis avec une solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , puis évaporée sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec un mélange AcOEt / Heptane (1:9) pour donner des cristaux jaunes de **3** (2.95 g).

Rendement : 78%

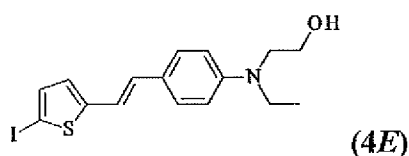
Point de fusion : 53°C

RMN ^1H (CDCl_3 , 300.13 MHz): 9.77 (s, 1H); 7.39 (s, 2H).

RMN ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.47 MHz): 181.1, 149.6, 138.2, 137.0, 87.8.

Exemple 3 :

(E)-2-[Ethyl-[4-[(1E)-2-(5-iodo-2-thiényl)éthényl]phényl]amino]éthanol (4 E)



Sous argon, on dissout l'aldéhyde **3** (1.95 g, 8.19 mmol) et le sel de phosphonium **2** (6.32 g, 12.29 mmol) dans du CH_2Cl_2 (50 mL) fraîchement distillé, puis tBuOK (1.84 g, 16.38 mmol) est ajouté. La solution est agitée à température ambiante pendant 15h. Le mélange est filtré sur silice, puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice, en éluant avec un mélange CH_2Cl_2 / AcOEt (98:2 à 92:8). On obtient un mélange de stéréoisomères **4 Z/E** (2.16 g). 1.34 g de ce mélange est dissous dans l'éther (50 mL) et une solution de diiode dans l'éther (1 g.L $^{-1}$, 3.4 mL) est ajoutée. Le mélange est agité sous irradiation (lampe tungstène, 75W) à température ambiante

pendant 20h. La couleur de la solution passe alors du jaune au vert. Après un lavage au $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, la phase étherée est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée sous pression réduite. On obtient des cristaux jaunes de **4 E** (1.02 g).

Rendement: 50%

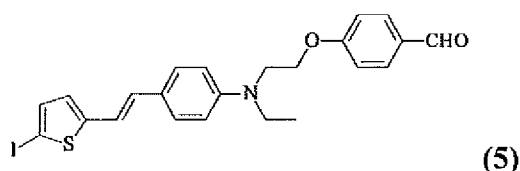
Point de fusion: 93 °C.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300.13 MHz): 7.34 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.12 (d, $J=3.7$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J=16$ Hz, 1H), 6.78 (d, $J=16$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.65 (d, $J=3.7$ Hz, 1H), 3.83 (m, 2H), 3.52 (m, 4H), 1.65 (t, $J=5.8$ Hz, 1H), 1.24 (t, $J=7$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75.47 MHz): 149.7, 147.7, 137.2, 129.1, 127.5, 125.6, 124.7, 116.5, 112.3, 70.2, 60.0, 52.2, 45.4, 11.8.

Exemple 4 :

4-[2-[Ethyl-[4-[(1E)-2-(5-iodo-2-thiényl)éthényl]phényl]amino]éthoxy]benzaldéhyde (5)



Sous argon, on dissout **4 E** (0.5 g, 1.25 mmol), le 4-hydroxybenzaldéhyde (0.31 g, 2.51 mmol) et de la triphénylphosphine (0.66 g, 2.51 mmol) dans du THF (15 mL) sous argon. Une solution de DIAD (0.5 mL, 2.51 mmol) dans le THF (3 mL) est ensuite ajoutée goutte à goutte et agitée à température ambiante pendant une nuit. Les solvants sont évaporés sous pression réduite et le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec du CH_2Cl_2 pour donner des cristaux jaunes de **5** (0.51 g).

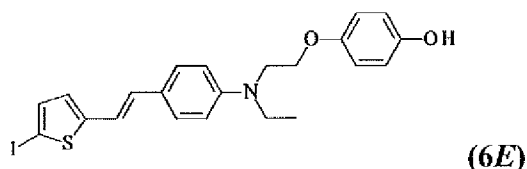
Rendement: 81%

Point de fusion: 108 °C.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300.13 MHz): 9.89 (s, 1H), 7.85 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.12 (d, $J=3.7$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 6.94 (d, $J=15.5$ Hz, 1H), 6.78 (d, $J=16$ Hz, 1H), 6.72 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 6.65 (d, $J=3.7$ Hz, 1H), 4.24 (t, $J=6$ Hz, 2H), 3.82 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 3.55 (m, 2H), 1.25 (t, $J=7$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75.47 MHz): 190.9, 163.7, 149.9, 147.2, 137.5, 132.1, 130.1, 129.4, 127.9, 125.9, 124.7, 116.7, 114.8, 111.9, 70.6, 65.8, 49.4, 45.8, 12.4.

Exemple 5 :

4-[2-[Ethyl-[4-[(1*E*)-2-(5-iodo-2-thiényl)]éthényl]phényl]amino]éthoxy]phénol (6*E*)

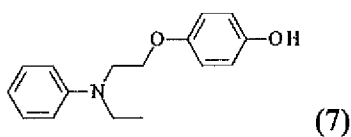
Sous argon, on dissout l'aldéhyde **3** (0.556 g, 2.34 mmol) et le sel de phosphonium **8** (2.09 g, 3.18 mmol) dans du CH₂Cl₂ fraîchement distillé (25 mL), puis tBuOK (0.53 g, 4.67 mmol) est ajouté. Le mélange est agité à température ambiante pendant 15h. Le mélange est filtré sur un mélange célite/silice. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec du CH₂Cl₂. On obtient un mélange de stéréoisomères **6 E/Z** (45/55). Ce mélange **6 E/Z** est dissous dans l'éther et une solution de I₂ dans Et₂O est ajoutée. Le mélange est agité sous irradiation (lampe tungstène, 75W) pendant 20 h. Après un lavage au Na₂S₂O₃, la phase étherée est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. On obtient des cristaux jaunes de **6 E** (0.62 g).

Rendement : 54%.

Point de fusion: 114 °C.

RMN ¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): 7.34 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 2.5 Hz, 4H), 6.71 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 6.64 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 4.53 (s, 1H), 4.09 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.74 (t, *J* = 6 Hz, 2H), 3.53 (q, 2H), 1.24 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75.47 MHz): 152.7, 149.9, 149.7, 147.4, 137.4, 129.4, 127.8, 125.8, 124.4, 116.5, 116.1, 115.5, 111.8, 70.3, 66.0, 49.6, 45.6, 12.3.

Exemple 6 : 4-[2-(Ethylphénylamino)éthoxy]phénol (7)

Sous argon, on dissout le 2-[éthylphényl]amino]éthanol (**1**) (3.00 g, 18.07 mmol), l'hydroquinone (3.98 g, 36.14 mmol) et PPh₃ (9.51 g, 36.14 mmol) dans du THF (55 mL) anhydre. Une solution de DIAD (7.16 mL, 36.14 mmol) dans le THF (35 mL) est ensuite ajoutée goutte à goutte et le mélange est agité à température ambiante pendant 15 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit brut est purifié par chromatographie sur

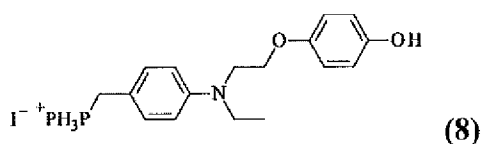
colonne de gel de silice en éluant avec du CH_2Cl_2 . Des cristaux jaunes de **7** sont obtenus (1.68 g).

Rendement : 36%

RMN ^1H (CDCl_3 , 300.13 MHz): 7.38 (m, 2H), 6.87 (m, 7H), 6.58 (s, 1H), 4.17 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 3.80 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 3.59 (q, 2H), 1.31 (t, $J=6.9$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75.47 MHz): 152.6, 149.6, 147.4, 129.3, 116.1, 115.5, 111.9, 66.0, 49.6, 45.5, 12.1.

Exemple 7 : Iodure de [[4-[éthyl[2-(4-hydroxyphénoxy)éthyl]amino]phényl]méthyl]-triphénylphosphonium (8)



Un mélange de **7** (0.600 g, 2.34 mmol), PPh_3 (0.552 g, 2.34 mmol) et para-formaldéhyde (0.063 g, 0.70 mmol) est dissous dans du toluène (8 mL). NaI (0.434 g, 2.34 mmol), l'eau (0.4 mL) et l'acide acétique (1.2 mL) sont ensuite ajoutés. La solution est agitée 66h à 61°C. De l'eau (30 mL) est ajoutée et le mélange est agité 10 min. La phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 puis lavée avec du NaHCO_3 (20 mL) et de l'eau (20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées et concentrées sous vide. Le résidu est lavé avec de l' Et_2O pour donner des cristaux gris (1.362 g).

Rendement : 88%

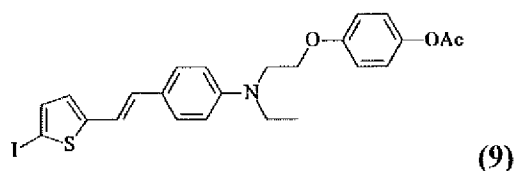
RMN ^1H (CDCl_3 , 300.13 MHz): δ (ppm) 7.64 (m, 15H), 7.05 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 6.76 (m, 4H), 6.44 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 4.88 (d, $J=12.9$ Hz, 2H), 4.05 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 3.77 (s, 1H), 3.71 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 3.48 (q, 2H), 1.22 (t, $J=6.9$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (DMSO, 75.47 MHz): δ (ppm) 151.2, 151.0, 147.2 (d, $J=2.7$ Hz), 134.8 (d, $J=2.9$ Hz), 133.9 (d, $J=9.7$ Hz), 131.0 (d, $J=9.7$ Hz), 129.9 (d, $J=12.2$ Hz), 118.1 (d, $J=84.7$ Hz), 115.6, 115.2, 112.4 (d, $J=8.7$ Hz), 111.5, 65.7, 48.8, 44.5, 27.5 (d, $J=45.0$ Hz), 11.6.

RMN ^{31}P (DMSO, 121.58 MHz): δ (ppm) 21.1.

Exemple 8 :

Acétate de 4-[2-[éthyl-[4-[(1E)-2-(5-iodo-2-thiényl)]éthényl]phényl]amino]éthoxy]phényle (9)



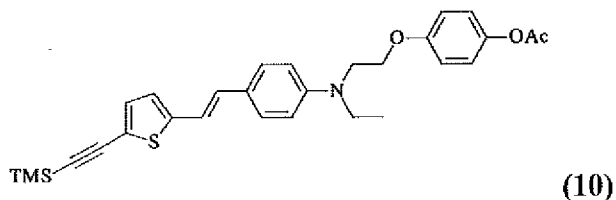
Sous argon, on ajoute à 0°C de la DMAP (22 mg, 0.18 mmol) à une solution de **6 E** (0.62 g, 1.26 mmol) dans le CH₂Cl₂ (36 mL). De la triéthylamine (0.39 mL) est ensuite ajoutée à 0°C, puis le chlorure d'acétyl (0.19 mL, 2.73 mmol) est additionné lentement. Le mélange est agité à température ambiante pendant 16 h. De la glace puis une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (20 mL) sont ajoutées. La phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂ (3 × 15 mL). Les phases organiques réunies sont séchées et évaporées sous pression réduite, et le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec du CH₂Cl₂ afin d'obtenir des cristaux jaunes de **9** (0.61 g).

Rendement : 97%

RMN ¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): 7.34 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 6.78 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 6.64 (d, *J* = 4 Hz, 1H), 4.11 (t, *J* = 6 Hz, 2H), 3.74 (t, *J* = 6 Hz, 2H), 3.49 (q, 2H), 2.28 (s, 3H), 1.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75.47 MHz): 169.8, 156.3, 150.0, 147.3, 144.4, 137.4, 129.5, 127.8, 125.8, 124.6, 122.4, 116.6, 115.0, 111.82, 111.8, 70.3, 65.8, 49.6, 45.7, 12.3.

Exemple 9 : Acétate de 4-[2-[éthyl-4-[(1*E*)-2-(5-triméthylsilyl)-2-thiényl]éthényl]phényl]amino]éthoxy]phényle (10**)**



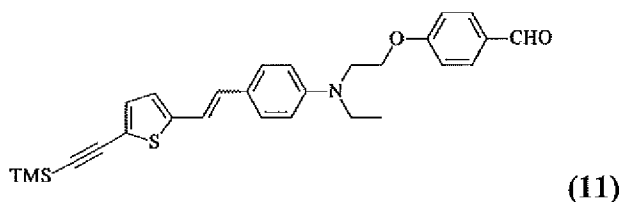
L'air est purgé d'une solution de **9** (0.37 g, 0.70 mmol) et de Et₃N (1 mL) dans du toluène (5 mL) par bullage d'argon pendant 20 min. La solution est chauffée à 40°C, puis du CuI (3 mg, 0.02 mmol), du Pd(PPh₃)₂Cl₂ (12 mg, 0.02 mmol) et de l'éthynyltriméthylsilane (0.19 mL, 1.31 mmol) sont ajoutés successivement. Le mélange est alors agité à 40°C pendant 16 h. Les solvants sont évaporés sous pression réduite et le produit brut est purifié par colonne chromatographique en éluant avec un mélange CH₂Cl₂/heptane (6:4). Des cristaux orange de **10** sont obtenus (0.33g).

Rendement: 94%

RMN ^1H (CDCl_3 , 300.13 MHz): 7.37 (d, $J = 9 \text{ Hz}$, 2H), 7.12 (d, $J = 3.9 \text{ Hz}$, 1H), 7.03 (d, $J = 9 \text{ Hz}$, 2H), 6.98 (d, $J = 16 \text{ Hz}$, 1H), 6.90 (d, $J = 9 \text{ Hz}$, 2H), 6.87 (d, $J = 16 \text{ Hz}$, 1H), 6.83 (d, $J = 3.9 \text{ Hz}$, 1H), 6.72 (d, $J = 9 \text{ Hz}$, 2H), 4.13 (t, $J = 6 \text{ Hz}$, 2H), 3.77 (t, $J = 5.9 \text{ Hz}$, 2H), 3.54 (q, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.26 (t, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 3H), 0.30 (s, 9 H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75.47 MHz): 169.8, 156.4, 147.5, 145.8, 144.5, 133.4, 129.8, 128.0, 124.7, 124.3, 122.5, 120.2, 117.0, 115.1, 111.9, 99.3, 98.4, 65.9, 49.7, 45.8, 12.4, 0.0.

Exemple 10 : 4-[2-[éthyl-4-[(1E)-2-(5-triméthylsilyl-2-thiényl)éthényl]phényl]amino]éthoxy]benzaldéhyde (11)



Une solution de **5** (0.774 g, 1.54 mmol) et de Et_3N (3 mL) dans le toluène (15 mL) est dégazée sous argon pendant 20 min. La solution est chauffée à 40°C , puis CuI (6 mg, 0.03 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (22 mg, 0.03 mmol) et de l'éthynyltriméthylsilane (0.33 mL, 2.31 mmol) sont ajoutés successivement. Le mélange est alors agité à 40°C pendant 16h. Les solvants sont évaporés sous pression réduite et le produit brut est purifié par colonne chromatographique avec un mélange CH_2Cl_2 /heptane (6/4 jusqu'à 7/3). On obtient 0.634 g du mélange de stéréoisomères **11 Z/E** (10/90), sous la forme d'une huile brune.

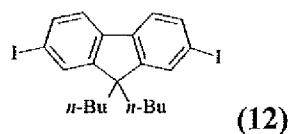
Rendement: 87%

Stéréoisomère majoritaire (E) :

RMN ^1H (CDCl_3 , 300.13 MHz): δ (ppm) 9.9 (s, 1H), 7.9 (d, $J = 9 \text{ Hz}$, 2H), 7.4 (d, $J = 9 \text{ Hz}$, 2H), 7.1 (d, $J = 3.7 \text{ Hz}$, 1H), 7.01 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H), 6.97 (d, $J = 16 \text{ Hz}$, 1H), 6.85 (d, $J = 16 \text{ Hz}$, 1H), 6.82 (d, $J = 3.8 \text{ Hz}$, 1H), 6.7 (d, $J = 8.9 \text{ Hz}$, 2H), 4.2 (t, $J = 6 \text{ Hz}$, 2H), 3.8 (t, $J = 5.9 \text{ Hz}$, 2H), 3.5 (q, 2H), 1.3 (t, $J = 7 \text{ Hz}$, 3H), 0.3 (s, 9H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75.47 MHz): δ (ppm) 190.9, 163.8, 147.5, 145.8, 133.6, 132.2, 130.4, 129.8, 128.2, 124.6, 120.4, 117.3, 115.0, 112.1, 111.7, 99.6, 98.4, 66.1, 49.7, 46.1, 12.6, 0.1.

Exemple 11 : 9,9-Dibutyl-2,7-diiodo-9H-fluorène (12)



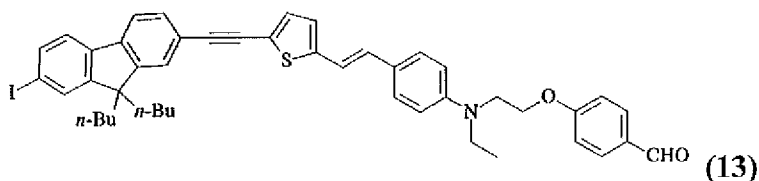
Dans un ballon de 20 mL surmonté d'un réfrigérant, on mélange du *n*-Bu₄NBr (0.31 g, 0.96 mmol) et du KOH (2.68 g, 47.8 mmol) dans de l'eau (2.7 mL) et l'on chauffe à 65°C. Puis une solution de 2,7-diiodo-9*H*-fluorène (2.0 g, 4.78 mmol) et de 1-bromobutane (3.93 g, 28.68 mmol) dans le toluène (5 mL) est ajoutée, et le mélange est agité à 65°C pendant 1 heure. Ensuite, la phase aqueuse est extraite avec CH₂Cl₂. Les phases organiques réunies sont séchées sur Na₂SO₄, avant d'être filtrées sur silice. Les solvants sont évaporés pour obtenir **12** sous la forme de cristaux blancs (2.33 g).

Rendement: 92%

Point de fusion: 130-131 °C

RMN ¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ (ppm) 7.65 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 1.7 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 1.90 (m, 4H), 1.08 (m, 4H), 0.68 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H), 0.56 (m, 4H).

Exemple 12 : 4-[2-[[4-[(1*E*)-2-[5-[(9,9-dibutyl-7-iodo-9*H*-fluorèn-2-yl)éthynyl]-2-thiényl]éthényl]phényl]éthylamino]éthoxy]benzaldéhyde (13)



Une solution de **11** (0.63 g, 1.34 mmol), de 9,9-dibutyl-2,7-diiodo-9*H*-fluorène **12** (2.13 g, 4.01 mmol) et de Et₃N (2.4 mL) dans le toluène (12 mL) est dégazée sous argon pendant 20 min. La solution est chauffée à 40°C, puis le CuI (5.7 mg, 0.03 mmol) et le Pd(PPh₃)₂Cl₂ (21 mg, 0.03 mmol) sont ajoutés. Une solution de TBAF dans le THF (1 M, 0.80 mmol) préalablement dégazée sous argon est alors ajoutée. Le mélange est agité à 40°C pendant 16h, puis les solvants sont évaporés sous pression réduite et le produit brut est purifié par colonne chromatographique en éluant avec un mélange CH₂Cl₂/heptane (6:4). Des cristaux oranges de **13** sont obtenus (0.83 g).

Rendement: 77%

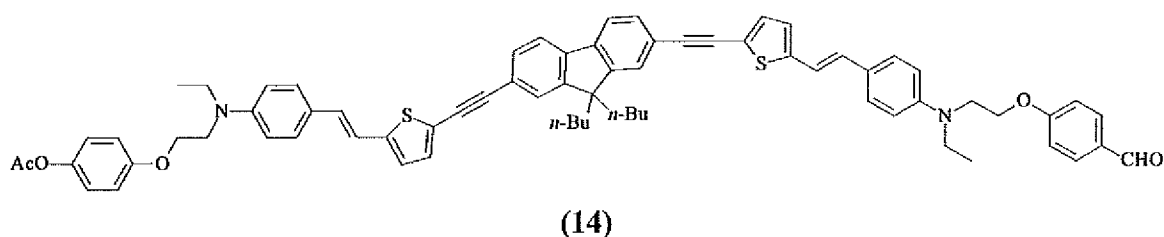
Point de fusion: 146 °C.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300.13 MHz): 9.89 (s, 1H), 7.85 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.68 (dd, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.63 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.51 (dd, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.42 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 9$ Hz, 2H), 7.18 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.96 (d, $J = 16$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 6.73 (d, $J = 9$ Hz, 2H), 4.25 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.83 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.56 (q, 2H), 1.96 (m, 4H), 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.14 (m, 4H), 0.72 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 0.56 (m, 4H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75.47 MHz): 190.6, 163.4, 153.2, 150.0, 147.0, 145.5, 140.2, 139.8, 135.8, 132.5, 131.87, 131.82, 130.3, 129.9, 129.3, 127.8, 125.4, 124.7, 124.6, 121.7, 121.5, 120.2, 119.6, 116.9, 114.5, 111.7, 94.6, 92.9, 83.7, 65.6, 55.1, 49.3, 45.6, 39.9, 29.5, 25.7, 22.8, 13.6, 12.2.

HRMS (ES $^+$): m/z 826.21862 calculé pour $\text{C}_{46}\text{H}_{46}\text{NO}_2\text{INaS}$ [(M+Na) $^+$], trouvé 826.2185.

Exemple 13 : Acétate de 4-[2-[[4-[(1E)-2-[5-[2-[9,9-dibutyl-7-[2-[5-[(1E)-2-[4-[éthyl-[2-[4-(formyl)-phénoxy]éthyl]amino]phényl]éthényl]-2-thiényl]ethynyl]-9H-fluorèn-2-yl]ethynyl]-2-thiényl]éthényl]phényl]éthylamino]éthoxy]phényle (14)



Une solution de **10** (0.33 g, 0.66 mmol), de **13** (0.48 g, 0.60 mmol) et de Et_3N (2.8 mL) dans le toluène (14 mL) est dégazée sous argon pendant 20 min. La solution est chauffée à 40°C, puis le CuI (2.3 mg, 12 μmol) et le $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (8.4 mg, 12 μmol) sont ajoutés. Une solution de TBAF dans le THF (1 M, 0.42 mmol) préalablement dégazée sous argon est alors ajoutée, et le mélange est agité à 40°C pendant 16h. Les solvants sont évaporés sous pression réduite et le produit brut est purifié par colonne chromatographique en éluant avec un mélange CH_2Cl_2 /heptane (7:3). Des cristaux oranges de **14** sont obtenus (0.46 g).

Rendement: 70%

Point de fusion: 160 °C.

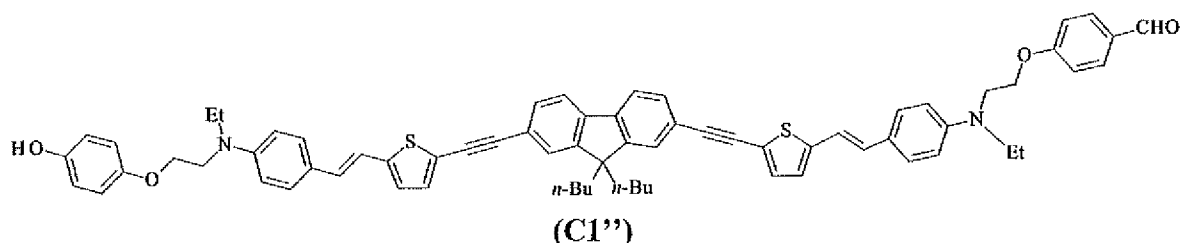
RMN ^1H (CDCl_3 , 300.13 MHz): 9.89 (s, 1H), 7.85 (d, $J = 9$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.52 (m, 4H), 7.39 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.19 (d, $J = 4$ Hz, 2H), 7.01 (d, $J = 9$ Hz, 2H), 7.00 (2xd, $J = 16$ Hz, 2H), 6.90 (s, 4H), 6.89 (m, 2H), 6.85 (d, $J = 16$ Hz, 2H), 6.73 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.72 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 4.24 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 4.14 (t, $J = 6$ Hz, 2H),

3.82 (m, 4H), 3.53 (m, 4H), 2.29 (s, 3H), 2.03 (m, 4H), 1.28 (m, 6H), 1.16 (m, 4H), 0.73 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 0.63 (m, 4H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75.47 MHz): 190.9, 170.0, 163.8, 156.4, 151.2, 145.8, 144.5, 132.8, 132.2, 130.6, 130.3, 129.8, 128.1, 125.83, 125.76, 125.0, 124.0, 124.81, 124.77, 122.5, 120.6, 120.1, 117.3, 115.2, 114.9, 111.9, 65.94, 65.92, 55.3, 49.8, 49.62, 49.60, 45.96, 45.86, 26.0, 23.2, 21.1, 13.9, 12.5.

HRMS (ES⁺): m/z 1129.46184 calculé pour $\text{C}_{72}\text{H}_{70}\text{N}_2\text{O}_5\text{NaS}_2$ [(M+Na)⁺], trouvé 1129.4620.

Exemple 14 : Acétate de 4-[2-[[4-[(1*E*)-2-[5-[2-[9,9-dibutyl-7-[2-[5-[(1*E*)-2-[4-[éthyl-2-(4-hydroxyphénoxy)éthyl]amino]phényl]éthényl]-2-thiényl]éthynyl]-9*H*-fluorén-2-yl]éthynyl]-2-thiényl]éthényl]phényl]éthylamino]éthoxy]benzaldéhyde (C1'')



Le photosensibilisateur protégé **14** (0.46 g, 0.42 mmol) est dissous dans un mélange d'EtOH (10 mL) et de THF (28 mL). Une solution de NaOH (0.5 M, 4 mL) est ajoutée et le mélange est agité 20 min à température ambiante. HCl (1 M, 15 mL) est ensuite ajouté. La phase aqueuse est extraite au CH_2Cl_2 (10 mL). La phase organique est ensuite lavée à l'eau (5 mL), séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée sous vide. Le produit brut est purifié sur colonne chromatographique en éluant avec du CH_2Cl_2 . Des cristaux oranges de **C1''** sont obtenus (0.37 g).

Rendement: 84%

Point de fusion: 94 °C.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300.13 MHz): 9.89 (s, 1H), 7.85 (d, $J = 9$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.52 (m, 4H), 7.39 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.19 (d, $J = 4$ Hz, 2H), 7.01 (d, $J = 9$ Hz, 2H), 6.99 (2xd, $J = 16$ Hz, 2H), 6.89 (m, 2H), 6.87 (d, $J = 16$ Hz, 2H), 6.77 (s, 4H), 6.73 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.72 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 5.19 (s, 1H), 4.24 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 4.10 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 3.80 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.73 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.53 (m, 4H), 2.01 (m, 4H), 1.28 (m, 6H), 1.16 (m, 4H), 0.73 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 0.63 (m, 4H).

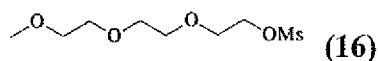
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75.47 MHz): 191.1, 163.8, 152.8, 151.2, 149.9, 147.6, 147.3, 145.9, 145.8, 140.8, 140.7, 132.8, 132.2, 130.6, 130.1, 129.8, 129.6, 128.1, 128.0, 125.7, 124.98,

124.91, 124.7, 124.6, 121.89, 121.8, 120.5, 120.3, 120.1, 117.2, 116.9, 116.1, 115.6, 114.8, 111.9, 111.8, 95.06, 94.9, 84.1, 84.0, 66.1, 65.9, 55.3, 49.8, 49.5, 45.9, 45.7, 40.3, 26.0, 23.1, 13.9, 12.46, 12.44.

HRMS (ES⁺) : m/z 1065.46933 calculé pour C₇₀H₆₉N₂O₄S₂ [(M+H)⁺], trouvé 1065.4691.

ATR-FTIR (cm⁻¹): 3363, 2926, 2189, 2037, 1685, 1596, 1507, 1446, 1397, 1349, 1256, 1221, 1182, 1158, 1136, 1074, 1020, 946, 885, 806, 751.

Exemple 15 : Méthanesulfonate de 2-[2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy]éthyle (16)



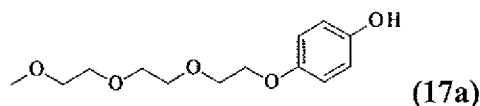
Dans un ballon sous argon, on ajoute à 0°C Et₃N (5.83 mL) à une solution de 2-[2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy]éthanol (**15**) (6.00 g, 36.58 mmol) dans le CH₂Cl₂ (10 mL). Le mélange est agité vigoureusement et une solution de chlorure de méthanesulfonyle (3.25 mL, 42.07 mmol) dans le CH₂Cl₂ (3 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange est agité à température ambiante pendant 24 h. Le précipité blanc formé est filtré, et le filtrat est lavé avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (2×10mL). La phase aqueuse est extraite au CH₂Cl₂, puis les phases organiques réunies sont séchées sur Na₂SO₄ et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner **16** sous la forme d'une huile jaune (8.46 g).

Rendement : 95%

RMN ¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): 4.36 (m, 2H), 3.74 (m, 2H), 3.64 (m, 6H), 3.51 (m, 2H), 3.33 (s, 3H), 3.04 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75.47 MHz): 71.7, 70.5, 70.4, 70.3, 69.2, 68.8, 58.8, 37.5.

Exemple 16 : 4-[2-[2-(2-Méthoxyéthoxy)éthoxy]éthoxy]phénol (17a)



A une solution de **16** (8.46 g, 34.97 mmol) et d'hydroquinone (3.86 g, 34.97 mmol) dans le DMSO (25 mL) refroidie à 0 °C avec un bain de glace, est ajouté KOH (5.89 g, 104.91 mmol). Le mélange est agité à 0°C puis à température ambiante pendant une nuit. De l'eau (20 mL) est alors ajoutée. La phase aqueuse est extraite à l'Et₂O (3×30 mL) pour séparer le composé **16** n'ayant pas réagi et le produit disubstitué **17b**. La phase aqueuse est acidifiée avec du HCl concentré et extraite avec du CHCl₃ (3×20 mL). Les phases organiques sont

rassemblées, lavées avec de l'eau jusqu'à pH neutre, séchées sur Na₂SO₄ et le solvant est évaporé sous vide. Le composé **17a** est obtenu sous la forme d'une huile marron (3.69 g).

Rendement: 41%

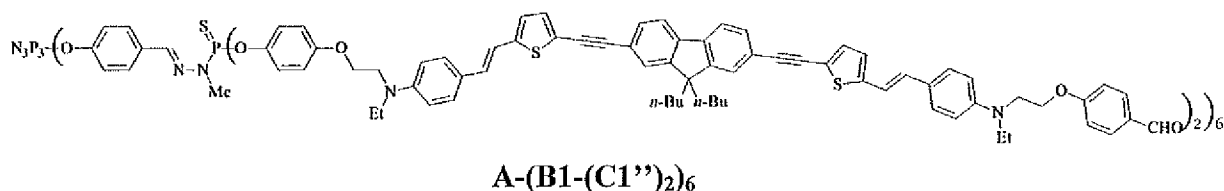
RMN ¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): 6.82 (s, 1H), 6.73 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 6.69 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 3.98 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.79 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.70 (m, 6H), 3.55 (m, 2H), 3.34 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75.47 MHz): 152.3, 150.1, 115.9, 115.5, 71.7, 70.5, 70.4, 70.3, 69.7, 67.8, 58.8.

HRMS (ES⁺) : *m/z* 279.12029 calculé pour C₁₃H₂₀O₅Na [(M+Na)⁺], trouvé 279.1203.

ATR-FTIR (cm⁻¹): 3333, 2873, 1508, 1448, 1355, 1214, 1096, 1064, 824, 753.

Exemple 17 : Dendrimère A-(B1-(C1'')₂)₆



La réaction est effectuée à l'abri de la lumière. A une solution de photosensibilisateur **C1''** (152 mg, 142.72 μmol) dans le THF distillé (0.75 mL), est ajouté Cs₂CO₃ (93 mg, 285.43 μmol). La solution est agitée à 35°C pendant 2 h, puis ajoutée à une solution de dendrimère de première génération possédant des fonctions P(S)Cl₂ terminales **A-(B1')**₆ (20 mg, 10.95 μmol) dans 0.75 mL de THF distillé. Le mélange est agité à 35°C pendant 7 jours. L'avancement de la réaction est suivi par RMN ³¹P, en ajoutant dans le tube RMN un capillaire de C₆D₆. Le mélange réactionnel est filtré, et le dendrimère est précipité dans du pentane (200 mL). Le précipité orange est lavé avec de l'acétate d'éthyle, puis purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (pentane/THF 1:1 jusqu'à THF 100%), pour conduire à **A-(B1-(C1'')₂)₆** sous la forme d'une poudre orange (106 mg).

Rendement: 69%

Point de fusion: 178 °C.

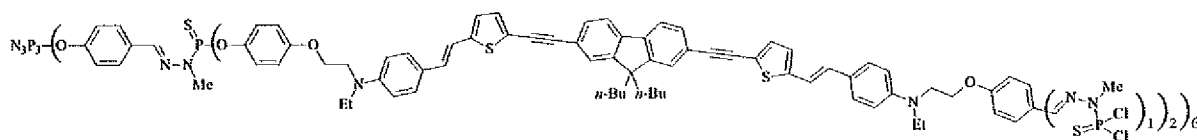
RMN ¹H (CD₂Cl₂, 300.13 MHz) 9.86 (s, 12H), 7.82 (d, *J* = 8.7 Hz, 24H), 7.67 (d, *J* = 7.8 Hz, 24H), 7.61 (m, 18H), 7.51 (m, 48H), 7.38 (d, *J* = 9 Hz, 24H), 7.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 24H), 7.16 (2×d, *J* = 9 Hz, 24H), 7.05- 6.81 (m, 132 H), 6.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 48H), 6.64 (d, *J* = 7.5 Hz, 24H), 4.24 (t, *J* = 6 Hz, 24H), 3.98 (t, *J* = 6 Hz, 24H), 3.80 (t, *J* = 6 Hz, 24H), 3.62 (s br, 24H), 3.54 (q, 24H), 3.40 (s br, 24H), 3.21 (d, *J* = 12 Hz, 18H), 2.00 (m, 48H), 1.21-1.02 (m, 120H), 0.77-0.48 (m, 120H).

RMN ^{13}C (CD_2Cl_2 , 75.47 MHz) 191.1, 164.2, 156.7, 151.8, 148.2, 148.1, 146.5, 146.4, 144.8 (d, $J = 7.5 \text{ Hz}$), 141.3, 133.4, 132.3, 130.9, 130.8, 130.3, 130.2, 128.8, 128.5, 126.3, 125.4, 125.1, 124.9, 122.9, 122.8, 122.3, 122.2, 121.9, 121.8, 120.8, 120.7, 120.6, 117.3, 117.2, 115.6, 115.3, 112.5, 95.4, 84.4, 84.3, 66.6, 66.5, 55.8, 50.0, 46.3, 46.2, 40.6, 33.6 (d, $J = 12.07 \text{ Hz}$), 26.5, 23.6, 14.2, 12.6.

RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121.58 MHz): 64.3, 8.5.

LC/MS: m/z 14198.2 masse moyenne calculée pour $\text{C}_{888}\text{H}_{852}\text{N}_{39}\text{O}_{54}\text{NaP}_9\text{S}_{30}$ [(M+Na)+], trouvé: 14197.1.

Exemple 18 : Dendrimère A-(B1-(C1-(D1')₁)₂)₆



A-(B1-(C1-(D1')₁)₂)₆

La réaction est effectuée à l'abri de la lumière. Une solution de **26** (508.3 μL , 91.5 μmol) dans le CHCl_3 est ajoutée sur **A-(B1-(C1'')₂)₆** (86.4 mg, 6.10 μmol) à 0°C. Le mélange est agité à température ambiante pendant 5 jours. L'avancement de la réaction est suivi par RMN du proton. Le dendrimère **A-(B1-(C1-(D1')₁)₂)₆** est précipité dans du pentane (200 mL) pour éliminer l'excès de **26**, filtré sous argon puis séché sous pression réduite pour donner une poudre orange (85 mg).

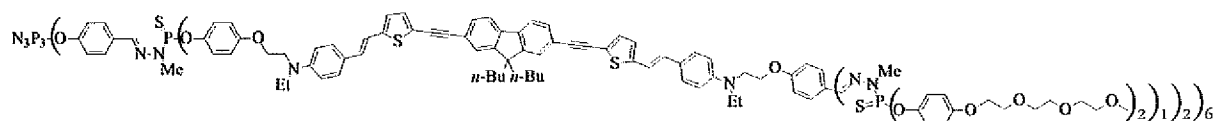
Rendement: 86%

Point de fusion: 184 °C.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300.13 MHz) 7.68 (m, 126H), 7.38 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 24H), 7.31 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 24H), 7.16 (2×d, $J = 9 \text{ Hz}$, 24H), 7.08 (d, $J = 7.8 \text{ Hz}$, 24 H), 6.95 (m, 108H), 6.73 (d, $J = 7.8 \text{ Hz}$, 48H), 6.64 (d, $J = 7.8 \text{ Hz}$, 24H), 4.19 (t, $J = 4.5 \text{ Hz}$, 24H), 3.96 (s br, 24H), 3.80 (s br, 24H), 3.62 (s br, 24H), 3.53 (m, 84H), 3.19 (d, $J = 9.6 \text{ Hz}$, 18H), 1.98 (m, 48H), 1.15 (m, 120H), 0.69 (m, 120H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75.47 MHz): 160.4, 156.2, 151.6, 151.2, 147.5, 145.8, 144.3, 141.8, 140.8, 135.9, 132.8, 130.6, 129.7, 129.1, 128.3, 128.1, 127.3, 125.7, 125.6, 124.8, 124.7, 122.4, 121.8, 121.6, 120.6, 120.5, 120.1, 117.2, 117.1, 115.1, 114.9, 112.0, 95.1, 84.2, 84.1, 68.1, 65.9, 65.7, 55.3, 49.7, 45.9, 45.8, 40.3, 34.5, 31.9, 30.5, 28.8, 26.1, 23.2, 21.3, 14.2, 12.5, 12.4.

RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121.58 MHz): 64.3, 63.3, 8.6.

Exemple 19 : Dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆**A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆**

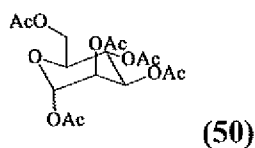
La réaction est effectuée à l'abri de la lumière. A une solution de 4-[2-[2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy]éthoxy]phénol (**17a**) (12 mg, 46.50 μmol) dans le THF distillé (2 mL), est ajouté Cs_2CO_3 (29 mg, 89.28 μmol). La solution est agitée à température ambiante pendant 1 nuit, puis ajoutée à une solution de dendrimère A-(B1-(C1-(D1')₁)₂)₆ (30.1 mg, 1.86 μmol) dans 1.5 mL de THF. Le mélange est agité à température ambiante pendant 5 jours. L'avancement de la réaction est suivi par RMN du phosphore. Le mélange réactionnel est filtré avec une canule sous argon et précipité dans du pentane (200 mL). Le solide orange résultant est lavé à l'éther pour éliminer l'excès de **17a**, puis filtré. Après avoir solubilisé le produit brut dans un minimum de THF, le mélange est centrifugé 4 min à 10000 tours/min pour éliminer le chlorure de césium formé au cours de la réaction. Le surnageant est récupéré, et le produit est précipité dans du pentane, filtré sous argon, et séché sous pression réduite. On obtient une poudre orange de A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ (30 mg).

Rendement: 75%

Point de fusion: 178 °C

RMN ¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): 7.68-7.47 (m, 126H), 7.37 (2×d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 48H), 7.13-6.54 (m, 324H), 4.16-3.16 (m, 558H), 1.97 (m, 48H), 1.11 (m, 120H), 0.66 (m, 120H).

RMN ³¹P (CDCl₃, 121.58 MHz) : 64.6, 8.5.

Exemple 20 : 1,2,3,4,6-Penta-O-acétyl-D-mannopyranose (50)

Dans un ballon sous argon, le D-(+)-mannose (5 g, 27.75 mmol) est dissous dans 15 mL de pyridine à -10°C. L'anhydride acétique (12.6 mL, 130 mmol) est ajouté goutte à goutte à -10°C. Le mélange est ensuite agité pendant 17 h. De la glace est ajoutée à cette solution limpide, et un précipité blanc se forme, que l'on filtre sur fritté. Le solide blanc pâteux obtenu est redissous dans du DCM. Après lavage à l'eau, puis au NaHCO_3 , la phase organique est

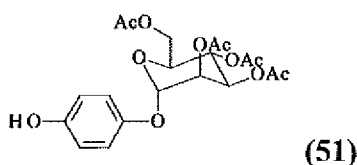
séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée sous pression réduite. On obtient alors une poudre blanche (6.73 g) de **50**, sous la forme d'un mélange d'anomères α et β dans un rapport 87/13.

Rendement: 62%

Anomère majoritaire α :

RMN ^1H (CDCl_3 , 300.13 MHz): 6.01 (d, $J = 1.8 \text{ Hz}$, 1 H), 5.34 – 5.15 (m, 3 H), 4.22 (dd, $J = 4.8 \text{ Hz}$, $J = 12.3 \text{ Hz}$, 1 H), 4.03 (m, 2 H), 2.11 (s, 3 H), 2.10 (s, 3 H), 2.03 (s, 3 H), 1.99 (s, 3 H), 1.94 (s, 3 H).

Exemple 21 : 2,3,4,6-Tétraacétate de 4-hydroxyphényl- α -D-mannopyranoside (51)



A une solution de composé **50** (1 g, 2.56 mmol) dans le DCM (5.5 mL), est ajoutée l'hydroquinone (848 mg, 7.68 mmol). Le mélange blanc hétérogène résultant est refroidi à 0°C , et $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (2.6 mL, 20.48 mmol) est ajouté goutte à goutte pendant 20 min. Le mélange devient alors jaune pâle. Le milieu réactionnel est alors agité pendant 2 jours, en laissant la température remonter à température ambiante. Le mélange devenu marron est lavé avec du NaHCO_3 ($2 \times 10 \text{ mL}$). La phase aqueuse est rose et la phase organique est jaune. Cette phase organique est ensuite lavée avec H_2O ($2 \times 10 \text{ mL}$), puis avec de la saumure ($2 \times 10 \text{ mL}$). La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée sous pression réduite. L'huile brune obtenue est purifiée par colonne chromatographique, en éluant avec $\text{AcOEt}/\text{Heptane}$ (1:1). Le composé **51** est obtenu sous la forme d'une poudre beige (400 mg). Seul l'anomère α est obtenu.

Rendement: 30%

RMN ^1H (CDCl_3 , 300.13 MHz): 6.95 (d, $J = 9 \text{ Hz}$, 2 H), 6.76 (d, $J = 9 \text{ Hz}$, 2 H), 5.54 (dd, $J = 3.3 \text{ Hz}$, $J = 9.9 \text{ Hz}$, 1 H), 5.45 (m, 4 H), 4.33 (m, 1 H), 4.10 (m, 2 H), 2.19 (s, 3 H), 2.05 (s, 3 H), 2.04 (s, 3 H), 2.03 (s, 3 H).

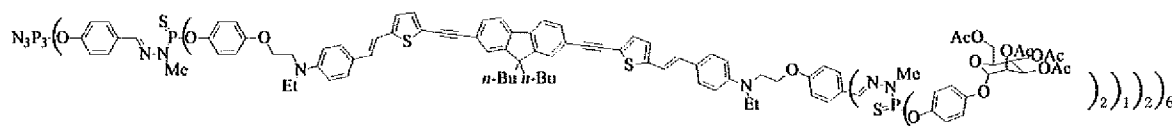
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75.47 MHz): 171.31, 170.73, 170.68, 170.42, 152.09, 150.16, 118.54, 116.61, 97.17, 70.06, 69.54, 69.51, 66.58, 62.79, 21.46, 21.29, 21.27, 21.26.

HRMS (ES $^+$) : m/z 463.1216 calculé pour $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_{11}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, trouvé 463.1212.

Microanalyse calculée pour $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$ (440,4) :

% théorique : C : 54.55, H : 5.49

% expérimental : C : 54.68, H : 5.74.

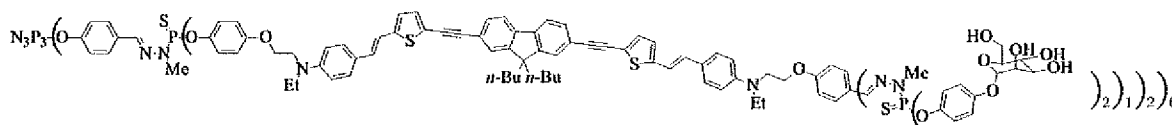
Exemple 22 : Dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆**A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆**

La réaction est réalisée à l'abri de la lumière. A une solution de 2,3,4,6-tétraacétate de 4-hydroxyphényl- α -D-mannopyranoside (**51**) (65.5 mg, 148.8 μ mol) dans 1 mL de THF distillé est ajouté Cs₂CO₃ (97 mg, 297.6 μ mol) à 0°C. La solution est agitée pendant 4h30 à 0°C, puis elle est ajoutée à une solution de A-(B1-(C1-(D1')₁)₂)₆ (50 mg, 3.1 μ mol) dans 15 mL de THF. Le mélange est agité à température ambiante pendant 12 jours. L'avancement de la réaction est suivi par RMN du phosphore. Le mélange réactionnel est filtré par canule sous argon. Le dendrimère est précipité dans du pentane (250 mL), puis filtré et lavé à l'éther pour éliminer l'excès de mannose **51**, avant d'être séché sous vide. Le solide orange obtenu est redissous dans un minimum de THF et centrifugé 4 min à 10000 tours/min pour éliminer le chlorure de césium formé. Le surnageant est récupéré, et le produit est précipité dans du pentane, filtré sous argon, et séché sous pression réduite. On obtient une poudre orange de A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆ (77.5 mg).

Rendement : 91%

RMN ¹H (CDCl₃, 300.13 MHz) : 7.68-7.47 (m, 126 H), 7.37 (dd, $J = 8.7$ Hz, 48 H), 7.17 (m, 252 H), 6.70 (s br, 48 H), 6.62 (d, $J = 8.1$ Hz, 24 H), 5.54 (dd, $J = 3.3$ Hz, 24 H), 5.43 (m, 72 H), 4.28 (dd, $J = 5.7$ Hz, 24 H), 4.17 (m, 72 H), 3.94 (s br, 24 H), 3.78 (s br, 24 H), 3.61 (s br, 24 H), 3.51 (s br, 24 H), 3.39 (s br, 24 H), 3.32 (d, $J = 10.5$ Hz, 36 H), 3.19 (d, $J = 9.9$ Hz, 18 H), 2.18 (s, 72 H), 2.04 (m, 216 H), 1.71 (s br, 48 H), 1.26 (m, 120 H), 0.69 (m, 120 H).

RMN ³¹P (CDCl₃, 121.58 MHz): 64.5, 63.9, 8.6.

Exemple 23 : Dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆**A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆**

A une solution de A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆ (62 mg, 2.42 μ mol) dans un mélange de CH₂Cl₂ (2.2 mL) et de MeOH (1.2 mL), est ajoutée à 0°C une solution de MeONa (0.46 mL, 0.5 M). Le mélange est agité à 0°C pendant 2 h. Le précipité formé est filtré sous argon, lavé

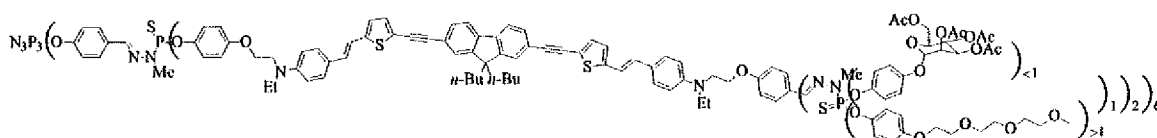
à l'éther puis au pentane et séché sous vide. Une poudre orange de **A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆** est obtenue (42 mg).

Rendement : 80%

RMN ¹H (DMSO, 300.13 MHz) : 7.86-7.12 (m, 174 H), 7.07-6.48 (m, 324 H), 5.28 (s, 24H), 5.20-2.75 (m, 462H), 1.71 (s br, 48H), 1.11 (m, 120 H), 0.47 (m, 120 H).

RMN ^{31}P (DMSO, 121.58 MHz): 63.8, 8.6.

Exemple 24 : Dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4Ac})₂)₁)₂)₆



A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4Ac})₂)₁)₂)₆

La réaction est réalisée à l'abri de la lumière. A une solution de 2,3,4,6-tétraacétate de 4-hydroxyphényl- α -D-mannopyranoside (**51**) (0.48 g, 0.11 mmol) dans 1 mL de THF distillé est ajouté Cs_2CO (0.07 g, 0.22 mmol) à 0°C. La solution est agitée pendant 1 h à 0°C, puis elle est ajoutée à une solution de **A-(B1-(C1-(D1')₁)₂)₆** (0.15 g, 9.31 μmol) dans le THF (2 mL). Le mélange est agité à température ambiante pendant 1 nuit. En parallèle, à une solution de 4-[2-[2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy]éthoxy] (**17a**) (0.03 g, 0.11 mmol) dans le THF (1 mL) est ajouté Cs_2CO_3 (0.07 g, 0.22 mmol) à 0°C. La solution résultante est agitée pendant 1 h à 0°C, puis elle est ajoutée au mélange précédent. L'agitation est poursuivie à température ambiante pendant 6 jours. Le suivi de la réaction par RMN du phosphore montre que la réaction n'est pas terminée. Des quantités supplémentaires de **47** (4.00 mg, 9.31 μmol), de **17a** (2.30 mg, 9.31 μmol) et de Cs_2CO_3 (6 mg, 18.62 μmol) sont alors rajoutées. Le mélange réactionnel est ensuite agité à température ambiante pendant 10 jours supplémentaires. La réaction n'étant toujours pas terminée, **17a** (9.50 mg, 37.24 μmol) et Cs_2CO_3 (24 mg, 74.48 μmol) sont à nouveau rajoutés, et l'agitation est encore poursuivie pendant 21 jours à température ambiante. La RMN de phosphore du milieu réactionnel semblant montrer que la réaction est terminée, le dendrimère est précipité dans du pentane et lavé à l'éther, puis à l'acétate d'éthyle et séché sous vide. L'analyse RMN ^{31}P du produit isolé montre que la réaction n'est en fait pas finie. A une solution de **17a** (29.0 mg, 0.11 mmol) dans le THF (2 mL) est ajouté Cs_2CO_3 (0.07 g, 0.22 mmol) à 0°C. La solution est agitée pendant 4 h à 0 °C, puis elle est ajoutée à une solution du dendrimère incomplètement fonctionnalisé (0.15 g, 9.31 μmol) dans le THF (10 mL). Le mélange est cette fois agité à 30 °C pendant 5 jours. Le mélange réactionnel est

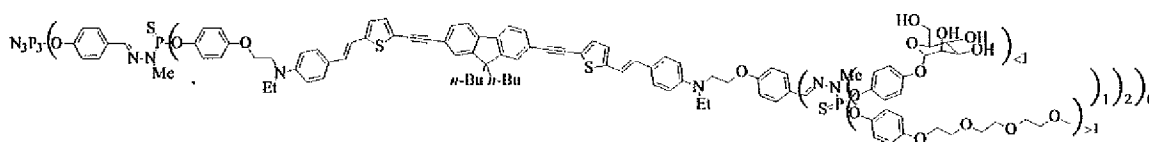
filtré par canule sous argon et le dendrimère est précipité dans du pentane (250 mL), puis filtré et lavé à l'éther puis à l'AcOEt, avant d'être séché sous vide. On obtient une poudre orange de **A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4Ac})₂)₁)₂)₆** (0.20 g).

Rendement : 94%

RMN ¹H (CDCl₃, 300.13 MHz) : 7.68-7.26 (m, 174 H), 7.16-6.62 (m, 324 H), 5.53 (dd, *J* = 3.0 Hz, 10 H), 5.43 (m, 30H), 4.17-3.15 (m, 438 H), 2.04 (s, 30H), 2.02 (m, 138 H), 1.31 (m, 120H), 0.69 (m, 120H).

RMN ³¹P (CDCl₃, 121.58 MHz): 64.6, 64.23, 63.9, 8.6.

Exemple 25 : Dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆



A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆

A une solution de **A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4Ac})₂)₁)₂)₆** (0.20 g, 8.78 μmol) dans un mélange de CH₂Cl₂ (5mL) et de MeOH (3 mL), est ajoutée à 0°C une solution de MeONa (0.70 mL, 0.5 M). Le mélange est agité à 0 °C pendant 2h. Le précipité formé est filtré sous argon, lavé au pentane puis à l'éther. Le produit est ensuite redissous dans un minimum de CH₂Cl₂ puis précipité dans le pentane et séché sous vide. Une poudre orange est obtenue (0.14 g).

Rendement : 76%

RMN ¹H (DMSO, 300.13 MHz) : 7.86-6.53 (m, 498H), 5.29 (s, 10H), 5.03-2.90 (m, 468H), 1.99 (m, 48H), 1.04 (m, 120H), 0.47 (m, 120H).

RMN ³¹P (DMSO, 121.58 MHz) : 64.0, 63.8, 8.5.

2. Propriétés photophysiques

Exemple 26 : absorption à un photon et émission des chromophores C1' et C1''

Les propriétés photophysiques du photosensibilisateur greffable **C1''** ont été mesurées dans le THF et comparées à celles de son analogue **C1'** dans le Tableau 1. **C1'** correspond à la formule générale **C'** dans laquelle $\alpha = \alpha' = -CH=CH-$, $\beta = \beta' = -C\equiv C-$ et $X^1 = X^2 = n$ -butyle. A la lecture du Tableau 1, on constate que les photosensibilisateurs **C1'** et **C1''** présentent tous deux une forte absorption dans la région violette, avec des coefficients d'extinction molaires supérieurs à 100 000 M⁻¹ cm⁻¹, ainsi qu'une émission située dans le

jaune. La présence de fonctions d'agrafage phénol et benzaldéhyde dans la molécule **C1''** conduisent à un déplacement hyperchrome de la bande d'absorption ainsi qu'à un déplacement hypsochrome des bandes d'absorption et d'émission (faible en absorption, mais plus marqué en émission), ce qui indique que ces fonctions modifient légèrement l'environnement du chromophore. Les groupements éthoxyphénol et éthoxybenzaldéhyde agissent comme des molécules de solvants qui contribuent à la réorganisation de l'état excité. On observe aussi un léger élargissement de la bande d'absorption, qui pourrait être attribué à une augmentation de l'élargissement inhomogène, causé par la présence de ces deux fonctions reliées au chromophore par des espaceurs flexibles, ce qui conduit à une augmentation du nombre de conformations. Des effets similaires ont déjà été observés lors du greffage de fonctions phénols sur d'autres chromophores. [C. Rouxel, M. Charlot, O. Mongin, T. R. Krishna, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral, M. Blanchard-Desce, "From Graftable Biphotonic Chromophores to Water-Soluble Organic Dendrimères for Biophotonics: The Importance of Environmental Effects", *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 16450-16462]

Tableau 1. Propriétés photophysiques des photosensibilisateurs **C1'** et **C1''**

Composé	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	$\epsilon^{\text{max } a}$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	Φ_f^b	τ^c (ns)	k_r^d (10^9 s^{-1})	k_{nr}^e (10^9 s^{-1})	τ_0^f (ns)	Φ_{Δ}^g
C1'	437	555	1.0×10^5	0.51	1.5	0.34	0.32	2.9	0.22
C1''	434	544	1.2×10^5	0.51	1.3	0.39	0.38	2.5	0.16

^a Coefficient d'extinction molaire à $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$. ^b Rendement quantique de fluorescence déterminé en utilisant comme standard le bisulfate de quinine dans H_2SO_4 0.5M ($\Phi = 0.546$). ^c Durée de vie de fluorescence. ^d Constante de désexcitation radiative, $k_r = \Phi_f / \tau$. ^e Constante de désexcitation nonradiative, $k_{nr} = (1 - \Phi_f) / \tau$. ^f Durée de vie naturelle. ^g Rendement quantique de production d'oxygène singulet dans le dichlorométhane, déterminé par rapport à la tétraphénylporphyrine dans le dichlorométhane ($\Phi_{\Delta} [\text{TPP}] = 0.60$).

Les deux composés maintiennent un rendement quantique de fluorescence élevé et identique de 51%, mais on constate que la durée de vie de fluorescence de **C1''** est légèrement plus faible, ce qui est lié à une augmentation des constantes de désexcitation radiative (ce qui peut être relié au déplacement hypsochrome) et non-radiative (ce qui suggère que les fonctions phénol et benzaldéhyde sont impliquées dans des processus supplémentaires de désexcitation non-radiative). La production d'oxygène singulet a été étudiée en mesurant la luminescence de $^1\text{O}_2$ à 1272 nm dans le dichlorométhane, par comparaison avec la tétraphénylporphyrine (TPP) dans le même solvant. Des rendements quantiques de production d'oxygène singulet de

22% et de 16% ont été respectivement obtenus pour **C1'** et **C1''**. Ces deux photosensibilisateurs présentent donc un rendement quantique d'oxygène singulet non négligeable tout en conservant un rendement quantique de fluorescence assez élevé.

Exemple 27 : Absorption et fluorescence à deux photons de **C1'** et **C1''**:

Les spectres d'absorption à deux photons (ADP) des composés **C1'** et **C1''** ont été déterminés dans le proche infra-rouge entre 700 et 950 nm, grâce à la technique de fluorescence par excitation à deux photons (TPEF). Les mesures sont effectuées à l'aide d'un laser titane:saphir délivrant des impulsions de 150 femtosecondes, en utilisant le protocole expérimental de Xu et Webb.[C. Xu, W. W. Webb, "Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm", *J. Opt. Soc. Am. B: Opt. Phys.* **1996**, *13*, 481-491] Pour les deux composés, on observe plusieurs bandes d'absorption intenses dans le proche infra-rouge (Figure 2). Les deux spectres d'absorption à deux photons, présentent la même allure, avec deux bandes possédant des maxima à 720 nm et à 830 nm. Le maximum à 830 nm est situé au double de la longueur d'onde maximale d'absorption à un photon et correspond à l'état excité de plus basse énergie autorisé à un photon. Le maximum à 720 nm, de plus haute énergie que le précédent, correspond à une transition interdite à un photon mais fortement autorisée à deux photons. Dans les deux cas, la bande à 720 nm est plus intense que la bande à 830 nm. Le photosensibilisateur symétrique **C1'** possède un σ_2 de 1300 GM à 720 nm et de 900 GM 820 nm, le photosensibilisateur dissymétrique **C1''** possède un σ_2 de 1900 GM à 720 nm et de 1200 GM à 820 nm. La désymétrisation du chromophore et la présence des fonctions d'agrafage phénol et benzaldéhyde conduisent à une augmentation des sections efficaces d'ADP d'environ 40%, soit le double de l'augmentation observée pour les coefficients d'extinction molaires en absorption à un photon.

Le photosensibilisateur **C1''** présente donc des caractéristiques photophysiques tout à fait satisfaisantes, dans certains cas mêmes supérieures à celles de **C1'**.

Exemple 28 : Absorption à un photon, fluorescence et photosensibilisation du dendrimère hydrosoluble A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆

Tableau 2. Propriétés photophysiques de **C1''** et des dendrimères A-(B1-(C1'')₂)₆ et A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ dans le THF

Composé	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$	$\epsilon^{\text{max } a}$	Φ_f^b	τ^c	Φ_A^d
---------	-------------------------------------	------------------------------------	----------------------------	------------	----------	------------

	(nm)	(nm)	(M ⁻¹ .cm ⁻¹)		(ns)	
C1''	434	544	1.2×10 ⁵	0.51	1.3	0.16
A-(B1-(C1'')₂)₆	433	547	1.2×10 ⁶	0.50	$\tau_1=0.56$; $n_1=63\%$ $\tau_2=1.5$; $n_2=37\%$	0.10
A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆	434	560	1.0×10 ⁶	0.21	$\tau_1=0.52$; $n_1=66\%$ $\tau_2=1.4$; $n_2=34\%$	0.07

^a Coefficient d'extinction molaire à $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$. ^b Rendement quantique de fluorescence déterminé en utilisant comme standard le bisulfate de quinine dans H₂SO₄ 0.5M ($\Phi = 0.546$). ^c Durée de vie de fluorescence. ^d Rendement quantique de production d'oxygène singulet dans le dichlorométhane, déterminé par rapport à la tétraphénylporphyrine dans le dichlorométhane (Φ_{Δ} [TPP] = 0.60).

Les propriétés d'absorption à un photon, de fluorescence et de production d'oxygène singulet, en solution dans le THF, du chromophore **C1''** et des dendrimères **A-(B1-(C1'')₂)₆** et **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** sont rassemblées dans le Tableau 2.

Tous les composés présentent une bande d'absorption intense allant du proche UV à la partie bleue du spectre visible, et une émission dans le visible du vert au jaune. Les dendrimères **A-(B1-(C1'')₂)₆** et **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** montrent une augmentation quasi linéaire du coefficient d'extinction molaire au maximum d'absorption avec le nombre de chromophores (Tableau 2).

Le greffage des photosensibilisateurs sur la plate-forme dendrimérique (lorsque l'on compare **C1''** et **A-(B1-(C1'')₂)₆**) induit un léger déplacement vers le rouge accompagné d'un élargissement de la bande d'émission, en relation avec une augmentation de la polarité induite par la plate-forme dendrimérique et la proximité des chromophores adjacents. Malgré un confinement aussi important des chromophores dans un volume aussi réduit, le dendrimère **A-(B1-(C1'')₂)₆** maintient le même rendement quantique de fluorescence que le chromophore isolé **C1''**. La flexibilité conformationnelle du chromophore et la présence des connecteurs π -conjugués doit faciliter la formation d'agrégats, ce qui est en accord avec un déclin de fluorescence biexponentiel.

Par ailleurs, un déplacement vers le rouge plus prononcé de la bande d'émission et une diminution significative du rendement quantique de fluorescence sont observés pour le dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆**, ce qui indique que l'addition d'une couche périphérique de chaînes triéthylèneglycol augmente la polarité de l'environnement des chromophores situés à l'intérieur du dendrimère, et modifie peut-être aussi leur positionnement relatif. Enfin, le rendement de production d'oxygène singulet est lui aussi légèrement réduit avec les dendrimères **A-(B1-(C1'')₂)₆** et **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆**.

Exemple 29: Effets de l'environnement du dendrimère hydrosoluble A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆

La Figure 3 représente la dépendance des propriétés d'absorption et d'émission du dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ en fonction de la polarité du solvant. Comme pour le chromophore isolé C1'', l'absorption de A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ est très peu affectée par la polarité du solvant alors qu'une solvatochromie positive est observée en émission. Cependant, on remarque que l'émission du dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ est déplacée vers le rouge dans les solvants peu polaires comme le toluène, avec un changement des intensités vibroniques relatives et une quasi disparition de la structure fine. Ceci confirme que la plateforme dendrimérique, les chaînes TEG périphériques et la proximité des chromophores adjacents concourent à modifier la polarité de l'environnement.

Exemple 30 : Absorption à deux photons du dendrimère hydrosoluble A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆

Les propriétés d'absorption à deux photons des dendrimères A-(B1-(C1'')₂)₆ et A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ ont été déterminées en mesurant leur fluorescence par excitation à deux photons (TPEF) dans le THF.

Tableau 3 : Données d'absorption à deux photons de C1'', A-(B1-(C1'')₂)₆ et A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆

Composé	$2 \lambda_{ADP}^{max}$ (nm)	$\lambda_{ADP}^{max1 \ a}$ (nm)	$\sigma_2^{max1 \ b}$ (GM)	λ_{ADP}^{max2} (nm)	σ_2^{max2} (GM)
C1''	868	820	1240	720	1890
A-(B1-(C1'') ₂) ₆	866	820	11200	730	19200
A-(B1-(C1-(D1-(E1) ₂) ₁) ₂) ₆	868	820	8160	730	13200

^a Longueur d'onde où l'ADP est maximale.

^b Section efficace d'ADP à λ_{ADP}^{max} . 1 GM = $10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1}$.

Comme on le voit sur la Figure 4 et dans le Tableau 3, les sections efficaces d'absorption à deux photons augmentent à peu près linéairement avec le nombre de chromophores greffés sur le dendrimère, conduisant à des valeurs extrêmement élevées, jusqu'à 19200 GM à 730 nm pour le dendrimère A-(B1-(C1'')₂)₆. Un tel comportement additif pour A-(B1-(C1'')₂)₆ indique que les réponses moléculaires individuelles des chromophores greffés sur la plate-

forme dendrimérique ne sont que légèrement affectées par le fort confinement et par la modification de l'environnement induite par la plate-forme dendrimérique. Concernant le dendrimère $A-(B1-(C1-(D1-(E1)_2)_1)_2)_6$, bien que l'introduction de groupements hydrosolubilisants conduise à une diminution d'environ 30% des sections efficaces d'ADP par rapport au dendrimère liposoluble $A-(B1-(C1'')_2)_6$, des valeurs très élevées (13200 GM à 730 nm) sont conservées.

De plus, des sections efficaces d'ADP supérieures à 5000 GM sont maintenues jusqu'à 900 nm pour $A-(B1-(C1'')_2)_6$ et jusqu'à 4000 GM pour $A-(B1-(C1-(D1-(E1)_2)_1)_2)_6$, ce qui est d'un grand intérêt pour les applications biologiques, pour la PDT à deux photons (où $\sigma_2\Phi_A$ est le facteur de mérite) comme pour l'imagerie multiphotonique (où $\sigma_2\cdot\Phi_F$ est le facteur de mérite).

Exemple 31 : Compatibilité du mannose avec le photosensibilisateur

Il est nécessaire de vérifier la compatibilité du mannose avec les propriétés d'émission du photosensibilisateur $C1''$. Pour cela, on étudie la fluorescence d'une solution de $C1''$ dans le DMSO en présence de quantités croissantes de mannose. Comme on peut le voir sur la Figure 5, l'intensité de fluorescence de $C1''$ ne diminue pas, même après ajout de 1760 équivalents de mannose. Le mannose n'est donc pas un inhibiteur de la fluorescence du chromophore $C1''$, et on peut donc conclure qu'il n'y a pas d'interaction entre le mannose et le photosensibilisateur.

Exemple 32 : Absorption à un photon, fluorescence et photosensibilisation du dendrimère mannose acétate

Les propriétés d'absorption à un photon, de fluorescence et de production d'oxygène singulet du $A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})_2)_1)_2)_6$ ont été mesurées dans le THF et sont rassemblées dans le Tableau 4.

Le $A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})_2)_1)_2)_6$ possède une bande d'absorption intense allant du proche UV à la partie bleue du spectre du visible, et une émission jaune dans le THF. Ces propriétés sont tout à fait comparables à celle du dendrimère $A-(B1-(C1-(D1-(E1)_2)_1)_2)_6$. Le coefficient d'extinction molaire au maximum d'absorption de $A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})_2)_1)_2)_6$ ($1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) est sensiblement plus élevé que celui de $A-(B1-(C1-(D1-(E1)_2)_1)_2)_6$ ($1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Toutefois, un déplacement vers le rouge de la bande d'émission et une diminution significative du rendement quantique de fluorescence sont observés pour le dendrimère $A-$

(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆ par rapport au dendrimère **A-(B1-(C1'')₂)₆**, ce qui indique que l'addition d'une couche périphérique de mannoses acétates augmente la polarité de l'environnement des chromophores situés à l'intérieur du dendrimère, et est également susceptible de modifier leur positionnement relatif.

Enfin, le rendement quantique de production d'oxygène singulet du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆** est de 0.11, ce qui est un peu moins élevé que celui du chromophore **C1''** seul (0.16), mais comparable à celui des dendrimères **A-(B1-(C1'')₂)₆** et **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** (0.10 et 0.07, respectivement).

Tableau 4 : Propriétés photophysiques du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆** dans le THF

Composé	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	$\varepsilon^{\text{max } a}$ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	Φ_f^b	Φ_{Δ}^c
A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆	437	555	1.2×10^6	0.30	0.11

^a Coefficient d'extinction molaire à $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$. ^b Rendement quantique de fluorescence déterminé en utilisant comme standard la Rhodamine 6G dans l'éthanol ($\Phi = 0.94$). ^c Rendement quantique de production d'oxygène singulet dans le dichlorométhane, déterminé par rapport à la tétraphénylporphyrine dans le dichlorométhane (Φ_{Δ} [TPP] = 0.60).

Exemple 33 : Absorption à deux photons **A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆** :

Les propriétés d'absorption à deux photons du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆** ont été déterminées en mesurant leur fluorescence par excitation à deux photons (TPEF) dans le THF, et comparées à celles du photosensibilisateur **C1''** seul ainsi qu'à celles du dendrimère **A-(B1-(C1'')₂)₆**.

Tableau 5 : Propriétés d'ADP du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆** dans le THF

Composé	$2 \lambda_{\text{ADP}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{ADP}}^{\text{max1 } a}$ (nm)	$\sigma_2^{\text{max1 } b}$ (GM)	$\lambda_{\text{ADP}}^{\text{max2}}$ (nm)	σ_2^{max2} (GM)
C1''	868	820	1240	720	1890
A-(B1-(C1'')₂)₆	866	820	11200	730	19200
A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆	874	820	12600	730	21000

^a Longueur d'onde où l'ADP est maximale.

^b Section efficace d'ADP à $\lambda_{\text{ADP}}^{\text{max}}$. 1 GM = 10^{-50} cm⁴.s.photon⁻¹.

Comme on peut le voir sur la Figure 6 et dans le Tableau 5, la section efficace d'absorption à deux photons du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆** est pratiquement proportionnelle au nombre de chromophore greffés sur le dendrimère, comme c'était le cas pour le dendrimère **A-(B1-(C1'')₂)₆**, conduisant à une valeur extrêmement élevée de 21000 GM à 730 nm. Cela indique que les réponses individuelles de chaque chromophore greffé sur la plate-forme ne sont que légèrement affectées par le confinement, et même par la modification de l'environnement induite par la présence des mannoses protégés. Les sections efficaces d'absorption du **A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆** sont même légèrement supérieures à celles du **A-(B1-(C1'')₂)₆**, ce qui semble indiquer que la présence de ces mannoses permet de mieux isoler les chromophores sur la plate-forme dendrimérique. Les sections efficaces d'ADP du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆** sont supérieures à 5000 GM jusqu'à plus de 900 nm, ce qui est positif pour une utilisation de ce dendrimère dans des applications biologiques.

Exemple 34 : Absorption à un photon, fluorescence et photosensibilisation de A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆

Les propriétés d'absorption à un photon, de fluorescence du **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆** ont été mesurées dans le DMF et sont rassemblées dans le Tableau 6. Ces mesures n'ont pas pu être réalisées dans le THF comme pour tous les autres dendrimères, car **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆** est insoluble dans ce solvant.

Tableau 6 : Propriétés photophysiques du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆** dans le DMF

Composé	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	$\varepsilon^{\text{max } a}$ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	Φ_f^b
A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆	439	600	9.8×10^5	0.11

^a Coefficient d'extinction molaire à $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$. ^b Rendement quantique de fluorescence déterminé en utilisant comme standard la Rhodamine 6G dans l'éthanol ($\Phi = 0.94$).

Le dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆** possède une bande d'absorption intense allant du proche UV à la partie bleue du spectre du visible, et une émission orange.

Le coefficient d'extinction molaire au maximum d'absorption de $9.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour le **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆** est sensiblement égal à celui du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** ($1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Le déplacement vers le rouge plus prononcé de la bande d'émission et la diminution significative du rendement quantique de fluorescence du

dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆** ($\Phi_F = 0.11$) par rapport aux autres dendrimères s'expliquent avant tout par l'utilisation du DMF, solvant nettement plus polaire que le THF. La présence d'une couche périphérique de mannoses peut aussi contribuer à l'augmentation de la polarité de l'environnement des chromophores situés à l'intérieur du dendrimère. Enfin, le rendement quantique de production d'oxygène singulet de **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆** n'a pas pu être mesuré, car ce dendrimère n'est pas soluble dans les solvants dans lesquels cette mesure peut être réalisée (toluène, chloroforme, DCM, EtOH, D₂O).

Exemple 35 : Absorption à deux photons de **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆**

Les propriétés d'absorption à deux photons du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆** ont été déterminées dans le DMF (Tableau 7, Figure 7), et comparées à celles du photosensibilisateur **C1''** seul ainsi qu'à celles du dendrimère **A-(B1-(C1'')₂)₆**. Les différences observées entre les spectres d'ADP de **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆** et de **A-(B1-(C1'')₂)₆** sont relativement peu importantes et peuvent s'expliquer par le changement de solvant.

Tableau 7 : Données d'ADP du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆** dans le DMF

Composé	$2 \lambda_{ADP}^{max}$ (nm)	$\lambda_{ADP}^{max1}{}^a$ (nm)	$\sigma_2^{max1}{}^b$ (GM)	λ_{ADP}^{max2} (nm)	σ_2^{max2} (GM)
A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆	878	830	10100	720	16900

^a Longueur d'onde où l'ADP est maximale.

^b Section efficace d'ADP à λ_{ADP}^{max} . 1 GM = $10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1}$.

Exemple 36 : Absorption à un photon, fluorescence et photosensibilisation du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆**

Bien que la solubilité du dendrimère mixte **A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆** dans le THF soit améliorée par rapport au dendrimère tout mannose **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆**, elle n'est pas suffisante pour réaliser l'ensemble des mesures photophysiques (en particulier la détermination du coefficient d'extinction molaire) dans ce solvant. Les propriétés photophysiques de **A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆** ont donc été mesurées dans le DMF, comme l'ont été précédemment celles du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆** (Tableau 8).

Tableau 8 : Propriétés photophysiques du dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆ dans le DMF

Composé	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	$\varepsilon^{\text{max } a}$ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	Φ_f^b
A-(B1-(C1-(D1-(E5 _{E1/E4H}) ₂) ₁) ₂) ₆	439	600	1.0×10^6	0.15

^a Coefficient d'extinction molaire à $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$. ^b Rendement quantique de fluorescence déterminé en utilisant comme standard la Rhodamine 101 dans l'éthanol ($\Phi = 1$).

Comme les précédents dendrimères, le composé A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆ possède une bande d'absorption intense dans la partie du spectre allant du proche UV à la partie bleue du visible, et comme le dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆ une émission orange dans le DMF.

Le coefficient d'extinction molaire de A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆ (1.0×10^6 M⁻¹.cm⁻¹) est pratiquement identique à celui de A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆ (9.8×10^5 M⁻¹.cm⁻¹). Cependant, le rendement quantique de fluorescence dans le DMF augmente sensiblement, de 11% à 15%.

Comme pour le dendrimère tout mannose, le rendement quantique de production d'oxygène singulet du dendrimère mixte n'a pas pu être mesuré, à cause de son manque de solubilité dans les solvants compatibles avec cette mesure.

Exemple 37 : Absorption à deux photons du dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆

Les propriétés d'absorption à deux photons du dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆ sont très proches de celles du dendrimère tout mannose A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆ (Figure 8 et Tableau 9). Le dendrimère mixte présente ainsi une section efficace d'ADP de 17100 GM à 730 nm. Un tel comportement indique que la modification de l'environnement induite par le remplacement de la moitié des mannoses par des groupements TEG n'affecte que très peu les réponses moléculaires individuelles des chromophores situés au cœur du dendrimère. Il faut aussi noter que les sections efficaces d'ADP dépassent également les 5000 GM jusqu'à 950 nm, ce qui est d'un grand intérêt pour les applications biologiques.

Tableau 9 : Données d'ADP du dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆ dans le DMF

Composé	$2 \lambda_{\text{ADP}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{ADP}}^{\text{max1 } a}$ (nm)	$\sigma_2^{\text{max1 } b}$ (GM)	$\lambda_{\text{ADP}}^{\text{max2}}$ (nm)	σ_2^{max2} (GM)
A-(B1-(C1-(D1-(E5 _{E1/E4H}) ₂) ₁) ₂) ₆	878	830	9610	730	17100

^a Longueur d'onde où l'ADP est maximale.

^b Section efficace d'ADP à λ_{ADP}^{max} . 1 GM = 10^{-50} cm⁴.s.photon⁻¹.

3. Applications *in vitro/in vivo*

Exemple 38 : Culture cellulaire

Les cellules MCF-7 viennent de la banque cellulaire américaine ATCC. Elles sont cultivées dans des flacons de cultures de 175 cm³ contenant du milieu DMEM/-F12 avec Glutamax enrichi avec 10% de sérum de veau foetal et 1% de Pénicilline/Streptomycine. Elles sont placées dans un incubateur à 37°C et à 5% de CO₂ à saturation en humidité et se multiplient jusqu'à former un tapis cellulaire monocouche jointif : on parle alors de confluence. A ce stade, on procède à un passage : les cellules sont décollées pour être réensemencées dans un nouveau flacon de culture. Pour cela, le surnageant contenant le milieu de culture appauvri et les cellules mortes est retiré puis deux rinçages doux au PBS sont effectués afin d'éliminer toutes traces de milieu et de sérum. En effet, le sérum contenu dans le milieu inactiverait l'enzyme, la trypsine, utilisée pour décoller les cellules. On ajoute 1.5 mL de trypsine que l'on garde au contact des cellules pendant 10 s avant de la retirer. On place le flacon de culture dans l'incubateur à 37°C / 5% de CO₂. Après 5 min, les cellules se décollent et sont récupérées avec 36 mL de milieu frais. C'est à partir de cette suspension cellulaire que les dilutions seront effectuées pour ensemercer les flacons de cultures ou chambres de culture cellulaire multi-compartmentées.

Une dilution au 5ème est effectuée pour la sous culture.

Exemple 39 : Viabilité cellulaire en présence du dendrimère hydrosoluble A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ :

Afin de solubiliser les dendrimères dans les milieux biologiques, ils sont tout d'abord dissous dans un minimum de THF à 5 mg/mL, puis cette solution mère est diluée dans le milieu de culture à la concentration choisie. Les tests biologiques ont été réalisés sur des cellules MCF-7, une lignée de cellules de cancer du sein humaines. Ce sont des cellules couramment utilisées car elles sont adhérentes et prolifèrent rapidement.

La viabilité cellulaire en présence de dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ a tout d'abord été testée (Figure 9). Les cellules MCF-7 sont incubées 4 jours à différentes concentrations de

A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ allant de 0 à 50 µg/mL. Après incubation, un test enzymatique au MTT est réalisé afin de déterminer le pourcentage de survie cellulaire. Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium). Le cycle tétrazolium est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, conduisant à la formation d'un précipité de couleur violette dans la mitochondrie (Figure 10).

La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (mais également à l'activité métabolique de chaque cellule). Il suffit donc après l'incubation des cellules avec du MTT pendant 3 h à 37 °C de dissoudre les cellules, leur mitochondries et donc les précipités violets de formazan dans un mélange DMSO/ EtOH (1 :1). Un simple dosage par spectroscopie de la densité optique à 540 nm permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes et métaboliquement actives.

Il en ressort que le **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** n'est pas toxique sans irradiation à ces concentrations, et que le THF jusqu'à 1% n'a pas non plus d'effet délétère sur la viabilité cellulaire.

- **Imagerie confocale**

Exemple 40 : Etudes par microscopie confocale

La microscopie confocale est une technique de microscopie optique. Elle permet d'étudier l'intérieur des objets microscopiques et de les visualiser en trois dimensions. Par rapport à la microscopie conventionnelle, la microscopie confocale offre différents avantages pour la localisation *in situ* d'une sonde fluorescente dans les cellules et plus particulièrement dans des coupes de tissus épais :

- élimination du signal fluorescent provenant d'autres plans que le plan focal grâce au pinhole,
- augmentation de la résolution latérale (0.2 µm) et axiale (0.4 µm)
- observation simultanée de différentes sondes fluorescentes
- acquisition de séries de sections optiques permettant la reconstruction 3D.

Une dilution au 25ème est effectuée sur les cellules pour leur ensemencement, afin de les observer (un ou deux photons) ou de les exciter (deux photons) au microscope confocal, dans des plaques multi-puits (384 ou 96 puits) à fond de verre (épaisseur 0.17 mm), avec un bord

noir en polystyrène. Il est à noter que pour toute série d'expériences, un des puits est conservé comme puits témoin (absence de dendrimères). On vérifie ainsi que l'autofluorescence des cellules est négligeable comparativement à la fluorescence des dendrimères. De plus, cela permet également de vérifier l'innocuité du laser sur les cellules.

Une solution mère de dendrimère à 5 mg/mL est préparée dans le THF ou dans le DMSO, et soniquée. Une dilution par 100 dans du milieu frais est effectuée afin d'obtenir une concentration de 50 µg/mL en dendrimère. Dans les plaquesensemencées la veille, le surnageant contenant le milieu de culture appauvri et les cellules mortes est retiré, et la solution de dendrimère à 50 µg/mL est ajoutée (50 µL pour les plaques 384 puits et 200 µL pour les plaques 96 puits). La plaque multi-puits est placée à l'incubateur à 37°C/5% CO₂ pendant un temps déterminé (3h, 5h, ou 20h). Le surnageant est retiré, puis un lavage doux au PBS est effectué. Les cellules sont ensuite incubées avec le Hoechst 33342 (marqueur nucléaire) ou avec le CellMask deep red (marqueur membranaire). L'incubation avec le Hoechst 33342 est réalisée à une concentration de 2 µg/mL. Après 30 min, le surnageant est retiré, un lavage doux au PBS est effectué, puis du milieu frais sans rouge de phénol est ajouté. La plaque multi-puits peut alors être analysée en imagerie confocale à un photon. L'incubation avec le CellMask deep red (marqueur membranaire) est réalisée à une concentration de 1 mg/mL. Après 30 min, le surnageant est retiré, un lavage doux au PBS est effectué, puis du milieu frais sans rouge de phénol est ajouté. La plaque multi-puits peut alors être analysée en imagerie confocale à deux photons.

Exemple 41 : Imagerie confocale monophotonique avec le dendrimère hydrosoluble A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆

Grâce à la brillance à un et à deux photons élevée du dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆, il est possible d'étudier sa pénétration dans les cellules par microscopie confocale mono et/ou biphotonique. Les cellules MCF-7 ont été incubées 30 min avec un marqueur nucléaire, le Hoechst 33342, à une concentration de 2 µg/mL et avec le A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ pendant 24 h à 50 µg/mL. Les cellules sont alors analysées par microscopie confocale avec un objectif ×63. Un contrôle avec du THF seul a aussi été réalisé et s'est avéré négatif. Le marqueur nucléaire est excité à 405 nm, et le A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ à 458 nm. Les images obtenues sont regroupées dans la Figure 11.

L'image A correspond à la fluorescence des noyaux cellulaires incubés avec le marqueur Hoechst 33342. Sur l'image B, on observe des points plus ou moins brillants, correspondant à

la fluorescence de petits agrégats du dendrimère $A-(B1-(C1-(D1-(E1)_2)_1)_2)_6$. La superposition de la fluorescence du noyau (A) avec la fluorescence du $A-(B1-(C1-(D1-(E1)_2)_1)_2)_6$ (B) permet d'obtenir l'image C de la Figure 11, qui montre que les dendrimères se situent autour des noyaux. La mise au point du plan z étant réalisée au niveau des noyaux cellulaires, on peut en conclure que les nano-objets se trouvent dans la cellule et ont donc bien passé la membrane cellulaire.

On observe aussi que les dendrimères ont un alignement en forme de croissant, ce qui laisse supposer qu'ils se situent dans les lysosomes, et qu'ils auraient donc été incorporés dans les cellules par endocytose.

Exemple 42 : Imagerie confocale biphotonique avec le dendrimère hydrosoluble $A-(B1-(C1-(D1-(E1)_2)_1)_2)_6$

L'internalisation des dendrimères a aussi été étudiée en microscopie confocale multiphotonique. Cette fois, les cellules ont été incubées avec un marqueur membranaire, le CellMask deep red pendant 30 min à une concentration de 1 mg/mL et avec le $A-(B1-(C1-(D1-(E1)_2)_1)_2)_6$ pendant 3 h à 50 µg/mL. Les deux chromophores sont excités à 750 nm. Le résultat est présenté sur la Figure 12. Les membranes cellulaires sont spécifiquement marquées par le CellMask, et on observe que les dendrimères se trouvent pour la plupart à l'intérieur des cellules, ce qui confirme que les dendrimères sont bien internalisés après 3 h d'incubation.

Les deux expériences de microscopie mono- et biphotonique (Exemples 41 et 42) nous apprennent que le dendrimère $A-(B1-(C1-(D1-(E1)_2)_1)_2)_6$ est efficacement internalisé. L'internalisation est un point important pour l'efficacité d'un photosensibilisateur en PDT. En effet, quel que soit le mécanisme de la photoréaction, l'oxygène singulet et/ou les espèces oxygénées réactives produites sont des oxydants puissants qui réagissent sur leur lieu de production. Pour qu'il puisse y avoir mort cellulaire, il faut que les espèces réactives soient produites à l'intérieur des cellules.

- **PDT**

Exemple 43 : Expériences de thérapie photodynamique

Pour ces expériences, les cellules sontensemencées uniquement dans des plaques 384 puits, afin d'exciter de façon précise tout le puits lors de l'irradiation laser. Une solution mère de dendrimère à 5 mg/mL est préparée dans le THF ou dans le DMSO, et soniquée. Une dilution

est effectuée dans du milieu frais afin d'obtenir les différentes concentrations de 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL et 100 µg/mL en dendrimère. Dans les plaquesensemencées la veille, le surnageant contenant le milieu de culture appauvri et les cellules mortes est retiré, et la solution de dendrimère à la concentration voulue est ajoutée (50 µL pour les plaques 384 puits). La plaque multi-puits est placée à l'incubateur à 37°C/5% CO₂ pendant un temps déterminé (5h ou 20h). Le surnageant est retiré, puis un lavage doux au PBS est effectué et 50 µL de milieu frais sont ajoutés. Les cellules sont alors prêtes à être irradiées.

Après irradiation, les plaques sont remises à l'incubateur à 37°C/5% CO₂ pendant 48h. 10 µL de CellTiter 96 AQueous One Solution (solution aqueuse de MTS commerciale) sont ajoutés au puits. Une première mesure sur le spectromètre de plaque Multiskan FC Thermo scientifique est réalisée à 492 nm. La plaque est ensuite remise à l'incubateur pendant 3h et à nouveau mesurée à 492 nm en spectrométrie.

Exemple 44 : Expériences phototoxicité en lumière naturelle

Le protocole est le même que pour la microscopie confocale. Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits en plastique. Les cellules sont incubées avec une solution de dendrimère à 20 µg/mL dans du milieu frais et placées à l'incubateur à 37°C/5% CO₂ pendant 5h. Les cellules sont ensuite placées à la lumière du jour (sur la paillasse à côté de la fenêtre) pendant 4h.

Une solution de MTT à 5 mg/mL dans du milieu sans sérum est filtrée, puis 20 µL de cette solution sont ajoutés dans le puits. La plaque est placée à l'incubateur. Après 3h, le surnageant est filtré doucement, puis 150 µL d'une solution d'éthanol/DMSO (1:1) sont ajoutés et la plaque est agitée 30 min avant d'être mesurée par colorimétrie sur le spectrophotomètre Multiskan FC à 540 nm.

Exemple 45 : Evaluation de l'efficacité du dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ en PDT biphotonique : variation de la concentration en dendrimère

Les cellules MCF-7 ont été incubées pendant 5 h avec le dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ à différentes concentrations. L'irradiation est effectuée sur un microscope confocal avec un laser titane:saphir délivrant des impulsions femtosecondes, (47 J.cm⁻² en moyenne à pleine puissance) avec un objectif ×10. Les cellules sont irradiées à 760 nm par 3 scans de 1.57 seconde chacun. Les résultats sont observés 48 h après l'irradiation, par un test enzymatique au MTS grâce à une mesure de la densité optique à 492 nm. Le MTS est un sel de tétrazolium analogue au MTT, mais le formazan formé est soluble directement dans le

milieu. (Le MTS est utilisé lorsque l'on travaille avec des plaques à fond de verre, ce qui est le cas ici).

Comme on peut le voir sur la Figure 13, l'augmentation de la concentration en A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ a une incidence sur l'efficacité en PDT à deux photons. Le pourcentage de survie cellulaire varie en effet de 85% à 64% lorsque l'on augmente la concentration en A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ de 5 µg/mL à 50 µg/mL. Lorsque l'on passe de 50 µg/mL à 100 µg/mL, le gain en efficacité est beaucoup plus limité, puisque la survie cellulaire n'est diminuée que de 6%. Il semble donc que 50 µg/mL soit une concentration suffisante.

Exemple 46 : Evaluation de l'efficacité du dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ en PDT biphotonique : variation du temps d'incubation

Cette expérience a été réalisée en augmentant le temps d'incubation (20 h au lieu de 5 h) et en utilisant la concentration intermédiaire de 50 µg/mL. La phototoxicité du laser et du dendrimère, seuls ou combinés a été étudiée dans les mêmes conditions que dans l'**Exemple 45**. Les résultats sont observés 48 h après l'irradiation (Figure 14). On observe que l'irradiation seule n'a aucun effet délétère sur les cellules, de même que les dendrimères seuls. En revanche, l'irradiation biphotonique des nano-objets permet de détruire environ 80% des cellules cancéreuses après 20 h d'incubation. L'allongement de la durée de l'incubation permet donc d'augmenter considérablement l'efficacité du dendrimère.

La Figure 15 permet d'apprécier l'efficacité du dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ en PDT à deux photons, par la comparaison des images en transmission d'une zone où les cellules MCF-7 incubées avec A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆ n'ont pas été irradiées et d'une zone irradiée à deux photons. La zone non irradiée est composée de cellules à ~70% de confluence, alors que sur la zone irradiée il ne reste presque plus de cellules cancéreuses, et l'on observe surtout des débris cellulaires.

Exemple 47 : Phototoxicité en lumière naturelle du dendrimère A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆

Actuellement, les patients ayant été traités en thérapie photodynamique avec les photosensibilisateurs sur le marché, tels que le Photofrin, restent photosensibles plusieurs jours (voire plusieurs semaines) après le traitement, et doivent éviter pendant cette période toute exposition de la peau et des yeux à la lumière du soleil ou aux lumières intérieures vives (ampoules sans abat-jour, lumières des néons...). Le non-respect de ces précautions peut entraîner des érythèmes, des œdèmes et/ou la formation de cloques. Ainsi, la phototoxicité du

dendrimère $A-(B1-(C1-(D1-(E1)_2)_1)_2)_6$ à la lumière du jour a été évaluée. Pour cela, les cellules MCF-7 ont été incubées 5 h avec du $A-(B1-(C1-(D1-(E1)_2)_1)_2)_6$ à 20 $\mu\text{g/mL}$, puis exposées ou non pendant 4 h à la lumière naturelle. La survie cellulaire est déterminée comme précédemment par un test au MTT mesuré à 540 nm. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la Figure 16 et montrent que le dendrimère ne présente pas de phototoxicité en lumière naturelle.

Le dendrimère $A-(B1-(C1-(D1-(E1)_2)_1)_2)_6$ ne présente donc des propriétés photosensibilisatrices que par excitation à deux photons dans le proche infra-rouge. Un tel résultat permet de traiter des tumeurs avec une résolution spatiale élevée tout en réduisant les effets secondaires non désirés liés à la photosensibilisation des patients à la lumière du jour. Cette grande différence d'efficacité entre la phototoxicité à un et à deux photons pourrait être liée au rendement quantique relativement faible de $A-(B1-(C1-(D1-(E1)_2)_1)_2)_6$, qui est contrebalancée par sa section efficace d'ADP très élevée. Autrement dit, le facteur de mérite $\sigma_2\Phi_A$ serait suffisamment élevé pour produire un effet phototoxique à deux photons avec le laser, mais le facteur de mérite $\varepsilon\Phi_A$ ne le serait pas pour qu'un effet phototoxique soit mesurable à la lumière du jour. Une autre explication peut tenir de la structure même du dendrimère dont le squelette dendrimérique produit un effet écran sous excitation à un photon.

Exemple 48 : Comparaison des Dendrimères pour la thérapie photodynamique ciblée.

Bien que les fonctions alcools libres des mannoses soient nécessaires à sa reconnaissance par les lectines, le dendrimère $A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})_2)_1)_2)_6$, possédant des mannoses protégés sous forme d'acétates, a été testé *in vitro* afin de comparer ses propriétés à celles du dendrimère $A-(B1-(C1-(D1-(E1)_2)_1)_2)_6$. Même si *in vitro* les fonctions mannoses protégées devraient jouer un rôle plus hydrosolubilisant que réellement cibleur, *in vivo* les groupes protecteurs mannoses pourront être clivés en présence d'estérases, et permettre alors une reconnaissance efficace par les lectines des cellules cancéreuses.

La présence de 24 mannoses déprotégés en périphérie du dendrimère $A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)_2)_1)_2)_6$ a engendré des problèmes de solubilité et des phénomènes d'aggrégation dans la plupart des solvants polaires ou apolaires, à l'exception du DMF. Nous nous sommes donc orientés vers un dendrimère possédant moins de groupements de ciblage mannoses. Dans le but de retrouver une solubilité adéquate tout en conservant un ciblage spécifique pour les lectines, nous avons décidé de décorer la périphérie du dendrimère $A-(B1-(C1-(D1')_1)_2)_6$ par une alternance de groupements hydrosolubilisants de type TEG et des groupements mannoses ($A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})_2)_1)_2)_6$).

L'efficacité en thérapie photodynamique à deux photons des dendrimères cibleurs **A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆**, **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆** et **A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆** a été évaluée et comparée à celle du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** ne possédant pas de fonctions de ciblage.

Comme pour les essais de PDT à deux photons réalisés dans les exemples précédents (**Exemples 45 à 47**), différents essais ont été réalisés sur des cellules de cancer du sein MCF-7, en faisant varier la concentration en dendrimères et le temps d'incubation.

La première série de tests a été réalisée avec une faible concentration en dendrimères de 5 µg/mL et un temps court d'incubation de 5h, en irradiant tous les échantillons à 760 nm par 3 scans de 1.57 seconde avec la même puissance laser.

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 17, l'irradiation laser seule (Contrôle), en l'absence de dendrimères, n'a aucun effet délétère sur les cellules. D'une manière générale, on observe que pour cette faible concentration en dendrimères, la présence des motifs mannoses permet d'améliorer l'efficacité de la 2P PDT. En effet, la présence de ces mannoses permet une internalisation plus rapide des dendrimères dans les cellules tumorales par rapport au dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** ne possédant pas ces motifs. Par ailleurs, on constate que l'efficacité du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)₂)₁)₂)₆** possédant 24 fonctions mannoses et celle du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})₂)₁)₂)₆** n'en possédant que 10 sont pratiquement identiques, avec une mortalité cellulaire de 43% et 42%, respectivement. Il n'est donc pas nécessaire que la surface des dendrimères soit entièrement recouverte de mannose. Il serait donc intéressant de diminuer encore le nombre de motifs mannoses, pour regarder si l'efficacité thérapeutique pourrait être maintenue avec un ou deux motifs mannoses seulement.

De plus, les fonctions mannoses contribuent à diminuer la solubilité des dendrimères dans des solvants tels que le THF. Or pour solubiliser les dendrimères dans les milieux biologiques, il sont tout d'abord dissous dans un minimum de THF (dont l'innocuité vis-à-vis des cellules a été prouvée), avant d'être dilués dans le milieu de culture. La diminution du nombre de mannoses devrait donc permettre d'améliorer la solubilité des dendrimères dans le THF et d'éviter leur agrégation dans les milieux biologiques.

On remarque enfin que l'efficacité du dendrimère **A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})₂)₁)₂)₆**, qui possède 24 motifs mannoses dont les fonctions alcools sont protégées sous forme d'acétates, se situe à un niveau intermédiaire entre celui du **A-(B1-(C1-(D1-(E1)₂)₁)₂)₆** qui ne possède aucune

fonction de ciblage, et celui du $A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)_2)_1)_2)_6$. Une certaine affinité des mannoses acétates pour les lectines est envisagée de même qu'une amélioration du caractère hydrosoluble du dendrimère évitant la formation d'agrégats.

Exemple 49 : Comparaison des dendrimères pour la thérapie photodynamique ciblée et variation de la concentration en dendrimère.

Deux autres séries de tests ont été effectuées sur les mêmes dendrimères, à des concentrations plus élevées de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en conservant le même temps d'incubation court de 5h. Les résultats sont présentés dans la Figure 18. Globalement, on observe que l'augmentation de la concentration conduit à une augmentation de l'effet cytotoxique. On constate également qu'à concentration égale, cette efficacité augmente lorsque les dendrimères possèdent des motifs mannoses spécifiques des cellules cancéreuses, et particulièrement à la concentration la plus élevée de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ainsi, à cette concentration, le pourcentage de survie cellulaire est de 58% avec le dendrimère $A-(B1-(C1-(D1-(E1)_2)_1)_2)_6$, contre 25% avec le dendrimère $A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)_2)_1)_2)_6$. On peut aussi noter que cet effet de concentration est plus marqué pour les dendrimères possédant des fonctions de ciblage que pour ceux qui n'en possèdent pas. Ainsi lorsque l'on compare les pourcentages de survie cellulaire à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour les différents dendrimères, on constate que le gain en efficacité est modéré pour $A-(B1-(C1-(D1-(E1)_2)_1)_2)_6$ (6%) et $A-(B1-(C1-(D1-(E4_{Ac})_2)_1)_2)_6$ (11%) qui ne possèdent pas de fonctions de ciblage, alors qu'il est plus important pour $A-(B1-(C1-(D1-(E5_{E1/E4H})_2)_1)_2)_6$ (18%) et surtout pour $A-(B1-(C1-(D1-(E4_H)_2)_1)_2)_6$ (26%). Avec ce dernier composé, on parvient à 75% de mortalité cellulaire. On peut attribuer ce phénomène à la présence accrue des lectines à la surface des cellules tumorales, ce qui permet une internalisation plus rapide des dendrimères possédant des groupements mannoses par rapport à ceux n'en possédant pas.

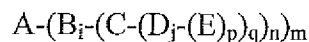
Exemple 50 : Comparaison des dendrimères pour la thérapie photodynamique ciblée et augmentation du temps d'incubation.

Une dernière série de tests a été réalisée en portant le temps d'incubation à 20h, avec une concentration intermédiaire en dendrimères de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 19). Comme on peut le voir sur la Figure 19, les 4 dendrimères présentent des efficacités en PDT à deux photons assez similaires, qu'ils soient ou non fonctionnalisés par des groupements mannoses. Il semble donc que, même si l'internalisation des dendrimères sans motifs mannoses est plus lente,

l'allongement de la durée de l'incubation leur permet d'arriver (*in vitro*) à des niveaux d'efficacité comparables à ceux des dendrimères cibles.

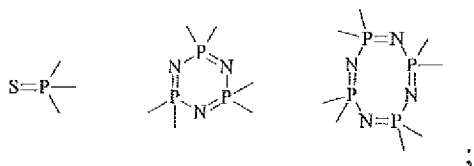
REVENDICATIONS

1. Composé chimique photosensibilisateur biphotonique constitué par un dendrimère de formule générale



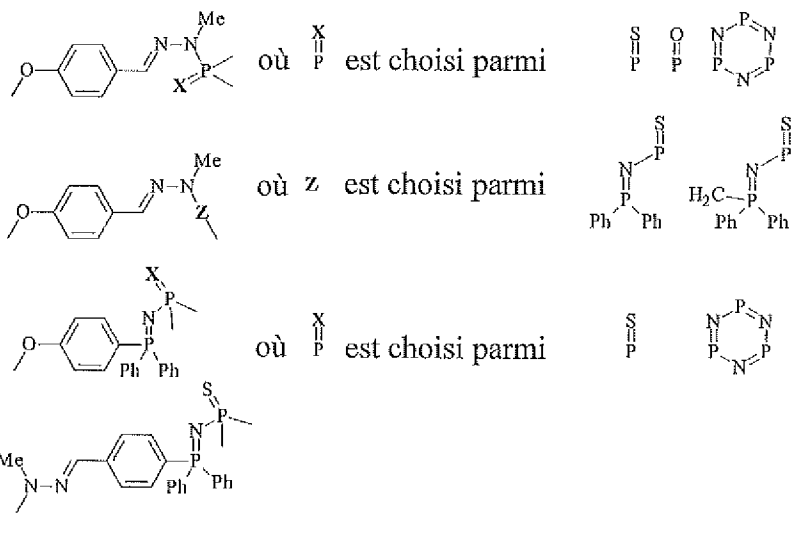
où :

- A représente un cœur phosphoré choisi parmi



m correspondant à la valence du cœur phosphoré A et étant un entier non nul compris de 3 à 8;

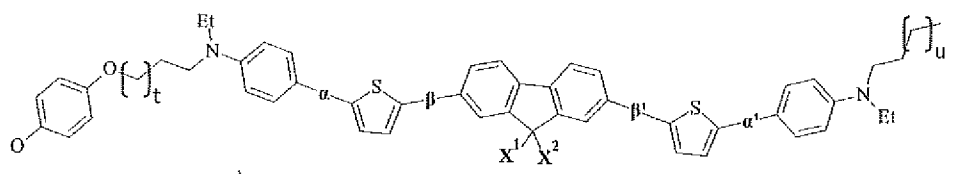
- B représente un premier motif, non chromophorique, directement lié m fois audit cœur phosphoré et choisi parmi



n correspondant à la valence du premier motif B et étant un entier non nul compris de 2 à 5 ; i représentant le nombre d'unités de répétition successives du premier motif B greffée sur une branche et étant égal à 0 ou étant un entier compris de 1 à 10, notamment de 1 à 4 ;

- C représente un second motif, chromophorique, présentant des propriétés d'absorption à deux photons, et étant lié n fois directement audit premier motif B lorsque i est différent de 0 ou étant lié m fois directement audit cœur phosphoré A lorsque i est égal à 0 ;

ledit second motif C étant de formule

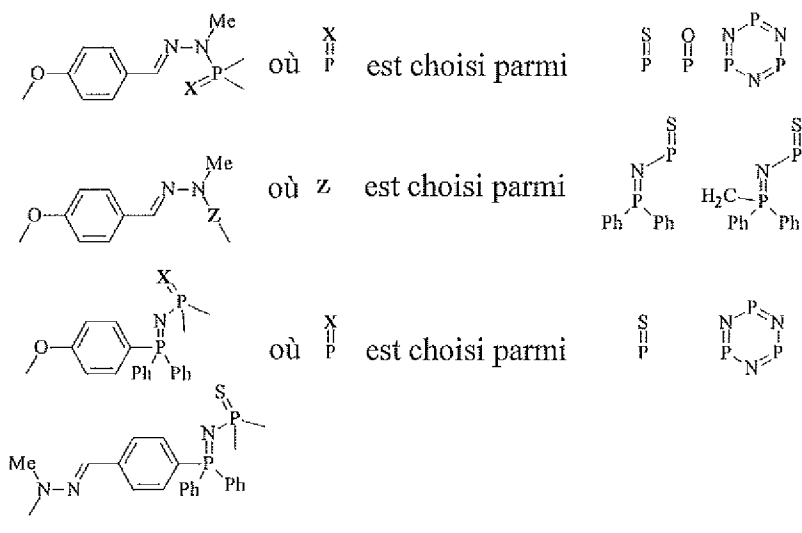


α , β , α' et β' représentant indépendamment les uns des autres soit un groupement $-\text{CH}=\text{CH}-$ soit un groupement $-\text{C}\equiv\text{C}-$;

t et u représentant indépendamment l'un de l'autre un entier compris de 0 à 9 ;

X_1 et X_2 , identiques ou différents, représentant chacun un groupement alkyle en C_1 à C_{25} , avantageusement en C_1 à C_{12} , de préférence en C_4 , $(CH_2)_x-SO_3M$, $(CH_2)_x-NAlk_3^+$, $(CH_2)_x-(OCH_2-CH_2)_y-OH$, M étant un métal alcalin et x étant égal à 0 ou étant un entier compris de 1 à 12, préférentiellement de 1 à 6, y étant un entier compris de 1 à 25 ; q correspondant à la valence du second motif C et étant un entier non nul, notamment égal à 1 ;

- D représente un appendice d'agrafage rattaché q fois directement audit second motif C, et choisi parmi



p correspondant à la valence de l'appendice d'agrafage D et étant un entier non nul compris de 2 à 5, notamment égal à 2 ; j représentant le nombre d'unités de répétition successives de l'appendice d'agrafage D greffée sur une branche et étant égal à 0 ou étant un entier compris de 1 à 5 ; notamment de 1 à 2 ;

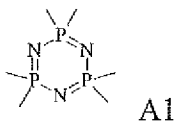
- E représente un groupement hydrosolubilisant et/ou une fonction de ciblage, l'ensemble de ces groupements hydrosolubilisants et/ou fonctions de ciblage formant une couche périphérique sur le dendrimère ; ledit groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage étant directement liés p fois audit appendice d'agrafage D lorsque j est différent de 0 ou étant directement liés q fois audit second motif C lorsque j est égal à 0.

2. Composé chimique photosensibilisateur biphotonique selon la revendication 1, dans lequel ledit dendrimère possède

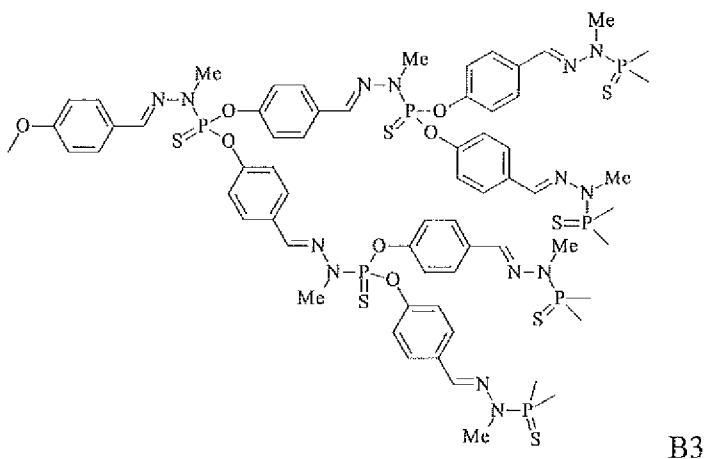
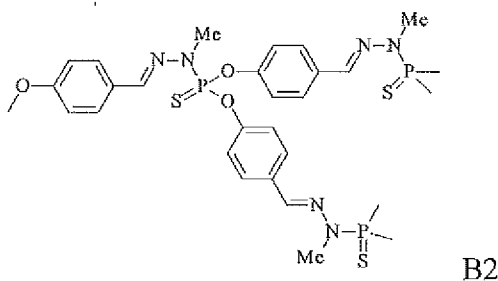
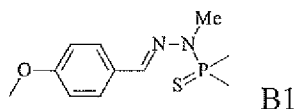
- a. une section efficace d'absorption à deux photons supérieure à 5 000 GM, avantageusement supérieure à 10 000 GM, plus avantageusement supérieure à 15 000 GM, de préférence supérieure à 20 000 GM pour au moins une valeur de longueurs d'ondes comprise de 700 à 900 nm, en particulier à 730 nm ; et/ou
- b. un rendement quantique de production d'oxygène singulet compris de 5 à 30 %, de préférence compris de 10 à 20 % ; et/ou
- c. un rendement quantique de fluorescence supérieur à 10 %.

3. Composé chimique photosensibilisateur biphotonique selon l'une des revendications 1 ou 2, dans lequel ledit dendrimère n'est pas phototoxique sous une excitation comprise de 400 à 700 nm avec un éclairage compris de 200 à 3 000 lx, avantageusement de 1 000 à 2 000 lx, de préférence de 1 000 lx.

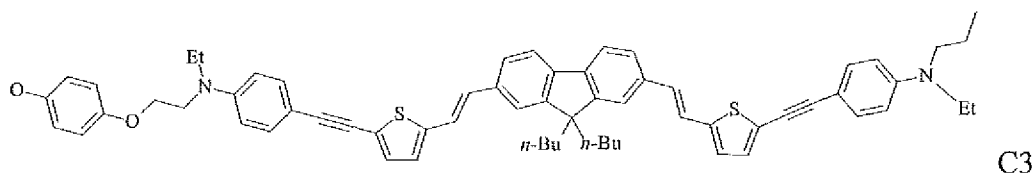
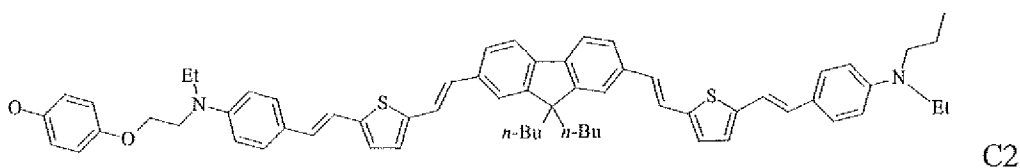
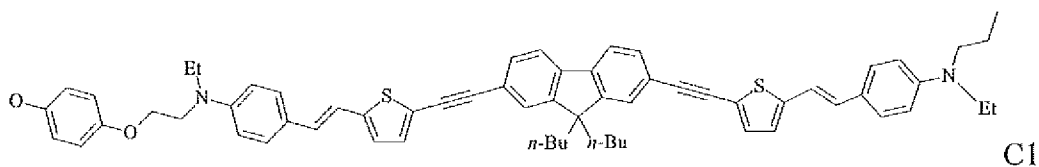
4. Composé chimique photosensibilisateur biphotonique selon l'une des revendications 1 à 3, constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, dans lequel le cœur phosphoré A de valence m, m étant égal à 6, est de formule A1.



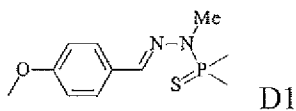
5. Composé chimique photosensibilisateur biphotonique selon l'une des revendications 1 à 4, constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, dans lequel ledit premier motif B de valence n répété i fois est de formule B1, n étant égal à 2 et i étant égal à 1 ; ou ledit premier motif B de valence n répété i fois est de formule B2, n étant égal à 2 et i étant égal à 2 ; ou ledit premier motif B de valence n répété i fois est de formule B3, n étant égal à 2 et i étant égal à 3.



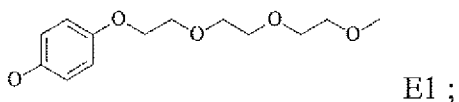
6. Composé chimique photosensibilisateur biphotonique selon l'une des revendications 1 à 5, constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, dans lequel le second motif C de valence q, q étant égal à 1, est de formule C1, C2 ou C3.

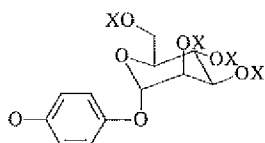
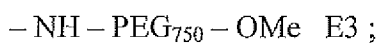
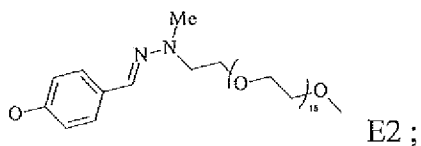


7. Composé chimique photosensibilisateur biphotonique selon l'une des revendications 1 à 6, constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, dans lequel ledit appendice d'agrafage D de valence p répété j fois, est de formule D1, p étant égal à 2 et j étant égal à 1 ; ou ledit appendice d'agrafage D de valence p répété j fois est absent et est noté D2, j étant égal à 0.

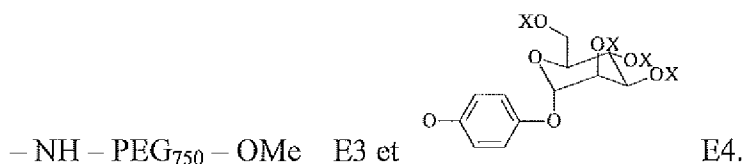
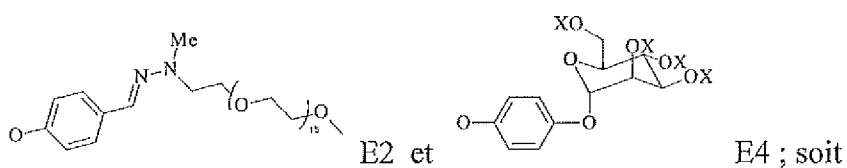
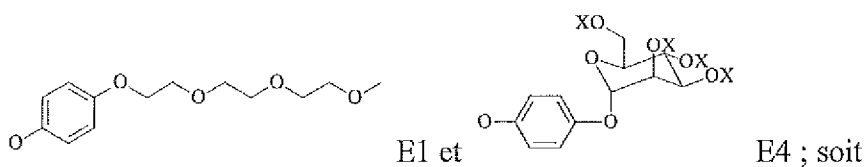


8. Composé chimique photosensibilisateur biphotonique selon l'une des revendications 1 à 7, constitué par un dendrimère de formule générale $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, dans lequel ledit ensemble des groupements hydrosolubilisants et/ou fonctions de ciblage E
- est tel que tous les E sont identiques et est de formule E1 ; ou
 - est tel que tous les E sont identiques et est de formule E2 ; ou
 - est tel que tous les E sont identiques et est de formule E3 ; ou
 - est tel que tous les E sont identiques et est de formule E4 ; ou
 - est tel que tous les E ne sont pas identiques et est de formule E5.

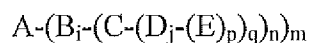




E5

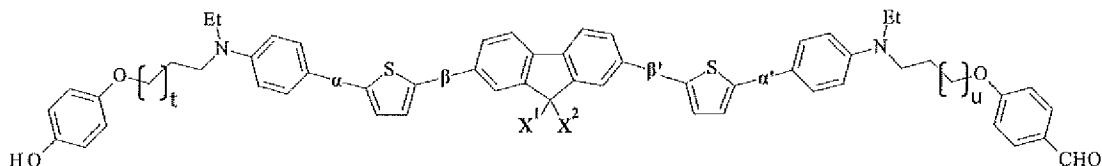


9. Composé chimique photosensibilisateur biphotonique selon l'une des revendications 1 à 8, constitué par un dendrimère de formule générale



dans lequel :

- A est de formule A1;
- B est choisi parmi B1, B2 ou B3;
- C est choisi parmi C1, C2 ou C3;
- D est choisi parmi D1 ou D2;

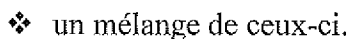
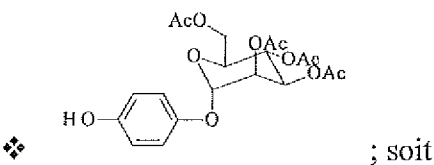
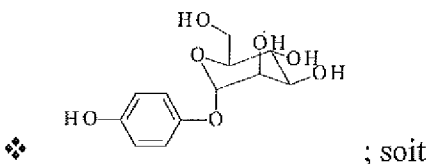
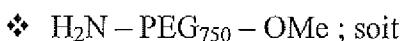
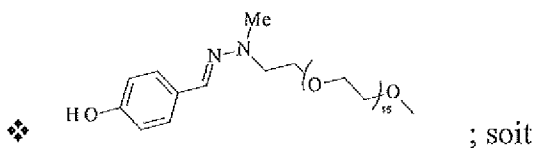
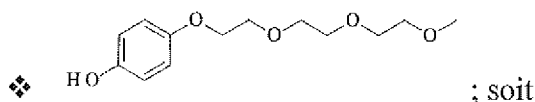


X^1 et X^2 , identiques ou différents, représentant chacun un groupement alkyle en C_1 à C_{25} , avantageusement en C_1 à C_{12} , de préférence en C_4 , $(CH_2)_x-SO_3M$, $(CH_2)_x-NAlk_3^+$, $(CH_2)_x-(OCH_2-CH_2)_y-OH$, M étant un métal alcalin et x étant égal à 0 ou étant un entier de 1 à 12, préférentiellement de 1 à 6, y étant un entier de 1 à 25 ;

ladite étape de dissymétrisation permettant d'augmenter la section efficace d'absorption à deux photons du chromophore dissymétrique C'' d'au moins 20 %, avantageusement d'au moins 40 % par rapport à C' .

- b. une étape de greffage du chromophore dissymétrique C'' sur une entité centrale $A-(B_i')_m$ de sorte à former un premier dendrimère intermédiaire $A-(B_i-(C'')_n)_m$; $A-(B_i')_m$ représentant une espèce réactive correspondant à $A-(B_i)_m$; m étant la valence du groupement A et étant un entier non nul compris de 3 à 8 ; n étant la valence de B' dans l'entité centrale $A-(B_i')_m$ et étant un entier non nul compris de 2 à 5 ; i étant le nombre d'unités de répétition successives du premier motif B greffée sur une branche et étant égal à 0 ou étant un entier compris de 1 à 10, notamment de 1 à 4 ;
- c. une étape de formation du dendrimère $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$ réalisée soit
 - i. en plusieurs étapes consistant en :
 - une étape de formation d'un second dendrimère intermédiaire $A-(B_i-(C-(D_j')_q)_n)_m$ par la réaction, réalisée q fois, d'un appendice d'agrafage D' sur le premier dendrimère intermédiaire $A-(B_i-(C'')_n)_m$ et réalisée j fois successivement ; D' correspondant à une première espèce réactive de l'appendice d'agrafage D ; q étant la valence du second motif C et étant un entier non nul, notamment égal à 1 ; j étant le nombre d'unités de répétition successives de l'appendice d'agrafage D greffée sur une branche et étant égal à 0 ou étant un entier compris de 1 à 5, notamment de 1 à 2 ;
 - une étape de fonctionnalisation du second dendrimère intermédiaire $A-(B_i-(C-(D_j')_q)_n)_m$ obtenu à l'étape précédente avec un groupement

hydrosolubilisant et/ou une fonction de ciblage E' pour former le dendrimère $A-(B_i-(C-(D_j-(E)_p)_q)_n)_m$, ledit groupement hydrosolubilisant et/ou ladite fonction de ciblage E' représentant une espèce réactive correspondant à E et étant de formule



p étant la valence de l'appendice d'agrafage D et étant un entier non nul compris de 2 à 5, notamment égal à 2 ; soit

- ii. en une étape consistant en une fonctionnalisation du premier dendrimère intermédiaire $A-(B-(C'')_n)_m$ par sa réaction, réalisée q fois, avec une entité $D_j''-(E)_p$ préformée ; D'' correspondant à une seconde espèce réactive de l'appendice d'agrafage D ; j étant le nombre d'unités de répétition successives de la seconde espèce réactive D'' et étant égal à 0 ou étant un entier compris de 1 à 5, notamment de 1 à 2 ; q étant la valence du second motif C et étant un entier non nul, notamment égal à 1 ; p étant la valence de l'appendice d'agrafage D et étant un entier non nul compris de 2 à 5, notamment égal à 2.

11. Utilisation du dendrimère selon l'une des revendications 1 à 10, dans un dispositif de thérapie photodynamique, notamment mettant en œuvre une absorption à deux

photons, ou d'imagerie de fluorescence, notamment mettant en œuvre une absorption à un ou à deux photons.

FIGURES

Figure 1

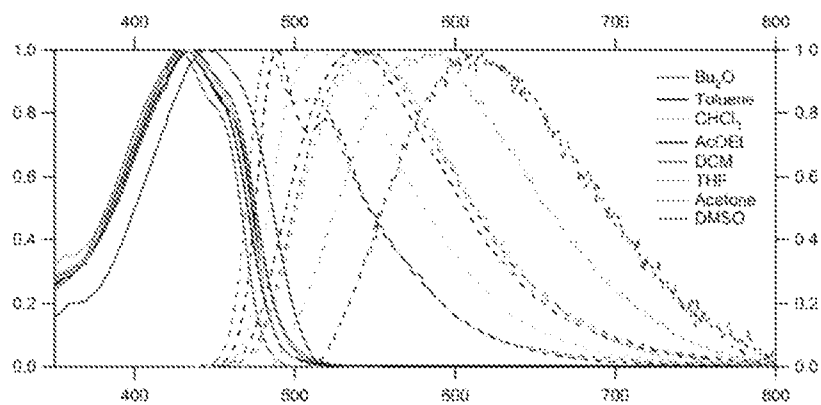


Figure 2

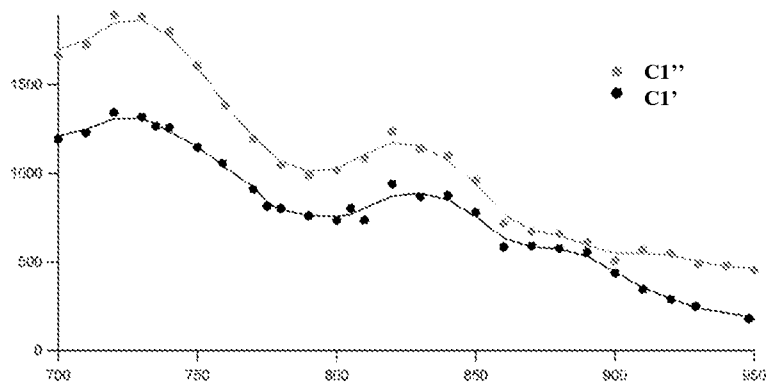


Figure 3

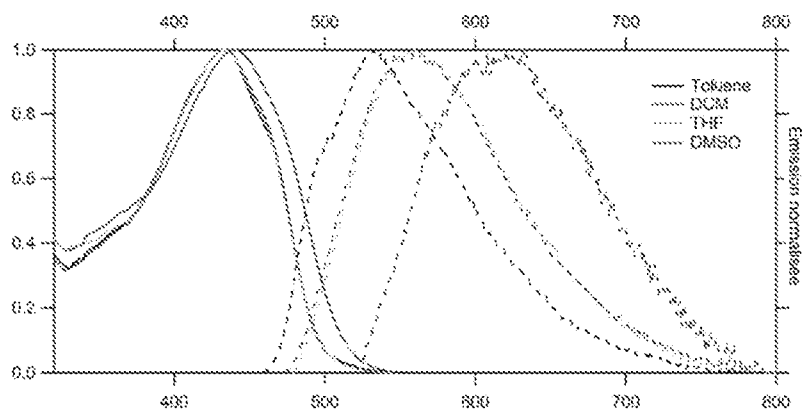


Figure 4

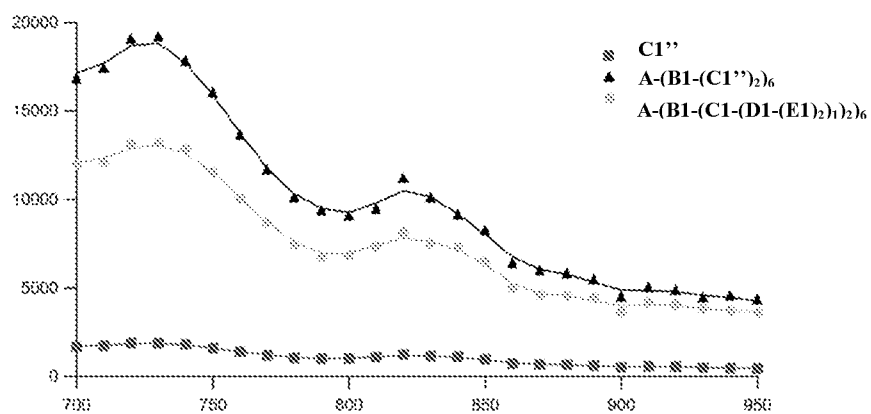


Figure 5

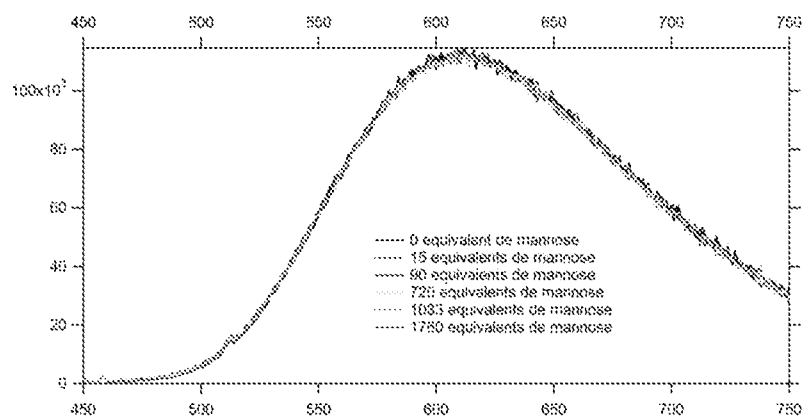


Figure 6

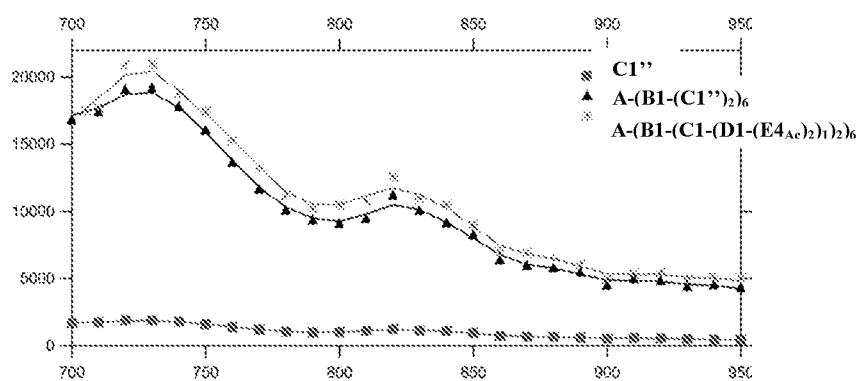


Figure 7

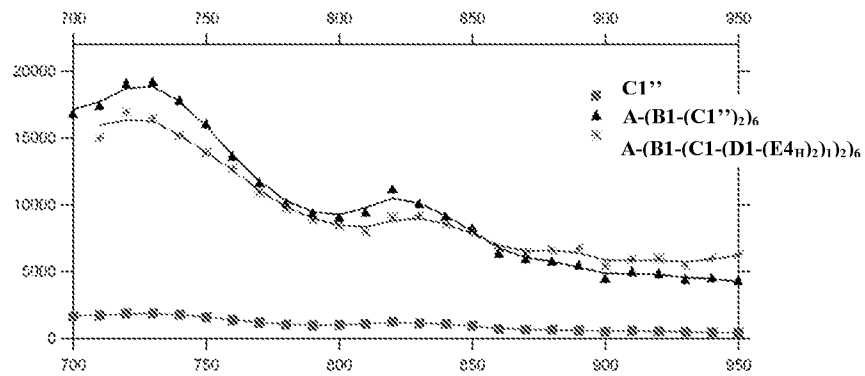


Figure 8

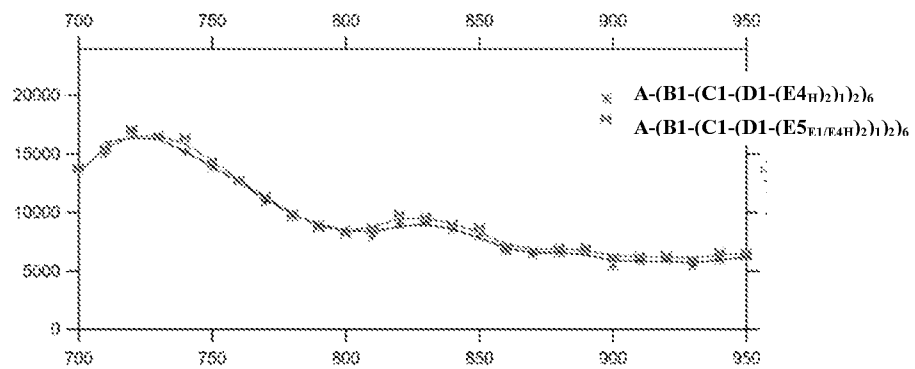


Figure 9

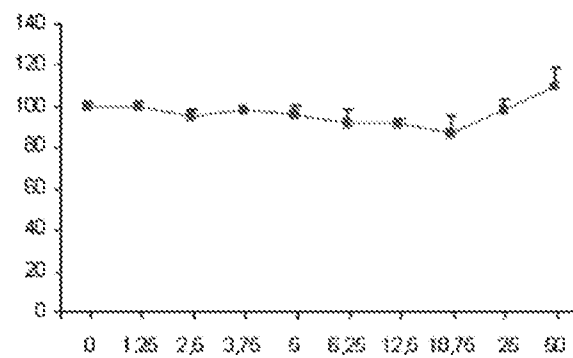


Figure 10

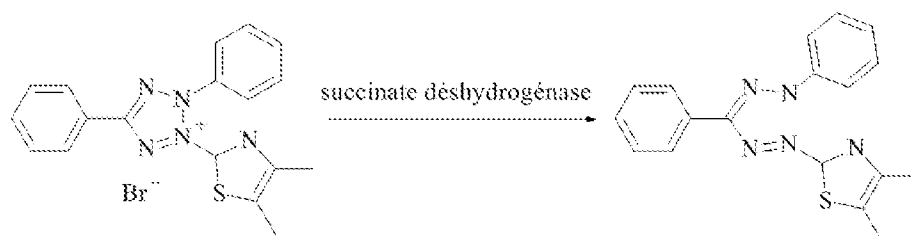


Figure 11

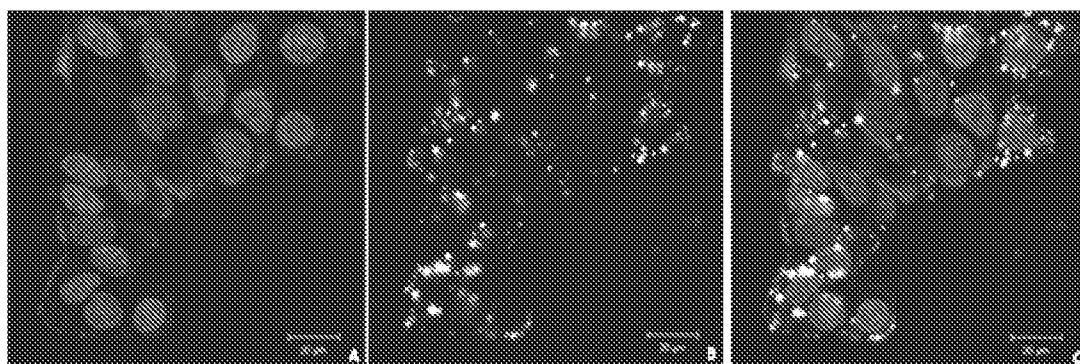


Figure 12

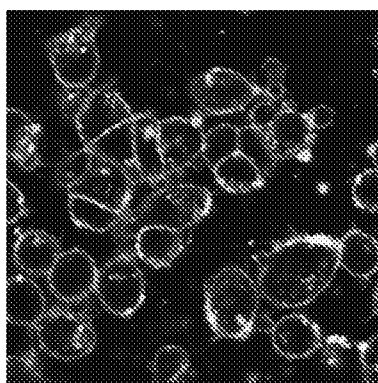


Figure 13

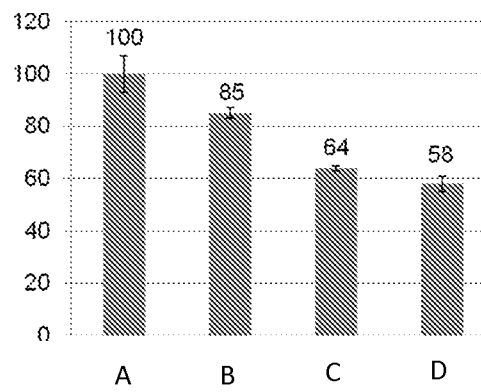


Figure 14

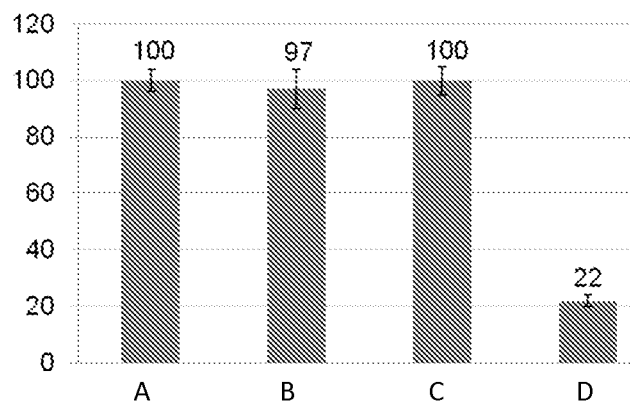


Figure 15

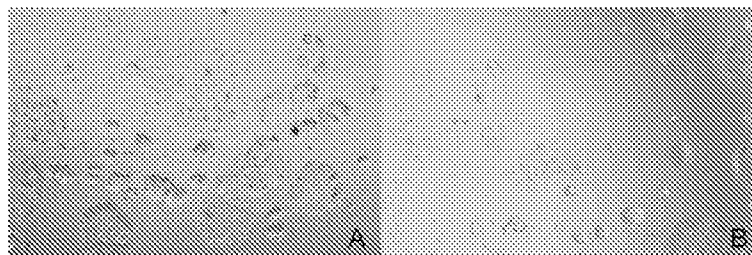


Figure 16

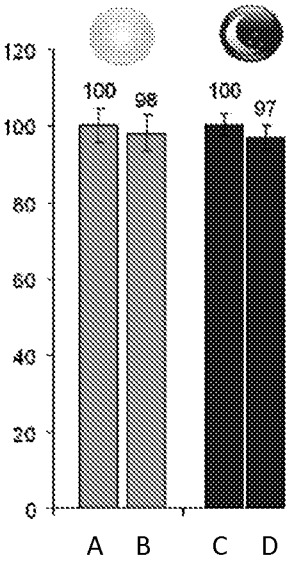


Figure 17

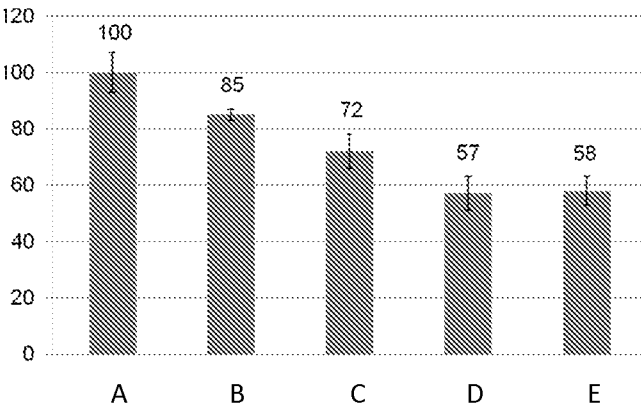


Figure 18

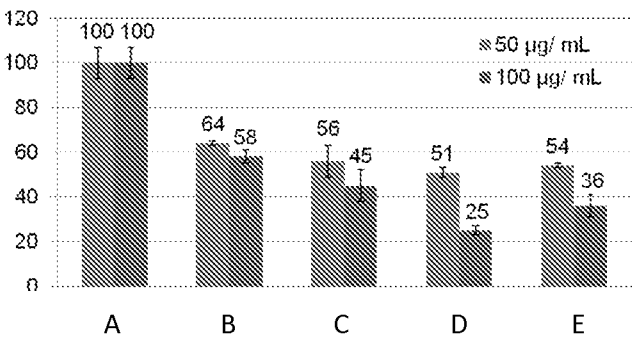
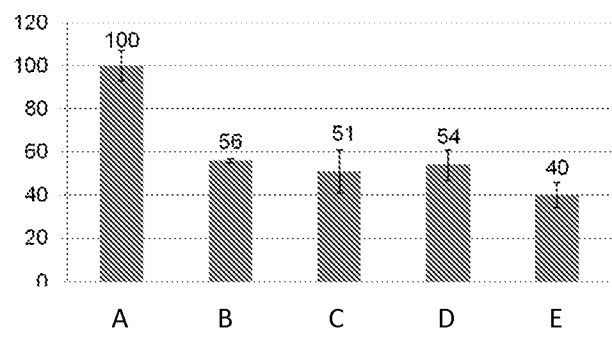


Figure 19



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2016/053198

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C09K11/06 A61N5/06 A61K41/00 C08G83/00 C07D333/06
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)
C09K A61N A61K C08G C07D

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, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/080176 A1 (UNIV RENNES [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; BLANCHARD-DESCE MIREILL) 19 July 2007 (2007-07-19) page 1 figures 9, 11, 12; compound G'2 -----	1-11
Y	WO 2011/073054 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV RENNES [FR]; I N S E R M INST NAT DE) 23 June 2011 (2011-06-23) pages 22,41; examples 8,10, 21-23; compound 6a -----	1-11



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

22 February 2017

Date of mailing of the international search report

02/03/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vanier, Cécile

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2016/053198

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007080176 A1	19-07-2007	AT 443120 T CA 2636892 A1 EP 1971665 A1 FR 2896251 A1 US 2010266506 A1 WO 2007080176 A1	15-10-2009 19-07-2007 24-09-2008 20-07-2007 21-10-2010 19-07-2007
WO 2011073054 A1	23-06-2011	CA 2784212 A1 EP 2513083 A1 JP 5926685 B2 JP 2013513632 A US 2013065849 A1 WO 2011073054 A1	23-06-2011 24-10-2012 25-05-2016 22-04-2013 14-03-2013 23-06-2011

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2016/053198

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C09K11/06 A61N5/06 A61K41/00 C08G83/00 C07D333/06 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) C09K A61N A61K C08G C07D		
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, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 2007/080176 A1 (UNIV RENNES [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; BLANCHARD-DESCE MIREILL) 19 juillet 2007 (2007-07-19) page 1 figures 9, 11, 12; composé G'2 -----	1-11
Y	WO 2011/073054 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV RENNES [FR]; I N S E R M INST NAT DE) 23 juin 2011 (2011-06-23) pages 22,41; exemples 8,10, 21-23; composé 6a -----	1-11
☐ 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 22 février 2017		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 02/03/2017
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Vanier, Cécile

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2016/053198

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2007080176 A1	19-07-2007	AT 443120 T CA 2636892 A1 EP 1971665 A1 FR 2896251 A1 US 2010266506 A1 WO 2007080176 A1	15-10-2009 19-07-2007 24-09-2008 20-07-2007 21-10-2010 19-07-2007
WO 2011073054 A1	23-06-2011	CA 2784212 A1 EP 2513083 A1 JP 5926685 B2 JP 2013513632 A US 2013065849 A1 WO 2011073054 A1	23-06-2011 24-10-2012 25-05-2016 22-04-2013 14-03-2013 23-06-2011