



**HAL**  
open science

# Synthèse par chimie click non métallo-catalysée de glycoconjugués macromoléculaires d'intérêt médical

Antoine Petrelli

► **To cite this version:**

Antoine Petrelli. Synthèse par chimie click non métallo-catalysée de glycoconjugués macromoléculaires d'intérêt médical. Chimie organique. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV043 . tel-01687493

**HAL Id: tel-01687493**

**<https://theses.hal.science/tel-01687493>**

Submitted on 18 Jan 2018

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

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

# UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Chimie organique**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« **Antoine PETRELLI** »

Thèse dirigée par « **Sebastien FORT** » et

Co-encadrée par « **Sami HALILA** »

Préparée au sein du **Centre de Recherche sur les  
Macromolécules Végétales**  
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

## **Synthèse par chimie click non métallo-catalysée de glycoconjugués macromoléculaires d'intérêt médical**

Thèse soutenue publiquement le « **10 décembre 2015** »,  
Devant le jury composé de :

**Pr Etienne FLEURY**

Professeur, IMP-INSA, Lyon, Président du Jury

**Pr Cécile NOUVEL**

Professeur, LRGP ENSIC, Université de Lorraine, Rapporteur

**Dr Boris VAUZEILLES**

Directeur de Recherche, ICCMO Université Paris Sud / ICSN-CNRS  
Gif-sur-Yvette, Rapporteur

**Dr Didier BOTURYN**

Directeur de Recherche, DCM Université Grenoble Alpes, Examineur

**Dr Sami HALILA**

Chargé de recherche, CERMAV-CNRS, Grenoble, Co-Encadrant

**Dr Sébastien FORT**

Chargé de Recherche, CERMAV-CNRS, Grenoble, Directeur de thèse





*« La nature ne connaît aucune morale et la montagne ne commet aucune erreur, seul l'homme en fait »*

Reinhold Messner



## Remerciements

*Je souhaite remercier et saluer toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin, sur le plan scientifique ou humain à cette aventure qu'a été pour moi cette thèse.*

J'adresse mes remerciements au Dr Boris Vauzeilles et au Pr Cécile Nouvel pour avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux de thèse. Je tiens également à remercier Mr Didier Boturyn et Pr Etienne Fleury de m'avoir fait l'honneur de participer à ce Jury de thèse.

Je tiens à remercier Mr Redouane Borsali, directeur du CERMAV, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans le support financier du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche qui a financé ces travaux de thèse et que je remercie vivement.

Je tiens tout particulièrement à remercier Sebastien Fort, mon directeur de thèse pour ces trois belles années. Pour m'avoir soutenu lorsque les premiers financements n'ont pas abouti. Pour avoir réussi à orienter de manière habile ces travaux de thèse dans la bonne direction. Et plus particulièrement pour les discussions enrichissantes et conseils avisés.

Je souhaite également à remercier Mr Sami Halila, co-encadrant de thèse pour son amicalité, sa bonne humeur et pour avoir été durant toute ma thèse une source d'idée intarissable lors de nos réunions.

Je n'oublierai pas non plus les personnes de tous les services techniques qui m'ont aidé, formé et avec qui j'ai passé de bons moments : Jean-luc Putaux pour les discussions intéressantes devant le TEM, Isabelle Jeacomine pour son soutien avec mes analyses RMN compliquées, et toutes les autres que je n'ai pas nommées et avec lesquels j'ai échangé lors de ces trois années.

Une pensée émue pour les gens du 3<sup>ème</sup> avec qui j'ai partagé d'innombrable cafés, repas, discussions et parties de rigolade :

- Emeline Richard, ma collègue thésarde, biologiste (personne n'est parfait), Bescherelle personnel attiré, soutien moral et amie, avec qui j'ai partagé un bureau et de très bons moments !
- Laurine Buon, professionnelle de la chromato, organisatrice insatiable de repas et d'apéros fédérateurs et dont la jovialité rayonne au troisième.
- Stéphanie Pradeau (Stoufmout), pour son aide précieuse au labo, et les bonnes parties de rigolade.
- Sophie Martini, (le gentil dragon), et Mélanie Touvrey-Loidice, (Maman-Mel) pour avoir fait de moi un biologiste en herbe et avoir réussi à me faire courir et presque aimer ça !
- Rémy Chambon, pour son humour piquant, et sans qui les permanents-poissons du 3<sup>ème</sup> n'auraient jamais survécu.

- Tinaïg Le Costaouec, parce-que tout bon labo a besoin d'une hippie-bretonne et de la bonne humeur qui va avec.
- Flavien Labre pour les bières, m'avoir fait souffrir à la course et parce que c'est bien d'avoir un copain chimiste !
- Claire Boisset, pour son sourire inaltérable, sa gentillesse et pour les mangas réconfortants qui arrivaient magiquement sur mon bureau pendant les temps durs de la rédaction.
- Sylvain Cottaz, grand professeur, toujours opérationnel pour une bonne blague ou un conseil avisé.
- William Helbert, et Bernard Priem pour les discussions aussi improbables qu'intéressantes autour d'un café.
- Philippe Colin-Morel, que je ne rattraperai jamais à Candy-Crush.
- Je n'oublie pas non plus les autres membres de l'équipe, Patricia Chaud, Laurent Poulet, Eric Samain, Sylvie Armand, Mélanie Leroux, et Sophie Drouillard.

-  
Je remercie également les copains du 2<sup>ème</sup> et les copains « Glycomat » pour les bonnes soirées et les différents événements entre intermittents du spectacle.

Enfin je tiens à remercier mes proches :

Max et Laure, amis de longue date à qui je dois quelques canyons rafraichissant et des agréables barbecues après les longues journées au labo.

Cyril, et Laurent, toujours prêt à se lever tôt pour le ski de rando avant le travail.

Ma compagne de thèse, Anna, qui m'a épaulé durant la plus grande partie de celle-ci.

Sans oublier la famille :

Je remercie mes parents qui ont supporté et soutenu mes différents projets et mes très longues études en m'encourageant et ma sœur qui a toujours été là pour moi.

*Encore une fois, merci à tous*

## INTRODUCTION GENERALE

---



Cette thèse de doctorat a été réalisée au Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) sous la direction du Dr Sébastien Fort, responsable de l'équipe Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides (CBO) et du Dr Sami Halila de l'équipe PhysicoChimie des Glycopolymères (PCG). Cette thèse intitulée «Synthèse par chimie click non métallo-catalysée de glycoconjugués macromoléculaires d'intérêt médical» est financée par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (bourse MESR). L'objectif de ce travail est de développer de nouvelles méthodes de modification régiosélective d'oligosaccharides pour la préparation de glycoconjugués par une chimie click sans catalyse métallique. Ces travaux s'appuient sur les expertises complémentaires de l'équipe CBO pour la synthèse chimio-enzymatique d'oligosaccharides complexes et la modification sélective de la position réductrice des oses et de l'équipe PCG pour la caractérisation physico-chimique des macromolécules obtenues.

Un premier volet de cette thèse porte sur la préparation de copolymères à bloc amphiphiles obtenus par chimie click entre un polymère hydrophobe et un oligosaccharide naturellement hydrophile. Les nanoparticules obtenues par auto-assemblage des copolymères en solution seront ensuite analysées.

Un second volet concerne l'utilisation des propriétés de reconnaissance moléculaire des oligosaccharides. Cette partie sera focalisée sur le couplage efficace d'oligosaccharides d'intérêt biologiques sur support solide pour la purification de protéines.

Ce manuscrit de thèse est organisé en quatre chapitres structurés autour de la fonctionnalisation chimique d'oligosaccharides de structure définie pour la synthèse de glycoconjugués par chimie click sans catalyse métallique. Le premier chapitre est une étude bibliographique, les trois chapitres suivants sont articulés autour des articles scientifiques issus de ce travail. Ces derniers sont composés d'une introduction décrivant l'état de l'art ainsi que les objectifs fixés. Ils sont suivis de l'article et de la partie expérimentale complémentaire. Chacun de ces chapitres sera terminé par une conclusion sur l'article et les perspectives futures. Enfin une conclusion générale résumera les principaux résultats obtenus durant la thèse.

- Le premier chapitre est une étude bibliographique composée d'un état de l'art sur les glycoconjugués à visée thérapeutiques ou pour les nanosciences. Puis cette étude décrit la production d'oligosaccharides de structure définie puis leur modification en position anomère. Finalement, un état de l'art de la chimie de couplage dite chimie click est

établit. Elle conclut sur des exemples de chimies de couplages sans catalyses métallique pour la ligation de macromolécules.

- Le deuxième chapitre décrit l'utilisation de l'addition de Michael thiol-maléimide comme une alternative au couplage azide alcyne catalysé par le cuivre (CuAAC) pour la préparation de copolymères à blocs polystyrene-*b*-sucre. La modification en position anomère d'oligosaccharides issus de la biomasse est décrite avant d'appliquer cette chimie de ligation à l'obtention de copolymères à blocs hybrides amphiphiles. L'auto-assemblage de ces macromolécules donne des nanoparticules en solution qui sont ensuite caractérisées. Ce système est ensuite comparé avec un modèle précédemment synthétisé par CuAAC pour évaluer l'impact de la chimie de couplage sur la structure des particules obtenues.
- Le troisième chapitre présente une variante de la chimie thiol-maléimide avec des dérivés bromo-maléimides permettant l'accès à des glycoconjugués sensibles à des *stimuli* red-ox. Les nanoparticules obtenues par auto-assemblage en solution des copolymères sont caractérisées avec ou sans la présence d'un chromophore hydrophobe encapsulé. Finalement une étude sur la libération de l'agent encapsulé en milieu réducteur ainsi que le contrôle de celle-ci est réalisée.
- Le quatrième chapitre présente la modification en position anomère des antigènes oligosaccharidique des groupes sanguins. Suivi l'étude de leur réactivité sur le groupement maléimide pour la préparation de support de chromatographie d'affinité. Ces immunoadsorbants sont ensuite évalués pour le piégeage d'anticorps.
- Le manuscrit se termine par une conclusion générale sur l'utilisation de chimie click sans catalyse métallique pour l'obtention de glycoconjugués à forte valeur ajoutée.

Les travaux présentés dans cet ouvrage ont fait l'objet des communications scientifiques suivantes :

- **25<sup>ème</sup> journée des Glycosciences** Paris, 12-15/05/2014 (Communication par affiche)  
Efficient metal free click chemistry for the synthesis of sweet amphiphilic block-copolymers  
Antoine Petrelli, Sébastien Fort, Sami Halila
  
- **Séminaire Interne CERMAV** Grenoble le 16/06/2014 (Communication orale)  
Oligosaccharide functionalization for the metal free synthesis of amphiphilic block-copolymers  
Antoine Petrelli, Sébastien Fort, Sami Halila
  
- **Erc BIOMIM 2015** Grenoble, du 11-13/03/2015 (Communication par affiche)  
Redox sensitive oligosaccharide-based nanoparticles for controlled release of hydrophobic drugs  
Antoine Petrelli, Sébastien Fort, Sami Halila
  
- **EPNOE 2015** Varsovie, du 18-22/10/2015 (Communication orale)  
Redox sensitive oligosaccharide-based nanoparticles for the controlled release of hydrophobic drugs  
Antoine Petrelli, Sébastien Fort, Sami Halila



<b>Introduction générale.....</b>	<b>7</b>
<b>CHAPITRE I. Etude bibliographique .....</b>	<b>17</b>
<b>I. Les sucres, molécules du vivant.....</b>	<b>19</b>
<b>II. Les glycoconjugués .....</b>	<b>20</b>
II.1. Les glycoconjugués naturels .....	20
II.2. Les glycoconjugués synthétiques .....	21
<b>III. Méthodes d'obtention d'oligosaccharides .....</b>	<b>37</b>
III.1. Hydrolyse de polysaccharides.....	37
III.2. Synthèse d'oligosaccharides .....	41
<b>IV. Méthodes de modification anomère d'oligosaccharides.....</b>	<b>47</b>
IV.1. Glycosylations chimiques.....	48
IV.2. Réactions d'amination .....	50
<b>V. La chimie click, un outil de ligation .....</b>	<b>55</b>
V.1. La chimie dite click.....	57
V.2. Les alternatives .....	62
<b>CHAPITRE II. Synthèse de copolymère a bloc amphiphiles par reaction thiol maléimide 71</b>	
<b>I. Introduction et objectifs .....</b>	<b>73</b>
<b>II. Oligosaccharide-based block copolymers: metal-free thiol-maleimide click conjugation and self-assembly into nanoparticles .....</b>	<b>75</b>
<b>III. Supporting Information .....</b>	<b>93</b>
<b>IV. Conclusions et perspectives.....</b>	<b>112</b>
<b>CHAPITRE III.Copolymères a blocs redox sensibles pour le relarguage controle d'agents hydrophobes .....</b>	<b>114</b>
<b>I. Introduction et objectifs .....</b>	<b>116</b>
<b>II. Redox programmable delivery systems : Sweet block copolymers micelles via, mixed-thiol-(bromo)-maleimides conjugaison .....</b>	<b>118</b>
<b>III. Supporting Information .....</b>	<b>128</b>

TABLE DES MATIERES

---

IV. Résultats supplémentaires .....	146
V. Conclusions et perspectives.....	150
<b>CHAPITRE IV. Préparation de supports d'affinités d'anticorps .....</b>	<b>152</b>
I. Introduction et objectifs .....	154
II. Efficient Production of Neoglycoconjugates as Affinity Adsorbents: Toward Antibody-free Universal Blood Plasma .....	156
III. Supporting Information .....	164
IV. Conclusions et perspectives.....	182
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>183</b>
<b>Références.....</b>	<b>187</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>199</b>





## CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---



## I. Les sucres, molécules du vivant

Les sucres sont les molécules organiques issues du vivant les plus abondantes sur la planète. Ils constituent la troisième catégorie de biomolécules avec les protéines et les bases nucléiques constituant l'ADN et sont représentées dans toutes les espèces vivantes. Le carbone anomère des sucres réducteurs porte une fonction aldéhyde sous sa forme ouverte, en équilibre avec une forme cyclique hémiacétalique (*furanose ou pyranose*) majoritaire en solution. Un hydroxyle peut condenser sur le carbone anomère d'un autre sucre pour donner un disaccharide, la répétition de ces condensations résulte en la formation de structures osidiques linéaires ou ramifiées dont la complexité augmente considérablement avec le nombre de résidus. Les oses sont une famille de molécules extrêmement diversifiées. Selon le nombre de sous unités osidiques (n), on peut classer les sucres en trois sous familles : les monosaccharides (n=1) communément appelés glucides, les oligosaccharides (n<20), qui feront l'objet de cette étude, et les polysaccharides (n>20). Les rôles des sucres dans le vivant sont extrêmement variés :

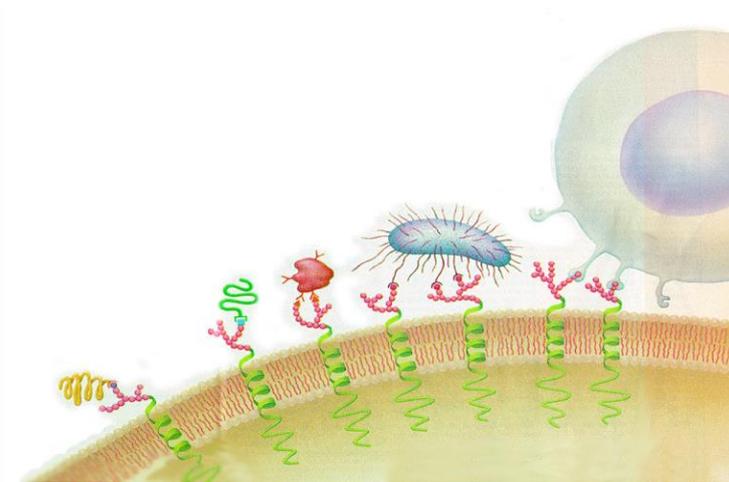
- Rôle structural (polysaccharides)
- Réserve d'énergie (polysaccharides)
- Communication cellulaire (oligosaccharides/glycoconjugués)

Les oligosaccharides sont obtenus par extraction, synthèse chimique et enzymatique, ou sont des dérivés de l'hydrolyse chimique ou enzymatique de polysaccharides.<sup>[1]</sup> Les oligosaccharides sont principalement utilisés dans l'agroalimentaire, comme fibres non digestibles,<sup>[2]</sup> prébiotiques pour la flore intestinale<sup>[3]</sup> ou comme édulcorants.<sup>[4]</sup> Sous forme de glycoconjugués, ce sont des molécules complexes qui sont impliquées dans de nombreux processus biologiques de communication intercellulaires, majoritairement par interaction avec les protéines.<sup>[5a, 5b]</sup> Ces interactions sont impliquées dans : les processus infectieux par les bactéries et les virus,<sup>[6]</sup> les réactions inflammatoires<sup>[7]</sup> et certaines maladies auto immunes.<sup>[8]</sup>

## II. Les glycoconjugués

### II.1. Les glycoconjugués naturels

Le terme glycoconjugué définit les produits d'association covalente de glucides avec un autre type de molécules. Lors de l'association covalente d'un sucre avec une protéine ou un lipide on parle de glycoprotéine ou de glycolipide. Les glycoconjugués naturels sont composés principalement d'hexoses (D-glucose, D-galactose, D-mannose, etc.), de leurs dérivés naturels aminés libres ou protégés (glucosamine, *N*-acetyl-galactosamine, etc.), des acides uroniques (acide glucuronique, iduronique, etc.), du fucose qui est un 6-deoxy-galactose, mais aussi de pentoses (L-arabinose, D-xylose) et des acides sialiques. Ces glucides sont liés aux protéines par leur extrémité réductrice au travers d'une liaison *N*- ou *O*-glycosidique. Le nombre de combinaisons permises par la variété de glucides possibles et par la regio et stéréosélectivité des liaisons confère aux glycanes une grande complexité structurelle. Ces structures sont reconnues spécifiquement par des protéines (les lectines) et sont les molécules fondamentales des processus de reconnaissance et de signalisation intercellulaires.



**Figure 1** : Fonctions de reconnaissance des glycoconjugués<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Nature cover, 1995 Feb 16 vol 373

Les oligosaccharides présents à la surface des cellules sous formes de glycoconjugués (glycolipides et glycoprotéines) jouent un rôle majeur dans la communication cellulaire et sont directement impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que les mécanismes d'infections bactériennes ou virales, les phénomènes inflammatoires et la réponse immunitaire. (Figure 1)

## II.2. Les glycoconjugués synthétiques

L'abondance des polysaccharides dans la nature ainsi que le développement des méthodes d'obtention d'oligosaccharides a encouragé les chimistes, biologistes et physico-chimistes à utiliser ces molécules aux propriétés remarquables. Les oligosaccharides sont des molécules généralement biocompatibles, biodégradables, hydrophiles et pouvant présenter des activités biologiques variées. La synthèse de glycoconjugués macromoléculaires connaît un développement rapide grâce au concept de la chimie click qui a introduit des méthodes efficaces de ligation.

Ce nouveau domaine, à l'interface de la glycomique, de la science des matériaux et de la chimie organique a des applications potentielles dans de nombreuses disciplines. Les paragraphes suivants présenteront certains de ces aspects. La première partie concerne les glycoconjugués exploitant les capacités d'interactions et de reconnaissance biologique de sucres complexes par les protéines. La deuxième partie traite des glycoconjugués oligosaccharidiques exploitant les propriétés physicochimiques des oses.

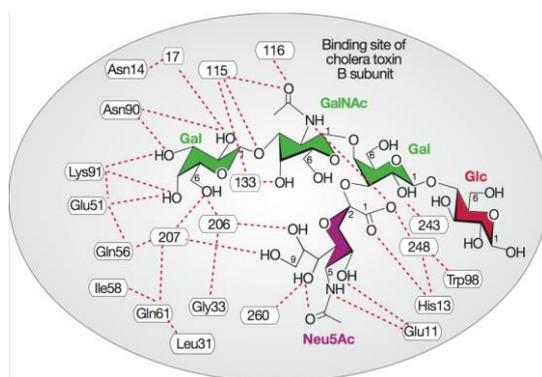
- **Glycoconjugués à propriétés biologiques**

L'ubiquité des oligosaccharides dans les processus de communication cellulaire et de reconnaissance des pathogènes a poussé les chercheurs à développer des glycoconjugués synthétiques pour étudier les interactions sucres/protéines. Les nombreuses interactions hydrophobes et liaisons hydrogènes d'un complexe sucre-protéine (figure 2) permet une discrimination spatiale importante ce qui rend les protéines reconnaissant les sucres extrêmement sélectives pour leur substrat. Ainsi le contrôle de la structure et de la stéréochimie des glycoconjugués synthétique est un paramètre primordial pour le maintien des propriétés biologiques.

Les glycanes présent à la surface des cellules sont souvent impliqués dans les invasions par les microorganismes. Ils utilisent ces motifs pour la reconnaissance, l'ancrage et l'inclusion d'agent toxiques dans le milieu intracellulaire.<sup>[9]</sup> Par exemple, la toxine B de *vibrio cholerae*,

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

bactérie responsable du choléra, reconnaît spécifiquement le ganglioside-GM1 (figure 2) présent à la surface des cellules épithéliales du gros intestin ce qui permet son internalisation.



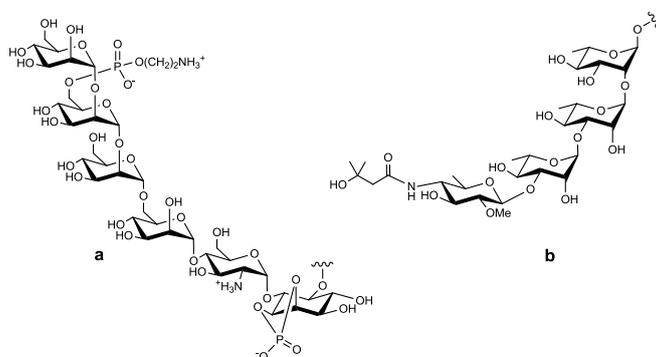
**Figure 2 :** Le pentasaccharide GM1 lié à la sous unité B de la toxine de *vibrio cholerae*<sup>[9]</sup>

Les pathogènes possèdent aussi un glycome qui varie d'une espèce à l'autre. La réponse immunitaire à une infection est basée sur la reconnaissance de ces antigènes exogènes pour déclencher le processus de défense du corps humain. Ces propriétés biologiques ont poussé les chimistes à développer des glycoconjugués à but thérapeutique.

### Glycanes synthétiques

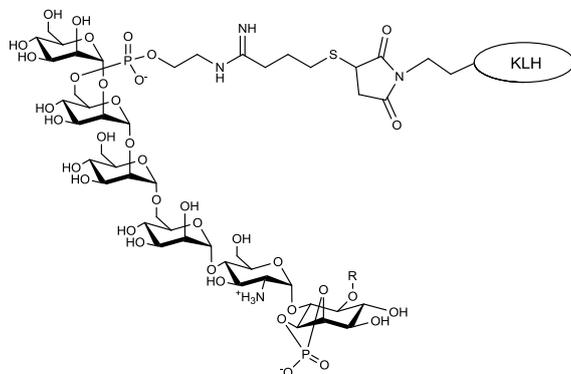
De nombreuses structures oligosaccharidiques ont été identifiées à la surface de pathogènes comme responsables de facteurs de virulence comme le tétrasaccharide de *B.anthraxis* bactérie responsable de l'Anthrax,<sup>[10]</sup> ou les oligosaccharides capsulaires de *Haemophilus Influenza type b* (Hib)<sup>[11]</sup> ou comme la toxine glycosylphosphatidylinositol (GPI) responsable des symptômes de la Malaria<sup>[12]</sup> (figure 3).

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



**Figure 3** : Structure du GPI (a) et du tétrasaccharide de B anthracis (b)

Ces antigènes exogènes sont absents du glycome humain et sont donc des cibles privilégiées pour le développement d'un vaccin. Ils sont couplés à une structure immunogène afin de déclencher une réponse immunitaire dirigée contre les épitopes glucidiques du pathogène ciblé et ainsi immuniser le sujet contre une exposition ultérieure à ce microorganisme. Seeberger *et coll.*<sup>[13]</sup>, ont synthétisé puis couplé un dérivé du pentasaccharide GPI sur la protéine immunogène *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) par addition de Michaël (figure 4).

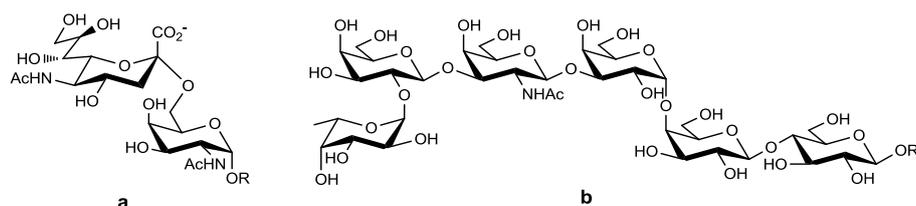


**Figure 4** : Structure du vaccin anti-malaria GPI-KLH<sup>[13]</sup>

Ce vaccin testé chez la souris a permis des taux de survie allant jusqu'à 75% des animaux traités exposés au parasite responsable de la malaria, ce qui est prometteur pour le développement d'un vaccin humain.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les cellules cancéreuses présentent à leur surface des motifs glycosidiques modifiés, normalement absent du glycome d'un individu sain, tel que le Globo-H ou le Sialyl Tn (figure 5). Ces glycanes sont surexprimés et représentés majoritairement parmi les cancers des ovaires, du sein ou de la prostate.<sup>[14]</sup>

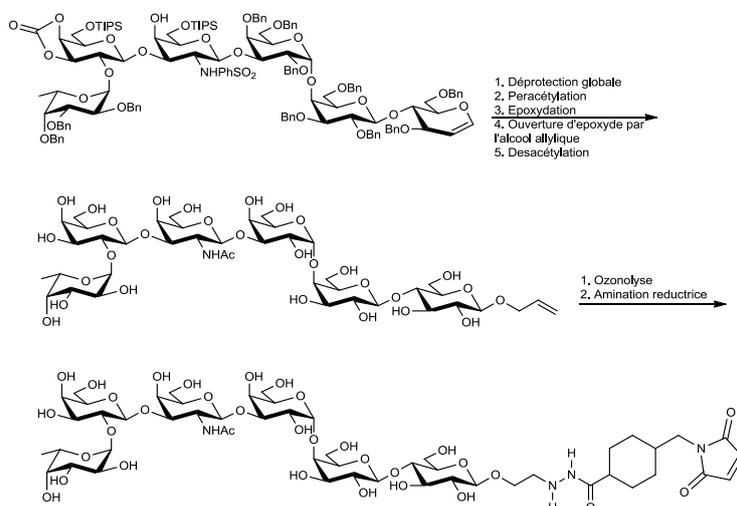


**Figure 5 :** Structure du sialyl Tn (a) et de Globo H (b)

Ces marqueurs spécifiques peuvent donc être utilisés pour développer des stratégies de vaccination contre le cancer. Utilisés sous forme libre, ces oligosaccharides sont naturellement non reconnus par le système immunitaire.<sup>[15]</sup> Il est donc nécessaire de les coupler à un motif immunogène afin de déclencher une réaction immunitaire dirigée contre ces antigènes spécifiques des tissus malades.<sup>[14]</sup>

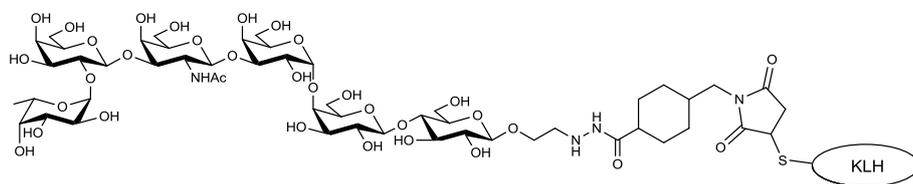
Danishefky *et al.*<sup>[16]</sup> ont développé une synthèse chimique de l'antigène globo H puis ils ont modifié le sucre réducteur afin d'obtenir un groupement allyle. La coupure oxydante de l'alcène suivie de l'amination réductrice de l'aldéhyde obtenu permet l'introduction du groupement maléimide (figure 6).

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



**Figure 6 :** Modification anomère du globo H

Le maléimide est ensuite couplé à la protéine immunogène KLH par addition de Michael. Cette réaction de liaison est très répandue pour le couplage de molécules actives sur les protéines. Ce vaccin est évalué dans des études en phase clinique III contre plusieurs types de cancers.



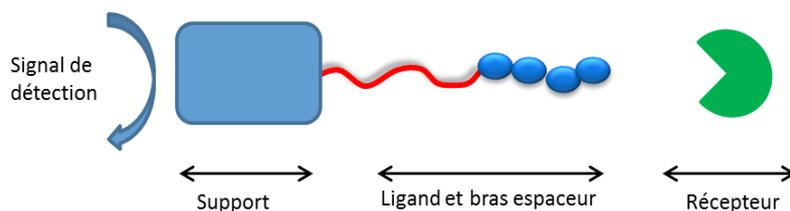
**Figure 7 :** Glycoconjugué KLH-globo H pour une approche de vaccin anticancer

Ils décrivent aussi l'utilisation de ces antigènes greffés sur une surface pour la détection des anticorps produits en réponse à l'administration du vaccin. La préparation et l'utilisation de ce type de biocapteurs fait l'objet de la partie suivante.

### Fonctionnalisation de surface

La préparation de sucres immobilisés sur un support solide ouvre l'accès à de nombreuses applications basées sur la reconnaissance moléculaire spécifique entre des protéines (lectines) et certains oligosaccharides. Les chimistes ont exploité cette propriété et développé des supports solides fonctionnalisés tels que les biocapteurs, qui permettent l'étude directe des interactions moléculaires entre les sucres présents sur un support et un récepteur biologique (lectine, bactérie, anticorps). Les supports d'affinité représentent un autre type de sucre immobilisés sur support solide servant à piéger et purifier les protéines reconnaissant les sucres.

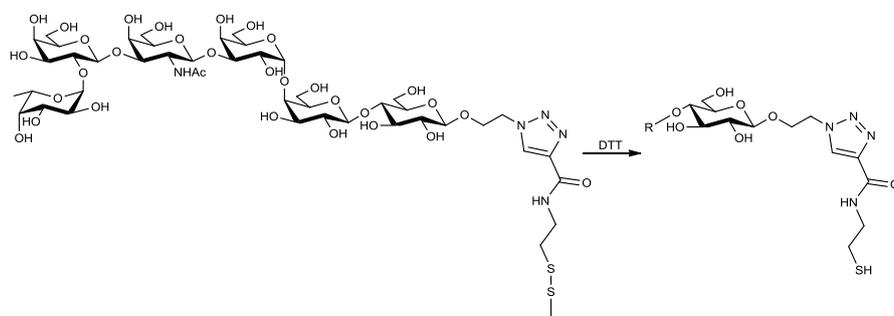
Un biocapteur est composé d'un ligand immobilisé sur un support solide pouvant être une électrode, une plaque de verre ou un support de micro titration selon la méthode de détection utilisée. Les méthodes d'immobilisation du ligand sont diverses, mais nous nous focaliserons sur les ligands liés de façon covalente au support (figure 8).



**Figure 8 :** Structure générale d'un biocapteur

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

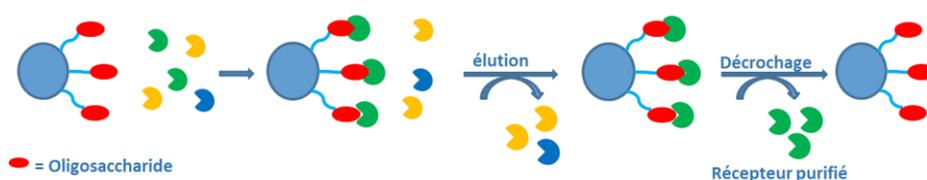
Wong *et coll.*<sup>[17]</sup> ont utilisé une réaction de chimie click pour l'immobilisation d'oligosaccharides présentant un groupement azoture sur une surface fonctionnalisée par des alcynes. L'antigène globo-H a été fixé sur une plaque de microtitration puis il a été reconnu par la lectine de *Lotus Tetragonolobus* spécifique du  $\alpha$ -L fucose. Ces biocapteurs permettent de détecter la présence d'anticorps anti globo-H dans le cas d'une stratégie de vaccination anti-cancer et ainsi évaluer directement l'efficacité de celui-ci. L'approche de Wong possède aussi l'avantage de pouvoir libérer l'oligosaccharide par réduction au dithiothreitol (DTT) du pont disulfure. Les ligands détachés du support sont ensuite analysés pour vérifier leur intégrité structurale et ainsi confirmer la relation structure activité observée. (figure 9).



**Figure 9 :** Antigène globo-H supporté sur une plaque de micro titration et réaction de relargage du ligand<sup>[17]</sup>

Ce type de puce à sucres ont de nombreuses utilisations et elles sont souvent utilisées comme outils de diagnostic par détection de lectines ou de bactéries<sup>[18a, 18b]</sup>.

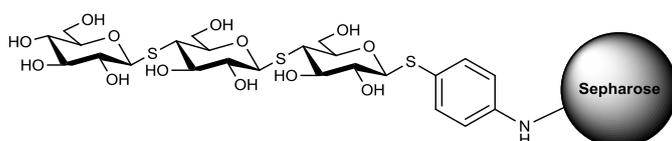
L'immobilisation d'oligosaccharides sur support solide est aussi utilisé pour préparer des matrices d'affinités afin de purifier ou piéger des biomolécules. Une matrice, est fonctionnalisée avec le ligand d'intérêt, dans notre cas un oligosaccharide puis une solution contenant des potentiels récepteurs à cet oligosaccharide sont mis en contact avec le ligand. Après une élution des composants n'ayant pas d'interactions spécifiques avec le ligand, le récepteur d'intérêt est isolé par un lavage avec un ligand compétitif, un fort gradient en sel ou une variation de pH. (figure 10)



**Figure 10** : Principe de purification par chromatographie d'affinité

Cette approche est couramment utilisée pour la purification de lectines, principalement sur des gels d'agaroses réticulés<sup>[19]</sup> mais aussi sur des gels de silice.<sup>[20]</sup>

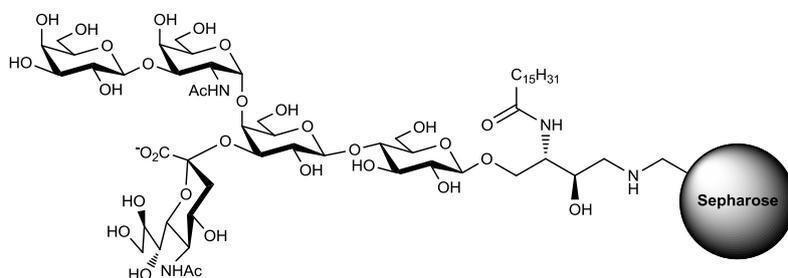
Driguez *et al.*<sup>[21]</sup> ont utilisé des thiocellooligosaccharides supportés sur support solide pour la purification d'enzymes. Ces thio-sucres sont des analogues non hydrolysables de cellodextrines ce qui leur permet de retenir les cellulases sur la matrice sans être dégradés. Les cellulases CHB I et CHB II du champignon décomposeur du bois *Trichoderma reesei* ont été piégées sur le support d'affinité puis éluées ce qui a permis d'obtenir les enzymes pures.



**Figure 11** : Thiocellotriose greffée sur Sépharose 4B

Cette approche permet de purifier des extraits complexes en utilisant directement l'activité de la protéine souhaitée contrairement aux approches classiques comme la chromatographie d'exclusion stérique ou ionique qui effectuent la différentiation sur des propriétés physico-chimiques. La préparation de supports d'affinités peut être utilisée pour la découverte et purification simultanée de nouvelles enzymes afin de les caractériser.

En utilisant une approche similaire, des immunoabsorbants ont été développés pour purifier ou piéger des anticorps spécifiques. Townson *et al.*<sup>[22]</sup> ont décrit la modification du ganglioside GM1 et son greffage sur des billes de Sépharose (figure 12). Le GM1 est un glycolipide naturellement lié à un groupement céramide. L'oligosaccharide est greffé sur une amino Sépharose par ozonolyse de la double liaison 4-5 du sphingolipide suivi d'une amination réductrice entre l'aldéhyde formé et l'amine du support.



**Figure 12** : Ganglioside GM1 greffé sur une bille de Sépharose

Le GM1 est présent principalement à la surface des cellules épithéliales de l'intestin. Dans le syndrome de Guillain Barré, la partie saccharidique du GM1 est reconnue comme exogène par des anticorps anti-GM1 ce qui déclenche une réaction auto-immune. Un des traitements de ce syndrome est la plasmaphérèse, qui consiste au remplacement du plasma sanguin du malade, éliminant ainsi les anticorps anti-GM1 de la circulation sanguine. Townson *et al.* ont démontré l'efficacité du GM1 greffé sur support solide pour l'élimination spécifique des anticorps anti-GM1 par filtration extracorporelle du plasma.

Au-delà de leurs propriétés d'interactions avec les protéines, les oligosaccharides présentent aussi des propriétés physico-chimiques intéressantes dans le cadre du développement durable de nouveaux matériaux biosourcés.

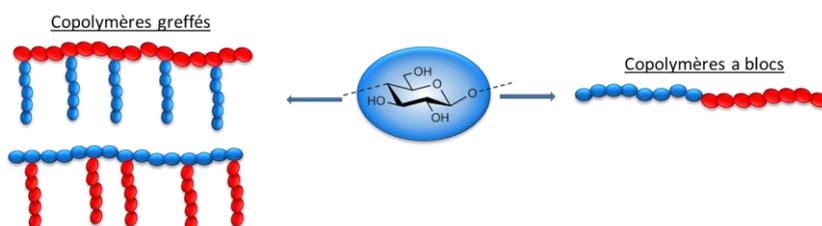
- **Glycoconjugués à propriétés structurales**

Les oligosaccharides et polysaccharides sont des molécules complexes du point de vue moléculaire mais aussi structural. Cette complexité se retrouve dans les conformations particulières des oligosaccharides, qui peuvent présenter des structures aussi variées que les « boîte à œufs » adoptée par les alginate en présence d'ions calcium<sup>[23]</sup> ou les triples hélices des  $\beta$ -1,3-glucanes.<sup>[24]</sup> Une autre propriété importante des oligosaccharides est le caractère hydrophile de ces molécules due à la présence de nombreux groupements hydroxyles. Cette propriété est depuis longtemps exploitée pour la fabrication d'agents gélifiants dans l'agroalimentaire ou la cosmétique avec par exemple les gels de xyloglucan, de carraghénanes ou d'alginate. La recherche de nouvelles propriétés physicochimiques permettant d'exploiter la biodégradabilité et la biocompatibilité des oligosaccharides a incité les chimistes à synthétiser de nouveaux glycoconjugués. Les dérivés glucidiques sont de plus en plus valorisés dans la science des polymères. L'association covalente d'un polymère de synthèse avec un poly

ou oligosaccharide forme un copolymère hybride. Dans le cas où le polymère de synthèse est hydrophobe, on obtient donc un copolymère amphiphile. Ce type de macromolécule a la propriété de s'auto assembler en solution ou en phase solide pour former des structures nano organisées tout en conservant les propriétés intrinsèques propres à chacun des blocs.

Différentes architectures de copolymères à blocs hybrides existent. Ils peuvent être classés en différentes familles en fonction de la géométrie de l'assemblage ou de la méthode d'obtention. En voici deux exemples principaux :

- Les polymères greffés ou « peigne »
- Les copolymères à blocs

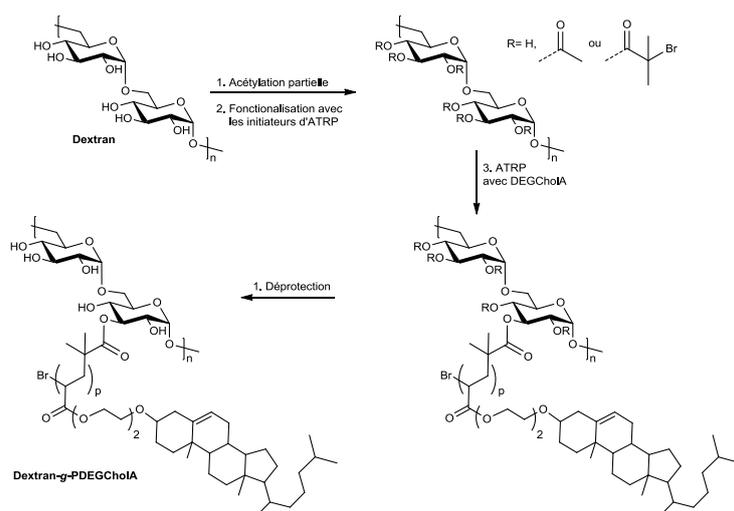


**Figure 13** : Structure des différentes familles de copolymères à bloc hybrides

Ces structures peuvent être préparées par trois stratégies différentes : la première consiste à polymériser la chaîne principale avec des monomères libres et des monomères fonctionnalisés avec une chaîne d'un autre polymère selon la méthode du « grafting through ». La deuxième stratégie est de faire croître par polymérisation le deuxième bloc à partir du squelette principal selon la méthode dite « grafting from ». Finalement, la troisième technique consiste à coupler le deuxième bloc déjà synthétisé et fonctionnalisé sur la chaîne principale selon la méthode dite « grafting onto ». Dans le cas de la recherche de propriétés structurales bien définies, il est important d'avoir un contrôle rigoureux de l'homogénéité de la taille de chacun des deux blocs et de la position de couplage. La méthode du « grafting onto » permet la synthèse et purification de chacun des deux blocs séparément puis leur couplage par des méthodes de ligation efficace, garantissant la regioselectivité et l'obtention de copolymères de structure contrôlée et définie. Ce chapitre présentera les méthodes d'obtention de ces deux familles de copolymères, en détaillant plus particulièrement les copolymères amphiphiles comportant un motif oligosaccharidique obtenu par la méthode du « grafting onto ».

## Les polymères greffés

Les polymères greffés sont formés d'une chaîne principale le long de laquelle sont couplés un ou plusieurs types de polymères ou oligomères (greffons). Ces polymères hybrides peuvent être constitués d'un squelette polysaccharidique avec des greffons synthétiques ou inversement. Une stratégie de synthèse de copolymères greffés est appelée « grafting from ». Elle consiste à modifier le squelette du copolymère greffé puis à faire croître les chaînes des greffons à partir d'une fonction polymérisable. Dans le cas d'un squelette polysaccharidique, soit les groupements hydroxyles soit d'autres fonctions chimiques qui dépendent du polysaccharide utilisé sont modifiés avec un groupement polymérisable. Ferji *et al.*<sup>[25]</sup> décrivent la préparation d'un copolymère de dextran greffé avec des chaînes de polymère d'ester acryliques d'éther d'éthylène glycol et de cholestérol (PDEGCholA) (figure 14).

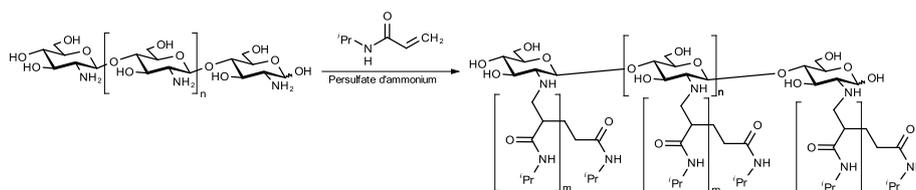


**Figure 14** : Synthèse des copolymères Dextran-g-PDEGCholA par ATRP

Ce copolymère est obtenu par fonctionnalisation des hydroxyles libres du dextran partiellement acétylé par un initiateur de polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP) puis le DEGCholA est polymérisé sur le squelette glucidique qui est ensuite déprotégé. C'est l'un des rares exemples de copolymères greffés formant des polymérosomes par auto-assemblage en solution.<sup>[26]</sup> Bien que dans cet exemple, le taux d'acétylation du dextran limite la quantité de greffons sur la chaîne, il est néanmoins difficile d'obtenir un contrôle sur la regioselectivité.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

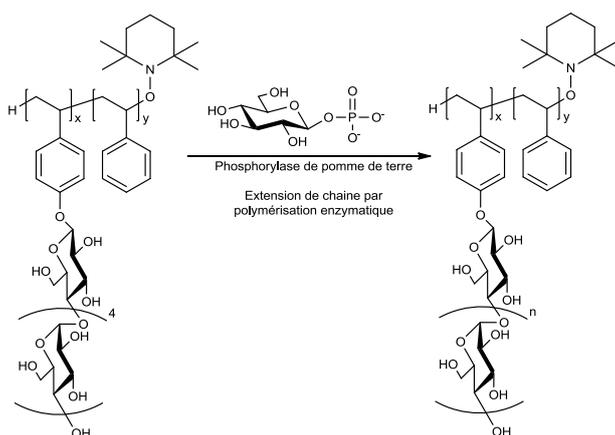
Spizziri *et al.*<sup>[27]</sup> décrivent la polymérisation radicalaire de chaînes de poly-*N*-isopropylacrylamide (PNIPAM) directement sur les fonctions amines du chitosan. (figure 15)



**Figure 15** : Synthèse du chitosan-g-PNIPAM

Cette approche permet en une seule étape d'obtenir des copolymères greffés sans modification préalable du polysaccharide et aussi de contrôler la position du greffage sur chaque ose. Le PNIPAM étant un polymère thermosensible les hydrogels obtenus sont évalués comme support de relargage d'un anti-inflammatoire (le diclofenac) lors de l'échauffement du gel.

Ce type d'approche peut aussi être appliquée pour la préparation de copolymères greffés par des greffons glucidiques. Stadler *et coll.* ont décrit la synthèse de maltodextrines par polymérisation enzymatique à l'aide d'une phosphorylase sur un squelette de polydiméthylsiloxane.<sup>[28]</sup> Plus récemment, Kakuchi *et al.* ont décrit la préparation d'un glycopolymère de polystyrène avec des greffons de maltopentaose. Ils ont ensuite allongé la chaîne glucidique par croissance enzymatique pour obtenir un polymère PS-g-amylose.<sup>[29]</sup>

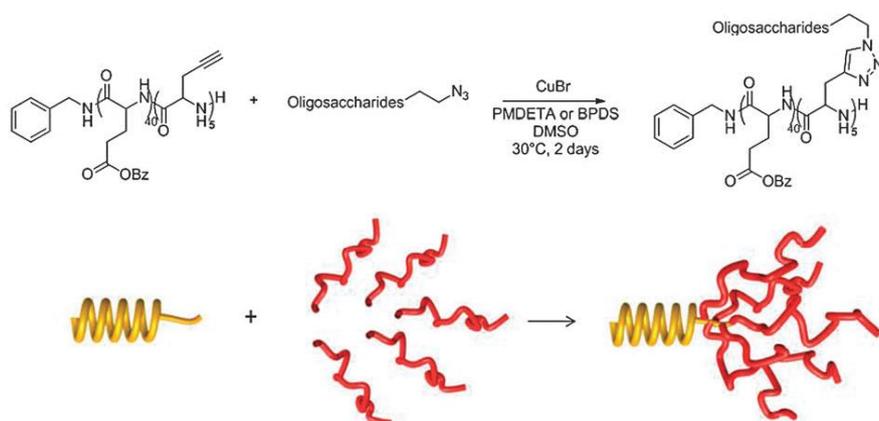


**Figure 16** : Synthèse de copolymère PS-g-Amylose par polymérisation enzymatique sur le maltopentaose<sup>[29]</sup>

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Une des limites de cette technique est le contrôle difficile du nombre de greffons et de leur taille sur le squelette principal. La méthode du « grafting onto » consiste à préalablement synthétiser des greffons fonctionnalisés puis de les coupler au squelette macromoléculaire. Cette méthode, bien que limitée par l'encombrement stérique sur la chaîne principale permet de greffer des chaînes de tailles et de structure contrôlée. Cette approche a bénéficié des développements de la chimie click pour le couplage efficace des greffons. Similairement à la méthode du « grafting from » le copolymère obtenu peut être constitué d'un squelette saccharidique et de greffons synthétiques ou inversement.

Bonduelle *et al.* décrivent la synthèse de copolymères de poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate)-block-poly(propargylglycine) auquel a été cliqué du dextran ( $M_n$  6600g.mol<sup>-1</sup>) ou de l'acide hyaluronique ( $M_n$  3600g.mol<sup>-1</sup>) modifié avec un azoture<sup>[30]</sup>.

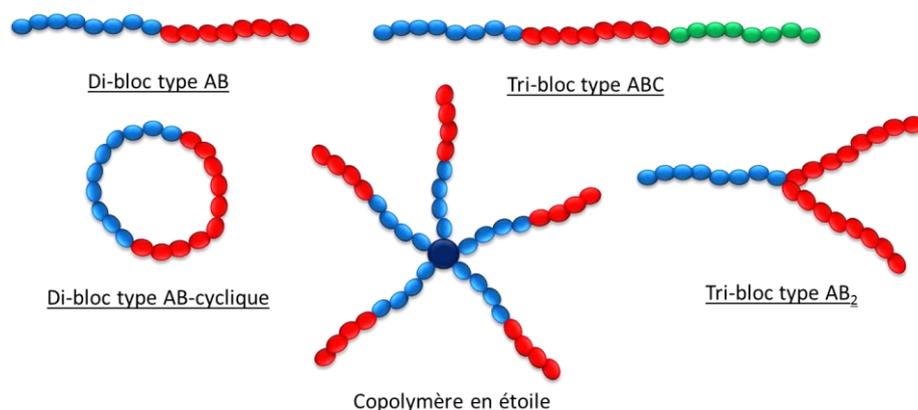


**Figure 17** : Synthèse de glycopeptides décorés avec des oligosaccharides de dextran ou d'acide hyaluronique<sup>[30]</sup>

Ces copolymères sont amphiphiles et ont la propriété de s'auto assembler en nanoparticules dans l'eau. Le système avec le dextran donne des particules de 50nm de diamètre et celui contenant de l'acide hyaluronique, des particules de 35nm. Ces particules biocompatibles présentent des tailles comprises entre 10nm et 100nm qui ont la propriété de passer les membranes cellulaires. Ces systèmes sont donc adaptés pour l'encapsulation et la vectorisation d'agents actifs.

## Copolymères a blocs

Les copolymères à blocs sont constitués d'un ou plusieurs blocs de polymères liés de façon covalente. Il existe plusieurs familles de copolymères à blocs, qui sont classés selon l'arrangement des différents blocs et la géométrie de la molécule finale. (Exemples figure 18 )



**Figure 18** : Exemples d'architecture de copolymères à blocs

Ils peuvent être constitués de deux (di-blocs), trois (tri-blocs), ou plus (multi-blocs) de blocs de monomères différents et selon des architectures variées. Lorsqu'ils sont formés d'un bloc hydrophobe et d'un bloc hydrophile, ils acquièrent un caractère amphiphile. La grande différence de solubilité entre les deux blocs provoque une micro ségrégation de phase et leur auto assemblage. Ils forment en solution ou en phase solide des nano-objets de taille micro ou nanométrique.<sup>[31]</sup> Ces propriétés d'auto assemblage proviennent de la grande incompatibilité physicochimique des deux blocs. Lors de la mise en solution dans l'eau d'un copolymère amphiphile polymère-*b*-oligosaccharide, on observe la formation d'un assemblage limitant les interactions pénalisantes du polymère hydrophobe tout en maximisant la solvation de l'oligosaccharide. On obtient donc un nano-assemblage avec une couronne composée du bloc glucidique et un cœur composé du bloc hydrophobe. L'architecture du composé, les fractions volumiques de chacun des blocs et le paramètre d'incompatibilité régissent le type d'assemblage obtenu.<sup>[32]</sup> Cette propriété structurale permet d'obtenir des objets de tailles nanométriques.

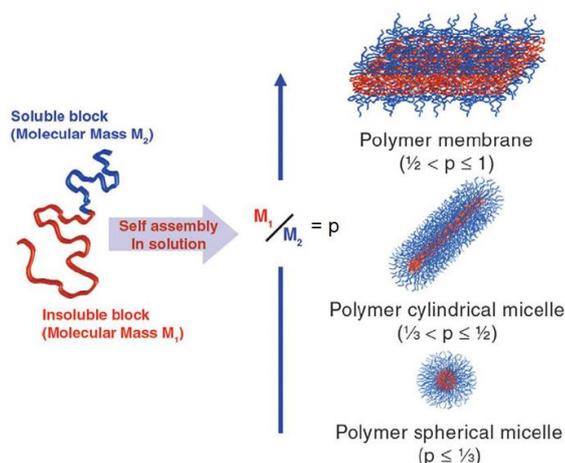


Figure 19 : Fraction massique des blocs polymériques et types de structures obtenues en solution<sup>[33]</sup>

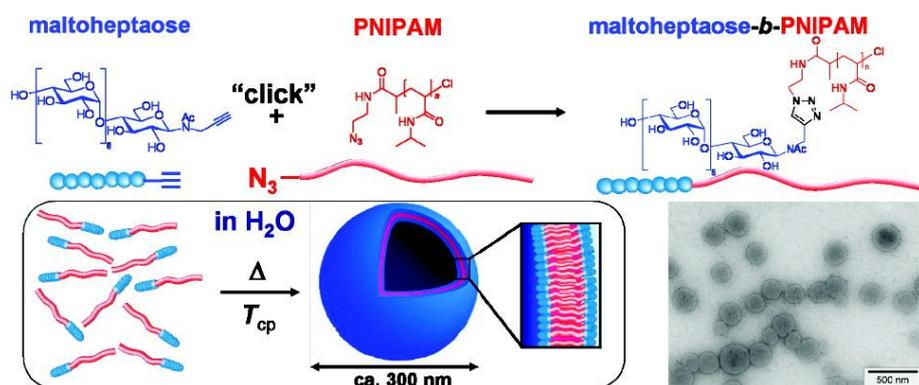
La synthèse de copolymères diblocs de type polymère-*b*-sucre peut être divisée en trois stratégies différentes. La première est la polymérisation enzymatique d’amorceurs saccharidiques en bout de chaîne du polymère. La deuxième consiste en la polymérisation du bloc synthétique à partir du polysaccharide précédemment fonctionnalisé avec un initiateur de polymérisation ou un monomère polymérisable. Et la troisième voie d’accès concerne le couplage des deux blocs préalablement fonctionnalisés avec des groupements sélectivement réactifs.



Figure 20 : Stratégie de synthèse d’un copolymère dibloc par la méthode du « grafting onto »

Dans le cadre de l’obtention d’objets de taille homogène et maîtrisée, il est important d’avoir un contrôle strict de la taille de chacun des deux blocs composant le copolymère. La méthode du « grafting onto » permet la préparation, fonctionnalisation et purification de chacun des blocs individuellement procurant de ce fait un contrôle plus poussé sur leur structure. Bien que la fonctionnalisation de chacun des groupements peut nécessiter un plus grand nombre d’étapes, l’utilisation de structures définies permet l’accès à des nano-objets de taille homogène et contrôlée. Otsuka *et al.* ont décrit la préparation de copolymères de maltoheptaose-*b*-poly(*N*-isopropylacrylamide) par chimie click entre le maltoheptaose fonctionnalisé avec un alcynes et

le PNIPAM comportant une fonction azoture<sup>[34]</sup>. Ce copolymère a montré des propriétés d'auto-assemblage en vésicules de taille homogène (300nm) lors d'un changement de température (figure 21).



**Figure 21** : PNIPAM-*b*-Maltoheptaose copolymères pour la préparation de nanocapsules thermo réversibles<sup>[34]</sup>

Le PNIPAM est un polymère thermosensible, il présente une transition d'un état hydrophile à basse température à un état hydrophobe lorsqu'il est chauffé au-delà de sa température critique de solubilité (LCST). Ce type de copolymère présentant une réversibilité de l'assemblage en réponse à un stimulus extérieur présente un intérêt pour le relargage contrôlé de substances actives.

Quelques applications relatives à la préparation de glycoconjugués ont été présentées. Les propriétés physicochimiques et biologiques particulières de ces macromolécules sont dépendantes de l'obtention d'oligosaccharides de taille et structure contrôlées. Cette partie présentera les différentes méthodes utilisées pour leur préparation.

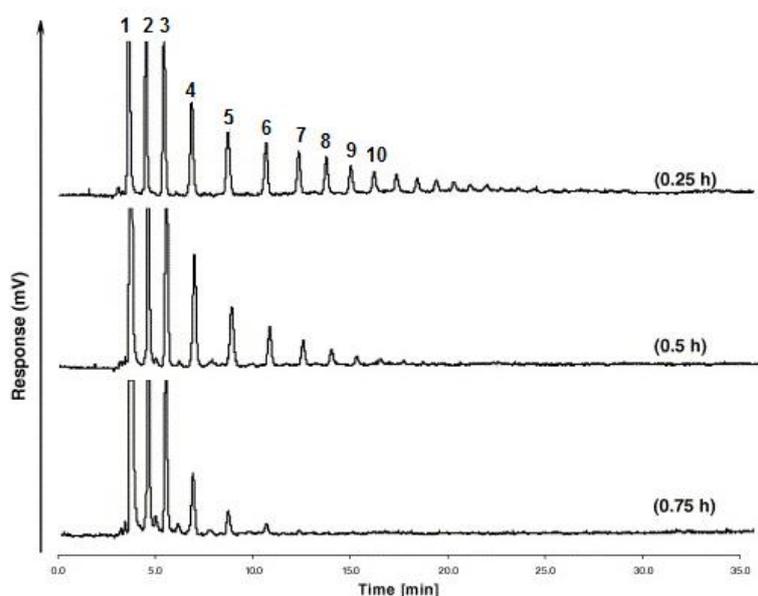
### **III. Méthodes d'obtention d'oligosaccharides**

#### **III.1. Hydrolyse de polysaccharides**

- **Hydrolyse chimique**

L'accès à des oligosaccharides de structure parfaitement contrôlée représente la première étape pour l'obtention de glycoconjugués. Une première voie d'accès est la dépolymérisation de polysaccharides. Cette dépolymérisation peut être réalisée par voie chimique en milieu acide ou bien par voie enzymatique.

L'hydrolyse chimique en milieu acide utilise principalement des acides minéraux pour couper les liaisons glycosidiques. Ces réactions permettent de dépolymériser la plupart des polysaccharides de manière efficace. Les acides utilisés sont principalement l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique ou l'acide phosphorique. L'avancement de ce type de réaction est difficile à contrôler et elles tendent thermodynamiquement à produire principalement des oligosaccharides de petite taille et des monosaccharides.<sup>[35]</sup> Pour pallier à ce manque de sélectivité pour les oligosaccharides, ces hydrolyses sont effectuées dans des milieux acides dilués à haute température ou dans des milieux concentrés à basse température mais les rendements pour les oligosaccharides contenant 5, 6 ou 7 sucres (que l'on notera degré de polymérisation : DP5, DP6, etc.) restent faibles. Warrand *et al.* ont effectué une étude de hydrolyse de l'amidon en conditions acides (figure 22) et obtiennent des rendements de 4-8% en malto-oligosaccharides.<sup>[36]</sup>

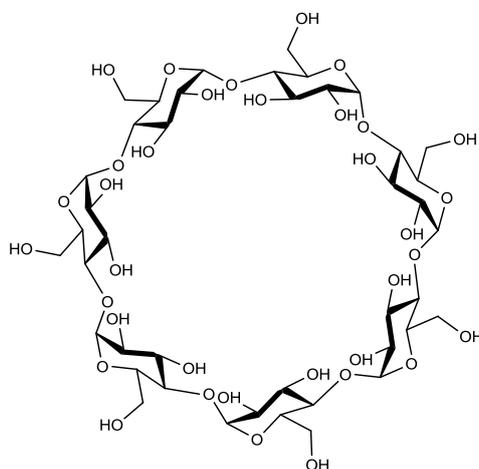


**Figure 22 :** Profil HPAEC de l'hydrolyse de l'amidon à 90°C dans 0.45M HCL à différent temps de réactions

L'hydrolyse acide de polysaccharides est une méthode efficace mais qui possède de nombreux inconvénients. Le contrôle de la réaction pour l'obtention d'oligosaccharides de taille définie est délicat, les réactifs utilisés sont fortement corrosifs et la génération de nombreuses espèces<sup>[37]</sup> dans le mélange réactionnel rend la purification difficile.

- **L'acétolyse**

L'acétolyse de polysaccharides permet la peracétylation et l'hydrolyse simultanée du polymère en oligosaccharides. Cette méthode possède les mêmes inconvénients en termes de rendement et de dangerosité des réactifs que l'hydrolyse acide et ajoute une étape supplémentaire de déprotection pour obtenir les oligosaccharides libres. Mais l'obtention de produits intermédiaires peracétylés permet néanmoins de réduire l'affinité des oligosaccharides pour la silice. Cette propriété permet de résoudre des mélanges complexes par chromatographie flash et d'isoler les degrés de polymérisation souhaités. Une approche particulièrement intéressante pour l'obtention de malto-oligosaccharides de taille définie DP(5-8) est l'acétolyse de cyclodextrines (CD). Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques d'amylose comportant 6-( $\alpha$ ), 7-( $\beta$ ) ou 8-( $\gamma$ ) unités sucres. Elles ont été découverte en étudiant la digestion de l'amidon par la bactérie *Bacillus macerans*<sup>[38]</sup>.



**Figure 23:** Structure de la  $\beta$ -cyclodextrine

L'acétylase de la  $\beta$ -cyclodextrine permet d'obtenir majoritairement des malto-oligosaccharides peracétylés de DP 4,5,6,7 avec des rendements de 30% pour le maltoheptaose<sup>[39]</sup>.

- **Digestion enzymatique**

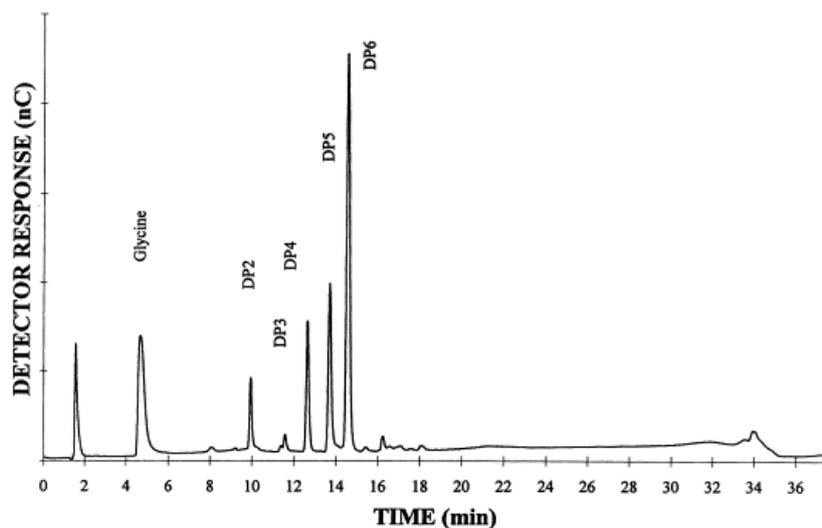
Une autre voie d'accès aux oligosaccharides est la digestion enzymatique de polysaccharides. Les enzymes sont des protéines spécialisées dans la formation, le transfert et l'hydrolyse des liaisons glycosidiques. Les glycosidases ou glycoside-hydrolases sont les enzymes responsables de l'hydrolyse des polysaccharides. Elles catalysent la rupture des liaisons glycosidiques et peuvent être classées en deux familles selon leur mode d'action :

- Les exo-glycosidases sont des enzymes processives, qui hydrolysent les liaisons glycosidiques des sucres terminaux. Elles procèdent généralement du sucre non réducteur au sucre réducteur.
- Les endo-glycosidases sont des enzymes qui coupent la liaison glycosidique entre deux résidus non terminaux.

Ces dernières sont utilisées industriellement pour la digestion enzymatique de polysaccharides comme la cellulose, l'amidon ou le xyloglucane<sup>[40]</sup> afin obtenir les oligosaccharides correspondants.

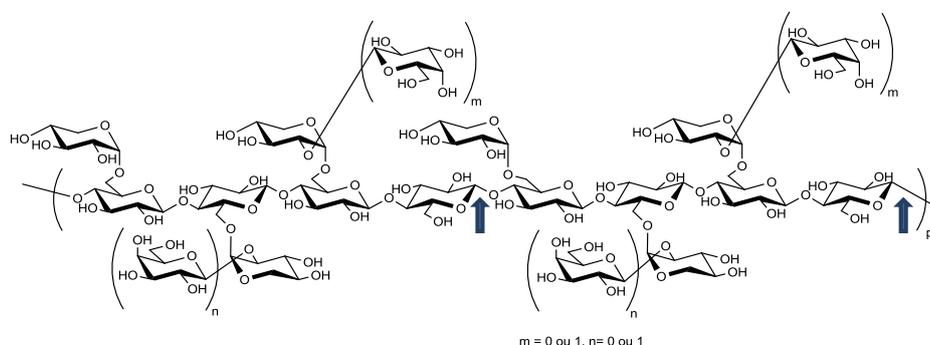
La digestion enzymatique est principalement statistique et tend vers la dégradation complète des polysaccharides vers des monomères ou des oligomères de petite taille. Certaines enzymes

plus spécifiques, avec des hydrolyses partielles ou ménagées permettent d'obtenir majoritairement des oligomères de DP plus élevé. Duedahl *et al.*<sup>[41]</sup> ont décrit la production d'une  $\alpha$ -amylase de *Bacillus clausii*, qui permet d'obtenir majoritairement des malto-oligosaccharides de DP4-5-6 (figure 24).



**Figure 24 :** Profil HPEAC des produits obtenus par hydrolyse d'amidon de pomme de terre par l'amylase BT-21, 30min pH 9.5 à 55°C.<sup>[41]</sup>

Une dernière stratégie d'obtention d'oligosaccharides de taille donnée consiste en l'utilisation d'enzymes spécifiques sur des substrats de structure régulière. L'hydrolyse du xyloglucane (XG) des graines de tamarin qui est un polysaccharide avec un motif régulier ne s'effectue que sur les glucoses non substitués. (figure 25)



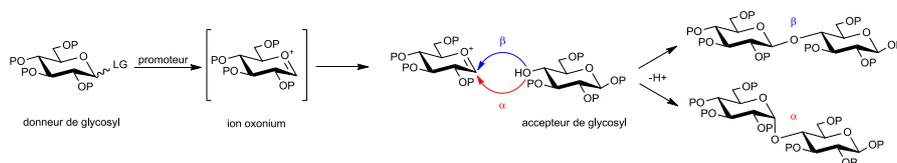
**Figure 25 :** Position d'hydrolyse du xyloglucan des graines de tamarin par la cellulase 3042A

Le produit final de l'hydrolyse du XG par la cellulase 3042A de Genencor est le motif de répétition du polymère constitué de quatre glucoses ramifié par deux xyloses qui comportent (Figure 25)  $m, n = 0$  ou  $1$  galactoses. Cette hydrolyse produit donc des xylooligosaccharides de DP 7,8 et 9.<sup>[40]</sup>

### III.2. Synthèse d'oligosaccharides

- Synthèse chimique**

La préparation d'oligosaccharides peut également être réalisée en couplant des oses par synthèse chimique. Cette chimie repose sur la réaction entre un sucre activé avec un groupement partant en position anomère (le donneur de glycosyle) et un deuxième sucre comportant un hydroxyle libre (l'accepteur de glycosyl) pour former une liaison glycosidique de configuration alpha ou beta (figure 26).

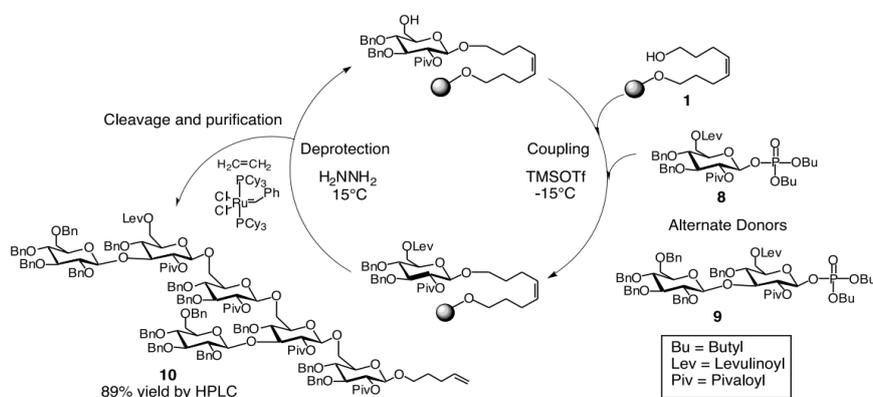


**Figure 26 :** Mécanisme général de la glycosylation chimique

La chimie des sucres se distingue par sa complexité, chaque hexose possède quatre ou cinq groupements hydroxyles nucléophiles pouvant réagir avec l'accepteur. Pour garantir la régiosélectivité de la réaction, la synthèse chimique d'oligosaccharides met en œuvre des

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

stratégies de protection/déprotection souvent complexes. Le contrôle de la configuration de la liaison glycosidique est dépendante de la méthode d'activation du donneur de glycosyl et des groupements protecteurs en présence. La synthèse d'oligosaccharides est donc un challenge<sup>[42]</sup> pour le chimiste organicien et nécessite des synthèses multi étapes.<sup>[43]</sup> L'automatisation des synthèses et l'utilisation de supports solides ont permis une avancée dans le domaine de la préparation d'oligosaccharides et de glycoconjugués complexes. Seeberger *et coll.*<sup>[44]</sup> décrivent la synthèse supportée d'un  $\alpha$ -manoside (figure 27) par synthèse automatisée à partir de donneurs de glycosyl phosphates.



**Figure 27** : Synthèse automatique sur support solide d'une sous unité  $\beta$ -glucane d'un éliciteur de la phytoalexine.<sup>[44]</sup>

Cette synthèse permet l'accès à des oligosaccharides complexes, avec de bons rendements et en limitant les manipulations par un opérateur. Bien qu'innovante et efficace, ce type de synthèse reste peu répandue car elle nécessite des automates de synthèse, la préparation préalable de précurseurs osidiques activés et sélectivement protégés.

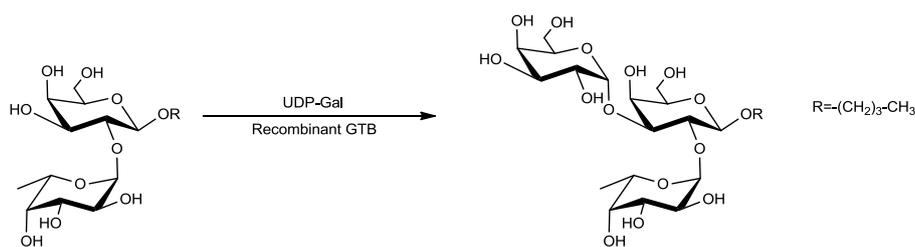
Bien que durant ces 20 dernières années, la synthèse chimique d'oligosaccharides a fait des avancées majeures, le contrôle de la stéréo et regioselectivité de la glycosylation en un minimum d'étape de synthèse est particulièrement difficile. La nature ayant développé des outils biocatalytiques de glycosylation très efficaces, la partie suivante présentera l'utilisation de ces enzymes pour la préparation d'oligosaccharides complexes.

• **Synthèse enzymatique**

Une alternative à la synthèse chimique consiste à utiliser des enzymes. Les principaux avantages de la synthèse enzymatique reposent sur la grande régio et stéréospécificité des enzymes, ainsi que sur des conditions réactionnelles douces. La composition et l'arrangement spatial du site actif de l'enzyme la rend spécifique à un substrat et conditionne son activité catalytique. Bien qu'étant des outils puissants pour la synthèse d'oligosaccharides, les freins à leur développement sont la faible disponibilité des enzymes pures et la difficulté de préparation des substrats activés. Les principaux types d'enzymes agissant sur les oligosaccharides sont les glycosyltransférases et les glycoside-hydrolases.

Les glycosyltransférases sont les enzymes naturelles responsables de la biosynthèse des oligosaccharides et polysaccharides dans les organismes vivants. Elles sont spécialisées dans la formation de liaison glycosidiques entre un sucre activé, appelé le donneur de glycosyle et un nucléophile (accepteur de glycosyle), principalement un sucre, un lipide ou une protéine. Leur utilisation est néanmoins limitée par leur faible disponibilité commerciale, la difficulté de production et d'isolement d'enzymes pures et l'utilisation de nucléotides sucre comme donneur de glycosyle.

La production de protéines recombinantes a permis de réel progrès pour la synthèse d'oligosaccharides complexes. Seto *et al.*<sup>[45]</sup> décrivent la préparation de l'antigène B des groupes sanguins à partir de  $\text{Fu}\alpha(1-2)\text{Gal}\beta\text{-O}-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$  et de l'UDP-Gal *in vitro* à l'aide d'une glycosyltransferase-B humaine GTB (EC 2.4.1.37) recombinante produite dans *Escherichia coli*.

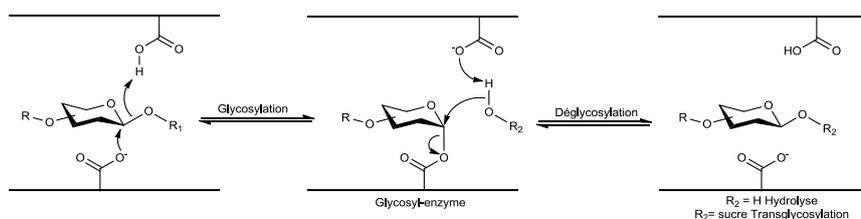


**Figure 28** : Synthèse enzymatique *in vitro* de l'antigène B du groupe sanguin<sup>[45]</sup>

Les glycosides-hydrolases, bien plus répandues et étudiées, sont les enzymes responsables de l'hydrolyse des oligosaccharides et polysaccharides. Elles peuvent être utilisées pour la

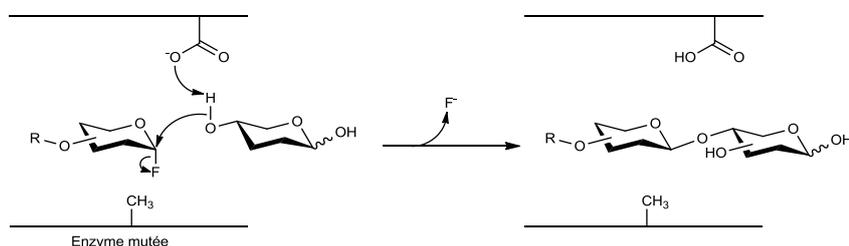
## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

synthèse d'oligosaccharides mais dans le cas d'enzymes natives, la trans-glycosylation est en équilibre avec la réaction d'hydrolyse de la liaison glycosidique (figure 29).



**Figure 29** : Réaction de transglycosylation par une glycosidase-native

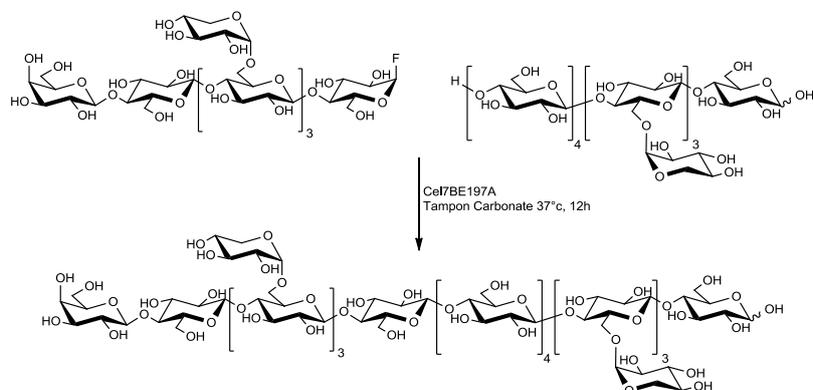
Il est tout de même possible de les utiliser pour la synthèse en se plaçant dans des conditions hydro-organiques et en utilisant un excès de donneur de glycosyle. Néanmoins, l'activité hydrolytique de ces enzymes diminue les rendements en hydrolysant partiellement le produit de la réaction. Withers *et coll.* ont développé des mutants de glycosidases dont l'activité d'hydrolyse a été supprimée [46a, 46b]. Ces enzymes mutantes sont appelées glycosynthases (figure 30).



**Figure 30** : Transglycosylation catalysée par une glycosynthase

Les glycosynthases sont donc des glycosidases dont l'acide aminé nucléophile est remplacé par un résidu non nucléophile par mutagenèse dirigée. Ces enzymes sont dépourvues d'activité hydrolytique mais conservent leur activité de transglycosylation en présence d'un glycoside activé mimant l'intermédiaire glycosyl-enzyme. Cette méthode a été utilisée par Lopez *et al.*[47] pour produire des analogues de xylooligosaccharides afin d'étudier leurs interactions avec la cellulose. Une cellulase mutée HiCel7B E197A a permis le couplage de différents fragments de xylooligosaccharides afin d'obtenir des oligosaccharides de structure définie possédant jusqu'à 20 unités osidiques (figure 31)

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



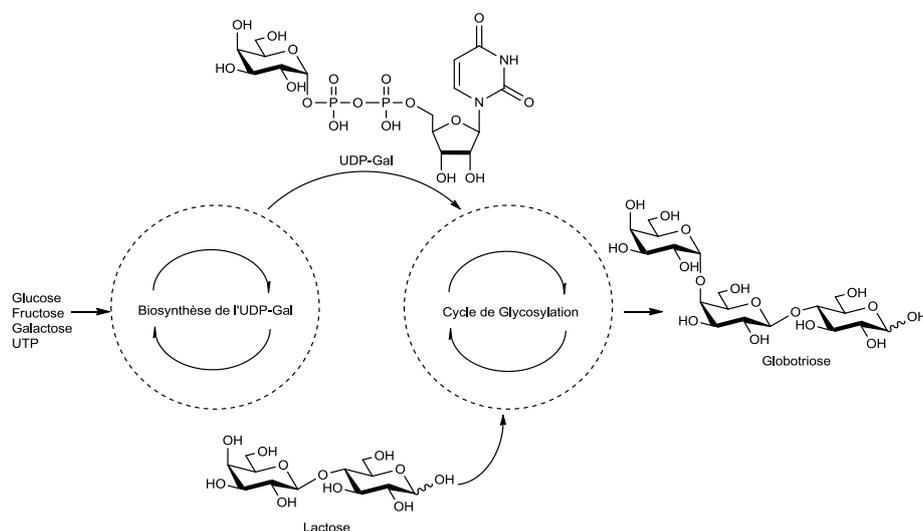
**Figure 31** : Préparation d'un oligosaccharide de xyloglucane de DP20 par synthèse enzymatique *in vitro*<sup>[47]</sup>

Les glycosynthases sont des outils efficaces pour la synthèse chimio-enzymatique d'oligosaccharides mais elles nécessitent un travail préalable de mutagenèse dirigée du site actif suivi de la production de ces enzymes mutantes.

La synthèse enzymatique *in vitro* à l'aide d'enzymes purifiées est souvent limitée à la production de quantités modestes d'oligosaccharides. De nouvelles approches biotechnologiques de synthèse d'oligosaccharides ont récemment été développées avec l'utilisation de bactéries recombinantes. Des souches bactériennes sont génétiquement modifiées afin d'exprimer des enzymes nécessaires à chaque étape de la synthèse d'un oligosaccharide cible. Cette approche présente l'avantage de ne pas nécessiter l'isolement des nombreuses enzymes nécessaires à la production d'oligosaccharides complexes puisque les bactéries sont utilisées dans leur intégralité.

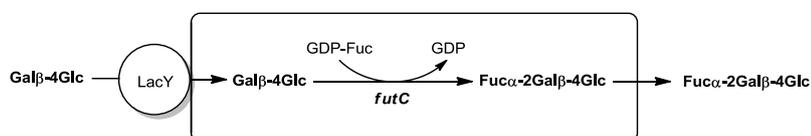
Une première méthode développée par Kozumi *et al.*<sup>[48a, 48b]</sup> utilise les enzymes produites par des souches de *E.coli* recombinantes puis perméabilisées. Elle a permis la synthèse du globotriose par biosynthèse d'UDP-Gal puis par transglycosylation sur le lactose. Cette méthode nécessite néanmoins la culture de plusieurs souches de bactéries génétiquement modifiées et peut être limitée par la diffusion des substrats à travers les membranes des différentes souches. (figure 32)

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



**Figure 32** : Système de production du globotriose par couplage de bactéries recombinantes perméabilisées<sup>[48a, 48b]</sup>

Samain *et coll.*<sup>[49]</sup> ont développé une méthode de production d'oligosaccharides *in vivo* par l'utilisation d'une souche d'*E.coli* recombinante cultivée à haute densité cellulaire. Cette souche surexprime les gènes codant pour les glycosyltransférases d'intérêt ainsi que les enzymes responsables de la synthèse des nucléotides-sucres nécessaires pour la production de l'oligosaccharide choisi. Drouillard *et al.*<sup>[50]</sup> ont décrit la préparation d'un analogue de l'antigène H du groupe sanguin. Cette biosynthèse repose sur la surexpression de *futC*, une fucosyl transférase de *H-pylori* ainsi que de la biosynthèse de l'accepteur de glycosyle GDP-fucose. *LacY* qui est une protéine normalement présente chez *E.coli*, est aussi surexprimée pour permettre une internalisation active du lactose au sein de la bactérie



**Figure 33** : Production du 2-fucosyllactose *in vivo* par *E.Coli* génétiquement modifiée<sup>[50]</sup>

Cette biosynthèse permet la production de 2-fucosyllactose avec des rendements de culture impressionnants (14g/L) pour des applications potentielles en nutraceutique.

La dépolymérisation enzymatique de polysaccharides ainsi que l'usine cellulaire sont donc deux moyens efficaces pour l'obtention de quantités non négligeables d'oligosaccharides pour la préparation ultérieure de glycoconjugués.

#### IV. Méthodes de modification anomère d'oligosaccharides

La préparation de neo-glycoconjugués nécessite une méthode de ligation sélective des oligosaccharides. La réactivité sur le glucide soit aussi s'effectuer de manière orthogonale aux éventuels autres groupements fonctionnels présents. Afin d'éviter les réactions de protection/déprotection rendant complexes les synthèses et l'utilisation de réactifs ou solvants toxiques, il est préférable de coupler des oligosaccharides libres dans l'eau. La méthodologie la plus répandue pour la ligation chimiosélective est l'introduction sur les deux molécules à coupler de groupements complémentaires réactifs (ex : aldéhyde et hydroxyamine) permettant la formation d'une liaison covalente entre les deux partenaires. Un bras espaceur est souvent introduit pour éviter les interactions stériques entre l'oligosaccharide et l'aglycone.

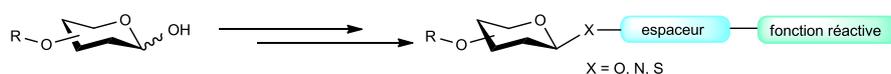
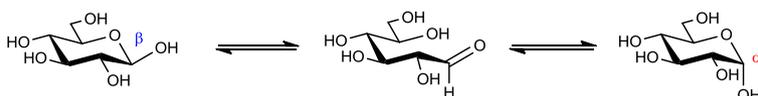


Figure 34 : Modification anomère d'oligosaccharide

La modification régiosélective d'oligosaccharides libres reste un challenge pour le glycochimiste. La présence de nombreux groupements hydroxyles, la faible solubilité dans les solvants organiques de certains oses et la fragilité des structures ne permettent pas une transposition aisée des réactions de chimie organique sur les sucres. Les oligosaccharides possèdent principalement trois types de fonctions, des hydroxyles primaires, secondaires, et s'ils sont réducteurs, une fonction aldéhyde, mais certains sucres peuvent posséder des fonctions carboxyliques, amine, cétone ou encore ester. La modification chimique régiosélective d'une seule position hydroxyle nécessite souvent l'utilisation de stratégies de protection/déprotection complexes. Quelques méthodes de modifications sélectives d'un hydroxyle primaire sur les cyclodextrines ont été décrites<sup>[51]</sup> mais cela reste des cas spécifiques à certains substrats. La fonction réactive prédominante des sucres réducteurs est un aldéhyde masqué en C1. Il est en équilibre en solution avec une forme hémiacétal cyclique de

configuration  $\alpha$  ou  $\beta$ . La stéréochimie du carbone anomère ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) est contrôlée par la nature du sucre.



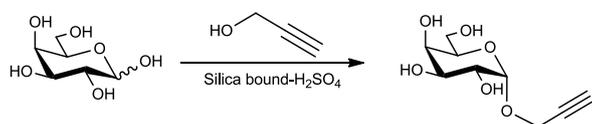
**Figure 35** : Equilibre hémiacétal cyclique, aldéhyde du glucose  $\alpha$  et  $\beta$

Cet équilibre en solution confère à la position anomère une réactivité de pseudo-aldéhyde fortement diminuée. Mais l'unicité de cette fonction et sa position à l'opposé des sucres terminaux principalement impliqués dans la reconnaissance cellulaire<sup>[52]</sup> en fait une cible de choix pour la préparation de glycoconjugués. Cette partie détaillera les méthodes principales de modification de la position anomère sur des sucres libres.

#### IV.1. Glycosylations chimiques

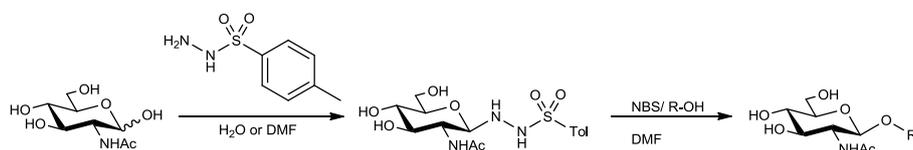
Les réactions de glycosylation chimique (Fischer, Koenigs-Knorr, Schmidt) ont été développées pour la formation de liaisons glycosidiques entre un donneur de glycosyle et un nucléophile. En utilisant un nucléophile différent d'un sucre, on peut donc utiliser ces réactions pour la modification d'oses. La glycosylation de Fischer<sup>[53]</sup> est la méthode de glycosylation la plus simple et efficace pour la formation d' $\alpha$ -O-glycosides sur des sucres libres. Elle consiste à condenser un alcool sur l'hémiacétal du donneur de glycosyle par activation à l'aide d'un acide. Cette réaction est équilibrée et elle tend vers les produits les plus stables thermodynamiquement. La configuration  $\alpha$  est majoritaire à cause de l'effet anomère.<sup>[54]</sup> La réaction de Fischer s'est donc imposée pour l'introduction de groupements fonctionnels comme des groupements propargyle ou allyle<sup>[55a, 55b]</sup> en position anomère des sucres qui permettent leur couplage ultérieur. Les principales limitations de la réaction de Fischer sont liées aux conditions réactionnelles. Cette glycosylation procède à chaud et en présence d'acide fort. Des efforts ont été fait pour utiliser des conditions réactionnelles plus douces par l'utilisation de micro-ondes,<sup>[56]</sup> ou d'ultrasons.<sup>[55b]</sup> La stabilité des oligosaccharides en milieu acide ainsi que leur faible solubilité dans les alcools utilisés comme nucléophiles limite l'utilisation de cette glycosylation à la fonctionnalisation de monosaccharides<sup>[57]</sup>.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



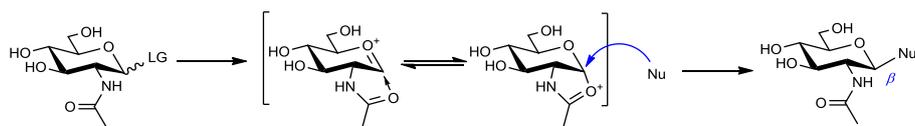
**Figure 36** : Préparation du galactose-( $\alpha$ )-O-propargyl par glycosylation de Fischer<sup>[56]</sup>

Une méthode alternative de glycosylation repose sur la préparation préalable de sucres couplés à une sulfono-hydrazide. Ces substrats jouent le rôle de donneur de glycosyl activé. Le NBS joue le rôle de promoteur pour la réaction de glycosylation avec un alcool. Cette réaction développée par Mark Nitz *et coll.*<sup>[58]</sup> a montré des rendements prometteurs sur des sucres non protégés



**Figure 37** : Glycosylation par *N*-glycosylsulfonohydrazide<sup>[58]</sup>

Cette glycosylation a été décrite sur le chitobiose, et permet de former des  $\beta$ -O-glycosides sur des alcools variés avec de bons rendements (70 à 87%) et une sélectivité  $\alpha/\beta$  de 1:6 à 1:10. La bonne sélectivité obtenue s'explique par la présence du dérivé *N*-acetyl qui favorise la formation du  $\beta$ -O-glycoside<sup>[59]</sup> (figure 38). La réactivité des sulfono hydrazides avec un alcool sur les sucres ne possédant pas de groupements participatif en C2 reste excellente mais on observe une perte de la sélectivité  $\alpha/\beta$  qui varie de 2.9:1 à 0.7:1.<sup>[60]</sup>

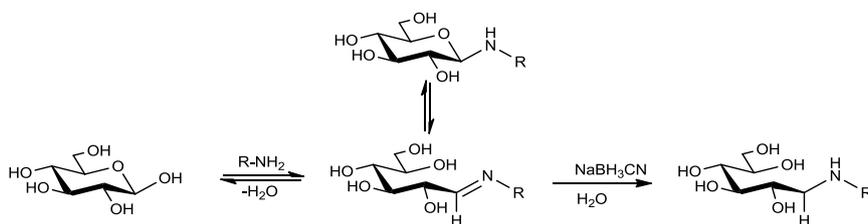


**Figure 38** : Assistance du groupe protecteur en C2

## IV.2. Réactions d'amination

- **Amination réductrice :**

L'amination réductrice est une réaction de condensation d'une amine sur l'aldéhyde du sucre réducteur. Cette addition forme un hémiaminal en équilibre avec l'imine qui est ensuite réduite pour former une amine (figure 39). Cette réaction permet la ligation covalente d'oligosaccharides natifs dans l'eau sans manipulations préalables. La réactivité de l'aldéhyde présent majoritairement sous sa forme hémiacétal est faible et la réaction de condensation est en compétition avec l'hydrolyse de l'imine en milieu aqueux.

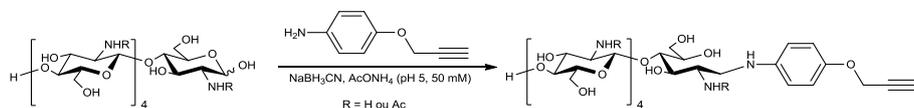


**Figure 39** : Schémas réactionnel de l'amination réductrice

Ces caractéristiques propres à la réaction nécessitent souvent l'utilisation de larges excès d'amine et d'agent réducteur (pouvant aller jusqu'à 300eq), ainsi que des temps de réactions de plusieurs jours<sup>[61]</sup>. Selon la nature du glycoconjugué souhaité, l'utilisation de large excès de réactifs ou d'un oligosaccharide précieux n'est pas envisageable. Un autre inconvénient de cette méthode est la perte du sucre réducteur par ouverture de cycle, ce qui peut affecter les propriétés de reconnaissance de l'oligosaccharide couplé.<sup>[62]</sup> Certaines améliorations ont permis d'accélérer la réaction en changeant le tampon<sup>[63]</sup> ou ont permis d'utiliser moins de réactifs par l'utilisation d'amines benzyliques.<sup>[64]</sup>

L'utilisation de dérivés d'amines telle que les anilines permet de circonvenir la faible réactivité de l'aldéhyde. Guerry *et al.*<sup>[65]</sup> ont utilisé la 4-(prop-2-nyloxy)aniline pour la fonctionnalisation en position anomère d'un chitoooligosaccharide par un groupement propargyl clickable.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



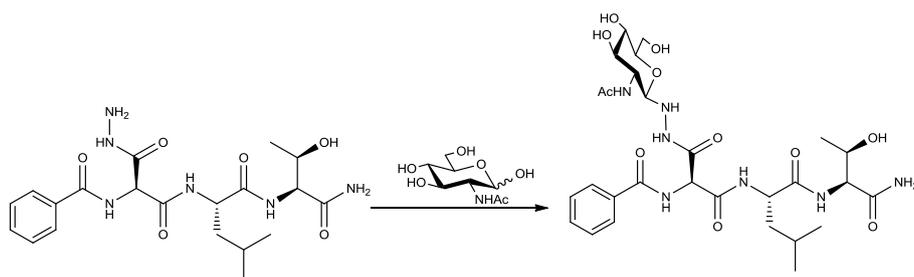
**Figure 40** : Fonctionnalisation anomère de chito-oligosaccharides par une aniline propargylée<sup>[65]</sup>

Le pKa moins élevé de l'aniline comparée aux amines primaires permet de former une imine intermédiaire plus réactive et donc favorise l'étape de réduction menant au produit d'amination réductrice souhaité.

Afin de circonvenir la faible nucléophilicité des amines, l'addition de dérivés aminés  $\alpha$ -activés tels que les *-O*-hydroxyamines ou les *-N*-alkylhydrazines a été étudiée.

- **Hydrazines :**

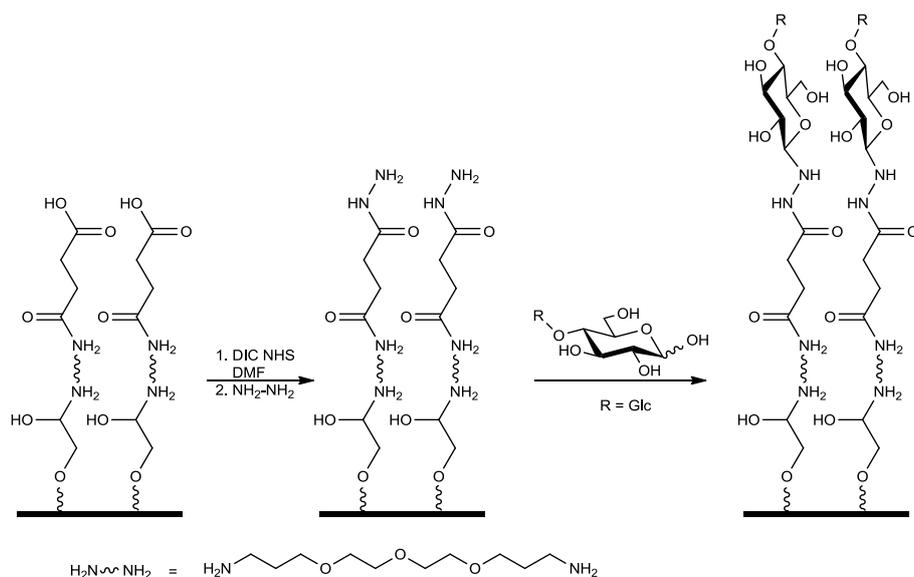
La formation de glycosyl-hydrazines a été étudiée pour la formation de *N*-glycosides et utilisée pour la formation de donneurs de glycosides.<sup>[58]</sup> L'utilisation d'hydrazines pour la préparation de glycoconjugués est attractive car le produit de condensation sur le sucre conserve sa forme pyranoside et donne majoritairement le produit de configuration  $\beta$ . Feizi et al.<sup>[66]</sup> ont préparé une biotine fonctionnalisée avec un groupement hydrazide et l'ont condensée sur de nombreux oligosaccharides. Leur approche est avantageuse par rapport à l'amination réductrice car elle n'utilise qu'un excès modéré de réactifs (5eq d'hydrazine) pour obtenir une modification complète des oligosaccharides. Peluso et Imperiali<sup>[67]</sup> ont préparé des dérivés alanine- $\beta$ -hydrazines qui ont été couplés au GlcNAc. Cette réaction représente une des premières approches de l'utilisation d'hydrazines pour la préparation de glycopeptides.



**Figure 41** : Couplage de la glycosylamine-*N*-acétylée sur un peptide par liaison hydrazine

Ces peptides servent à mimer les glycopeptides naturels et sont évalués comme substrats et inhibiteurs de l'oligosaccharyltransferase.<sup>[68]</sup>

Les hydrazines sont aussi utilisées pour la préparation de puces à sucre pour la détection d'interactions avec des protéines. Park *et al.*<sup>[69]</sup> décrivent la modification de surface de plaques de verre avec une fonction hydrazine puis le couplage de sucres libres à leur surface.



**Figure 42 :** Fonctionnalisation de surface avec l'hydrazine suivie du couplage avec le maltose

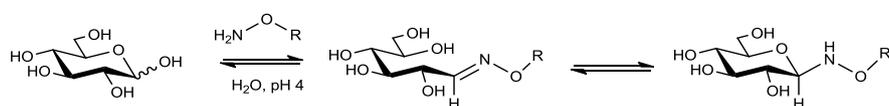
Ils ont ensuite préparé un support où ont été déposés en matrice cinquante-huit glucides libres différents et ont ensuite étudié la réponse de différentes lectines qui sont marquée par des groupements fluorescents.

Bien que la formation d'hydrazones avec les sucres constitue une méthode efficace de conjugaison, les produits formés sont sensibles à l'hydrolyse même dans des solutions faiblement acides.<sup>[70]</sup> Cette sensibilité est très dépendante du pKa de l'hydrazine utilisée, et peut donc limiter l'usage d'hydrazines dans certaines conditions de pH. Le couplage hydrazine-aldéhyde permet la conjugaison de molécules biologiquement actives sur les sucres natifs même complexes mais elle reste essentiellement appliquée aux domaines analytiques.

- **Condensation des hydroxyamines :**

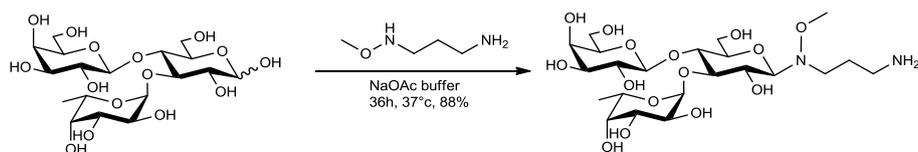
La formation d'oximes offre une alternative avantageuse pour la formation de *N*-glycosides. Elle repose sur la condensation d'une *O*-hydroxyamine sur l'aldéhyde du sucre réducteur.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



**Figure 43** : Condensation d'hydroxylamine sur le glucose

Le problème principal de la formation de dérivés oximes de sucre réside dans l'équilibre entre la forme ouverte et la forme cyclique du dérivé qui peut affecter les interactions avec les protéines<sup>[71]</sup>. Des études sur cet équilibre ont été effectuées par Wolfrom *et al.*<sup>[72]</sup> sur des dérivés du glucose puis par Finch et Merchant,<sup>[73]</sup> confirmant la présence majoritaire de la forme ouverte. Cette méthode, plus rapide que l'amination réductrice et ne nécessitant pas ou peu d'excès de réactifs a été utilisée par Mutter *et coll.*<sup>[74]</sup> pour la préparation de glycoprotéines avec des sucres natifs et des peptides précédemment modifiés avec un groupement oxime. Peri *et al.* ont décrit en 1998<sup>[75]</sup> l'utilisation de *N*-alkyl oxyamines pour la condensation. Ils ont synthétisé des *N*-glycosyl-oximes avec des rendements modérés à très bons (30 à 95%) dont la forme pyranose est prédominante. Cette méthode constitue un sérieux avantage par rapport aux hydroxylamines classiques donnant majoritairement des formes ouvertes. Cette variante a aussi l'avantage de donner majoritairement des produits de configuration  $\beta$ , sauf pour le mannose qui lui, donne la configuration  $\alpha$ . En 2015 Muneke *et al.*<sup>[76]</sup> ont décrit une variante de la condensation d'hydroxylamines utilisant des dérivés O-méthyl pour introduire des fonctionnalités variées comme un azide, thiol, ou amine sur des glucides et des oligosaccharides complexes comme le Lewis-X.



**Figure 44** : Modification du Lewis-X par condensation d'oximes<sup>[76]</sup>

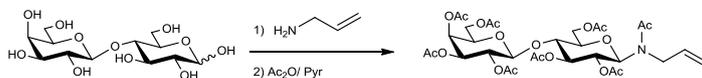
Carasco *et al.*<sup>[77]</sup> ont développés des peptides comportant le motif methyl-aminoxy attaché par une chaîne courte. Ils ont ensuite couplé sélectivement des sucres sur ce motif pour obtenir des glycopeptides mimant les glycoprotéines naturelles. Renaudet *et al.*<sup>[78]</sup> ont récemment décrit la synthèses de glycoclusters multivalents par des condensations d'oximes séquentielles. Cette

méthode permet par des étapes d'oxydation intermédiaires, de coupler différents types de molécules sur leur support cyclo-peptidique. La ligation par les *N*-alkyloxyamines présente l'avantage d'être une méthode polyvalente de couplage d'oligosaccharides et présente une meilleure résistance à l'hydrolyse que la ligation hydrazone. Les hydrazines et les hydroxylamines réagissent rapidement avec les fonctions aldéhydes et cétones présentes sur le substrat, cette propriété souhaitée pour la modification anomère, limite aussi leur champ d'application aux molécules ne possédant pas d'autres fonctions carbonyles.

- **Synthèse de glycosylamides :**

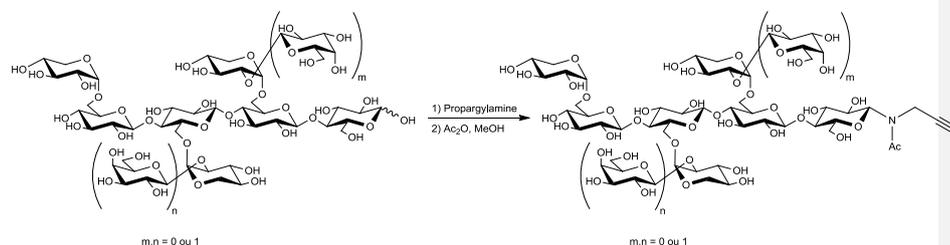
Une autre méthode permettant la préparation de *N*-glycoside sans ouverture du cycle réducteur a été développée par l'équipe de Stadler.<sup>[79]</sup> Il a décrit la préparation d'analogues de glycolipides par la condensation d'une amine primaire sur des mono ou disaccharides dans un solvant polaire. Par la suite, la *N*-glycosylamine est acétylée ou acylée, ce qui permet de bloquer le cycle dans sa configuration  $\beta$  et d'empêcher la réaction d'hydrolyse.

Utilisant la même méthodologie, Spevak *et al.* ont introduit une fonction allyle sur différents mono, di et tri saccharides par condensation de l'allylamine sur le sucre réducteur suivie d'une peracétylation.<sup>[80]</sup>



**Figure 45 :** Synthèse de lactose- $\beta$ -*N*(Ac)-allylamine peracétylé

La préparation de dérivés *N*-acetyl fonctionnels sont assez peu décrits dans la littérature, Pérez-Balderas *et al.* ont préparé des dérivés *N*-acétyl propargyle de monosaccharides<sup>[81]</sup> et ont évalué les possibilités de ligation de ces glycosylamides par chimie click. Dernièrement, cette méthodologie a été modifiée par Halila *et al.*<sup>[82]</sup> pour la préparation de xylooligosaccharides *N*-acétyl-propargyle.



**Figure 46** : Fonctionnalisation des Xylooligosaccharides par la propargylamine<sup>[82]</sup>

Cette méthodologie permet la modification d'oligosaccharides, avec une acétylation sélective de l'azote permettant l'obtention d'oligosaccharides fonctionnalisés sous forme libre à des échelles multi-grammes.

Ce paragraphe démontre de manière non exhaustive les efforts de synthèse concernant la modification anomère d'oligosaccharides non protégés. Ces réactions sont principalement utilisées pour l'introduction de groupements fonctionnels en position réductrice des oses. Ces modifications permettent, avec l'essor de nouvelles méthodes de couplage sélectives et efficaces, de préparer des néo-glycoconjugués cliquables. Les méthodes de couplage appartenant à la chimie dite click seront décrites dans les parties suivantes.

## V. La chimie click, un outil de ligation

Le couplage de deux biomolécules peut engendrer des réactions parasites ou des interactions non souhaitées entre leurs différents groupes fonctionnels. La préparation de composés complexes a donc recours à des stratégies de protection, couplage et déprotection impliquant la multiplication des étapes de synthèse et de purification. La diversité des structures utilisées a entraîné une complexité croissante des stratégies de synthèse de ces entités. Dans le contexte d'une difficulté croissante dans la recherche de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique, Sharpless proposa de recentrer l'effort de recherche vers des molécules plus faciles à synthétiser, et présenta le concept de chimie click<sup>[83]</sup>. En calquant les méthodes de biosynthèse de molécule dans le vivant, la recherche devrait se focaliser sur la synthèse de liaisons hétéroatomiques de type C-X-C (X = N, O, S, etc.) par des processus efficaces, fiables, et transposables à l'échelle industrielle. Plus précisément, le challenge consiste à développer des 'blocs' fonctionnels réactifs et modulables pour le couplage sélectif de deux entités. Sharpless a émis une liste de conditions à satisfaire pour que la réaction soit qualifiée de chimie click.

Ces réactions doivent :

- Etre modulables
- Présenter des rendements élevés
- Etre stéréosélectives
- Etre tolérantes à l'eau, à l'oxygène et aux autres groupes fonctionnels
- Ne pas nécessiter de groupements protecteurs
- Etre thermodynamiquement favorables
- Ne pas générer de sous-produits, ou des sous-produits non toxiques et éliminables

De plus il est recommandé que les réactions de chimie click :

- N'utilisent pas de solvant ou des solvants non toxiques et facilement éliminables
- Se déroulent dans des conditions réactionnelles simples
- Soient mise au point à partir de réactifs commerciaux ou simples à préparer

De plus, le concept de bio-orthogonalité s'est plus tard ajouté à la liste des conditions. Une réaction bio orthogonale peut avoir lieu de manière spécifique en présence de toutes les fonctionnalités chimiques présentes dans les milieux biologiques et cellulaires. Elle permet la fonctionnalisation de biomolécules ou l'introduction de marqueurs directement dans l'organisme afin de mieux étudier les processus biologiques.

Les types de réactions qui remplissent ce type de critères se retrouvent dans les classes de réactions regroupant principalement : les cycloadditions, les substitutions nucléophiles sur des cycles contraints, les additions de nucléophiles activés sur les carbonyles, et les additions sur les substrats insaturés.

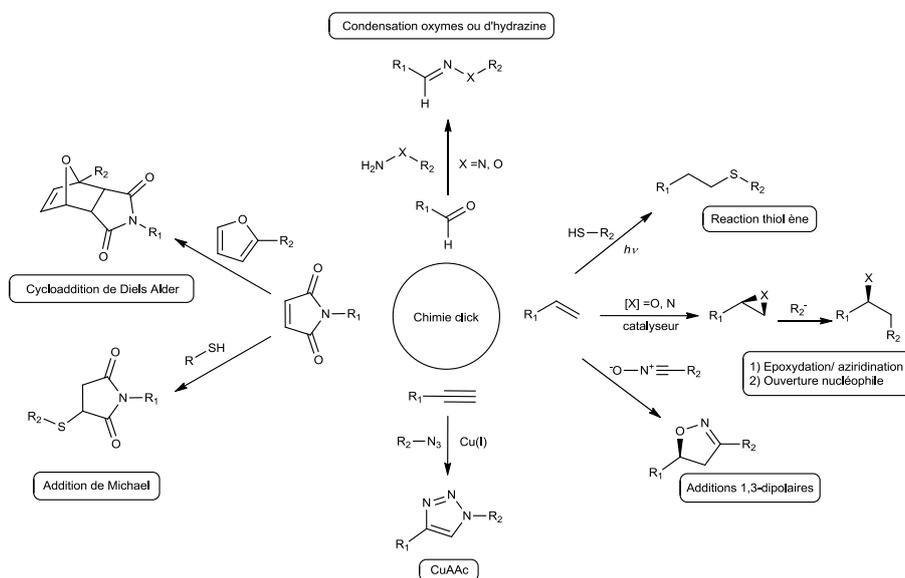


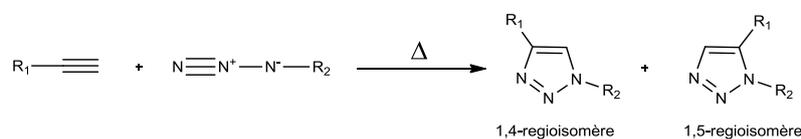
Figure 47 : Exemples de réactions de chimie click

## V.1. La chimie dite click

- **La CuAAC**

Le terme de chimie click est souvent confondu avec la cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne. Cette réaction fut découverte dans un premier temps par Huisgen, sous la forme d'une cycloaddition dipolaire thermique.<sup>[84]</sup> Cette réaction d'addition péricyclique entre un 1,3-dipôle (azoture) et un dipolarophile (alcyne) produit un triazole. Les groupements fonctionnels azoture et alcynes sont faciles à introduire sur une molécule organique. Ils sont aussi très stables à la plupart des conditions réactionnelles, bien qu'étant les groupes fonctionnels possédant les plus hautes énergies. La décomposition d'un azoture en azote est un phénomène très exothermique, donc thermodynamiquement favorable, mais limité par une barrière d'énergie d'activation élevée.

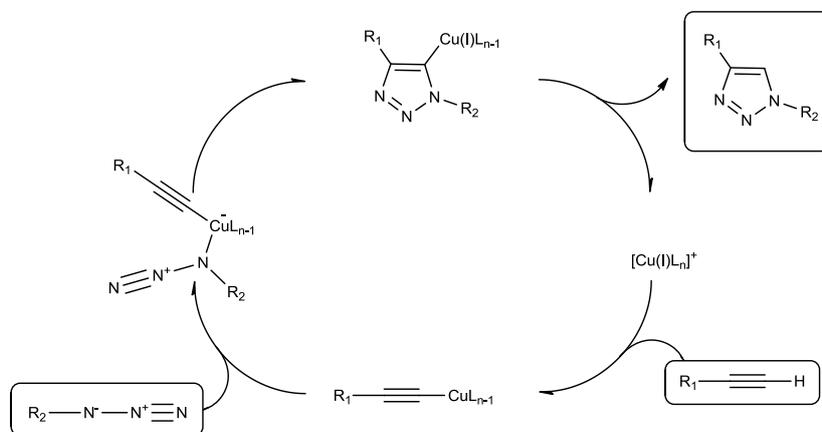
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



**Figure 48** : Cycloaddition dipolaire thermique de Huisgen

Initialement, cette réaction nécessitait une activation thermique importante et conduisait à un mélange de régioisomères 1,5 et 1,4 en quantités similaires. Ce manque de sélectivité s'explique par la non-différenciation énergétique des deux états de transition conduisant aux deux régioisomères.<sup>[85]</sup>

La forte barrière énergétique et l'absence de sélectivité était incompatible avec le concept de la chimie click avant que les équipes de Meldal<sup>[86]</sup> et Sharpless<sup>[87]</sup> découvrent que cette réaction peut être catalysée par les sels cuivreux. Les sels de Cu(I) permettent une réaction rapide à température ambiante, et surtout rendent la réaction régioselective pour l'isomère 1,4. Avec la catalyse au cuivre qui améliore la sélectivité et la cinétique, la CuAAC remplit les conditions de la chimie click.



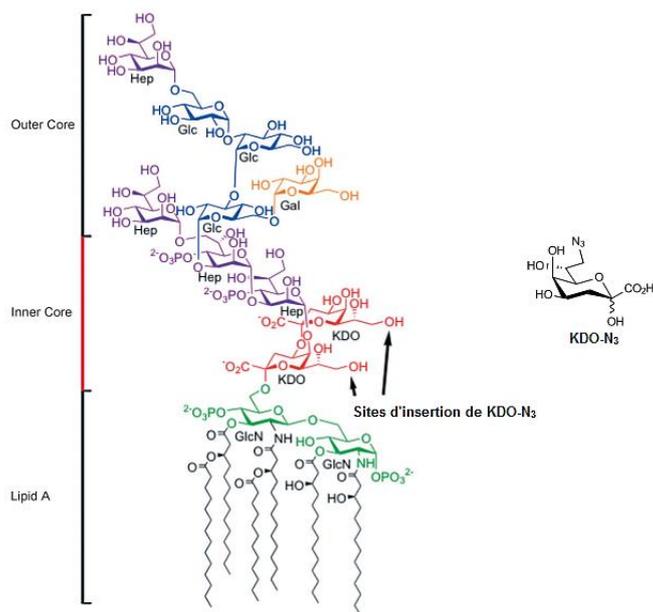
**Figure 49** : Mécanisme de la CuAAC proposé par Sharpless *et al.*<sup>[87]</sup>

Bien que le concept de la chimie click ait été initialement développé pour la synthèse de molécules à visée thérapeutique [83, 87] l'efficacité et la polyvalence de la CuAAC a favorisé la large adoption de cette réaction de couplage dans de nombreux autres domaines tels que la synthèse de nanoparticules hybrides,[88] de structures glycosylées multivalentes[89] ou la préparations de sucres supportés. [17, 90]

La réaction de CuAAC montre une extrême tolérance aux conditions réactionnelles. Elle peut être menée en solvants organiques anhydres, en milieu aqueux pur, en milieu biphasique mais aussi en milieu physiologique. Lors de sa découverte, la réaction fut développée parallèlement avec deux systèmes catalytiques différents. Le groupe de Meldal utilisait un halogénure cuivreux (CuI ou CuBr) en présence d'une base organique (typiquement la triéthylamine ou la DIPEA). Le groupe de Sharpless lui, exploitait la réduction *in situ* des sels cuivriques de sulfate de cuivre(II) par l'ascorbate de sodium comme source d'ion Cu(I). Bien que ces deux systèmes soient les plus fréquemment utilisés, la littérature regorge d'exemples de catalyse par d'autres sources de Cu(I). Citons par exemple la catalyse par les nanoparticules de cuivre,[91] ou par les oxydes cuivreux.[92]

- **Cycloaddition non catalysée**

La CuAAC a été utilisée *in vitro* pour le marquage de microorganismes. Vauzeilles *et coll.*[93] utilisent à leur avantage la synthèse métabolique des lipopolysaccharides (LPS) bactériens afin d'insérer un analogue de keto-deoxyoctulosonate (KDO) modifié avec une fonction azoture. (figure 50). Les bactéries Gram-négatives encore actives présentent donc des LPS-azoture à leur surface ce qui permet un marquage fluorescent par CuAAC avec un fluorophore comportant une fonction alcyne. Cette approche de détection potentielle de pathogènes permet de marquer sélectivement les bactéries actives avec le métabolisme visé.

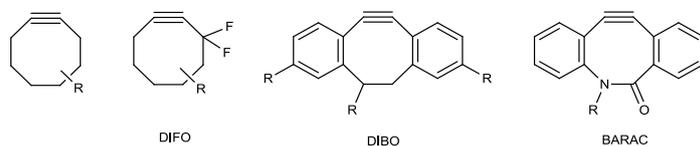


**Figure 50** : Structure des LPS bactériens avec les sites d'insertion et la structure de KDO-N<sub>3</sub>

Le problème soulevé par la CuAAC *in vivo* vient de la cytotoxicité des sels cuivreux. Contrairement au cuivre(II) qui est un microélément essentiel au vivant, le cuivre(I) nécessaire à la catalyse de la réaction est cytotoxique.<sup>[94]</sup> De plus les sels cuivreux (Cu(I)) peuvent être oxydés rapidement en sels cuivriques (Cu(II)), ce qui peut nécessiter l'apport important de Cu(I) pour des réactions *in vivo*.

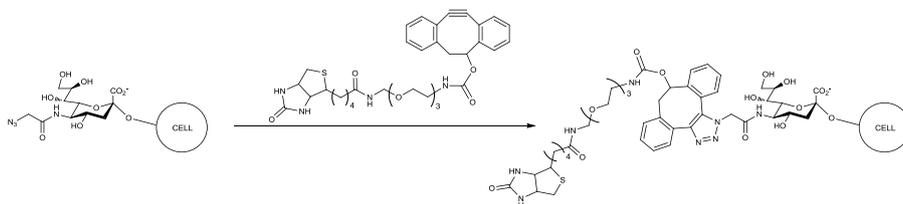
Bertozzi *et al.*<sup>[95a, 95b]</sup> ont utilisé des alcynes activés pour développer la chimie alcyne azide sans cuivre. Cette réactivité est poussée par la tension de cycle présente sur les cyclooctynes, plus le cycle est de taille réduite, plus la géométrie sp de l'alcyne est perturbée. Cette tension réduit la barrière d'activation de la réaction d'addition sur l'alcyne, et augmente donc la réactivité.<sup>[96]</sup>

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



**Figure 51** : Exemples de cyclooctynes utilisées pour la cycloaddition azide-alcyne, R = position utilisée pour la fonctionnalisation

Bertozzi *et coll.*<sup>[95a]</sup> ont donc développé ce concept de cycloaddition dipolaire sans catalyse en faisant réagir un cyclooctyne biotinylé et des peptidoglycane fonctionnalisés par des groupements azoture. Afin de circonvier la faible réactivité des cyclooctynes non substituées, d'autres analogues ont été développés. Les plus efficaces sont le difluorocyclooctyne (DIFO) conçu par Bertozzi *et coll.*<sup>[97]</sup>, ainsi que le dibenzocyclooctyne (DIBO) développé par Boons *et coll.*<sup>[98]</sup>. L'ajout de groupements électroattracteurs augmente la réactivité de l'alcyne pour le DIFO alors que les deux groupements aromatiques (DIBO, BARAC) imposent une géométrie plus tendue au cycle, augmentant de ce fait la réactivité de l'alcyne. Boons *et coll.* ont utilisé un DIBO biotinylé pour le marquage *in vitro* de cellules présentant des dérivés *N*-azidoacétyl-acide sialique (SiaNaz) à leur surface.<sup>[98]</sup> (figure 52)



**Figure 52** : Marquage *in vitro* de cellules présentant des groupements SiaNaz avec le DIBO-biotine<sup>[98]</sup>

Les cellules couplées avec le DIBO présentent un groupement biotine en surface, elles ont ensuite été incubées avec un conjugué Avidine-Fluoresceine afin d'effectuer un marquage fluorescent des cellules présentant du SiaNaz à leur surface.

### • Limitations de la cycloaddition [3+2]

Bien que cette réaction ait eu un grand impact du fait de sa fiabilité et des variétés de conditions réactionnelles possibles, de nombreuses études publiées sur son application ont montré des

exemples de réactions parasites pour la CuAAC comme le couplage de Glaser<sup>[99a, 99b]</sup>, qui est un homocouplage d'alcyne. Cette réaction partage les mêmes conditions réactionnelles que la CuAAC, car elle est catalysée par les sels cuivreux en présence d'une base et d'un oxydant. Une deuxième réaction parasite est le couplage oxydant en position 5 du triazole. Dans le schéma réactionnel proposé par Sharpless (figure 49), la dernière étape consiste en la substitution du cuivre par un électrophile pour former le triazole final. Cet électrophile est généralement un proton, mais en présence d'autres électrophiles, un triazole substitué peut être formé préférentiellement.<sup>[100]</sup> L'explosivité des azotures organiques et la haute toxicité de  $\text{NaN}_3$ <sup>[101]</sup> est un autre facteur limitant pour l'usage de la CuAAC. Bien que le problème de la catalyse ait été résolu par le développement des cyclooctynes, leur synthèse nécessite une expertise en chimie organique, et un compromis entre leur réactivité et leur stabilité doit être fait. Ces groupements sont récemment devenus commerciaux, mais leur coût limite leurs applications aux domaines analytiques.

## V.2. Les alternatives

De nombreuses autres réactions possèdent les propriétés requises pour être qualifiées de chimie click<sup>[83]</sup> (exemples figure 47). Le choix d'une réaction préférentielle repose principalement sur des considérations de gestion des contraintes réactionnelles ou d'accessibilité aux groupes fonctionnels réactifs. La liste exhaustive des réactions pouvant être classifiées de chimie click augmente rapidement<sup>[102a, 102b]</sup>. Les réactions présentées dans cette partie se limiteront aux réactions non catalysées, ayant des fonctions facilement synthétisables et/ou commerciales, et compatibles avec les milieux aqueux. Suivant ces contraintes, le groupement maléimide et les réactivités variées qui lui sont associés représentent des alternatives intéressantes et prometteuses pour la préparation de glycoconjugués par chimie click.

- **La chimie des maléimides**

La fonction maléimide a vraisemblablement été découverte en 1904 par G Plancher et F. Cattadori qui décrivent sa synthèse par oxydation chromique du pyrrole.<sup>[103]</sup> Il a fallu attendre 1960 pour que cette synthèse soit améliorée par Tawney *et al.*<sup>[104]</sup> Ils décrivent l'obtention du maléimide par une réaction d'addition d'une urée substituée sur l'anhydride maléique suivie par une déshydratation pour former la diimide cyclique (figure 53). Le maléimide peut être obtenu sous sa forme amide non substituée par décomposition du carbamyl dans le DMF.

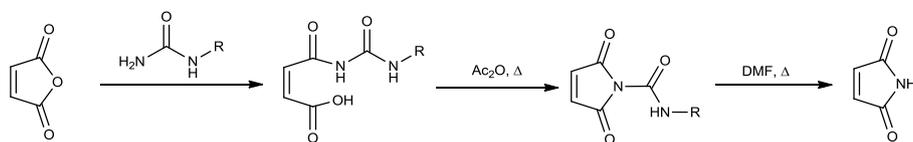


Figure 53 : Synthèse de Tawney des maléimides

La préparation de maléimide *N*-substitués se fait plus généralement en remplaçant les urées substituées par des amines primaires pour obtenir des *N*-alkymaleimides.<sup>[105]</sup> L'alcène présent dans la fonction maléimide possède une réactivité particulière de par son activation en  $\alpha$  par deux carbonyles ainsi qu'à la tension de cycle. Cette réactivité a attiré l'attention des chimistes vers la possibilité d'utiliser ce groupement pour la chimie de ligation.

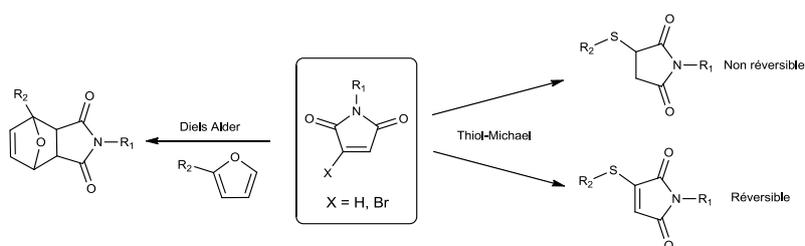


Figure 54 : Panel de réactions possibles sur la fonction maléimide

### • La réaction thiol-Michael

La réaction entre un thiol et un alcène activé dans des conditions nucléophiles peut être classée dans les additions de Michael. Ces réactions d'hydrothiolation sont catalysées par une base ou par addition nucléophile sur un alcène activé *c.a.d.* pauvre en électrons, contrairement à la réaction de thiol-ène qui est radicalaire.<sup>[106]</sup>

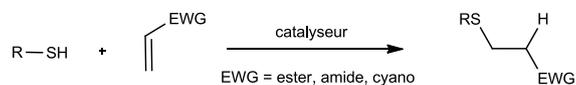
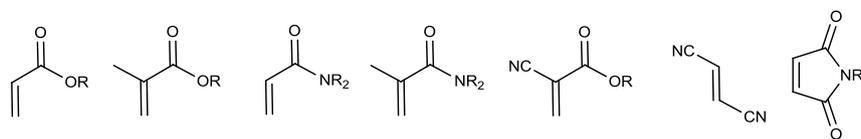


Figure 55 : Hydrothiolation d'un alcène activé

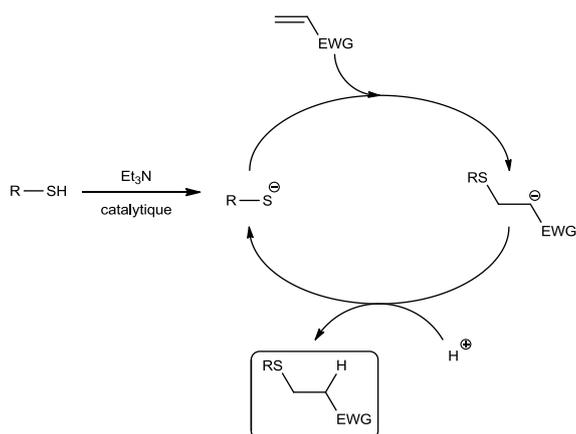
La figure 56 montre des exemples de substrats alcéniques activés, comme les acrylates, ester fumariques et les maléimides.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



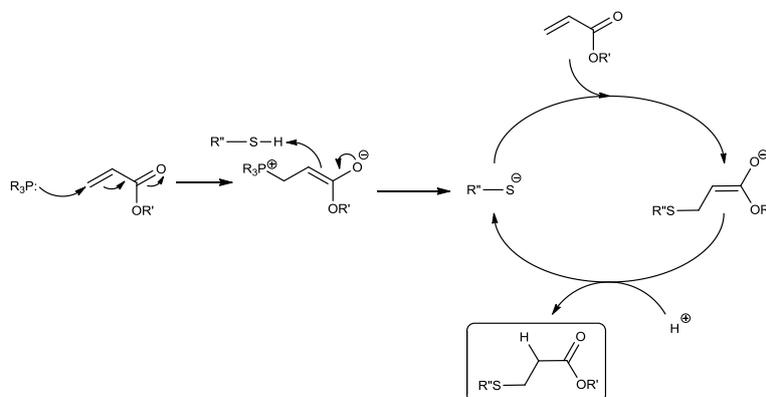
**Figure 56 :** Substrats activés pour la réaction de thiol-Michael

Contrairement à la réaction de Michael classique, le faible pKa du groupement thiol permet l'utilisation de bases faibles comme la triéthylamine. La réaction d'une amine tertiaire sur un thiol forme le cation ammonium et l'anion thiolate. Le thiolate qui est un très bon nucléophile s'additionne sur l'alcène, puis l'énolate formé déprotonne un autre groupement thiol entretenant le cycle catalytique pour donner l'adduit thio-éther avec une regioselectivité anti-Markovnikov (figure 57).



**Figure 57 :** Mécanisme proposé de l'addition de thiol-Michael catalysé par une base

Ces additions ont aussi été décrites par activation nucléophile, Lowe *et al.* décrivent la catalyse des réactions de thiol-Michael par l'utilisation de trialkylphosphines.<sup>[107]</sup> Le mécanisme proposé (figure 58) est une addition du nucléophile sur l'accepteur de Michael, qui forme un énolate, servant lui-même de base pour démarrer le cycle catalytique anionique.

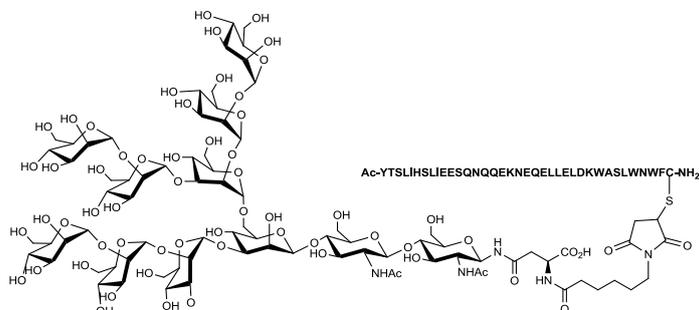


**Figure 58** : Cycle catalytique proposé par Lowes pour la thiol-Michael catalysée par les trialkylphosphines<sup>[107]</sup>

La réaction de thiol-maléimide a la particularité de pouvoir avoir lieu sans catalyse basique ou nucléophile dans des solvants polaires comme le DMF ou les solutions aqueuses tamponnées. Il n'y a pas eu de preuve mécanistique d'une addition concertée du thiol sur la double liaison en absence de catalyseur, mais il a été décrit que les solvants possédant une forte constante diélectrique favorisent la dissociation des thiols en thiolates. Ces réactions sont donc plus vraisemblablement catalysées par le solvant lui-même.<sup>[108]</sup>

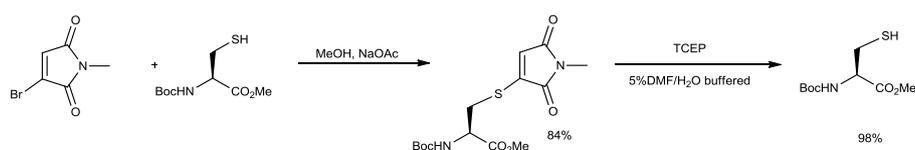
Le groupement maléimide est particulièrement adapté à la réaction de thiol-Michael. Il donne de très bons rendements avec des cinétiques réactionnelles extrêmement rapides même en absence de catalyseur. Ces propriétés particulières ont favorisé le développement de l'addition thiol maléimide qui est maintenant devenue une des méthodes préférentielle pour le couplage de biomolécules. De nombreux produits commerciaux sont désormais disponibles avec une fonction maléimide tels que des fluorophores, la biotine ou encore des protéines immunogènes ce qui simplifie sa mise en œuvre. Les limites à cette réactivité sont la mauvaise stabilité en milieu basique des maléimides qui sont sensibles à l'hydrolyse ainsi qu'à la difficulté de stockage ou d'obtentions de thiol libres.

Wang *et coll.*<sup>[109]</sup> décrivent la fonctionnalisation d'oligosaccharides par des groupements maléimides en position anomère pour le couplage sur la cystéine d'un peptide inhibiteur du VIH (figure 59).



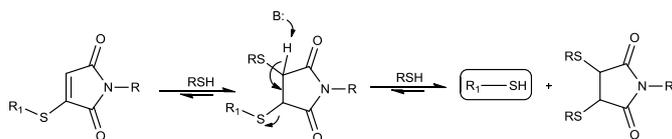
**Figure 59** : Ligation thiol maléimide du peptide VIH-20 avec un oligosaccharide de mannose

De récents développements sur la chimie des maléimides ont été réalisés par S. Caddick, J. Baker *et al.*<sup>[110]</sup>, qui décrivent l'utilisation de maléimides substitués par des groupements halogénés permettant la conjugaison réversible de groupement thiols.



**Figure 60** : Ligation réversible de la cystéine protégée sur un bromomaleimide<sup>[110]</sup>

L'addition d'un groupement bromé sur le maléimide permet la régénération de la double liaison après l'addition du thiol, puis par déplacement nucléophile en présence d'un excès de thiol compétitif, de libérer le groupement initial (figure 60).



**Figure 61** : Mécanisme proposé pour le relavage du thiol en solution

Cette variante de la thiol-Michael permet une chimie de ligation sélective et efficace tout en permettant de couper la liaison sous certaines conditions réactionnelles (figure 61). La thiol-maléimide est donc une réaction efficace et versatile, qui permet de contourner le problème de la CuAAC pour les applications sensibles à la présence de sels métalliques.

• **La réaction de Diels Alder :**

La réaction de Diels-Alder (DA) est une réaction de cycloaddition pericyclique [4+2] au cours duquel un diène conjugué et une molécule comportant une double ou triple liaison réagissent pour former un cycle à six atomes comportant une insaturation (figure 62).

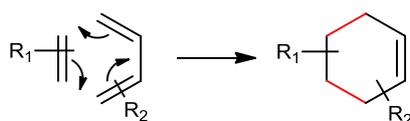


Figure 62 : La cycloaddition de Diels-Alder

Le fait que cette réaction permette la formation de deux nouvelles liaisons et d'un cycle en une seule étape est la raison de son immense succès en synthèse organique. Otto Diels et Kurt Alder ont décrit cette réaction en 1928.<sup>[111]</sup> Ils ont aussi découvert que la réaction entre l'anhydride maléique et le furane<sup>[112]</sup>, est réversible thermiquement et donne de nouveau le diène et le diénophile lors d'une élévation de température. Cette réaction est la réaction de rétro Diels-Alder. Ces travaux et ceux qui en découlent leur ont valu l'obtention du prix Nobel de chimie en 1950. L'aspect mécanistique de cette réaction a été intensément étudiée de manière pratique et expérimentale<sup>[113]</sup> et la question de son mécanisme semble dépendre au cas par cas de la nature des réactifs. Il est tout de même acquis que cette réaction procède en une étape sous contrôle orbitalaire.<sup>[114]</sup> Les liaisons sont formées par l'approche du diénophile du même côté que le plan du diène. Cette réaction peut donner deux adduits, *endo* ou *exo* selon la face d'attaque du diénophile par rapport au diène (figure 63).

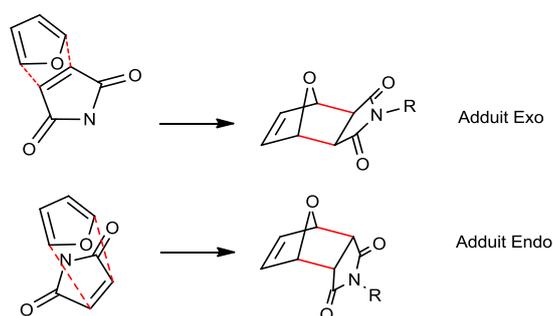


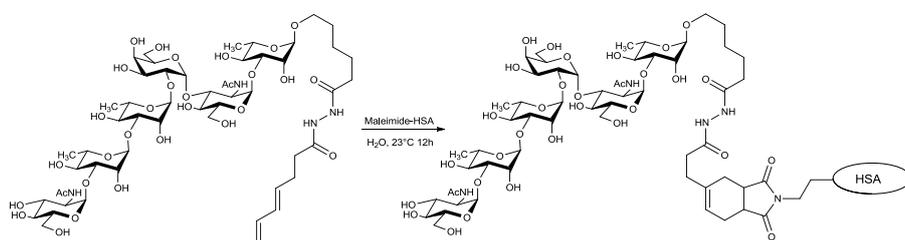
Figure 63 : Approches des réactifs conduisant aux adduits *exo* et *endo* de la réaction entre les groupements furane et maléimide

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

L'adduit *endo* est l'adduit cinétique car le recouvrement partiel des orbitales secondaires du diène sur le diénophile réduit l'énergie d'activation de la réaction, mais l'encombrement stérique du produit est plus important. L'adduit *exo* est l'adduit limitant le plus la gêne stérique, il est donc thermodynamiquement le plus favorable.<sup>[115]</sup> Le rapport *endo/exo* de la réaction de DA dépend donc principalement des réactifs utilisés.

Un développement important de la réaction de DA est son utilisation en phase aqueuse. Les doubles liaisons impliquées dans la réaction de DA sont localement hydrophobes. Le positionnement du diène et du diénophile durant l'état de transition réduit la surface hydrophobe présentée à l'eau. Comme la solvation par l'eau d'une surface hydrophobe est pénalisante, cet effet abaisse donc l'énergie d'activation de la réaction et accélère la cinétique de la cycloaddition.<sup>[116a, 116b]</sup> La réactivité des diènes et diénophiles vis-à-vis de la réaction de DA dépend principalement du niveau de leurs orbitales frontières et de l'aromaticité des diènes. Les diènes les plus courants sont les cycles tels que le cyclopentadiène et dérivés, le furane, l'anthracène et leurs dérivés. Pour les diénophiles, les alcènes activés tels que l'anhydride maléique, le maléimide et les quinones et leurs dérivés sont les plus couramment utilisés.

De manière générale, la réaction de Diels-Alder représente un pilier de la chimie organique moderne, mais elle s'est démarquée récemment dans la chimie des polymères et comme outil de conjugaison par chimie click.<sup>[117a, 117b, 117c]</sup> Les dérivés basés sur la réaction entre le furane et le maléimide présentent la meilleure réactivité par rapport à la DA<sup>[118]</sup> sans aucune catalyse. Ils possèdent aussi la propriété de former les adduits les plus stables capables de subir la retro-Diels-Alder. Ces adduits conservent leur réactivité en milieu aqueux, les rendant particulièrement attractifs pour la préparation de glycoconjugués. Pozsgay *et al.*<sup>[117c]</sup> ont décrit la préparation d'oligosaccharides modifiés par une chaîne comportant un diène et le couplage par DA à des protéines en milieu aqueux.



**Figure 64 :** Couplage d'oligosaccharose sur l'albumine humaine par réaction de Diels Alder<sup>[117c]</sup>

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

Ces épitopes saccharidiques sont présents à la surface du microorganisme *Shigella dysenteriae*<sup>[119]</sup> responsable de la dysenterie bactérienne. Le couplage de ces antigènes à une protéine de manière efficace représente un avantage pour la préparation de vaccins contre cette maladie. Cet exemple démontre la possibilité de couplage d'oligosaccharides complexes à des biomolécules par la réaction de DA en milieu aqueux.

Quelques exemples présentés ci-dessus montrent l'intérêt des méthodes de couplage d'oligosaccharides complexes par une chimie click sans catalyse métallique. Les travaux de thèse présentés dans les chapitres suivants sont focalisés sur le développement de telles méthodes pour la synthèse à l'échelle préparative de glycoconjugués macromoléculaires.



CHAPITRE II. SYNTHÈSE DE COPOLYMERE A  
BLOC AMPHIPHILES PAR REACTION THIOL  
MALEIMIDE

---



## I. Introduction et objectifs

Les copolymères amphiphiles à blocs hybrides ont montré des propriétés d'auto-assemblage remarquables. La forte incompatibilité<sup>[120]</sup> entre le bloc oligosaccharidique et le polymère hydrophobe permet d'obtenir une micro-séparation de phase même avec des blocs de faible poids moléculaire. Ils forment en solution des nanoparticules, ou des films minces en phase solide qui génèrent des matériaux nanostructurés de manière périodique et ordonnée, ayant des applications potentielles en nanolithographie<sup>[121]</sup> et microélectronique.<sup>[122]</sup> Les caractères biocompatible, biodégradable et bioactif des sucres présentent un intérêt pour les applications en cosmétique ou nano-médecine par encapsulation de substances actives.<sup>[123]</sup> Afin d'obtenir des nano-objets de dimensions et de propriétés contrôlées, il est primordial de maîtriser l'obtention, la fonctionnalisation et le couplage des deux blocs. La méthode actuellement développée au sein de l'équipe PCG pour l'obtention de copolymères à bloc repose sur la méthode du « grafting onto ». L'oligosaccharide fonctionnalisé avec un groupement alcyne par une réaction d'amidation est couplé par chimie click CuAAC sur un polymère comportant un groupement azoture ou inversement. Cette méthode bien que très efficace pour l'obtention de copolymères hybrides présente les inconvénients inhérent à l'utilisation du cuivre comme catalyseur. Les contaminations métalliques potentielles rendent les copolymères obtenus inapplicables dans les domaines médicaux ou en électronique. L'objectif de ce projet de recherche consiste à développer une stratégie d'obtention de copolymères hybrides par couplage non métallo-catalysé. Le système modèle choisi pour cette étude est le copolymère polystyrène-*b*-maltoheptaose déjà obtenu par chimie CuAAC. L'utilisation d'un modèle déjà caractérisé physico- chimiquement permet d'étudier l'impact de la chimie de couplage utilisée sur l'auto-assemblage du copolymère. La première stratégie explorée pour le couplage du maltoheptaose avec le polystyrène est basée sur la réaction radicalaire de thiol-ène. Un groupement thiol a donc été introduit sur le maltose pour évaluer la possibilité de couplage avec le polystyrène fonctionnalisé par un groupement allyl.

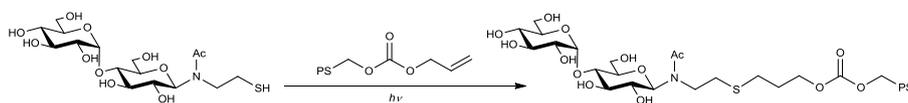


Figure 65 : Approche thiol-ène pour la préparation de copolymère à blocs

Malgré plusieurs tentatives, cette approche n'a pas donné de résultats concluants. Un suivi RMN de la réaction montre la disparition des protons correspondants au groupement allylique mais le copolymère n'a pas été isolé à l'issue de la réaction. De plus, le produit obtenu présente un décalage vers les petites masses en chromatographie d'exclusion stérique. Ces résultats sont cohérents avec une dégradation ou une réticulation du polystyrène dans les conditions radicalaires de la thiol-ène.<sup>[124]</sup> Une alternative envisagée était d'utiliser un initiateur radicalaire pour la réaction de thiol-ène mais elle n'a pas été explorée suite aux limitations intrinsèques de stabilité du polystyrène en conditions radicalaires. La préparation d'oligosaccharides avec une fonction thiol ayant été développée, la deuxième stratégie consistait à évaluer la réaction de thiol-maléimide pour la préparation de copolymères.

Les résultats obtenus sur la préparation de copolymères a blocs par réaction de Michael ont été publiés dans *Carbohydrate Polymers*<sup>[125]</sup> et sont présentés dans la suite de ce chapitre.

## II. Oligosaccharide-based block copolymers: metal-free thiol-maleimide click conjugation and self-assembly into nanoparticles

A. Petrelli, R. Borsali, S. Fort and S. Halila\*

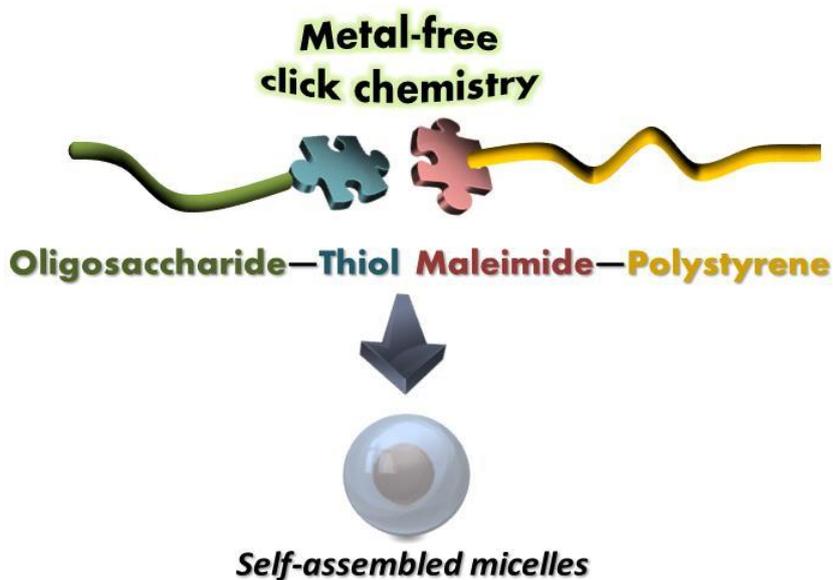
CERMAV, CNRS and Grenoble Alpes Université, 38000 Grenoble (France). E-mail:

\* Corresponding author. Tel.: +33-476-037-666; Fax: +33-476-547-203

E-mail address: [sami.halila@cermav.cnrs.fr](mailto:sami.halila@cermav.cnrs.fr)

Published in Carbohydrate Polymers, Volume 124, 25 June 2015, Pages 109-116,

ISSN 0144-8617, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.079>.



## ABSTRACT

Amphiphilic oligosaccharide-based block copolymers (OBCPs) are able to self-assemble either into nanoparticles with biocompatible oligosaccharides corona in aqueous solution or in sub-nanopatterned thin-films originating from the high incompatibility between the different blocks. For these reasons, these biosourced OBCPs are valuable structures for applications in nanomedicine and nanoelectronics. Up to now, the synthesis of those OBCPs was obtained through grafting-onto method using Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC). However, complete removal of metal catalyst residues from the resultant copolymer chains is critical and hampers electronic and biomedical applications. In this study, we report an efficient and convenient metal-free click chemistry approach consisting in coupling thiol-containing oligosaccharide blocks to maleimide-terminated polystyrenes. Upon self-assembly in water, spherical micelles of similar size than those obtained by Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition were formed as evidenced using dynamic light scattering and transmission electron microscopy techniques.

## Highlights

- A thiol function was readily introduced to the reducing-end of oligosaccharides.
- Oligosaccharide-*b*-polystyrene were prepared by metal-free thiol-maleimide addition.
- Amphiphilic OBCPs self-assembled in water into spherical nanoparticles.

**Keywords:** Thiol-functionalized oligosaccharide; Maleimide-terminated polystyrene; Metal-free thiol-maleimide addition; Click reaction; Amphiphilic block copolymers; Micelles.

## INTRODUCTION

Amphiphilic block copolymer systems (BCPs), which consist of a hydrophilic block covalently linked to a hydrophobic block, are fascinating macromolecules due to their ability to self-organize into nanostructured materials. In selective solvents, amphiphilic BCPs self-assemble into nanoparticles of various shapes<sup>[126]</sup> (spherical micelles, vesicles (polymersomes), worm-like micelles or large compound micelles). And in thin-films after generally an annealing process (solvent and/or thermal), amphiphilic BCPs tend to microphase-separate in nanodomains (lamellae, cubic, cylinders).<sup>[127]</sup> The size and morphology of these nanodomains are strongly related to the molar mass, the incompatibility between the blocks and the volume fractions of the blocks.

BCPs are commonly synthesized using *i*) the grafting-from method which consists in growing the copolymer directly from a chain-end initiating site on the first block, *i.e.* macroinitiator, or *ii*) through the grafting-onto method which is based on preformed end-functional polymers reacting with complementary functional groups.<sup>[128]</sup> For the latter, click chemistry coupling has proven to be a particularly useful technique to prepare amphiphilic BCPs for various (bio)polymers since it combines chemoselectivity, solvent tolerance and high yields. The most widespread click reaction is undoubtedly the copper (I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) which was successfully performed in our previous works for the preparation of oligosaccharides-based block copolymers (OBCPs).<sup>[34, 88, 120, 121, 129a, 129b]</sup>

In this case, “clickable” oligosaccharides were obtained by regio- and stereoselective functionalization of the anomeric position (reducing-end) with alkyne or azide groups without the fastidious requirement of the protection/deprotection strategy. The incorporation of naturally-occurring oligosaccharide blocks not only allows the saccharidic biomass valorization but also enables formation of biologically relevant nanoparticles in solution<sup>[129a, 129b]</sup> as well as high-resolution pattern thin films with sub-10 nm features.<sup>[88, 120]</sup> However, the use of a metal catalyst raises concerns about the possible contamination of the final products, and could compromise the future development of OBCPs nanomaterials, either as drug delivery systems because of the toxicity of copper<sup>[130a, 130b]</sup> as well as high resolution template for photolithography because of electronic disruption.

As a consequence, the development of “metal-free” click reactions is highly desirable. Notably, the metal-free thiol-based click reactions—including radical or Michael addition—have shown to be very promising approaches in various fields of applications.<sup>[106, 131]</sup> However, for

the synthesis of OBCPs, the thiol-ene coupling has been revealed as a poor conjugation tool,<sup>[132]</sup> while thiol-maleimide addition, which could proceed under mild and often catalyst-free conditions,<sup>[133]</sup> was successfully applied with high coupling yield.<sup>[134]</sup>

In light of these considerations, we have explored under which conditions, we could prepare oligosaccharides-based amphiphilic block copolymers by metal-free thiol-maleimide click reaction. In the present work, we successfully report the functionalization at the reducing end of oligosaccharides, including maltose (Mal), maltoheptaose (Mal<sub>7</sub>) and xyloglucan oligosaccharides (XGOs), with a thiol moiety, the synthesis of maleimide-terminated polystyrene (PS-maleimide) of different molecular weights, and their subsequent thiol-maleimide click reaction. The resulting amphiphilic oligosaccharide-*b*-PS systems were further studied in terms of self-assembly in aqueous solution, and characterized using dynamic light scattering (DLS) and imaging (transmission electron microscopy: TEM) techniques.

## EXPERIMENTAL

### Materials

Mono-hydroxy terminated polystyrene (PS-OH)  $M_w = 4700 \text{ g mol}^{-1}$  and  $M_w = 1900 \text{ g mol}^{-1}$  were purchased from Polymer Source (Dorval, QC, Canada), and used as received. Dimethylaminopyridine (DMAP), dicyclohexylcarbodiimide (DCC), tributylphosphine (P(Bu)<sub>3</sub>),  $\beta$ -cyclodextrin, maltose hydrate, were obtained from Sigma-Aldrich and used without further purification. Cystamine dihydrochloride, from Sigma-Aldrich, was neutralized with a stoichiometric amount of NaOH (2 M) in water, and then evaporated to dryness. The oily residue was extracted with dichloromethane, dried over sodium sulfate and filtrated. The mother liquor was evaporated to dryness to give the free base as yellow oil. Tamarind seed Xyloglucan from Saiguru Food Gum manufacturer (Bombay, India) was previously purified by dissolving in deionized water (2% w/v), boiling for 1h then removing the insoluble materials by filtration. XGOs consisting of 7, 8 or 9 sugar units were prepared by enzymatic hydrolysis of xyloglucan according to a previously published procedure (Halila *et al.*, 2008). Mal<sub>7</sub> was obtained from ring-opening of  $\beta$ -cyclodextrin according to literature.<sup>[39]</sup> Maleimidopropionic acid was prepared following a previously described procedure.<sup>[105]</sup> *N,N*-Dimethylformamide (DMF) was distilled under vacuum and stored over activated molecular sieves 4Å. The dichloromethane (DCM) was washed with deionized water to remove the ethanol stabilizer, followed by drying over calcium hydride and subsequent distillation. Acetonitrile (ACN),

methanol (MeOH), and acetic anhydride (Ac<sub>2</sub>O) were purchased from Carlo ERBA reagents and used as received.

## Equipment

Carbohydrate modifications were followed by thin-layer chromatography on silica gel 60F254 (E. Merck) using ACN/Water (7:3, v/v) as eluent and visualized by heat staining with sulfuric acid 3% solution in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v). Specific rotation measurements were recorded on a Perkin Elmer 341 polarimeter with the sodium D ray (589,2nm) at 20°C. NMR analyses were recorded at 25°C on a Bruker Advance DRX400 spectrometer. Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in ppm. The solvent residual peaks of D<sub>2</sub>O, DMF, and CDCl<sub>3</sub> were used as internal standards, at 4.75 ppm, 8.03 ppm and 7.27 ppm, respectively. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) measurements were performed on a Bruker Daltonics Autoflex apparatus using 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) as a matrix. High resolution mass spectrometry was carried on a Waters Xevo™ G2-S QTOF (quadrupole hybrid with orthogonal acceleration time-of-flight) mass spectrometer apparatus. For functionalized PS and OBCPs, gel permeation chromatography (GPC) measurements were performed at 60 °C using 1260 Infinity GPC system (Agilent Technologies) (100  $\mu$ L manual injection system, 1260 Agilent quaternary pump, 1260-MDS refractive index detector) equipped with two Agilent PolyPore PL1113-6500 columns (linear, 7.5  $\times$  300 mm; particle size, 5  $\mu$ m; exclusion limit, 200 – 2 000 000) in DMF containing lithium chloride (0.005 M) at the flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Dynamic light scattering experiments were carried out at room temperature using an ALV laser goniometer, which consists of a 22 mW HeNe linearly polarized laser operating at a wavelength of 632.8 nm and an ALV-5000/EPP multiple  $\tau$  digital correlator with 125 ns initial sampling time. Transmission electron microscopy (TEM) experiments were carried out using a CM220 Philips microscope.

## General procedures

### Synthesis of reducing-end thiol-functionalized oligosaccharides (Oligosaccharide-SH)

*N*-( $\beta$ -maltosyl)-2-acetamido-1-ethanethiol, *N*-( $\beta$ -maltoheptaosyl)-2-acetamido-1-ethanethiol and *N*-( $\beta$ -xylooligosyl)-2-acetamido-1-ethanethiol were prepared according to a modified procedure described in our previous work.<sup>[82]</sup> Cystamine free base (5 mmol) was added to the corresponding oligosaccharide (0.5 mmol) in 2 mL MeOH. The reaction mixture was stirred for 48 h and then precipitated with 20 mL of ACN. The solid was filtrated, rinsed three times with ACN, and then taken back in 2 mL MeOH. Acetic anhydride (5 mL) was slowly added

and the reaction mixture was then stirred for 16 h. Toluene (20 mL) was added to the heterogeneous mixture and the solvent was removed by evaporation under reduced pressure. The solid was taken back in 4 mL MeOH, and 1 M MeONa in MeOH was added dropwise until pH = 12. After stirring for 3 h, the solution was neutralized with IRA 120H<sup>+</sup> resin. The resin was removed by filtration, rinsed with 2%wt aq. NH<sub>4</sub>OH and concentrated under reduced pressure. The solid was dissolved in water (2 mL) and degassed by bubbling with argon for 15 min. A solution of 2 M P(Bu)<sub>3</sub> in DCM (2 mL) was added under inert atmosphere to the solution. The heterogeneous mixture was stirred vigorously for 4 h, and then the aqueous layer was isolated and washed 5 times with DCM (2 mL). The product was isolated from the aqueous layer by precipitation with 20 mL ACN to afford the corresponding free thiol-functionalized oligosaccharide with around 80% yield. The slight yellow coloration can be removed by purification on a Sep-Pak C18 cartridge using H<sub>2</sub>O/MeOH as eluent.

*N*-( $\beta$ -maltosyl)-2-acetamido-1-ethanethiol: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm): 2.09-2.34 (2 x s, 3H, rotamers, -NCOCH<sub>3</sub>), 2.54-2.87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-SH), 3.41-4.10 (m, 14H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b<sup>GlcI-GlcII</sup>, and -NCH<sub>2</sub>-), 5.00 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, H-1<sup>GlcI</sup>), 5.33-5.47 (m, 1H, H-1<sup>GlcII</sup>); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm): 21.29, 21.72 (2 x 1C, rotamers, -CH<sub>2</sub>-SH), 22.02, 23.33 (2 x 1C, rotamers -NCOCH<sub>3</sub>), 60.4, 60.7, 69.2, 69.3, 69.9, 71.6, 71.7, 72.7, 72.8, 76.1, 76.2, 76.6, 76.8, 76.9, 77.3, 86.7 (C-2,C-3,C-4,C-5, C-6<sup>GlcI-GlcII</sup>, -N-CH<sub>2</sub>), 99.5, 99.6 (2 x 1C, rotamers C-1<sup>GlcI</sup>), 175.5, 176.4 (2 x 1C, rotamers, -NCOCH<sub>3</sub>); ESI-MS:  $m/z$  calcd for C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>NNaO<sub>11</sub>S: 466.14; found: 465.8 [M+Na]<sup>+</sup>. HRMS-ESI/QTOF MS:  $m/z$  calcd for C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>NNaO<sub>11</sub>S: 466.1359; found: 466.1366; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 61.2 (c 1.00, H<sub>2</sub>O).

*N*-( $\beta$ -maltoheptaosyl)-2-acetamido-1-ethanethiol: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm): 2.17-2.34 (2 x s, 3H, rotamers, -NCOCH<sub>3</sub>), 2.47-2.96 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-SH), 3.20-4.10 (m, 70H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b<sup>GlcI-GlcVII</sup>, and -NCH<sub>2</sub>-), 5.02 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, H-1<sup>GlcI</sup>), 5.39 (br. s., 7H, H-1<sup>GlcII-GlcVII</sup>); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm) 21.2, 21.7 (2 x 1C, rotamers, -CH<sub>2</sub>-SH), 22.0, 23.3 (2 x 1C, rotamers -NCOCH<sub>3</sub>), 60.4, 60.6, 60.7, 69.2, 69.3, 69.6, 69.9, 71.4, 71.4, 71.6, 72.7, 72.8, 73.2, 74.0, 74.1, 74.5, 75.7, 75.9, 76.1, 76.2, 76.2, 76.6, 76.7, 76.6, 76.7, 76.8, 76.9, 77.3, 86.7, 91.9, 92.1, 95.7, 95.9 (C-2,C-3,C-4,C-5, C-6<sup>GlcI-GlcVII</sup>, -N-CH<sub>2</sub>), 99.5, 99.6 (2 x 1C, rotamers C-1<sup>GlcI</sup>), 175.5, 176.4 (2 x 1C, rotamers, -NCOCH<sub>3</sub>); MALDI-TOF MS:  $m/z$  calcd for C<sub>46</sub>H<sub>79</sub>NNaO<sub>36</sub>S: 1276.40; found: 1276.36 [M+Na]<sup>+</sup>. HRMS-ESI/QTOF MS:  $m/z$  calcd for C<sub>46</sub>H<sub>79</sub>NNaO<sub>36</sub>S: 1276.4000; found: 1276.3997; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 147.6 (c 1.00, H<sub>2</sub>O).

*N*-( $\beta$ -XGOSyl)-2-acetamido-1-ethanethiol:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm): 2.10-2.32 (2 x s, 3H, rotamers, -NCOCH<sub>3</sub>), 2.60 - 2.83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-SH), 3.29-4.02 (m, 51H, H-2,3,4,5,6 GlcI-IV, Gal II-III, H-2,3,4,5<sup>Xyl</sup> II-IV, NCH<sub>2</sub>), 4.45-4.62 (m, 4H, H-1<sup>GlcII-IV, Gal II-III</sup>), 4.90 - 4.98 (m, 2H, H-1<sup>XylIII-III</sup>), 5.02 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, H-1<sup>GlcI</sup>, rotamer I), 5.17 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H, H-1<sup>XylIV</sup>), 5.40 (d,  $J$  = 8.6 Hz, H-1<sup>GlcI</sup>, rotamer II);  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm) 21.3, 21.7, 22.0, 23.3 (2 x 1C, rotamers, -CH<sub>2</sub>-SH), 60.1, 61.0, 61.2, 61.5, 65.9, 66.7, 68.6, 69.4, 69.5, 69.5, 69.9, 71.1, 71.5, 71.9, 72.6, 72.7, 73.0, 73.3, 73.6, 74.1, 74.3, 75.1, 75.6, 76.8, 78.7, 79.8, 80.2, 86.7, 98.3, 98.9, 102.6, 102.9, 103.0, 104.5, 175.5, 176.5 (2 x 1C, rotamers, -NCOCH<sub>3</sub>); MALDI-TOF MS:  $m/z$  calcd for C<sub>43</sub>H<sub>73</sub>NNaO<sub>33</sub>S (DP7): 1186.37; found: 1186.31 [M+Na]<sup>+</sup>;  $m/z$  calcd for C<sub>49</sub>H<sub>83</sub>NNaO<sub>38</sub>S (DP8): 1348.42; found: 1348.36 [M+Na]<sup>+</sup>;  $m/z$  calcd for C<sub>55</sub>H<sub>93</sub>NNaO<sub>43</sub>S (DP9): 1510.47; found: 1510.41 [M+Na]<sup>+</sup>. HRMS-ESI/QTOF MS:  $m/z$  calcd for C<sub>43</sub>H<sub>73</sub>NNaO<sub>33</sub>S (DP7): 1186.3683; found: 1186.3685;  $m/z$  calcd for C<sub>49</sub>H<sub>83</sub>NNaO<sub>38</sub>S (DP8): 1348.4211; found: 1348.4229;  $m/z$  calcd for C<sub>55</sub>H<sub>93</sub>NNaO<sub>43</sub>S (DP9): 1510.4740; found: 1510.4718.

#### Synthesis of maleimide end-functionalized PS (PS-maleimide)

The synthesis of PS-maleimide was performed by a Steglich esterification on two different molecular weight polystyrenes  $M_w = 1900 \text{ g mol}^{-1}$  and  $M_w = 4700 \text{ g mol}^{-1}$ . Mono-hydroxy terminated polystyrene (PS-OH) (0.2 mmol) was dissolved in DCM (10 mL) followed by the addition of maleimidopropionic acid (2 mmol) and a catalytic amount of DMAP (0.1 mmol). The solution was cooled down to 0°C and then DCC (2 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 1 h at 0°C and allowed to warm up to r.t. and stirred for 16 h. The white precipitate was removed by filtration and washed twice with DCM. The filtrate was concentrated up to around 10 mL and the expected polystyrene was precipitated with cold methanol. The polymer was rinsed twice with MeOH, and then dried to afford the corresponding PS<sub>1900</sub>-maleimide or PS<sub>4700</sub>-maleimide as a white solid with 86% and 97% yield, respectively.

*PS*<sub>1900</sub>-maleimide:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0.47-1.11 (m, 8H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-), 1.16-2.32 (m, 62H, -CH(Ph)-CH<sub>2</sub>-CH(Ph)-), 2.36-2.53 (m, 2H, -NCH<sub>2</sub>-), 3.56-3.93 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-), 6.18-7.25 (m, 118 H, H(aromatic), -CO-CH=CH-CO-); MALDI-TOF MS:  $m/z$  calcd for C<sub>173</sub>H<sub>179</sub>NNaO<sub>4</sub> (n=20): 2359.39; found: 2359.41 [M+Na]<sup>+</sup>;  $M_w/M_n = 1.02$ .

*PS<sub>4700</sub>-maleimide*: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 0.40-2.32 (m, 167H, -CH(Ph)-CH<sub>2</sub>-CH(Ph)-, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>-), 2.43 (br. s., 2H, NCH<sub>2</sub>-), 3.55-3.91 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-), 6.10-7.24 (m, 268H, H(aromatic) , -CO-CH=CH-CO-); MALDI-TOF MS:  $m/z$  calcd for C<sub>173</sub>H<sub>179</sub>NNaO<sub>4</sub> (n=50): 5485.27; found: 5485.13 [M+Na]<sup>+</sup>; Mw/Mn = 1.04.

#### Synthesis of hybrid oligosaccharide-b-polystyrene

PS-maleimide (0.02 mmol) and oligosaccharide-SH (0.024 mmol) were dissolved in 1 mL of DMF and stirred under argon for 24 h. The copolymer was precipitated with MeOH/H<sub>2</sub>O (8:2, v/v) solvent mixture, filtrated and washed with the same solvent mixture. The solid was dried under vacuum to yield the corresponding BCP as a white solid.

*Mal<sub>7</sub>-b-PS<sub>1900</sub>*: Yield: 92%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>)  $\delta$  ppm 0.51 - 0.80 (m, 6H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>-) 0.84 - 2.25 (m, 80H, -CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>-), -CH(Ph)-CH<sub>2</sub>-CH(Ph)-) 2.25 - 5.93 (m, 74H, Carbohydrate, -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CO-CH<sub>2</sub>-CH(S)-CO-) 6.34 - 7.58 (m, 117H, H(aromatic)); MALDI-TOF MS:  $m/z$  calcd for C<sub>219</sub>H<sub>258</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>46</sub>S (n=20): 3612.79; found: 3612.50 [M+Na]<sup>+</sup>; Mw/Mn = 1.01.

*XGO-b-PS<sub>1900</sub>*: Yield: 84%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>)  $\delta$  ppm 0.46 - 0.82 (m, 6H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>-) 0.84 - 2.25 (m, 75H, -CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>-), -CH(Ph)-CH<sub>2</sub>-CH(Ph)-) 2.25 - 5.67 (m, 112H, Carbohydrate, -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CO-CH<sub>2</sub>-CH(S)-CO-) 6.36 - 7.50 (m, 107H, H(aromatic)); MALDI-TOF MS:  $m/z$  calcd for C<sub>216</sub>H<sub>252</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>37</sub>S (n=20)/(DP7): 3522.76; found: 3522.41 [M+Na]<sup>+</sup>;  $m/z$  calcd for C<sub>222</sub>H<sub>262</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>42</sub>S (n=20)/(DP8): 3684.81 ; found: 3684.43 [M+Na]<sup>+</sup>;  $m/z$  calcd for C<sub>228</sub>H<sub>272</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>47</sub>S (n=20)/(DP9): 3846.86; found: 3846.46 [M+Na]<sup>+</sup>. Mw/Mn = 1.01 calculated for the (DP9).

*Mal-b-PS<sub>4700</sub>*: Yield: 86%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>)  $\delta$  ppm 0.49 - 0.81 (m, 6H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>-) 0.82 - 2.66 (m, 154H, -CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>-), -CH(Ph)-CH<sub>2</sub>-CH(Ph)-) 3.19 - 5.99 (m, 75 H, Carbohydrate, -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CO-CH<sub>2</sub>-CH(S)-CO-) 6.29 - 7.60 (m, 257H); MALDI-TOF MS:  $m/z$  calcd for C<sub>429</sub>H<sub>448</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>15</sub>S (n=50): 5925.41; found: 5925.45 [M+Na]<sup>+</sup>; Mw/Mn = 1.02.

*Mal<sub>7</sub>-b-PS<sub>4700</sub>*: Yield: 91%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz DMF-*d*<sub>7</sub>)  $\delta$  ppm 0.53 - 0.81 (m, 6H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>-) 0.82 - 2.30 (m, 153H, -CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>-), -CH(Ph)-CH<sub>2</sub>-CH(Ph)-) 2.30 - 5.98 (m, 296H, Carbohydrate, -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CO-CH<sub>2</sub>-CH(S)-CO-) 6.30 - 7.49 (m, 293H, H(aromatic)); MALDI-TOF MS:  $m/z$  calcd for C<sub>459</sub>H<sub>498</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>40</sub>S (n=50): 6738.68; found: 6738.66 [M+Na]<sup>+</sup>; Mw/Mn = 1.02.

*XGO-b-PS<sub>4700</sub>*: Yield: 90%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>)  $\delta$  ppm 0.49 - 0.79 (m, 6H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>-)) 0.81 - 2.30 (m, 160 H, -CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>-), -CH(Ph)-CH<sub>2</sub>-CH(Ph)-) 2.30-5.60 (s, 64 H, H-Carbohydrate, -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CO-CH<sub>2</sub>-CH(S)-CO-) 6.28 - 7.61 (m, 252H, H(aromatic)); MALDI-TOF MS: *m/z* calcd for C<sub>456</sub>H<sub>492</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>37</sub>S (n=50)/(DP7): 6647.83; found: 6648.76 [M+Na]<sup>+</sup>; *m/z* calcd for C<sub>462</sub>H<sub>502</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>42</sub>S (n=50)/(DP8): 6810.70; found: 6810.52 [M+Na]<sup>+</sup>; *m/z* calcd for C<sub>468</sub>H<sub>512</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>47</sub>S (n=50)/(DP9): 6972.75; found: 6972.55 [M+Na]<sup>+</sup>. Mw/Mn = 1.03.

#### Self-assembly of hybrid OBCPs by nanoprecipitation

1 mg of the hybrid OBCP was dissolved in 1 mL of a THF/Water mixture whose volume ratio corresponded roughly to the block mass fraction (Table 2). The hybrid OBCP solution was added dropwise to 10 mL of Milli-Q water under constant stirring at 700 rpm. The solution was left under stirring for 2 h then filtered through 0.45  $\mu$ m PTFE membrane filter. The solution was reduced to 1 mL by rotavapor to afford the nanoparticle solutions.

#### Dynamic light scattering measurements (DLS)

The nanoparticle suspensions were directly poured into the glass cells, and the measurements were carried out at a 90° angle with 60 s sampling time. In DLS, the relaxation time distribution was obtained using the CONTIN analysis of the autocorrelation function ( $g^{(2)}-1$ ). From the linear dependence of the relaxation frequency ( $1/\tau$ ) as a function of the squared wave vector modulus ( $q^2$ ), the diffusion coefficient ( $D_{\text{diff}}$ ) of the nanoparticles was calculated. The hydrodynamic radius ( $D_h$ ) was then obtained from  $D_{\text{diff}}$  using the Stokes–Einstein relation.

#### Transmission electron microscopy (TEM) observations

TEM was carried out using a M200 Philips microscope (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) operating at 80 kV, and images were recorded on Kodak SO163 films. A droplet of nanoparticle suspension was deposited onto glow-discharged carbon-coated copper grids. After a few minutes, the liquid in excess was blotted with filter paper and the sample was air-dried overnight prior to imaging.

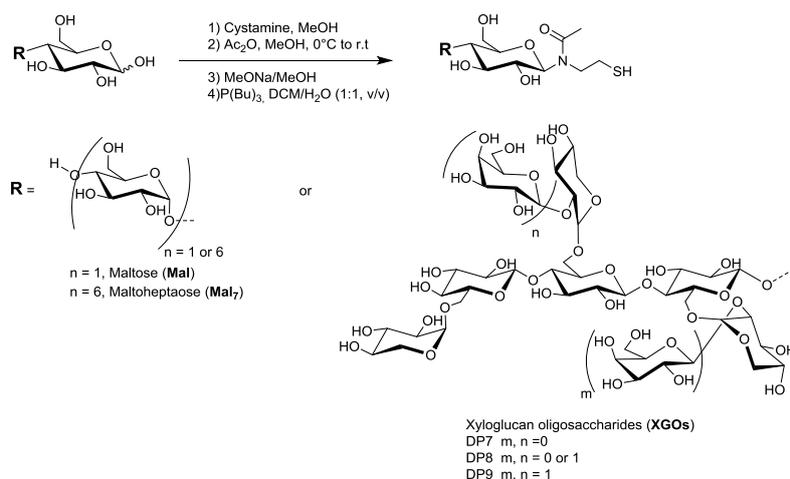
## RESULTS AND DISCUSSION

In order to synthesize hybrid oligosaccharide-*b*-polystyrene copolymers without the use of metal catalysts, we choose to take advantage of the efficient thiol–maleimide coupling reaction. To implement this metal-free click chemistry, we incorporated the thiol function at the

reducing-end of the oligosaccharide block. In addition, the mono-hydroxyl polystyrene was functionalized with maleimide according to the strategy depicted in the following sections.

### Synthesis of reducing-end thiol-functionalized oligosaccharides

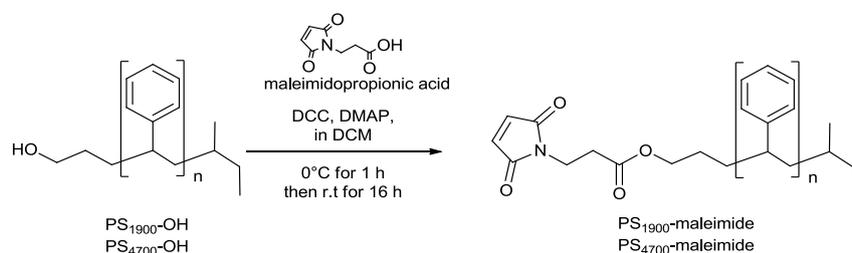
Mal<sub>7</sub> and XGOs were identified in this study because of their size-homogeneous structures allowing the control of self-assembled nanostructuration of micelles<sup>[34, 129a]</sup> and thin-films.<sup>[88, 120]</sup> Maltose was used as a model substrate to fine tune the experimental conditions. Mal<sub>7</sub> is a linear heptasaccharide, derived from starch, which exhibits interesting immunomodulator properties<sup>[135]</sup> and promotes receptor-mediated endocytosis in bacterial cells.<sup>[136]</sup> XGOs, which are known to regulate the plant growth<sup>[137]</sup>, are hemicellulosic oligosaccharides prepared by enzymatic depolymerisation of Tamarind seeds xyloglucan and consist in a cellotetraose backbone regularly substituted by 3 xylosyl units themselves linked to 0, 1 or 2 terminal galactosyl units.<sup>[40]</sup>



Scheme 1. Synthesis of thiol-modified oligosaccharides.

The oligosaccharide-SH (Scheme 1) were synthesized according to a four-step procedure featured by an imine intermediate at the anomeric position avoiding the use of protecting groups. It is clearly advantageous to modify unprotected native sugars because it enables a general access to a large set of oligosaccharides without extensive synthetic manipulations. The general procedure consisted in functionalization of the free oligosaccharides at the reducing end by addition of cystamine, according to a well-known mechanism widely exploited in our laboratory,<sup>[82]</sup> to form *N*-glycosylamine intermediates. Then the labile hemi-aminal was made stable by selective *N*-acetylation to yield *N*-acetyl- $\beta$ -d-glycopyranosylamines. Subsequent removal of possible *O*-acetyl groups was carried out by the Zemplén conditions.<sup>[138]</sup> Finally, the disulfide bridge was reduced by (Bu)<sub>3</sub>P in heterogeneous medium to afford the corresponding oligosaccharide-SH, with excellent overall yields (76-80%). The oligosaccharides-SH were carefully purified and characterized by spectroscopic methods, from which satisfactory analysis data corresponding to their molecular structures were obtained (see Experimental section for details). Typically, mass spectrometry data confirmed the presence of the *N*-acetyl cysteamine adduct with a mass gain of + 101 *m/z* between starting oligosaccharides and oligosaccharides-SH.

#### Synthesis of maleimide end-functionalized polystyrenes

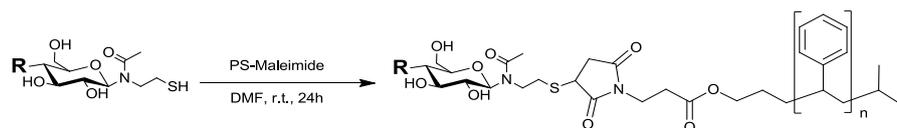


Scheme 2. Synthesis of PS-maleimide.

Commercially available mono-hydroxyl chain-end polystyrenes, with two different number-averaged molecular weights (4700 g mol<sup>-1</sup> and 1900 g mol<sup>-1</sup>), were chosen as hydrophobic blocks to introduce thiol-clickable maleimide end groups (Scheme 2). The Steglich esterification was performed to link the 3-propionyl maleimide acid onto PS-OH affording the maleimide end-functionalized polystyrenes, *e.g.*, PS<sub>1900</sub>-maleimide and PS<sub>4700</sub>-maleimide, with high efficiency (86% and 97% yield, respectively). A simple precipitation/filtration step in cold methanol was necessary to purify the PS-maleimide. It is noteworthy that an excess of 3-

propionyl maleimide acid (10 equiv.) and DCC (10 equiv.) was required in order to achieve the complete functionalization of the polystyrene. The conversion was quantitative, as indicated by  $^1\text{H}$  NMR spectra (Fig. S18-S20 in SI), where the peak of the methylene proton next to the terminal hydroxyl function in PS-OH at  $\delta$  3.30 ppm shifted completely at  $\delta$  3.80 ppm. The maleimido group was further confirmed by the presence of two methylene signals at  $\delta$  2.45 ppm and  $\delta$  3.70 ppm and the characteristic thin and intense single peak related to the two alkene protons around  $\delta$  6.7 ppm. For the slight modifications of low-molecular weight PS, MALDI-TOF mass spectrometry was very helpful since it confirmed the absence of starting material and a mass gain of + 151  $m/z$  corresponding to the addition of the maleimide group (Fig. S19-S21 in SI). We have found that the qualities of the mass spectra were greatly dependant of the sample spot preparation and mainly of the solvent used for mixing with matrix and deposition.

### Thiol-maleimide addition for hybrid OBCPs



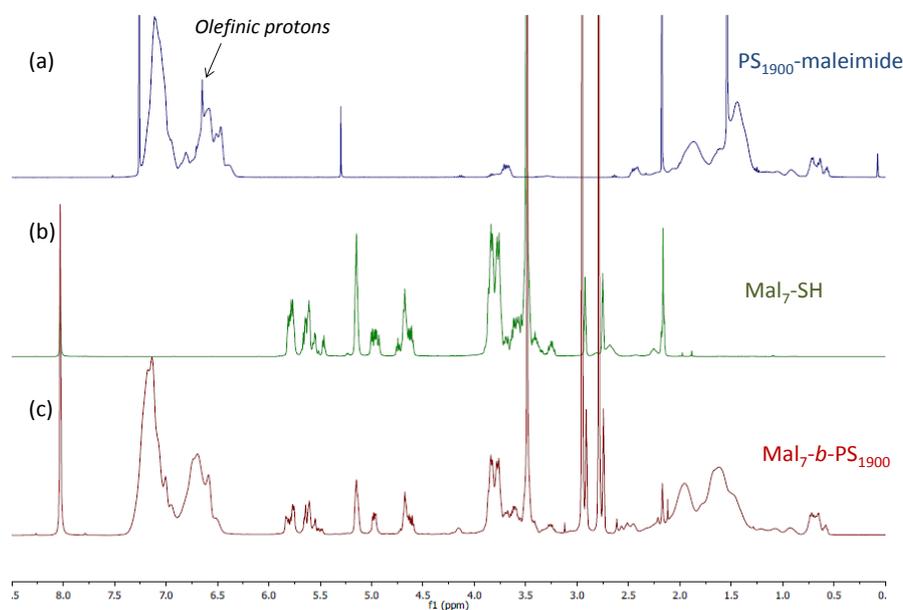
**Scheme 3.** Hybrid BCPs from thiol-maleimide click reaction.

The synthesis of amphiphilic OBCPs is fundamentally challenging, as it requires the end-to-end coupling of highly incompatible blocks in terms of solubility. In our case, the coupling reaction was carried out in DMF which is a good solvent for both blocks (scheme 3). A recent study showed that DMF considerably accelerates the rate of catalyst-free thiol-maleimide reaction.<sup>[139]</sup> In fact, mixing a 1:1.2 molar ratio of the PS<sub>1900</sub> or 4700-maleimide with oligosaccharide-SH in DMF at room temperature for 24 h resulted in the successful and complete formation of a series of hybrid OBCPs such as Mal-*b*-PS<sub>4700</sub>, Mal-*b*-PS<sub>1900</sub> or 4700, and XGO-*b*-PS<sub>1900</sub> or 4700. The hybrid OBCPs were isolated with 90% average yield by simple precipitation in an ice-cold mixture of MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2, v/v) capable of solubilizing and removing the oligosaccharide-SH in excess.

Oligosaccharide-SH (Yield)	Polystyrene-maleimide (Yield)	OBCPs (Yield)
Mal-SH (80%)		Mal- <i>b</i> -PS <sub>4700</sub> (86% ; 1.02 <sup>b</sup> )
Mal <sub>7</sub> -SH (76%)	PS <sub>1900</sub> -maleimide (86% ; 1.02 <sup>b</sup> ) PS <sub>4700</sub> -maleimide (97% ; 1.04 <sup>a</sup> )	Mal <sub>7</sub> - <i>b</i> -PS <sub>1900</sub> (92% ; 1.01 <sup>b</sup> ) Mal <sub>7</sub> - <i>b</i> -PS <sub>4700</sub> (91% ; 1.02 <sup>a</sup> )
XGO-SH (78%)		XGO- <i>b</i> -PS <sub>1900</sub> (84% ; 1.01 <sup>b</sup> ) XGO- <i>b</i> -PS <sub>4700</sub> (90% ; 1.03 <sup>a</sup> )

**Table 1.** Synthesis yields of blocks and hybrid OBCPs.

MALDI-TOF mass spectrometry and <sup>1</sup>H NMR of the resultant hybrid OBCPs unambiguously showed that the thiol-maleimide click reaction has occurred in an efficient manner. According to <sup>1</sup>H NMR spectra (Fig. 1), the disappearance of the olefinic signal of the maleimide moiety at  $\delta$  6.7 ppm, strongly corroborated the coupling reaction. The presence of overlapping protons signals did not allow us to estimate the efficiency by integration.



**Fig. 1.** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz) spectra of (a) PS<sub>1900</sub>-maleimide (CDCl<sub>3</sub>), (b) Mal<sub>7</sub>-SH (D<sub>2</sub>O) and (c) Mal<sub>7</sub>-*b*-PS<sub>1900</sub> (DMF-*d*<sub>7</sub>).

However the GPC analysis revealed monomodal products of shorter retention time due to the higher volume fraction of the hybrid OBCP which confirmed quantitative reactions. This analysis was only performed on PS<sub>4700</sub>-based OBCPs due to the size exclusion limit of the column (Fig. S34 in SI). While for the PS<sub>1900</sub>-based OBCP, the MALDI-TOF mass spectrometry was performed in order to determine as well the absolute molecular weight as molecular weight distribution.

Finally, we can conclude that the thiol-maleimide route is as efficient as CuAAC one<sup>[140]</sup> in term of overall yield (~ 65% for both), starting from readily accessible free oligosaccharides and PS-OH.

#### **Self-Assembly of hybrid OBCPs by nanoprecipitation**

As previously described for the “CuAAC”-mediated preparation of uniform Mal<sub>7</sub>-*b*-PS<sub>4700</sub> micelles in water,<sup>[140]</sup> the “thiol-maleimide”-mediated oligosaccharide-*b*-PS micellar nanoparticles were prepared by nanoprecipitation method. Our process relies on a fast solvent shifting from hydro-organic mixture (THF/water), allowing well-swollen single hybrid OBCP chains (volume ratio in THF corresponds roughly to molecular weight ratio of PS block) (Table 2), to miscible selective solvent for oligosaccharide blocks, herein, water. One can expect that micellar nanoparticles consist of PS core sterically stabilized by oligosaccharide corona. However, for Mal-*b*-PS<sub>4700</sub> (**8**), the maltose fraction (0.09) is too low to stabilize the micelles, resulting in a precipitation process of the OBCP system. For the others, the size and the morphology of micelles were investigated using DLS measurements and TEM image

**Dynamic Light Scattering Analysis and Microscopic observations**

Hydrodynamic radius ( $R_h$ ) of the micellar nanoparticles at 1 mg mL<sup>-1</sup> in water were determined using DLS technique and summarized in the Table 2.

OBCPs	PS mass fraction	THF/H <sub>2</sub> O (v/v)	$R_h$ (nm) <sup>a</sup>	Literature <sup>b</sup> (nm)
Mal <sub>7</sub> - <i>b</i> -PS <sub>1900</sub>	0.60	6/4	16 / 96	-
XGO- <i>b</i> -PS <sub>1900</sub>	0.57	6/4	25 / 121	-
Mal- <i>b</i> -PS <sub>4700</sub>	0.92	9/1	-	-
Mal <sub>7</sub> - <i>b</i> -PS <sub>4700</sub>	0.81	8/2	27 / 172	28
XGO- <i>b</i> -PS <sub>4700</sub>	0.79	8/2	26 / 188	

<sup>a</sup> DLS measurements showed a bimodal distribution for each OBCPs.

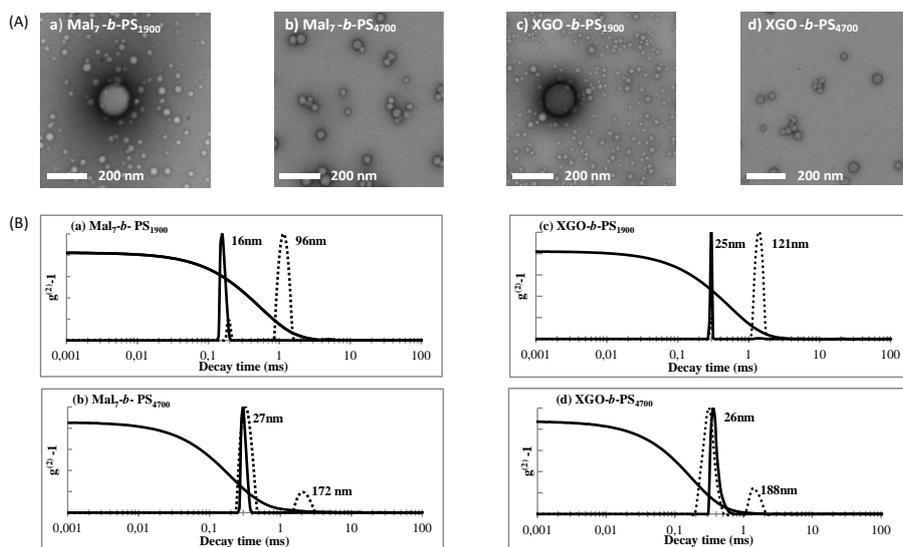
<sup>b</sup> See reference: (Otsuka, Osaka *et al.*, 2013).

**Table 2.** Nanoprecipitation solvent mixture and hydrodynamic radius of oligosaccharide-*b*-polystyrene nanoparticles

The weight-average size distribution showed a bimodal behavior with a first distribution for the size in the range of 16–27 nm and the second one in the range of 96–197 nm. The slow time peak could be reasonably attributed to the presence of aggregates. The hypothesis of the existence of very few aggregates is confirmed when plotting the size distribution in number average (Fig. 2B). Their number is very small and therefore, only the fastest relaxation time dominant the dynamics of the system. The average size measured from the TEM images was consistent with the DLS analysis and confirmed that small spherical micelles were predominant.

For Mal<sub>7</sub>-*b*-PS<sub>4700</sub> (Fig. 2A, b) and XGO-*b*-PS<sub>4700</sub> (Fig. 2A, d), homogeneous size distributions were observed while with Mal<sub>7</sub>-*b*-PS<sub>1900</sub> (Fig. 2A, a) and XGO-*b*-PS<sub>1900</sub> (Fig. 2A, c), large compound micelles still remained. For Mal<sub>7</sub>-based OBCPs, we assume that smallest size is elementary micelles if we consider the fully stretched length of both blocks. This hypothesis was confirmed since the extension of the molecular weight polystyrene chain from 1900 g mol<sup>-1</sup> to 4700 g mol<sup>-1</sup> led to typical increase of  $R_h$  from 16 nm to 27 nm according to DLS measurements. This tendency was not observed for XGO-based OBCPs since the small micelles already existed as aggregates. As already reported by us on thermoresponsive oligosaccharide-*b*-poly(*N*-isopropylacrylamide) systems,<sup>[140, 141]</sup> the observed difference in aggregation can be reasonably attributed to the change in conformation of the corona-forming oligosaccharides since XGOs are branched oligosaccharides while Mal<sub>7</sub> is linear. XGOs-based OBCPs seem

rather prone to aggregate certainly through intermolecular hydrogen-bonding. Lastly, it is worthy to mention that DLS analysis revealed for Mal<sub>7</sub>-*b*-PS<sub>4700</sub> nanoparticles, a  $R_h$  of 27 nm which corresponded to the 28 nm one already reported for the same hybrid OBCP synthesized using the CuAAC click chemistry.<sup>[140]</sup> This result demonstrated that the substitution of the rigid 1,4-triazole ring by succinimidyl thioether does not affect the size of micelles. In order to assess the stability of the nanoparticles upon dilution, the previously prepared samples were diluted up to 1 000-fold, a limit beyond which no scattered light was detected by DLS. The results did not show any variation of the size distribution confirming the good stability of the self-assembled oligosaccharides-*b*-polystyrene micelles. This high stability is attributed to the high block incompatibility<sup>[88]</sup> and the relative high  $T_g$  (about 90°C) of the PS-core.



**Fig. 2.** (A) TEM images of the self-assembled nanoparticles of a) Mal<sub>7</sub>-*b*-PS<sub>1900</sub>, b) Mal<sub>7</sub>-*b*-PS<sub>4700</sub>, c) XGO-*b*-PS<sub>1900</sub> and d) XGO-*b*-PS<sub>4700</sub>; (B) DLS autocorrelation function ( $g^{(2)}-1$ ) measured at 90° and weight (dashed line) and number (plain line) radius distribution of the oligosaccharide-*b*-polystyrene in water ( $c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) at 25°C.

## CONCLUSIONS

This work reports the synthesis of several amphiphilic copolymers consisting of polystyrene, a model synthetic polymer, linked to various oligosaccharides using the metal free thiol-maleimide coupling chemistry. We describe an efficient and direct method, based on amination and *N*-acylation steps, for the synthesis of neoglycoconjugates equipped with a thiol spacer at the reducing end of unprotected sugars. Those oligosaccharide-SH are prone to click with maleimide-terminated polystyrenes with high yield. Self-assembly in water of such amphiphilic systems and their characterization using scattering and imaging techniques, showed spherical micelles or/and aggregates with  $R_h$  in the range 16–28 nm. We also noted an influence of shell-forming oligosaccharide conformation on micellar size, since ramified XGOs existed only as aggregates in contrast to linear Mal<sub>7</sub>. Moreover, since the thioether linkage gave similar self-assembly properties in solution than the triazolic ring-linkage, we can assume that in thin-films, expected self-organized nanostructures with 10 nm scale will be obtained. This work will be reported in a forthcoming study. Finally, this study shows that the metal-free thiol-maleimide click addition is a viable alternative to the CuAAC for the synthesis of OBCPs without disrupting their self-assembly properties.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank MENRT for the PhD fellowship to A. Petrelli as well as CNRS, Carnot Institut Polynat, Labex Arcane (ANR-11-LABX-0003-01), the mass spectrometry and NMR platforms of ICMG (FR 2607) for their support. C. Travelet and J.L Putaux are acknowledged for their technical assistances in light scattering and electronic microscopy techniques, respectively.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/...>



### III. Supporting Information

#### Starting material characterization:

- Maltoheptaose (Mal<sub>7</sub>):

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 3.26 (t, *J*=8.68 Hz, 1 H) 3.34 - 3.47 (m, 2 H) 3.50 - 4.07 (m, 69 H) 4.64 (d, *J*=7.83 Hz, 1 H) 5.22 (d, *J*=3.67 Hz, 1 H) 5.39 (d, *J*=2.20 Hz, 6 H)

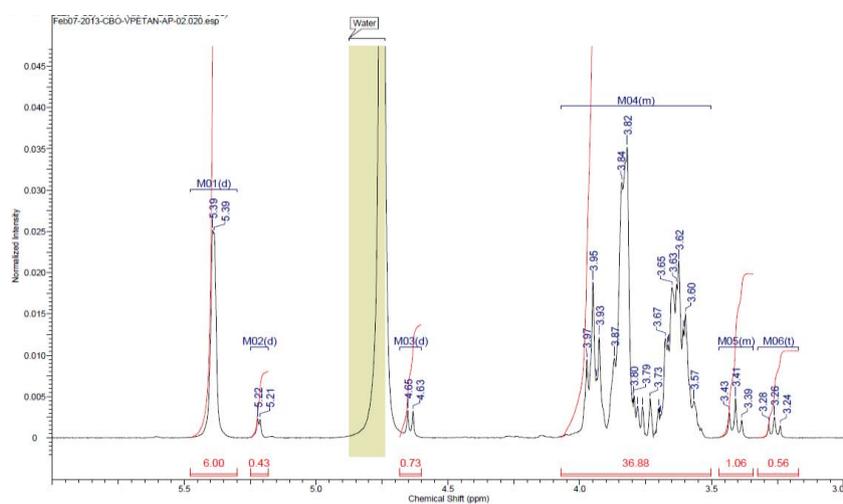


Fig. S1 <sup>1</sup>H NMR spectrum of Mal<sub>7</sub>

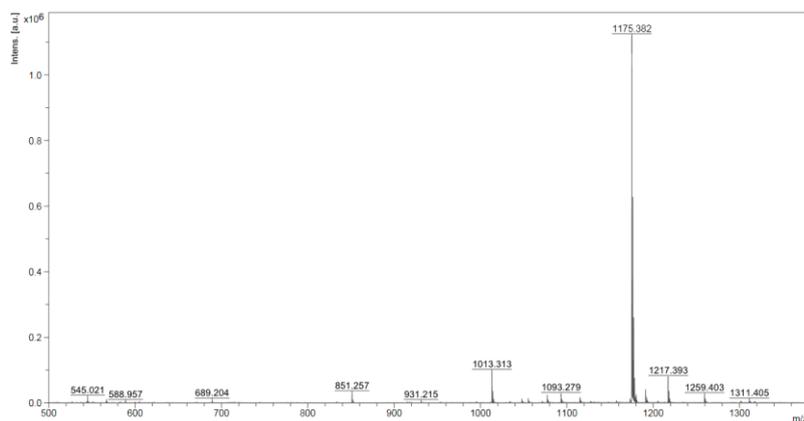


Fig. S2 MALDI-TOF mass spectrum of Mal<sub>7</sub>

○ **Xylooligosaccharides ( XGOs):**

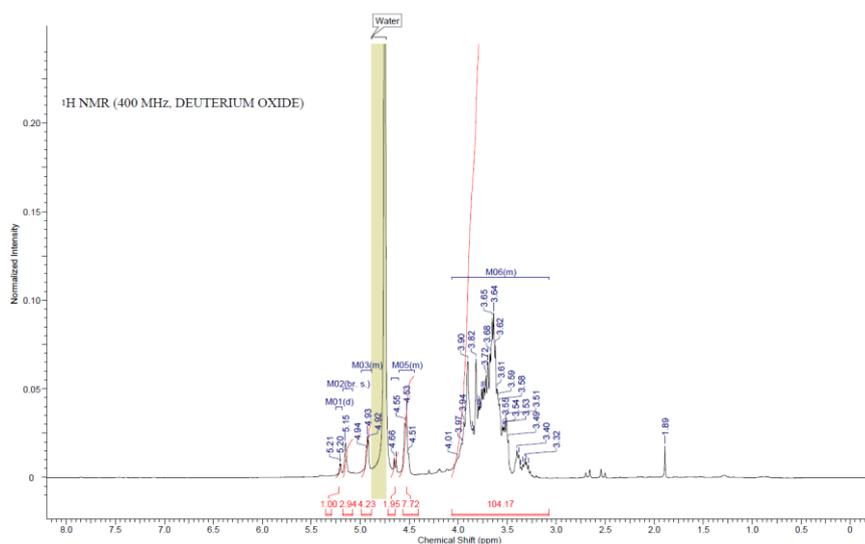
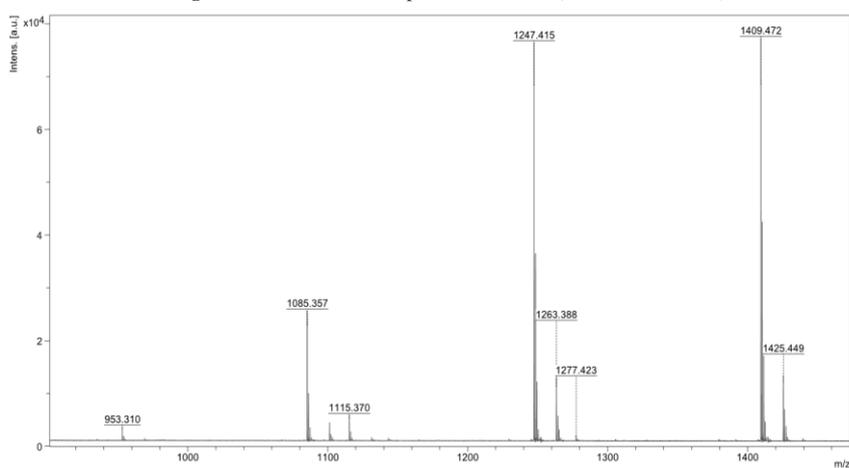


Fig. S3 <sup>1</sup>H NMR spectrum of XGOs (DP7, DP8 and DP9)

Fig. S4 MALDI-TOF mass spectrum of XGOs (DP7, DP8 and DP9)



○ **PS<sub>1900</sub>-OH :**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 0.46 - 0.99 (m, 8 H) 1.00 - 2.64 (m, 9 H) 3.15 - 3.44 (m, 2 H) 6.25 - 7.24 (m, 101 H)

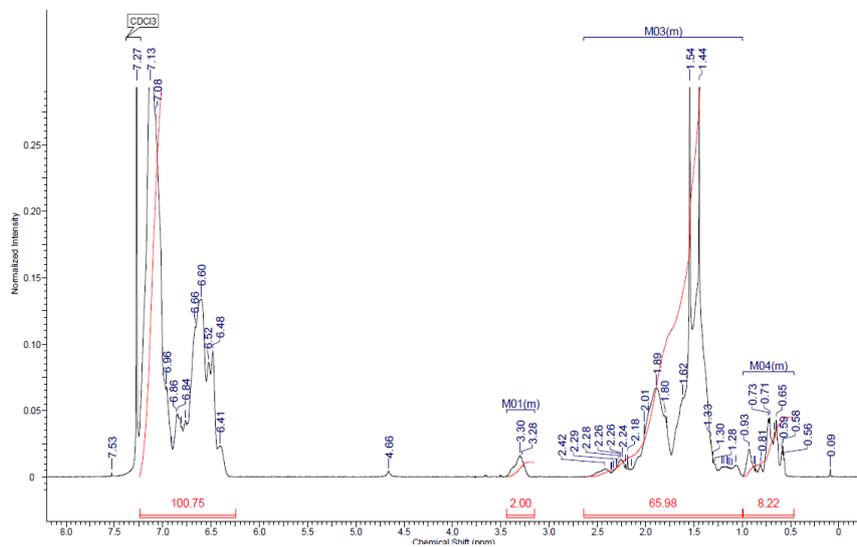


Fig. S5  $^1\text{H}$  NMR spectrum of PS<sub>1900</sub>-OH

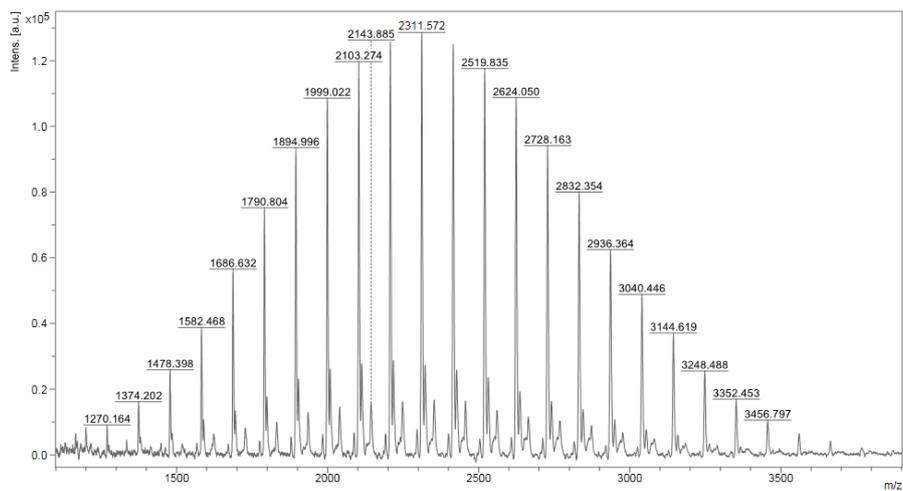


Fig. S6 MALDI-TOF mass spectrum of PS<sub>1900</sub>-OH

○ **PS<sub>4700</sub>-OH :**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 0.30 - 2.69 (m, 45 H) 3.31 (br. s., 2 H) 5.76 - 8.05 (m, 54 H)

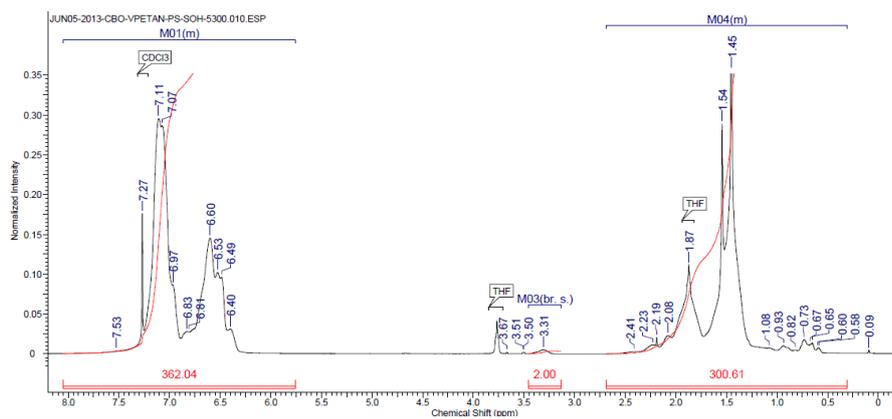


Fig. S7 <sup>1</sup>H NMR spectrum of PS<sub>4700</sub>-OH

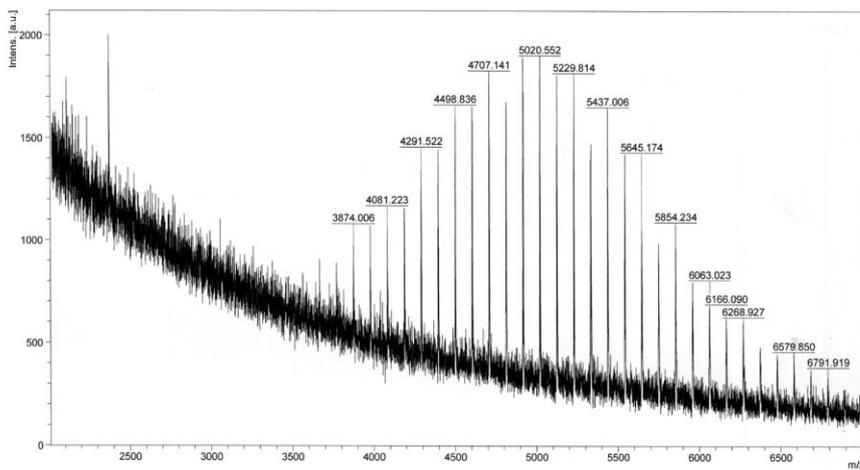
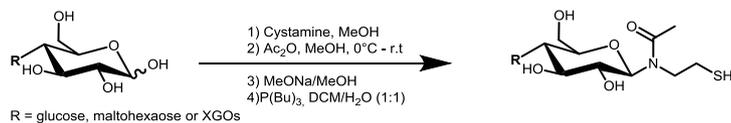
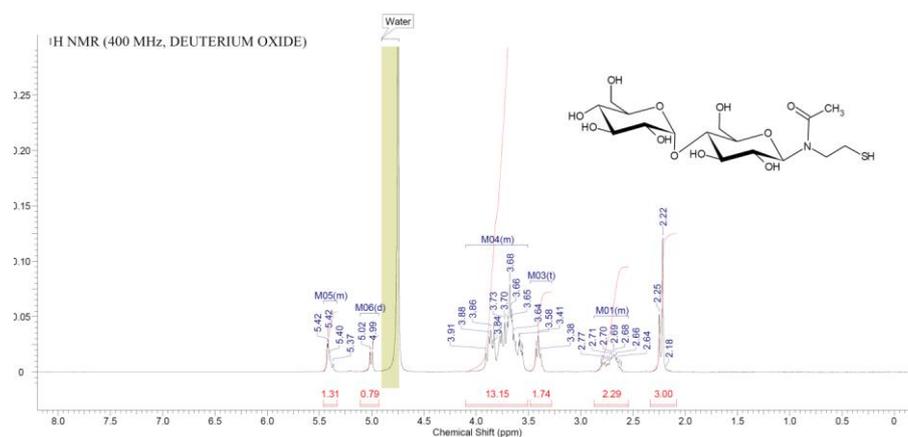


Fig. S8 MALDI-TOF mass spectrum of PS<sub>4700</sub>-OH

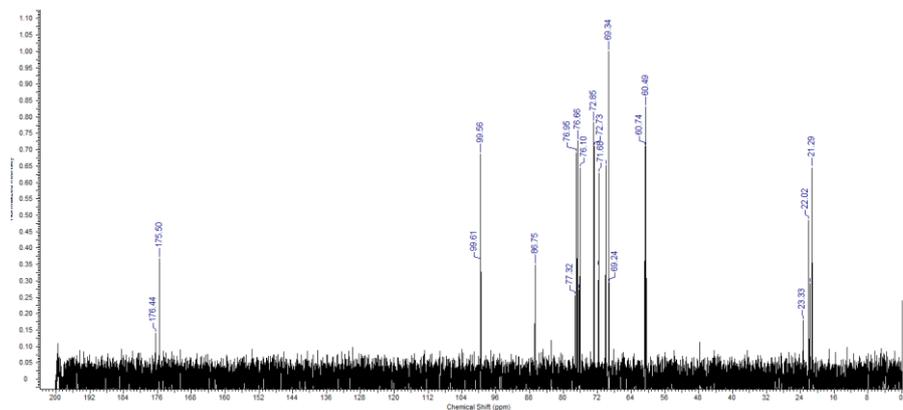
**Thiol-modified carbohydrates:**

 ○ *N*-(β-maltosyl)-2-acetamino-1-ethanethiol (Mal-SH)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm): 2.09-2.34 (2 x s, 3H, rotamers, -NCOCH<sub>3</sub>), 2.54-2.87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-SH), 3.41-4.10 (m, 14H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b<sup>GlcI-GlcII</sup>, and -NCH<sub>2</sub>-) 5.00 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-1<sup>GlcI</sup>), 5.33-5.47 (m, 1H, H-1<sup>GlcII</sup>);


**Fig. S9** <sup>1</sup>H NMR spectrum of Mal-SH

<sup>13</sup>C NMR (100MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm) : 21.29, 21.72 (2 x 1C, rotamers, -CH<sub>2</sub>-SH), 22.02, 23.33 (2 x 1C, rotamers -NCOCH<sub>3</sub>), 60.4, 60.7, 69.2, 69.3, 69.9, 71.6, 71.7, 72.7, 72.8, 76.1, 76.2, 76.6, 76.8, 76.9, 77.3, 86.7 (C-2,C-3,C-4,C-5, C-6<sup>GlcI-GlcII</sup>, -N-CH<sub>2</sub>), 99.5, 99.6 (2 x 1C, rotamers C-1<sup>GlcI</sup>), 175.5, 176.4 (2 x 1C, rotamers, -NCOCH<sub>3</sub>).

Fig. S10  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of Mal-SH



ESI MS+:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  for  $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_{11}\text{S}$  Calculated  $m/z=466.14$ ; found = 465.8

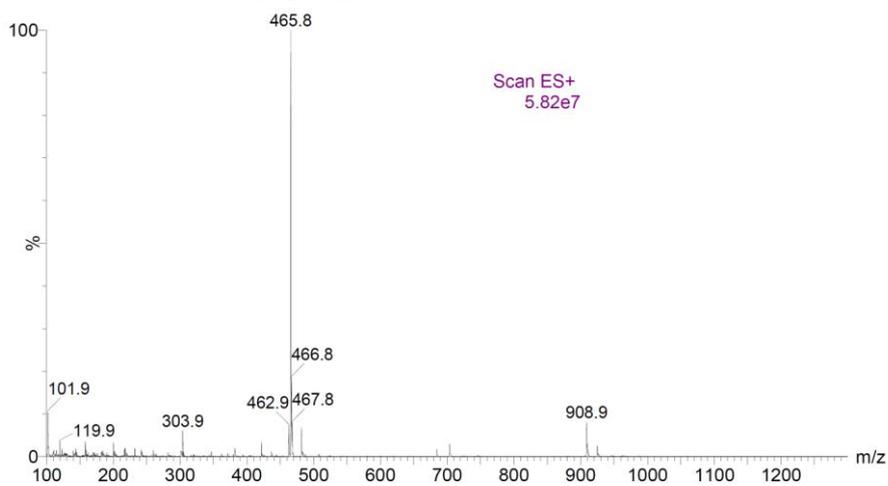


Fig. S11 ESI mass spectrum of Mal-SH

○ *N*-( $\beta$ -maltoheptaosyl)-2-acetamino-1-ethanethiol (Mal<sub>7</sub>-SH)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm): 2.17-2.34 (2 x s, 3H, rotamers, -NCOCH<sub>3</sub>), 2.47-2.96 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-SH), 3.20-4.10 (m, 70H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b<sup>GlcI-GlcVII</sup>, and -NCH<sub>2</sub>-), 5.02 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, H-1<sup>GlcI</sup>), 5.39 (br. s., 7H, H-1<sup>GlcII-GlcVII</sup>);

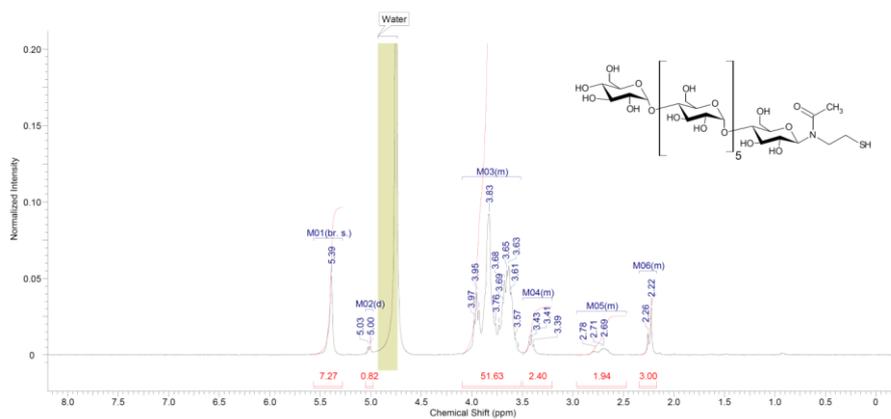


Fig. S12 <sup>1</sup>H NMR spectrum of Mal<sub>7</sub>-SH

<sup>13</sup>C NMR (100MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm) 21.2, 21.7 (2 x 1C, rotamers, -CH<sub>2</sub>-SH), 22.0, 23.3 (2 x 1C, rotamers -NCOCH<sub>3</sub>), 60.4, 60.6, 60.7, 69.2, 69.3, 69.6, 69.6, 69.9, 71.4, 71.4, 71.6, 72.7, 72.8, 73.2, 74.0, 74.1, 74.5, 75.7, 75.9, 76.1, 76.2, 76.2, 76.6, 76.7, 76.6, 76.7, 76.8, 76.9, 77.3, 86.7, 91.9, 92.1, 95.7, 95.9 (C-2,C-3,C-4,C-5, C-6<sup>GlcI-GlcVII</sup>, -N-CH<sub>2</sub>), 99.5, 99.6 (2 x 1C, rotamers C-1<sup>GlcI</sup>), 175.5, 176.4 (2 x 1C, rotamers, -NCOCH<sub>3</sub>);

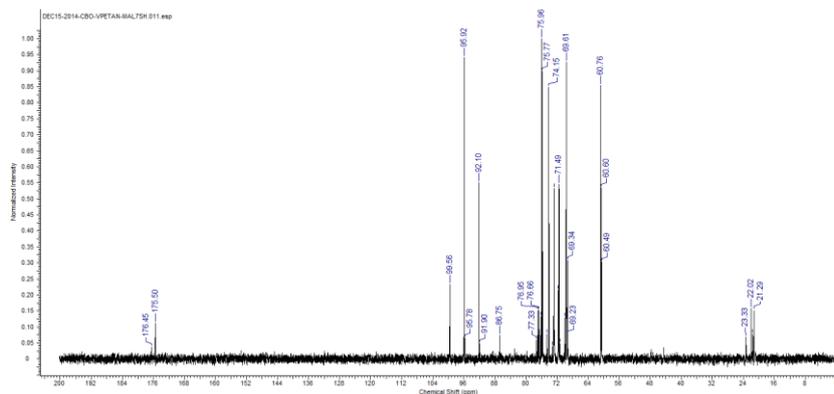


Fig. S13 <sup>13</sup>C NMR spectrum of Mal<sub>7</sub>-SH

MALDI-TOF MS<sup>+</sup>: [M+Na]<sup>+</sup> for C<sub>46</sub>H<sub>79</sub>NO<sub>36</sub>S Calculated m/z= 1276.40 found = 1276.36

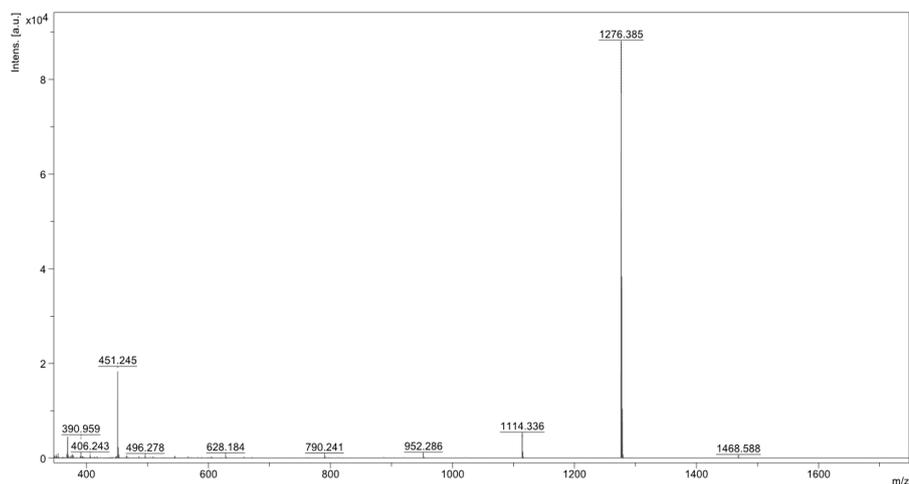


Fig. S14 MALDI-TOF mass spectrum of Mal<sub>7</sub>-SH

○ *N*-(β-xyloglucooligosyl)-2-acetamino-1-ethanethiol (XGOs-SH)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm): 2.10-2.32 (2 x s, 3H, rotamers, -NCOCH<sub>3</sub>), 2.60 - 2.83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-SH), 3.29-4.02 (m, 51H, H-2,3,4,5,6 GlcI-IV, Gal II-III, H-2,3,4,5<sup>Xyl</sup> II-IV, NCH<sub>2</sub>), 4.45-4.62 (m, 4H, H-1<sup>GlcII-IV, Gal II-III</sup>), 4.90 - 4.98 (m, 2H, H-1<sup>XylIII-III</sup>), 5.02 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-1<sup>GlcI</sup>, rotamer I), 5.17 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-1<sup>XylIV</sup>), 5.40 (d, *J* = 8.6 Hz, H-1<sup>GlcI</sup>, rotamer II);

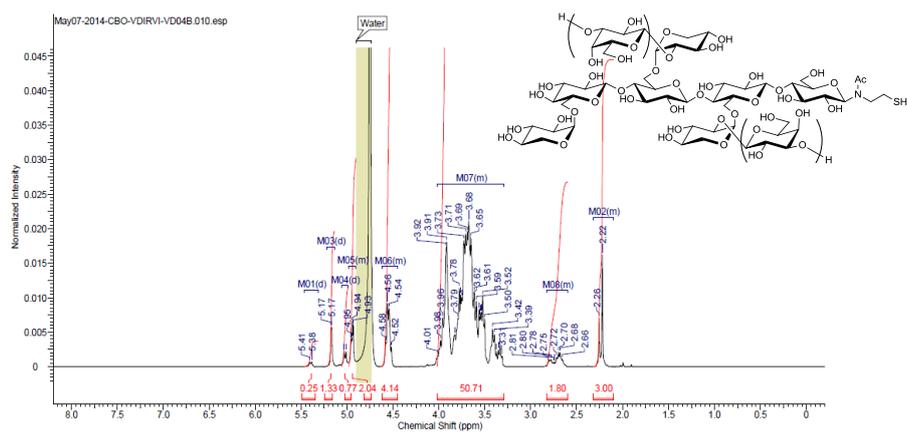


Fig. S15 <sup>1</sup>H NMR spectrum of XGOs-SH

$^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm) 21.3, 21.7, 22.0, 23.3 (2 x 1C, rotamers,  $-\text{CH}_2\text{-SH}$ ), 60.1, 61.0, 61.2, 61.5, 65.9, 66.7, 68.6, 69.4, 69.5, 69.5, 69.9, 71.1, 71.5, 71.9, 72.6, 72.7, 73.0, 73.3, 73.6, 74.1, 74.3, 75.1, 75.6, 76.8, 78.7, 79.8, 80.2, 86.7, 98.3, 98.9, 102.6, 102.9, 103.0, 104.5, 175.5, 176.5 (2 x 1C, rotamers,  $-\text{NCOCH}_3$ );

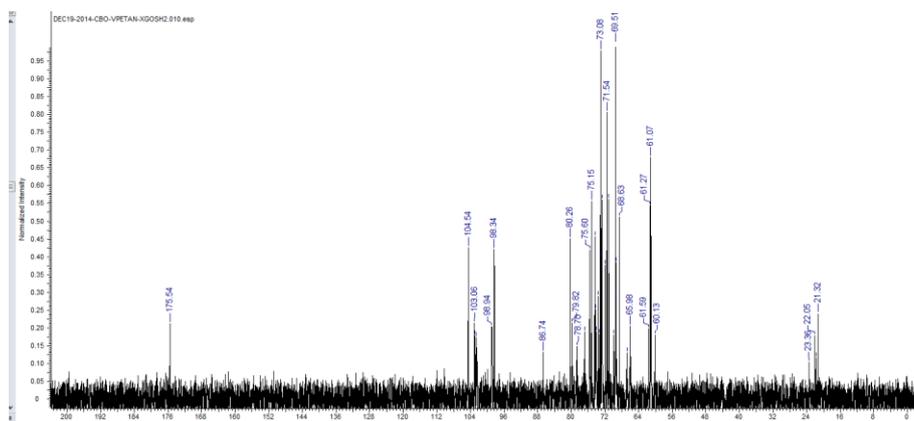


Fig. S16  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of XGOs-SH

MALDI-TOF  $\text{MS}^+$ : **DP<sub>7</sub>**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  for  $\text{C}_{43}\text{H}_{73}\text{NO}_{33}\text{S}$  calculated  $m/z = 1186.37$  found  $m/z = 1186.31$  / **DP<sub>8</sub>**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  for  $\text{C}_{49}\text{H}_{83}\text{NO}_{38}\text{S}$  calculated  $m/z = 1348.42$  found  $m/z = 1348.36$  / **DP<sub>9</sub>**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  for  $\text{C}_{55}\text{H}_{93}\text{NO}_{43}\text{S}$  calculated  $m/z = 1510.47$  found  $m/z = 1510.42$

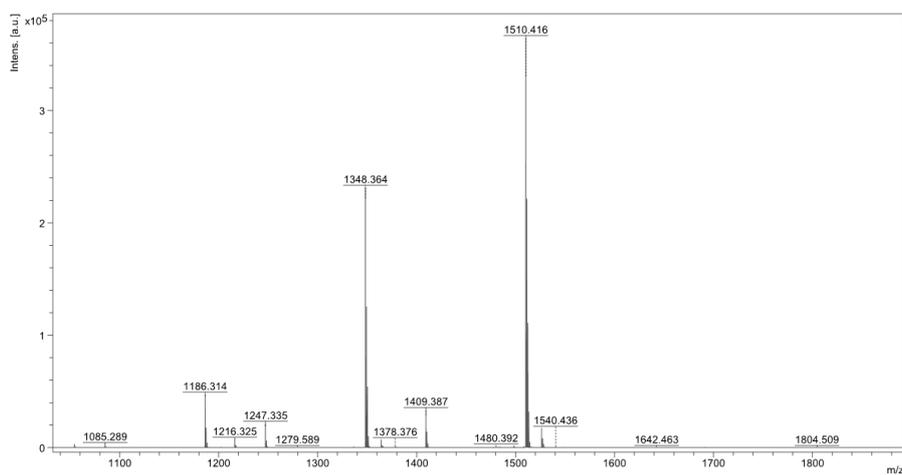


Fig. S17 MALDI-TOF mass spectrum of XGOs-SH

SYNTHESE DE COPOLYMERE A BLOC AMPHIPHILES PAR REACTION THIOL MALEIMIDE

○ PS<sub>1900</sub>-maleimide

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm):  
 0.47-1.11 (m, 8H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-),  
 1.16-2.32 (m, 62H, -CH(Ph)-CH<sub>2</sub>-CH(Ph)-), 2.36-2.53 (m, 2H, -NCH<sub>2</sub>-), 3.56-3.93 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-), 6.18-7.25 (m, 118 H, H(aromatic), -CO-CH=CH-CO-);

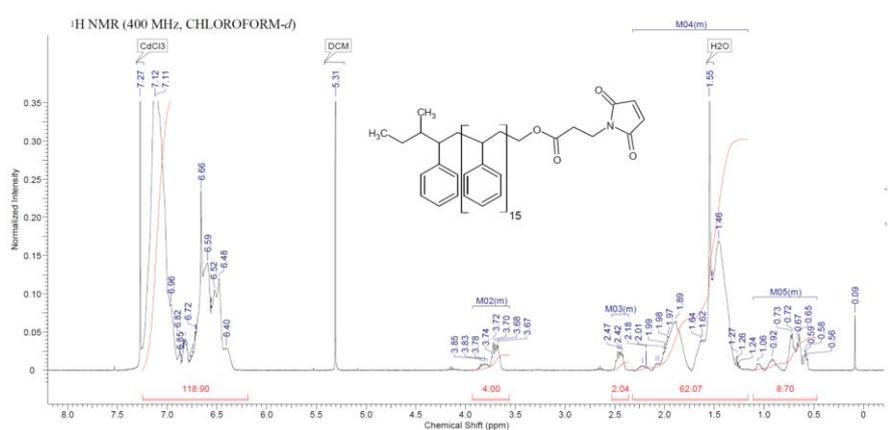
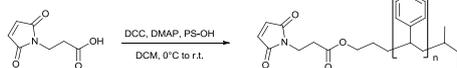


Fig. S18 <sup>1</sup>H NMR spectrum of PS<sub>1900</sub>-maleimide

MALDI-TOF MS<sup>+</sup>: [M+Na]<sup>+</sup> for C<sub>173</sub>H<sub>179</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (n=20) Calculated *m/z* = 2359.39; found = 2359.41

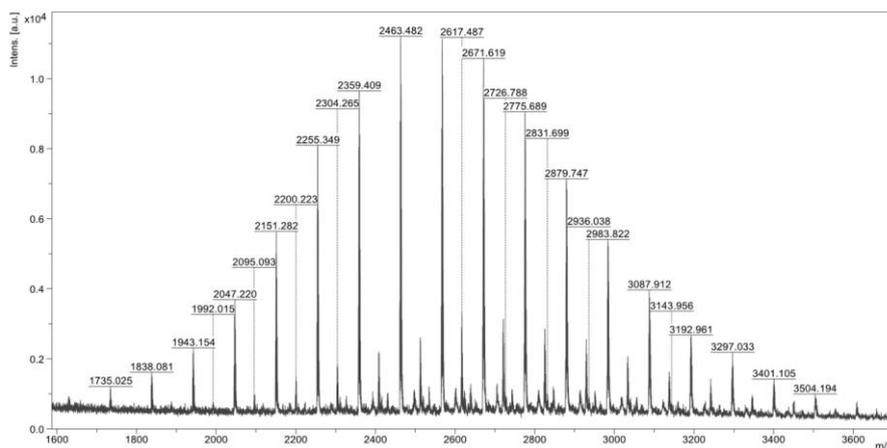


Fig. S19 MALDI-TOF mass spectrum of PS<sub>1900</sub>-maleimide



○ PS<sub>4700</sub>-maleimide

: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 0.40-2.32 (m, 167H, -CH(Ph)-CH<sub>2</sub>-CH(Ph)-, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>-), 2.43 (br. s., 2H, NCH<sub>2</sub>-), 3.55-3.91 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-), 6.10-7.24 (m, 268H, H(aromatic) , -CO-CH=CH-CO-);

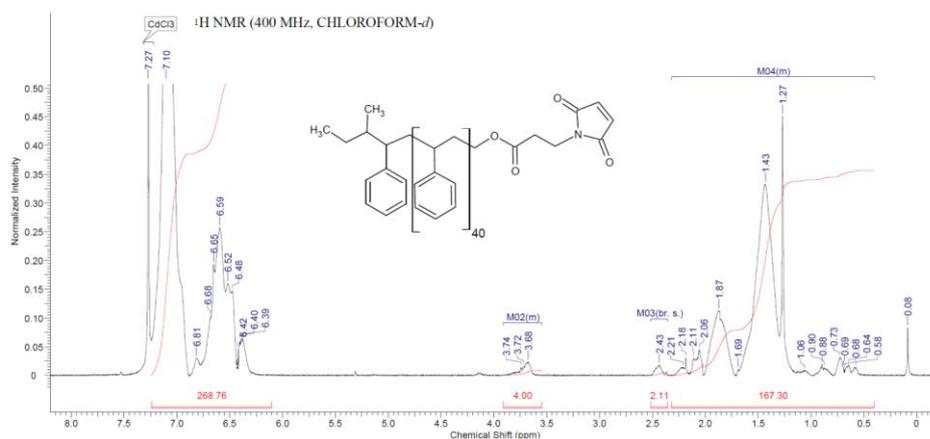


Fig. S20 <sup>1</sup>H NMR spectrum of PS<sub>4700</sub>-maleimide

MALDI-TOF MS<sup>+</sup>: [M+Na]<sup>+</sup> for C<sub>413</sub>H<sub>419</sub>NO<sub>4</sub> (n=50) Calculated m/z = 5485.27 found = 5485.14

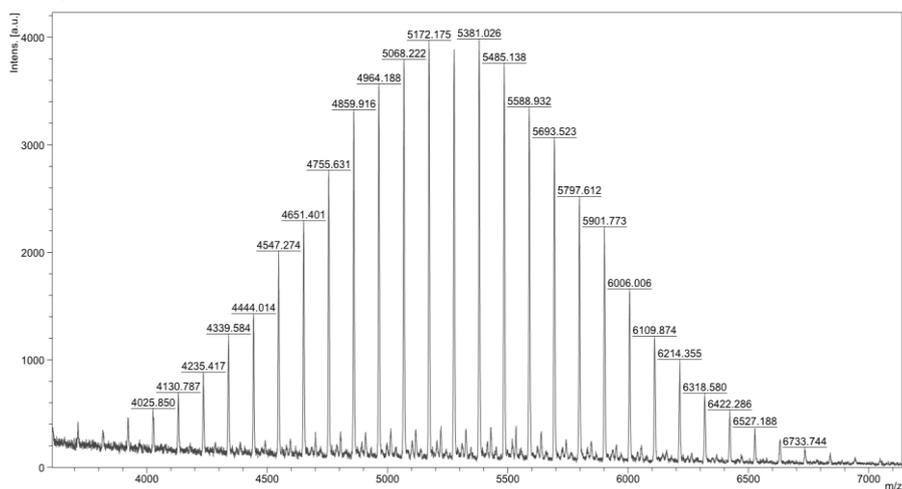
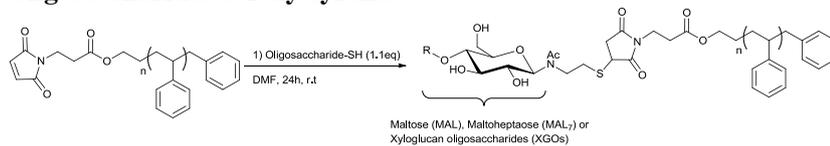


Fig. S21 MALDI-TOF mass spectrum of PS<sub>4700</sub>-maleimide

Oligosaccharides-*b*-Polystyrenes



○ **Mal<sub>7</sub>-*b*-PS<sub>1900</sub>:**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>) δ ppm 0.51 - 0.80 (m, 6H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-) 0.84 - 2.25 (m, 80H, -CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-, -CH(Ph)-CH<sub>2</sub>-CH(Ph)-) 2.25 - 5.93 (m, 74H, Carbohydrate, -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CO-CH<sub>2</sub>-CH (S)-CO-) 6.34 - 7.58 (m, 117H, H(aromatic))

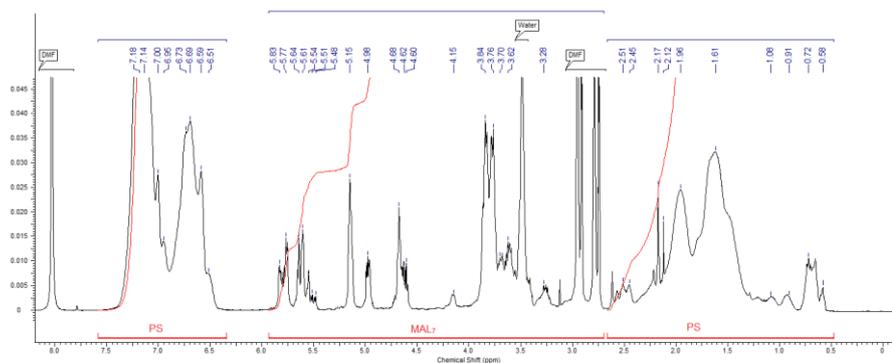


Fig. S22 <sup>1</sup>H NMR spectrum of Mal<sub>7</sub>-*b*-PS<sub>1900</sub>

MALDI-TOF MS<sup>+</sup>: [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>219</sub>H<sub>258</sub>N<sub>2</sub>O<sub>40</sub>S (n=20) Calculated m/z = 3612.79  
found = 3612.50

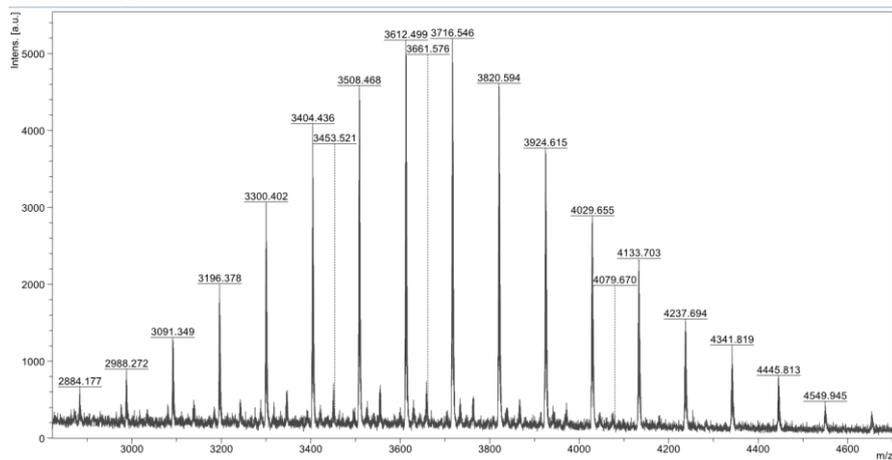


Fig. S23 MALDI-TOF mass spectrum of Mal<sub>7</sub>-*b*-PS<sub>1900</sub>



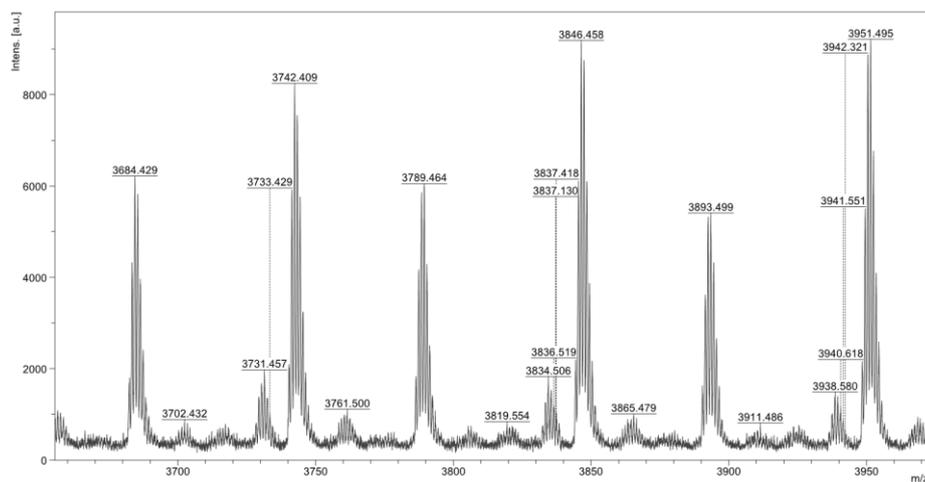


Fig. S26 Enlarged MALDI-TOF mass spectrum of XGOs-*b*-PS<sub>1900</sub>

○ **Mal-*b*-PS<sub>4700</sub>:**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>) δ ppm 0.49 - 0.81 (m, 6H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>-) 0.82 - 2.66 (m, 154H, -CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>-), -CH(Ph)-CH<sub>2</sub>-CH(Ph)-) 3.19 - 5.99 (m, 75 H, Carbohydrate, -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CO-CH<sub>2</sub>-CH(S)-CO-) 6.29 - 7.60 (m, 257H)

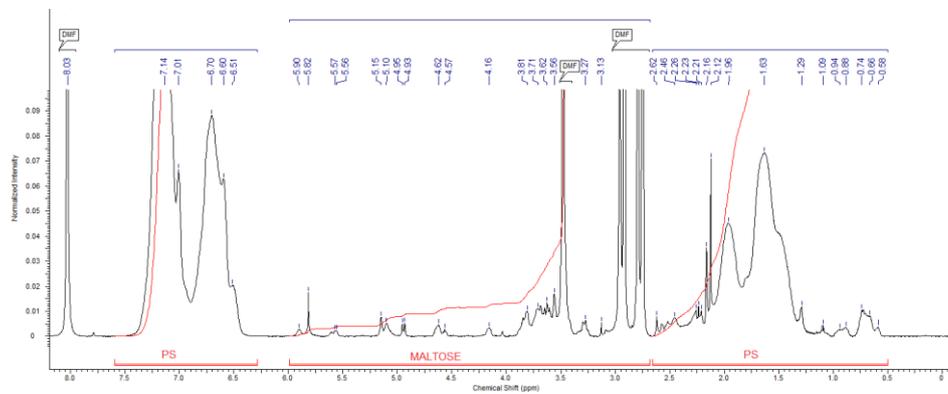


Fig. S27 <sup>1</sup>H NMR spectrum of Mal-*b*-PS<sub>4700</sub>

MALDI-TOF MS<sup>+</sup>: [M+Na]<sup>+</sup> for C<sub>429</sub>H<sub>448</sub>N<sub>2</sub>O<sub>15</sub>S (n=50) Calculated m/z = 5925.41 found = 5925.45

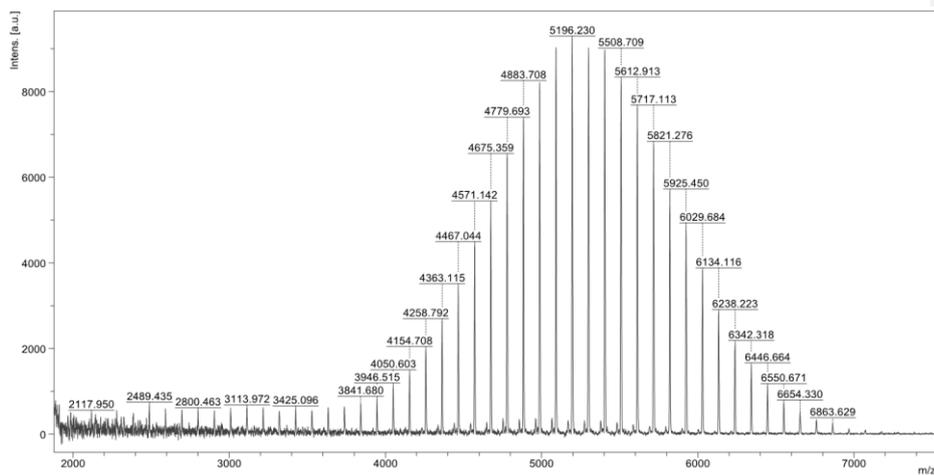


Fig. S28 MALDI-TOF mass spectrum of Mal-*b*-PS<sub>4700</sub>

○ Mal-*b*-PS<sub>4700</sub>:

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz DMF-*d*<sub>7</sub>) δ ppm 0.53 - 0.81 (m, 6H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>-) 0.82 - 2.30 (m, 153H, -CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>-), -CH(Ph)-CH<sub>2</sub>-CH(Ph)-) 2.30 - 5.98 (m, 296H, Carbohydrate, -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CO-CH<sub>2</sub>-CH(S)-CO-) 6.30 - 7.49 (m, 293H, H(aromatic))

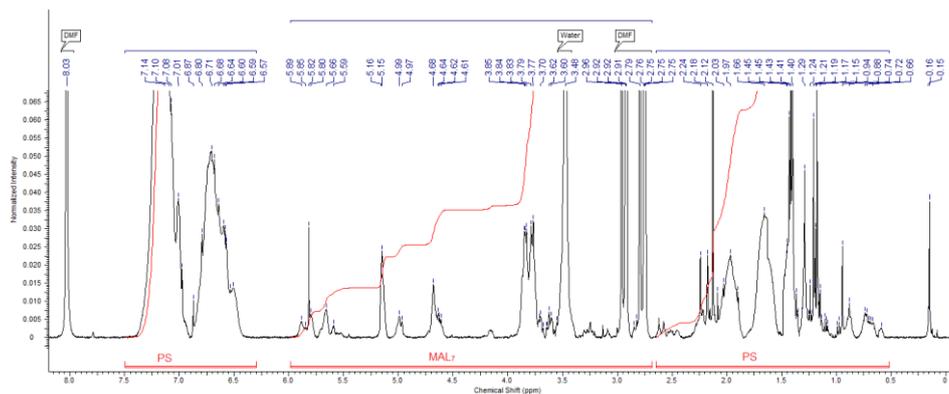


Fig. S29 <sup>1</sup>H NMR spectrum of Mal-*b*-PS<sub>4700</sub>

MALDI-TOF ms+:  $[M+Na]^+$  for  $C_{459}H_{498}N_2O_{40}S$  (n=50) Calculated m/z = 6738.68 found = 6738.66

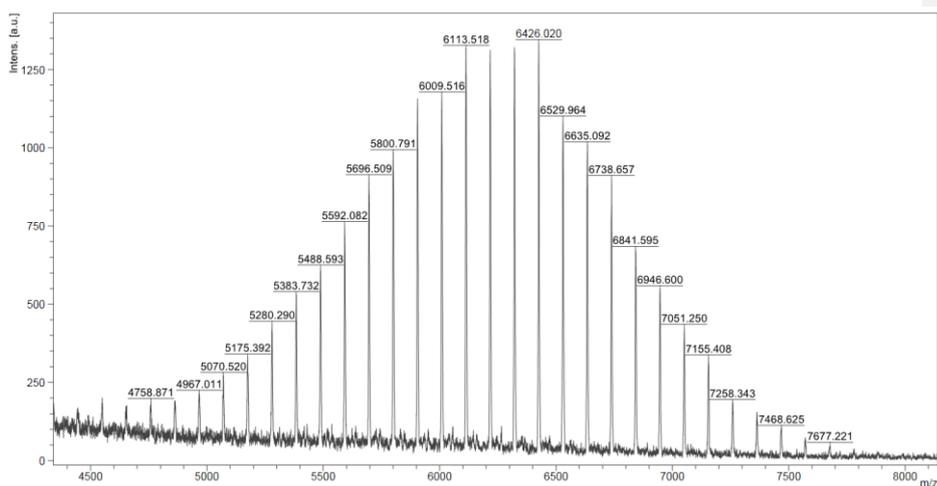


Fig. S30 MALDI-TOF mass spectrum of Mal<sub>7</sub>-b-PS<sub>4700</sub>

○ **XGOs-b-PS<sub>4700</sub>:**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>) δ ppm 0.49 - 0.79 (m, 6H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-) 0.81 - 2.30 (m, 160 H, -CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-, -CH(Ph)-CH<sub>2</sub>-CH(Ph)-) 2.30-5.60 (s, 64 H, H-Carbohydrate, -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CO-CH<sub>2</sub>-CH(S)-CO-) 6.28 - 7.61 (m, 252H, H(aromatic))

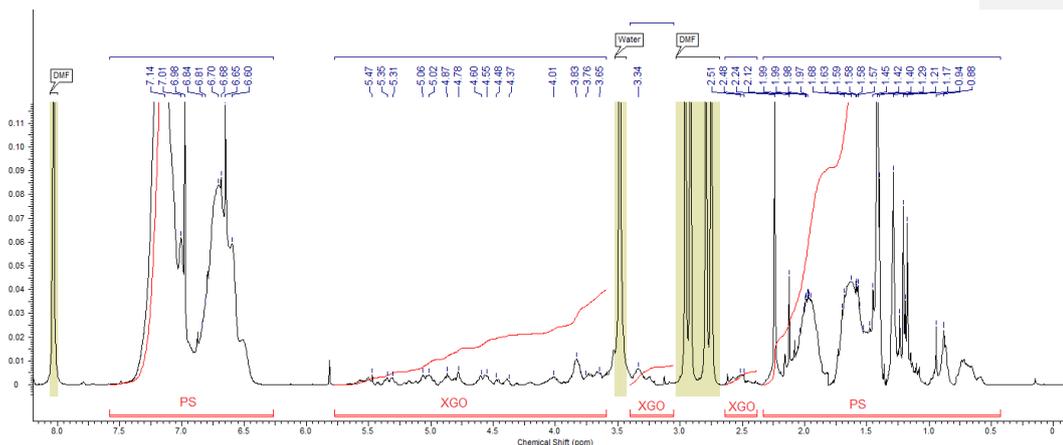


Fig. S31 <sup>1</sup>H NMR spectrum of XGOs-b-PS<sub>4700</sub>

MALDI-TOF MS<sup>+</sup>: [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>416</sub>H<sub>452</sub>N<sub>2</sub>O<sub>37</sub>S (n=50) / **DP7** Calculated m/z = 6127.33 found = 6127.20 / **DP8** [M+Na]<sup>+</sup> Calculated for C<sub>462</sub>H<sub>502</sub>N<sub>2</sub>O<sub>42</sub>S (n=50) m/z = 6810.70 found = 6810.52 / **DP9** [M+Na]<sup>+</sup> Calculated for C<sub>468</sub>H<sub>512</sub>N<sub>2</sub>O<sub>47</sub>S (n=50) m/z = 6972.75 found = 6972.55

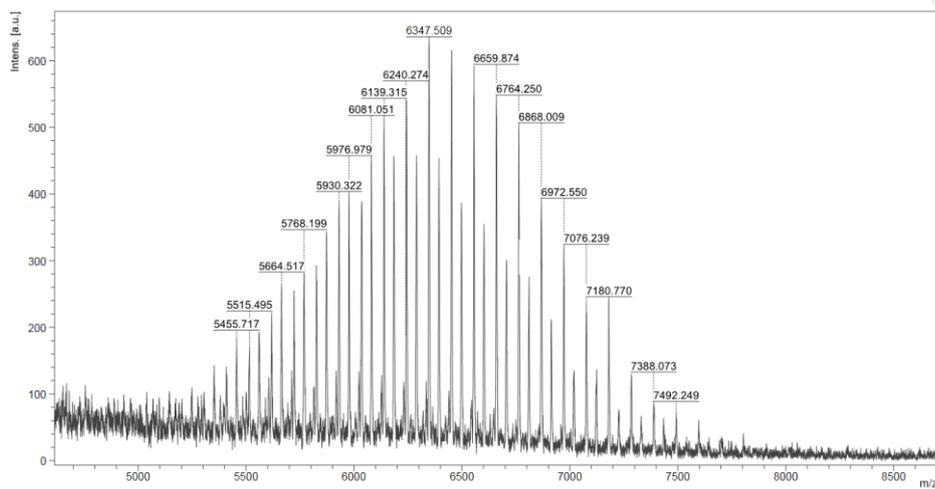


Fig. S32 MALDI-TOF mass spectrum of XGOs-*b*-PS<sub>4700</sub>

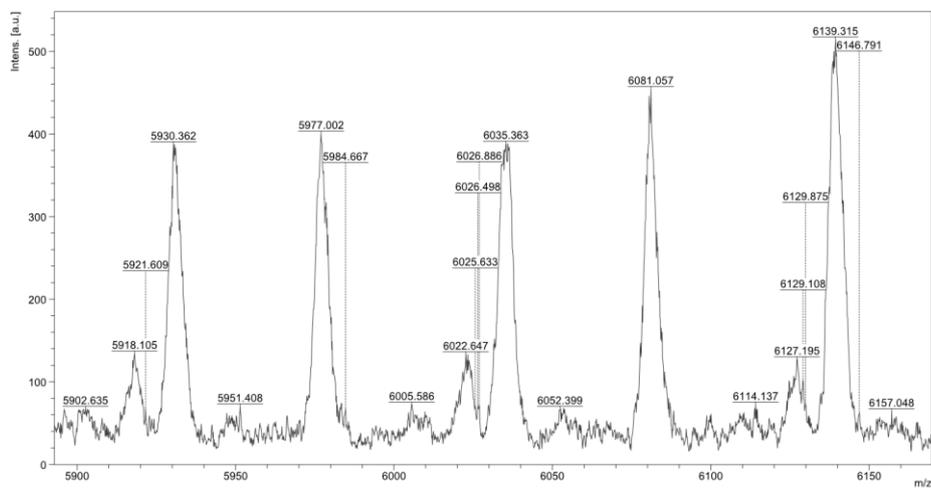


Fig. S33 Enlarged MALDI-TOF mass spectrum of XGOs-*b*-PS<sub>4700</sub>

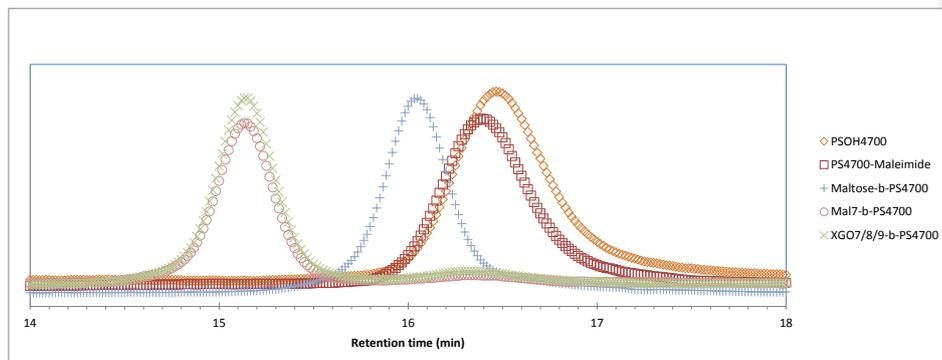


Fig. S34 GPC traces (DMF as eluent) of PS<sub>4700</sub>-OH, PS<sub>4700</sub>-maleimide, and PS<sub>4700</sub>-based block copolymers

## IV. Conclusions et perspectives

Ce projet a permis de développer une variante de la réaction d'amidation en position réductrice d'oligosaccharides pour l'introduction d'une fonction thiol. Cette voie de synthèse a été optimisée et s'est montrée adaptable à de nombreux oligosaccharides. Néanmoins l'utilisation de thiols libres durant la synthèse implique la manipulation d'un mélange de composés disulfures rendant le suivi de réaction difficile jusqu'à l'étape de réduction. La mise au point d'une méthode de protection de la fonction thiol de la cystéamine en amont de l'addition sur les oligosaccharides serait donc bénéficiaire. Une protection du thiol avec une fonction acétate éviterait la formation d'adduits disulfures et permettrait de combiner la *-O*-désacétylation avec la déprotection du groupement thiol. Cette amélioration éliminerait l'étape de réduction des ponts disulfures et éviterait d'utiliser des trialkylphosphines toxiques. Malgré sa complexité, la méthode décrite permet d'obtenir des thio-oligosaccharides avec de bons rendements (76-88%). Le couplage entre les oligosaccharides et le polystyrène-maléimide est quantitatif avec un faible excès de sucre (1.2eq). L'absence de catalyseur pour la réaction de couplage permet d'éviter l'utilisation de méthodes de purification avancées et souvent difficiles à mettre en œuvre sur les composés amphiphiles. Ils sont simplement isolés par précipitation, ce qui permet d'éliminer l'oligosaccharide en excès et d'obtenir les produits purs avec d'excellents rendements.

Les copolymères obtenus ont démontrés des propriétés d'auto assemblage identiques à leurs homologues obtenus par chimie CuAAC. Ce résultat démontre que le passage de la CuAAC à la réaction de thiol maléimide ne modifie pas les propriétés du copolymère et peut donc servir de méthode de remplacement dans les cas où la présence de cuivre est rédhitoire pour les potentielles applications.

La thiol maléimide étant une méthode prometteuse pour le couplage de copolymères à blocs sans utilisation de cuivre, dans le chapitre suivant, nous avons élargi le champ d'application de cette méthode à l'obtention de glycoconjugués biocompatibles.



CHAPITRE III. COPOLYMERES A BLOCS REDOX  
SENSIBLES POUR LE RELARGUAGE  
CONTROLE D'AGENTS HYDROPHOBES

---



## I. Introduction et objectifs

La préparation de copolymères à bloc amphiphiles et biocompatibles par une chimie non métallo-catalysée ouvre la porte aux applications dans le domaine de la nanomédecine. Ce type d'assemblage est de plus en plus utilisé pour le développement de thérapies anticancéreuses. L'utilisation d'agents actifs encapsulés permet de minimiser les doses utilisées et la toxicité générale des molécules actives dans l'organisme. Les nanoparticules ont une excellente perméation cellulaire et la propriété de rétention et d'accumulation passive dans les tissus cancéreux<sup>[142]</sup> ce qui en fait un potentiel outil thérapeutique pour la lutte contre le cancer. Les nanoparticules sont souvent modifiées pour répondre à des changements environnementaux afin de relarguer le principe actif sélectivement. De nombreuses tumeurs cancéreuses hypoxiques présentent un microenvironnement très réducteur ce qui en fait une cible préférentielle pour les stratégies thérapeutiques de « target and delivery » redox.

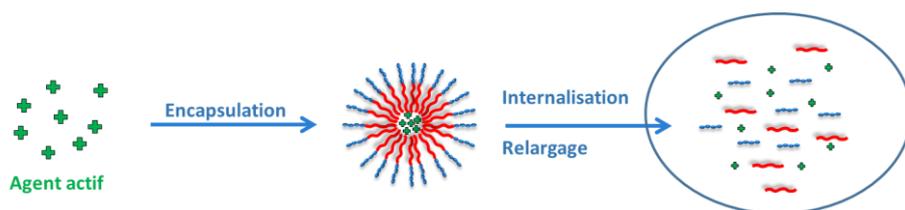


Figure 66 : Stratégie «target and delivery » pour la nano livraison d'agents actifs

Une variation de la réaction de thiol-maléimide utilisant les dérivés bromés permet de former une liaison thio-ether sensible aux conditions réductrices. Cette chimie, couplée à l'utilisation de polymères biocompatibles comme la polycaprolactone (PCL) et un oligosaccharide permettrait de développer un système de relargage contrôlé d'agents actifs en milieu réducteur.

L'objectif de ce projet est premièrement de développer une méthode de préparation de copolymères à blocs biocompatibles utilisant la réaction de thiol-maléimide ou thiol-bromomaléimide. Puis d'étudier les propriétés d'auto assemblage et d'encapsulation d'agents hydrophobes dans les nanoparticules obtenues et finalement d'évaluer le relargage de l'agent encapsulé dans un microenvironnement réducteur.



## II. Redox programmable delivery systems : Sweet block copolymers micelles via, mixed-thiol-(bromo)-maleimides conjugaison

A. Petrelli, R. Borsali, S. Fort and S. Halila\*

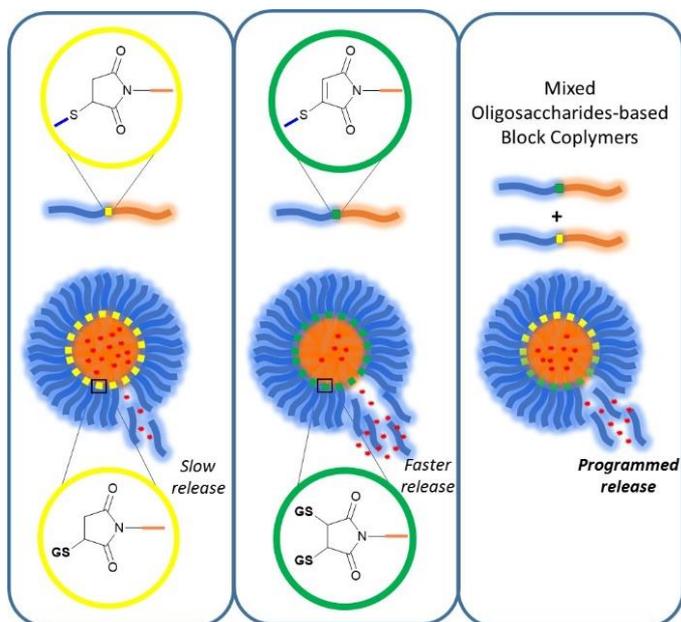
Commenté [AP1]: Voir le Chem comm pour la mise a jour

\* Corresponding author. Tel.: +33-476-037-666; Fax: +33-476-547-203

E-mail address: [sami.halila@cermav.cnrs.fr](mailto:sami.halila@cermav.cnrs.fr)

### TOC Graphical Abstract

A programmable release of Nile Red-encapsulated in xyloglucan-oligosaccharides-*block*-polycaprolactone was successfully achieved by tuning the glutathione-sensitivity of the thiol-(bromo)maleimide conjugaison



## ABSTRACT

Redox stimuli-responsive oligosaccharides-based block copolymers (OBCPs) are synthesized by thiol click conjugation using reducing-end thiol-containing xyloglucooligosaccharides and either maleimide or bromomaleimide terminated polycaprolactone. OBCP with different sensitivity toward glutathione allows us to control the release of micelle encapsulated hydrophobic Nile red.

## INTRODUCTION

Amphiphilic block copolymers (BCPs) designed with modularity and versatility exhibits fascinating self-assembly properties. BCPs are ideal organic materials for the development of drug delivery systems and more generally of nanocarriers.<sup>[143]</sup> Many critical parameters have to be considered in the development of drug delivery systems, among which, their intrinsic toxicity and the controlled spatial and temporal release of the active compound.

In this context, we have already reported a large library of amphiphilic oligosaccharides-based BCPs (OBCPs) that self-assemble in aqueous solution into core-shell micelles composed of an hydrophobic core stabilized by the hydrophilic carbohydrate shell. Carbohydrates are interesting natural building blocks fulfilling the previous requirements; they are abundant, biosourced, hydrophilic, non-toxic, biodegradable and often exhibit biological recognition properties.<sup>[144]</sup> In the course of our investigations, micelles made of chondroitin-sulfate-*b*-polylactic acid,<sup>[129b]</sup> xyloglucan-oligosaccharides (XGOs)-*b*-polycaprolactone<sup>[145]</sup> (PCL), maltoheptaose (Mal<sub>7</sub>)-*b*-polystyrene,<sup>[140]</sup> (Mal<sub>7</sub> or XGO or  $\beta$ -cyclodextrine)-*b*-poly(N-isopropylacrylamide),<sup>[141]</sup> Mal<sub>7</sub>-*b*-poly(methyl methacrylate)<sup>[146]</sup> and even amphiphilic BCPs exclusively constituted of oligosaccharide blocks<sup>[129a]</sup> were synthesized. Despite the extensive development of OBCPs, few studies focusing on nanoparticles responsive to exogenous (light, temperature, magnetic fields etc.) or endogenous (enzyme, redox potential, pH etc.) stimuli have been initiated. In fact, stimuli-responsive nanoparticles aim to address the need for the release of entrapped active molecules with controlled kinetics and specific targeting of tissue or cells. Typically, the release can be tuned by controlling the permeability of the shell- or core-forming BCPs micelles, by integrating stimuli-responsive blocks or by using cleavable or reversible linkages.<sup>[147]</sup>

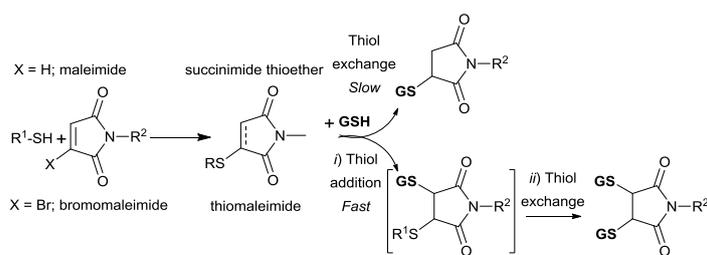
In continuation of our studies, we report, here, a new strategy to fine-tune the release of the solvochromic Nile red probe encapsulated in the core of OBCPs nanoparticles. This strategy

Commenté [AP2]:

takes advantage of the difference of thiol-maleimide and thiol-bromomaleimide redox-responsiveness toward a redox stimulus which offers an opportunity to tailor the release profiles of these “sweet” nanocarriers.

Maleimides are a versatile functional platform for thiol–Michael type addition reactions and they are extensively exploited across multiple areas of soft matter, and material science as well as in biochemistry.<sup>[131, 148a, 148b]</sup> Considering these attractive features, we previously demonstrated an efficient metal-free conjugation of stoichiometric thiol-functionalized oligosaccharides with maleimide-terminated polystyrene which afforded size-homogeneous OBCPs nanoparticle in aqueous solution.<sup>[125]</sup> Many studies indicated that the resulting succinimide thioether could undergo a retro-Michael-type cleavage through thiol exchanges when exposed to a reducing environment such as in presence of glutathione (GSH).<sup>[149a, 149b, 149c]</sup> The tripeptide GSH is one of the most appealing endogenous stimuli for a site-specific drug release since its intracellular concentration (~10 mM) is way higher than in extracellular fluids (~20 μM). Interestingly, in 2009, J. Baker and co-workers have proposed bromomaleimides for the selective and reversible modification of cysteine. Following the substitution reaction yielding a thiomaleimide linkage, the adduct can be easily cleaved by the use of tris(2-carboxyethyl)phosphine.<sup>[110]</sup> Further experiments demonstrated that the thiomaleimide easily undergoes a second thiol addition even with stoichiometric amount of GSH.<sup>[150]</sup> On the others hand, an excess of thiol, resulted in the retro-Michael-type cleavage (Scheme 1).<sup>[151]</sup>

Commenté [AP3]: nécessaire ?



Commenté [AP4]: Faire deux lignes sur le schémas : une pour l'échange lent sur le thiosuccinimide et une autre pour le thiomaleimide pour un souci de clareté non ?

**Scheme 1** Thiol-(bromo)maleimide adducts and GSH-mediated retro-Michael-type cleavage.

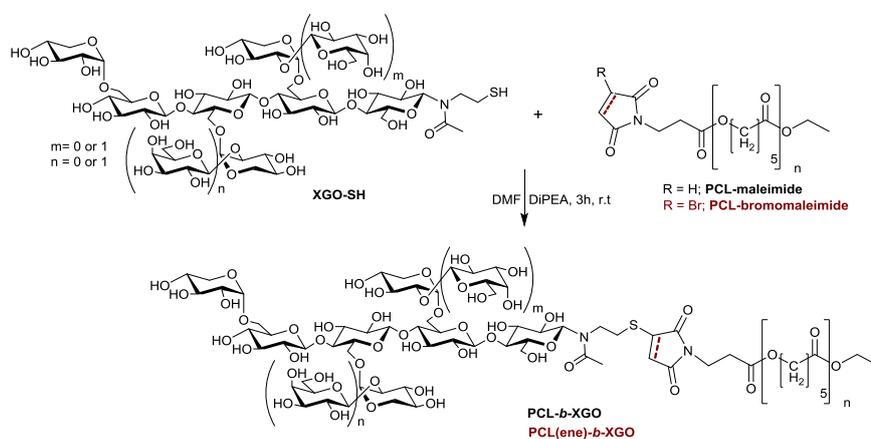
In the light of these results, we anticipated that by playing with the timescale reactivity of GSH towards thiol-maleimide or thiol-bromomaleimide adducts, the release of core-entrapped hydrophobic molecules in OBCPs nanoparticles could be predictably programmed. To achieve such concept, we propose to synthesize and to combine with a predetermined ratio, OBCPs linked either by succinimide thioether or by thiomaleimide.

## RESULTS AND DISCUSSION

GSH-responsive oligosaccharide-*b*-polycaprolactone copolymers were prepared according to the strategy depicted in scheme 2. First, we decided to incorporate the thiol function at the reducing-end of the size-defined XGOs blocks which were obtained from controlled enzymatic depolymerization of the hemicellulose xyloglucan. XGOs consist of a cellotetraose backbone regularly substituted by 3 xylosyl units themselves linked to 0, 1 or 2 terminal galactosyl units. As already reported in our previous paper,<sup>[125]</sup> the thiol function was regioselectively introduced at the anomeric position by an amination reaction with cystamine, followed by subsequent *N*-acetylation, *O*-deacetylation, and disulfide reduction using tributylphosphine. XGO-SH was obtained from this four-step procedure with 80% overall yield.

Commercially available hydroxyl-terminated polycaprolactone (PCL-OH, MW 4100 g mol<sup>-1</sup> PI = 1.01) was chosen as a biocompatible and biodegradable hydrophobic block. Maleimide or bromomaleimide group was incorporated by Steglich esterification using 3-propionyl maleimide acid or 3-propionylbromomaleimide acid and PCL-OH affording PCL-maleimide and PCL-bromomaleimide, with 66% and 70% yield respectively. A simple precipitation/filtration step in cold methanol was necessary to purify the modified PCL. It is noteworthy that an excess of 3-propionyl maleimide acid (10 equiv.) and DCC (10 equiv.) was required in order to achieve a complete functionalization of the PCL. <sup>1</sup>H NMR spectra (Fig. S8-S10 in SI) clearly displayed a shift from 3.65 ppm to 3.83 ppm of the peak related to the methylene protons next to the OH function for the PCL-maleimide conjugate. A shift to 3.87 ppm was observed for the PCL-bromomaleimide. The maleimido group was further confirmed by the presence of the characteristic intense single peak related to the alkenes protons around  $\delta$  6.7 ppm. This signal integrated for 2H for the maleimide and 1H for the bromomaleimide thus confirming the presence of the bromide moiety. MALDI-TOF mass spectrometry was very helpful since it obviously confirmed the complete conversion of starting material and a mass gain of + 151 *m/z* (for maleimide) and + 231 *m/z* (for bromomaleimide). (Fig. S9-S11 in SI).

COPOLYMERS A BLOCS REDOX SENSIBLES POUR LE RELARGUAGE CONTROLÉ D'AGENTS HYDROPHOBES



**Scheme 2** Synthesis by thiol “click” reaction of OBCPs to give PCL-*b*-XGO and PCL(ene)-*b*-XGO.

The synthesis of amphiphilic OBCPs was carried out in DMF which solubilized both blocks (scheme 2). Diisopropylethylamine (DiPEA) was used both as a base to catalyze the thiol-Michael addition and as a quencher to trap the hydrobromic acid formed during the reaction with bromomaleimide.<sup>[107]</sup> Mixing PCL<sub>4100</sub>-maleimide with XGO-SH in DMF with DiPEA at room temperature resulted in the successful and complete formation of PCL-*b*-XGO. While the reaction without DiPEA took 24 h to reach completion, the kinetic was significantly improved with the base catalyst with a 3h reaction time. In a practical way, the hybrid OBCPs were isolated with 85% average yield by simple precipitation in an ice-cold mixture of MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2, v/v). MALDI-TOF mass spectrometry and <sup>1</sup>H NMR of OBCPs unambiguously showed that the thiol-Michael addition reactions have occurred in an efficient manner. The coupling reaction for PCL-*b*-XGO was corroborated by the disappearance of the olefinic signal in the <sup>1</sup>H NMR spectra of the maleimide moiety (Fig. S12 SI) at  $\delta$  6.7 ppm. As expected, in the case of PCL(ene)-*b*-XGO (Fig. S15 SI), the olefinic signal is conserved. Quantitative reactions were confirmed by GPC analysis which revealed a monomodal distribution shifted to shorter retention time due to the higher volume fraction of the hybrid OBCP (Fig. S18 SI). In addition, since the maleimide moiety is UV active, the UV detector did not detect PCL-*b*-XGO whereas PCL-maleimide, PCL-bromomaleimide and PCL(ene)-*b*-XGO were detected (Fig. S18 in SI).

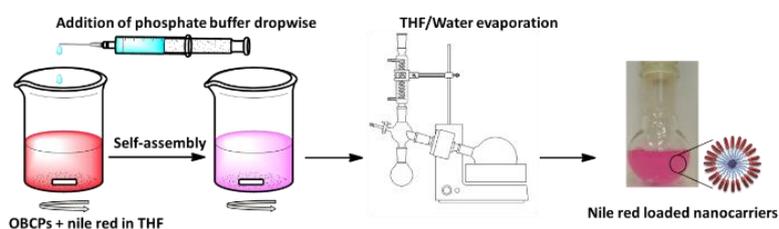


Fig. 1 Nile red encapsulation by the co-solvent method.

To assess the GSH-responsiveness of OBCPs nanocarriers, we formulated micellar nanoparticles by the co-solvent method also called nanoprecipitation, and encapsulated the model payload Nile red (Fig. 1). The process relies on the slow solvent shifting from THF to a large volume of aqueous solution, triggering the self-assembly into Nile red-encapsulating core-shell micelles. Due to the highly solvatochromic behavior of Nile red, the color of the THF solution shifted from red to pink when the phosphate buffer was added (Fig. 1). The ability of OBCPs to encapsulate Nile red was assessed by sonication in DMF of the nanocarriers and fluorescence titration. The results afforded a drug loading efficiency of 53 wt. % and 63 wt. % and drug loading content of 2.6 wt. % and 3.1 wt. % for PCL-*b*-XGO and PCL(ene)-*b*-XGO, respectively. These values indicated moderate interactions between Nile red and the PCL-core forming OBCPs micellar nanoparticles.

Commenté [AP5]: C'est deux méthodes différentes non ?

OBCPs	$R_h^a$ (nm)	Nile-red-encapsulating OBCPs		
		Drug loading efficiency <sup>b</sup>	Drug loading content <sup>b</sup>	$R_h^a$ (nm)
PCL- <i>b</i> -XGO	15	53 %	2,6 %	11
PCL(ene)- <i>b</i> -XGO	12	63 %	3,1 %	13

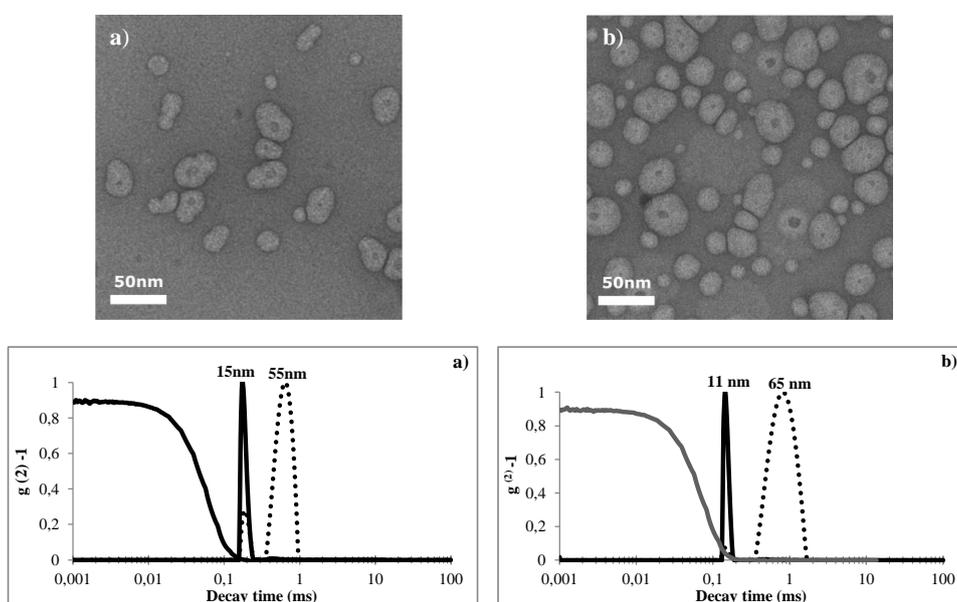
<sup>a</sup>DLS measurements showed a bimodal distribution for all the PCL<sub>4100</sub>-*b*-XGO BCs. <sup>b</sup>Weight %

Table 1 Nile red encapsulation efficiency and hydrodynamic radius of OBCP micellar nanoparticles

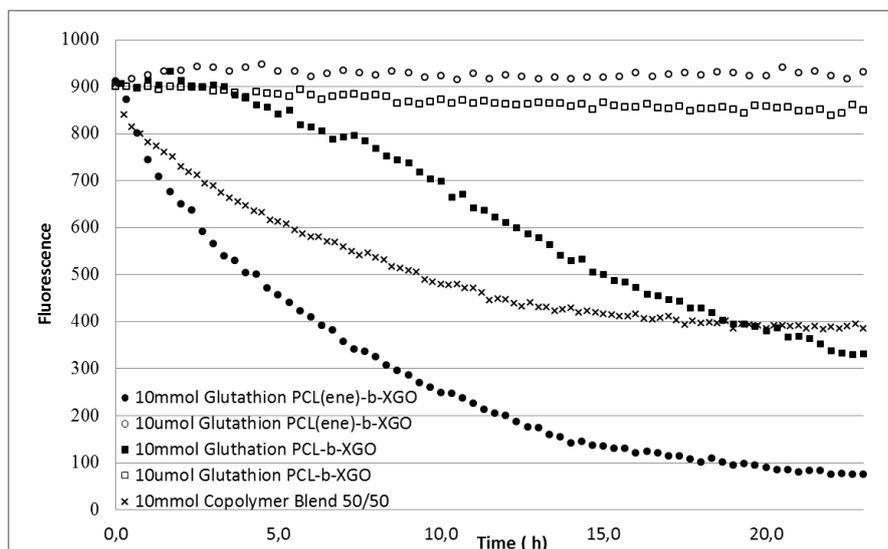
The size and the morphology of the micelles were investigated using DLS measurements and TEM imaging. The weight-average size distribution showed a bimodal behavior with a first distribution for the size in the range of 11-15nm and the second one in the range of 55-111 nm. The slow time peak could be reasonably attributed to the presence of aggregates. The hypothesis of the existence of very few aggregates is confirmed when plotting the size distribution in number average (Fig. 2b at bottom, plain line). Their numbers were very small and therefore,

only the fastest relaxation time dominated the dynamics of the system. The average size measured from the TEM images was consistent with the DLS analysis and confirmed that small spherical micelles were predominant.

Interestingly, the size between PCL-*b*-XGO and PCL(ene)-*b*-XGO nanoparticles were roughly similar, underlying no contribution of the succinimide thioether or thiomaleimide adducts on the geometry of the copolymers. For the Nile red-loaded nanoparticles, the size remained almost unaffected and ideally permitted to compare the release rate on the basis of the adduct reactivity toward GSH.



**Fig. 2** TEM images (at the top) and DLS (at bottom) autocorrelation function ( $g^{(2)}-1$ ) measured at  $90^\circ$  (weight (dashed line) and number (plain line) radius distribution) of the self-assembled nanoparticles of a) PCL-*b*-XGO and b) PCL(ene)-*b*-XGO in water ( $c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) at  $25^\circ\text{C}$ .



**Fig. 3** Kinetic of encapsulated Nile red release from PCL-*b*-XGO, PCL(ene)-*b*-XGO and 50/50 blend micelles in 10 mmol or 10 μmol of GSH.

Here we investigate redox-triggered release of Nile red encapsulated in PCL-*b*-XGO and PCL(ene)-*b*-XGO. Nile red is fluorescent, but only in an hydrophobic environment. That means that the release of Nile Red from OBCPs in aqueous solution can be easily monitored by measuring the decrease of fluorescence. When the OBCPs were exposed to micromolar concentration of GSH, mimicking the level found in extracellular compartments, the fluorescence remained unchanged, indicating stable OBCPs nanoparticles (Fig. 3). Size variations over time assessed by DLS were negligible (data not shown). By contrast, increasing the GSH content to millimolar concentration, mimicking the intracellular medium, resulted in a clear decrease of the fluorescence was observed OBCPs but with different release profiles. The PCL-*b*-XGO nanoparticles were stable during the first four hours before to be destabilized in favor to a progressive release of Nile red. While for loaded PCL(ene)-*b*-XGO nanoparticles, the release was immediate, fast, and almost total after 24 h. At 10 mmol of GSH, the half-time for the release was estimated to 16 h for PCL-*b*-XGO against 5 h for PCL(ene)-*b*-XGO. With these experiments and as expected, we have demonstrated a more sensitive GSH-responsiveness for thiomaleimide than for succinimide thioether. We decided to take advantage of this difference of sensitivity and a step further consisted to mix both OBCPs in order to control the release rate. An equimolar mixture of PCL-*b*-XGO and PCL(ene)-*b*-XGO was

prepared and nanoprecipitation with Nile red was performed as previously described. The release profile assessment at 10 mmol of GSH exhibited a fascinating intermediate behavior with a release half-time of 11h. The release is fast at the beginning and slows down rapidly to reach a slow linear release of the remaining encapsulated Nile red. This profile was anticipated by the fast consumption of the thiomaleimide in the first part of the kinetics followed by a slower release due to the succinimide thioether. These results demonstrated that the release can be fine-tuned thanks to an appropriate mixture of OBCPs with different sensitivity for GSH.

## CONCLUSION

In summary, maleimide and bromomaleimide terminated PCL polymers reacted efficiently with thiol-functionalized carbohydrates to afford OBCPs with self-assembling and encapsulating properties in aqueous solution. Nile red was successfully encapsulated into the OBCPs and was released while exposed to a reductive environment. GSH reacted more easily toward thiomaleimide than with the succinimide thioether. With succinimide based PCL-*b*-XGO, the GSH-mediated cleavage was progressively done by thiol exchange while for maleimide based PCL(ene)-*b*-XGO, GSH promptly reacted on the thiol-reactive alkene. This difference of reactivity was exploited to tune the drug release rate by simply mixing both OBCPs. This strategy constitutes an unprecedented, elegant and straightforward way to time-program the release in physiological environment of encapsulated functional species with a GSH trigger. We will extend the possibilities offered by the maleimide platform to prepare other cleavable sugar-based block copolymers architectures.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank MENRT for the PhD fellowship to A. Petrelli as well as CNRS, Carnot Institut Polynat, Labex Arcane (ANR-11-LABX-0003-01) and Greenanofilm project funded by European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under grant agreement no 603519. We gratefully acknowledge analytical platforms of ICMG (FR 2607) for their support and C. Travelet and J.L. Putaux for their technical assistances in light scattering and electronic microscopy techniques, respectively.



### III. Supporting Information

#### Materials

Hydroxy-terminated  $\gamma$ -polycaprolactone (PCL-OH)  $M_w = 4100 \text{ g mol}^{-1}$  was purchased from Polymer Source (Dorval, QC, Canada), and used as received. dimethylaminopyridine (DMAP), dicyclohexylcarbodiimide (DCC), beta alanine, diisopropylethylamine (DiPEA), maleic anhydride, bromomaleic anhydride was obtained from Sigma-Aldrich. Maleimidopropionic acid and bromo- maleimidopropionic acid were prepared following a previously described procedure.<sup>[152]</sup> *N,N*-dimethylformamide (DMF) was distilled under vacuum and stored over activated molecular sieves 4Å. Dichloromethane (DCM) was washed with deionized water to remove the ethanol stabilizer, followed by drying over calcium hydride and subsequent distillation. Tamarind seed Xyloglucan from Saiguru Food Gum manufacturer (Bombay, India) was previously purified by dissolving in deionized water (2% w/v), boiling for 1h then removing the insoluble materials by filtration. XGOs consisting of 7, 8 or 9 sugar units were prepared by enzymatic hydrolysis of xyloglucan according to a previously published procedure.<sup>[82]</sup> Thiol-oligosaccharides were synthesized according to a previously described procedure.<sup>[125]</sup>

#### Equipment

NMR analyses were recorded at 25°C on a Bruker Advance DRX400 spectrometer. Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in ppm. The solvent residual peaks of D<sub>2</sub>O, DMF, and CDCl<sub>3</sub> were used as internal standards, at 4.75 ppm, 8.03 ppm and 7.27 ppm, respectively. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) measurements were performed on a Bruker Daltonics Autoflex apparatus using 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) as a matrix. High resolution mass spectrometry was carried on a Waters Xevo™ G2-S QTOF (quadrupole hybrid with orthogonal acceleration time-of-flight) mass spectrometer apparatus. For functionalized PCL and OBCPs, gel permeation chromatography (GPC) measurements were performed at 60 °C using 1260 Infinity GPC system (Agilent Technologies) (100  $\mu$ L manual injection system, 1260 Agilent quaternary pump, 1260-MDS refractive index detector) equipped with two Agilent PolyPore PL1113-6500 columns (linear, 7.5  $\times$  300 mm; particle size, 5  $\mu$ m; exclusion limit, 200 – 2 000 000) in DMF containing lithium chloride (0.005 M) at the flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Dynamic light scattering experiments were carried out at room temperature using an ALV laser goniometer, which consists of a 22 mW HeNe linearly polarized laser operating at

a wavelength of 632.8 nm and an ALV-5000/EPP multiple  $\tau$  digital correlator with 125 ns initial sampling time. Transmission electron microscopy (TEM) experiments were carried out using a CM220 Philips microscope. Fluorescence experiments were carried on a Perkin Elmer LS-50B spectrometer with a pulsed high pressure xenon source.

#### **Dynamic light scattering measurements (DLS)**

The nanoparticle suspensions were directly poured into the glass cells, and the measurements were carried out at a 90° angle with 60 s sampling time. In DLS, the relaxation time distribution was obtained using the CONTIN analysis of the autocorrelation function ( $g^{(2)}-1$ ). From the linear dependence of the relaxation frequency ( $1/\tau$ ) as a function of the squared wave vector modulus ( $q^2$ ), the diffusion coefficient ( $D_{\text{diff}}$ ) of the nanoparticles was calculated. The hydrodynamic radius ( $D_h$ ) was then obtained from  $D_{\text{diff}}$  using the Stokes–Einstein relation.

#### **Transmission electron microscopy (TEM) observations**

TEM was carried out using a M200 Philips microscope (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) operating at 80 kV, and images were recorded on Kodak SO163 films. A droplet of nanoparticle suspension was deposited onto glow-discharged carbon-coated copper grids. After a few minutes, the liquid in excess was blotted with filter paper and the sample was air-dried overnight prior to imaging.

#### **GENERAL PROCEDURES:**

- **Cystamine neutralization :**

Cystamine dihydrochloride, from Sigma-Aldrich, was neutralized with a stoichiometric amount of NaOH (2 M) in water, and then evaporated to dryness. The oily residue was extracted with dichloromethane, dried over sodium sulfate and filtrated. The mother liquor was evaporated to dryness to give the free base as yellow oil.

- **Xyloglucan purification and hydrolysis :**

Tamarind seed Xyloglucan from Saiguru Food Gum manufacturer (Bombay, India) was previously purified by dissolving in deionized water (2% w/v), boiling for 1h then removing the insoluble materials by filtration. XGOs consisting of 7, 8 or 9 sugar units were prepared by enzymatic hydrolysis of xyloglucan according to a previously published procedure.<sup>[82]</sup>

#### **STARTING MATERIAL CHARACTERIZATION:**

○ Xylooligosaccharides (XGOs):

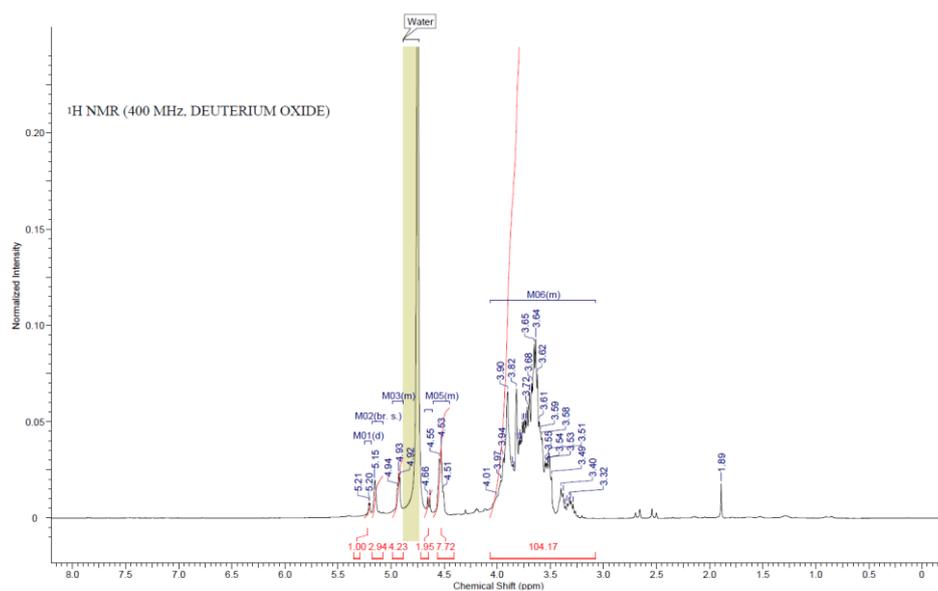


Fig. S1 <sup>1</sup>H NMR spectrum of XGOs (DP7, DP8 and DP9)

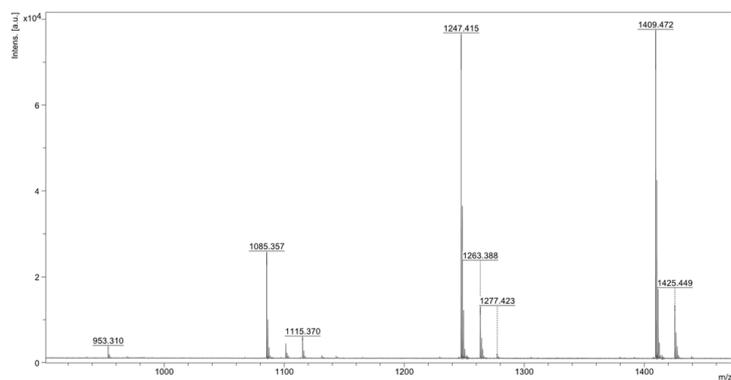


Fig. S2 MALDI-TOF mass spectrum of XGOs (DP7, DP8 and DP9)

COPOLYMERES A BLOCS REDOX SENSIBLES POUR LE RELARGUAGE CONTROLÉ D'AGENTS HYDROPHOBES

○ PCL<sub>4100</sub>-OH :

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) 1.26 (t, J=7.09 Hz, 3 H CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-) 1.39 (quin, J=7.64 Hz, 58 H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) 1.55 - 1.74 (m, 116 H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) 2.31 (t, J=7.58 Hz, 58 H, -C(O)-CH<sub>2</sub>-) 3.63 (t, J=7.21 Hz, 2 H, -CH<sub>2</sub>-OH) 3.97 - 4.10 (m, 54 H, -CH<sub>2</sub>-O-(CO)) 4.14 (q, J=7.09 Hz, 2 H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)

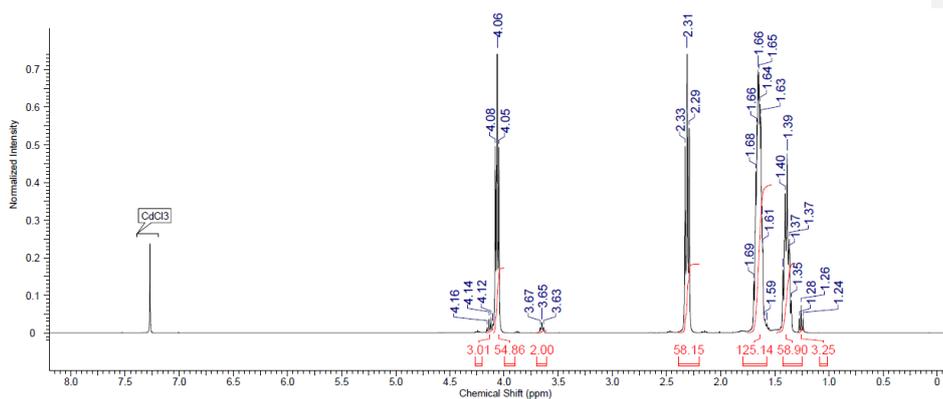


Fig. S3 <sup>1</sup>H NMR spectrum of PCL<sub>4100</sub>-OH

MALDI-TOF MS<sup>+</sup>: [M+Na]<sup>+</sup> for C<sub>182</sub>H<sub>306</sub>NaO<sub>61</sub>(n=30) Calculated m/z= 3493.08 ; found = 3493.96

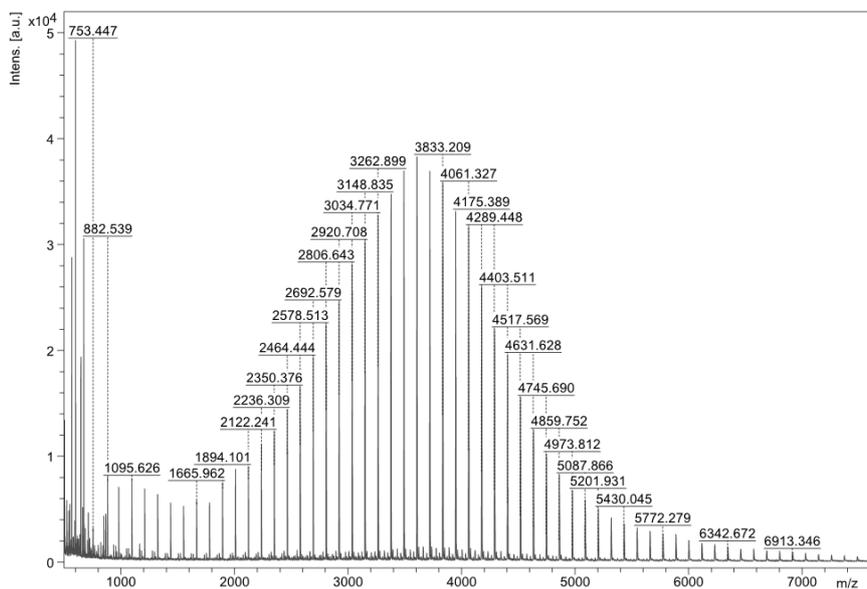
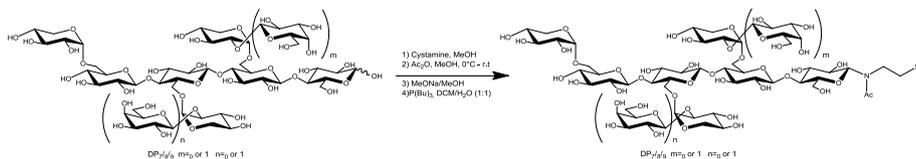


Fig. S4 MALDI-TOF mass spectrum of PCL<sub>4100</sub>-OH

○ *N*-( $\beta$ -xylooligoglucosyl)-2-acetamino-1-ethanethiol (XGOs-SH)



*N*-( $\beta$ -xylooligoglucosyl)-2-acetamido-1-ethanethiol were prepared according to procedure described in our previous work.<sup>[125]</sup>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm): 2.10-2.32 (2 x s, 3H, rotamers, -NCOCH<sub>3</sub>), 2.60 - 2.83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-SH), 3.29-4.02 (m, 51H, H-2,3,4,5,6 GlcI-IV, Gal II-III, H-2,3,4,5<sup>Xyl</sup> II-IV, NCH<sub>2</sub>), 4.45-4.62 (m, 4H, H-1<sup>GlcII-IV, Gal II-III</sup>), 4.90 - 4.98 (m, 2H, H-1<sup>XylIII-III</sup>), 5.02 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-1<sup>GlcI</sup>, rotamer I), 5.17 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-1<sup>XylIV</sup>), 5.40 (d, *J* = 8.6 Hz, H-1<sup>GlcI</sup>, rotamer II);

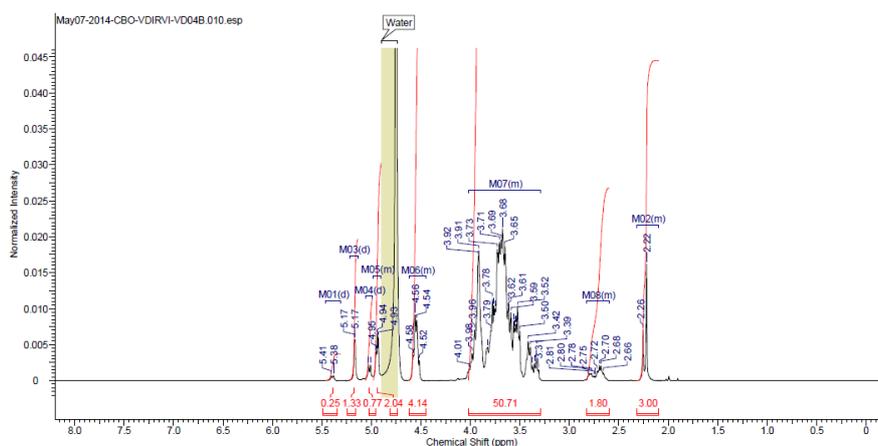


Fig. S5 <sup>1</sup>H NMR spectrum of XGOs-SH

COPOLYMERES A BLOCS REDOX SENSIBLES POUR LE RELARGUAGE CONTROLÉ D'AGENTS HYDROPHOBES

$^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm) 21.3, 21.7, 22.0, 23.3 (2 x 1C, rotamers, -CH<sub>2</sub>-SH), 60.1, 61.0, 61.2, 61.5, 65.9, 66.7, 68.6, 69.4, 69.5, 69.5, 69.9, 71.1, 71.5, 71.9, 72.6, 72.7, 73.0, 73.3, 73.6, 74.1, 74.3, 75.1, 75.6, 76.8, 78.7, 79.8, 80.2, 86.7, 98.3, 98.9, 102.6, 102.9, 103.0, 104.5, 175.5, 176.5 (2 x 1C, rotamers, -NCOCH<sub>3</sub>);

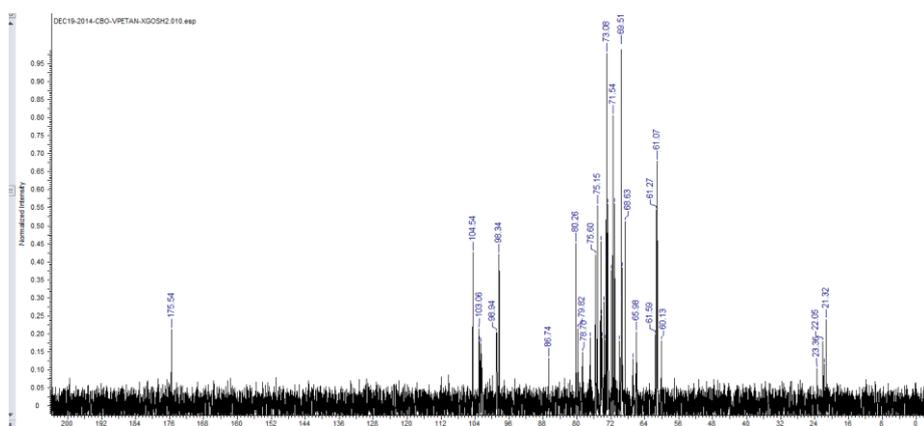


Fig. S6  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of XGOs-SH

MALDI-TOF MS<sup>+</sup>: **DP<sub>7</sub>** [M+Na]<sup>+</sup> for C<sub>43</sub>H<sub>73</sub>NO<sub>33</sub>S calculated m/z = 1186.37 found m/z = 1186.31 / MALDI-TOF MS<sup>+</sup>/ **DP<sub>8</sub>** [M+Na]<sup>+</sup> for C<sub>49</sub>H<sub>83</sub>NO<sub>38</sub>S calculated m/z = 1348.42 found m/z = 1348.36 MALDI-TOF MS<sup>+</sup>**DP<sub>9</sub>** [M+Na]<sup>+</sup> for C<sub>55</sub>H<sub>93</sub>NO<sub>43</sub>S calculated m/z = 1510.47 found m/z = 1510.42

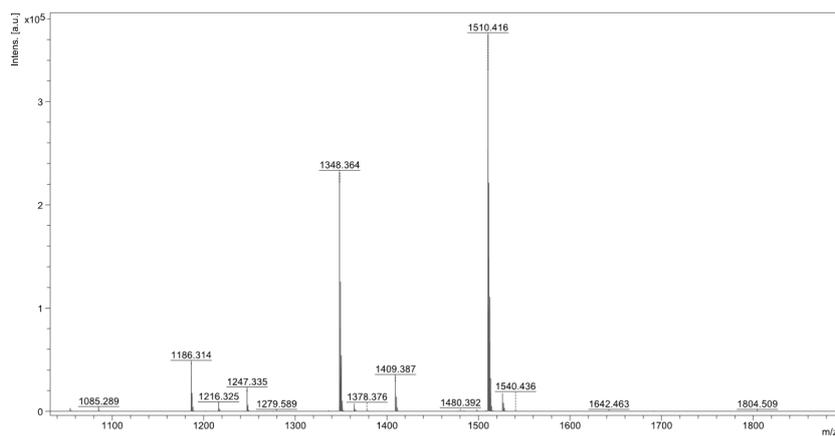
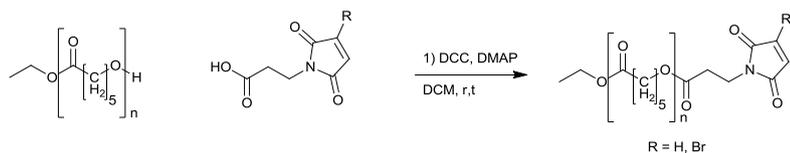


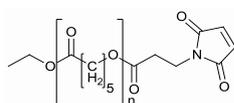
Fig. S7 MALDI-TOF mass spectrum of XGOs-SH

**PCL<sub>4100</sub>-maleimides :**



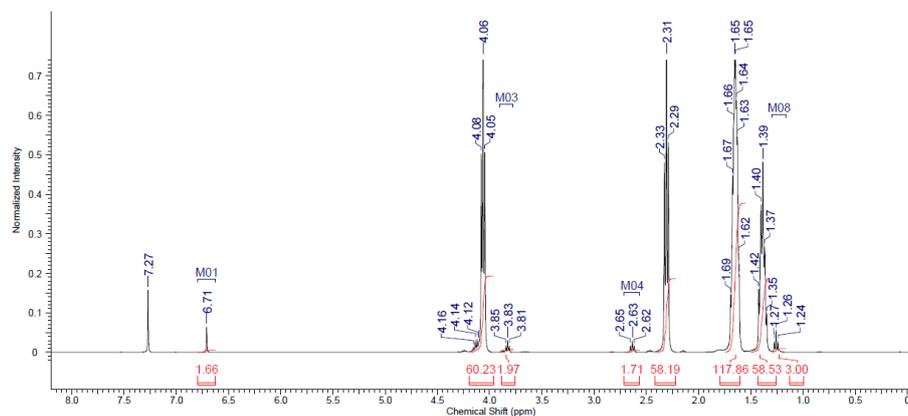
The synthesis of PCL-(bromo)maleimide was performed by a Steglich esterification with maleimidopropionic acid or bromo-maleimidopropionic acid . Mono-hydroxy terminated polycaprolactone (PCL-OH) (0.2 mmol) was dissolved in DCM (10 mL) followed by the addition of maleimidopropionic acid or bromomaleimidepropionic acid (2 mmol) and DMAP (0.1 mmol). The solution was cooled down to 0°C and then DCC (2 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 1 h at 0°C, allowed to warm up to room temperature and stirred 16 h. The white precipitate was removed by filtration and washed twice with DCM. The filtrate was concentrated to a final volume of 10 mL and the polymer was precipitated with cold methanol. The solid was rinsed twice with Methanol, and then dried to afford the corresponding PCL<sub>4100</sub>-maleimide or PCL<sub>4100</sub>-bromomaleimide as a white solid.

○ **PCL<sub>4100</sub>-maleimide**



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) 1.26 (t, *J*=7.09 Hz, 3 H CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-) 1.39 (quin, *J*=7.64 Hz, 58 H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- CH<sub>2</sub>-) 1.55 - 1.74 (m, 118 H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- CH<sub>2</sub>) 2.31 (t, *J*=7.58 Hz, 58 H, -C(O)-CH<sub>2</sub>-) 2.63 (t, *J*=7.09 Hz, 2 H, -C(O)-CH<sub>2</sub>-) 3.83 (t, *J*=7.21 Hz, 2 H, N-CH<sub>2</sub>-) 3.97 - 4.10 (m, 60 H) 6.71 (s, 2 H, -CH=CH-)

Fig. S8 <sup>1</sup>H NMR spectrum of PCL<sub>4100</sub>-maleimide



MALDI-TOF MS<sup>+</sup>: [M+Na]<sup>+</sup> for C<sub>189</sub>H<sub>311</sub>NO<sub>64</sub>(n=50) Calculated m/z= 3644.11 ; found = 3645.58

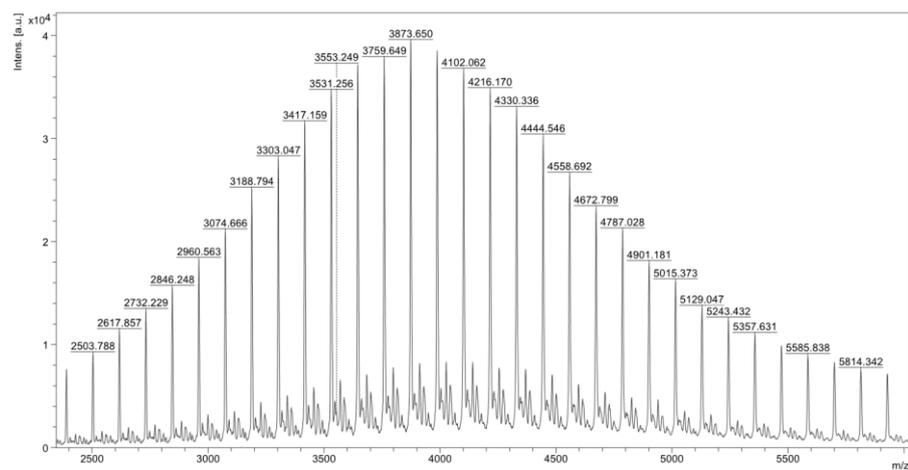
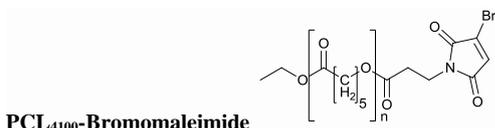


Fig. S9 MALDI-TOF mass spectrum of PCL<sub>4100</sub>-maleimide

COPOLYMERES A BLOCS REDOX SENSIBLES POUR LE RELARGUAGE CONTROLÉ D'AGENTS HYDROPHOBES



○ PCL<sub>4100</sub>-Bromomaleimide

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) 1.26 (t, *J*=7.09 Hz, 3 H CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-) 1.41 (quin, *J*=7.64 Hz, 57 H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) 1.55 - 1.74 (m, 117 H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) 2.31 (t, *J*=7.58 Hz, 57 H, -C(O)-CH<sub>2</sub>-) 2.65 (t, *J*=7.09 Hz, 2 H, -C(O)-CH<sub>2</sub>-) 3.87 (t, *J*=7.21 Hz, 2 H, N-CH<sub>2</sub>-) 4.05 - 4.16 (m, 59 H) 6.89 (s, 1 H, -CH=C(Br)-)

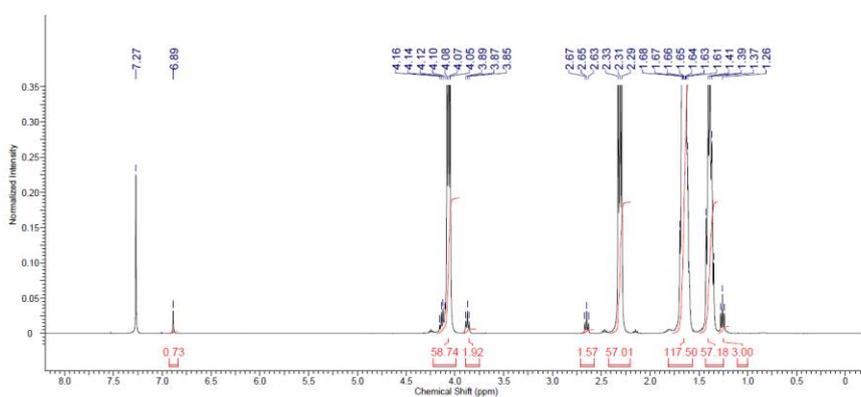


Fig. S10 <sup>1</sup>H NMR spectrum of PCL<sub>4100</sub>-Bromomaleimide

MALDI-TOF MS<sup>+</sup>: [M+Na]<sup>+</sup> for C<sub>189</sub>H<sub>310</sub>BrNO<sub>64</sub> (n=50) Calculated m/z =3724.02 found =3723.881

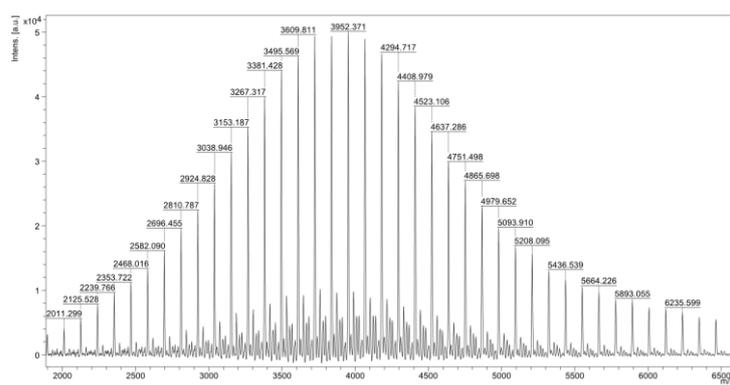
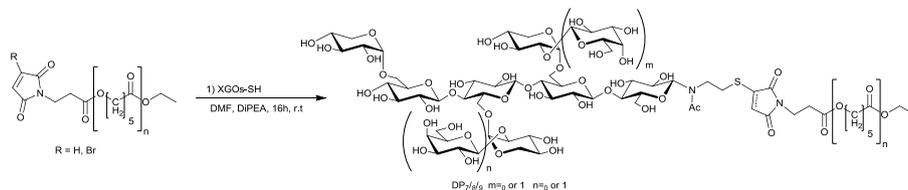


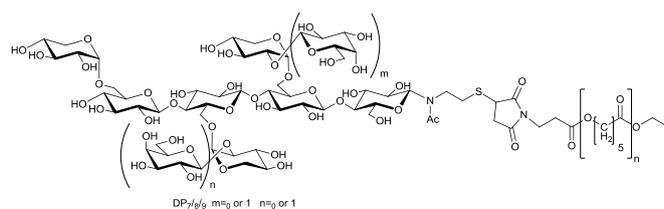
Fig. S11 MALDI-TOF mass spectrum of PCL<sub>4100</sub>-Bromomaleimide

### XGOs-*b*-Polycaprolactone



PCL-(bromo)maleimide (0.02 mmol), XGO-SH (0.024 mmol) were dissolved in 1 mL of DMF containing 1 eq of DIPEA and stirred under argon for 3h. The copolymer was precipitated with MeOH/H<sub>2</sub>O (8:2, v/v) solvent mixture, filtrated and washed with the same solvent mixture. The solid was dried under vacuum to yield the corresponding BCP as a white solid.

#### o PCL<sub>4100</sub>-*b*-XGOs :



PCL<sub>4100</sub>-*b*-XGO<sub>7/8/9</sub>: Yield: 88%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMF) δ ppm 1.22 (t, J=7.1 Hz 3H, (PCL) -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) 1.39 (quin, J=7.09 Hz, 70 H, (PCL) -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) 1.59 - 1.68 (m, 133 H, (PCL) -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) 2.35 (t, J=7.34 Hz, 70 H, (PCL)- C(O)-CH<sub>2</sub>) 3.20-3.80 (m, 70H, Carbohydrate, -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CO-CH<sub>2</sub>-CH(S)-CO-) 3.95- 4.15 (m, 70 H, (PCL), - C(O)-O-CH<sub>2</sub>-) 4.20-5.60 (m, 23H, Carbohydrate, -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CO-CH<sub>2</sub>-CH(S)-CO-);

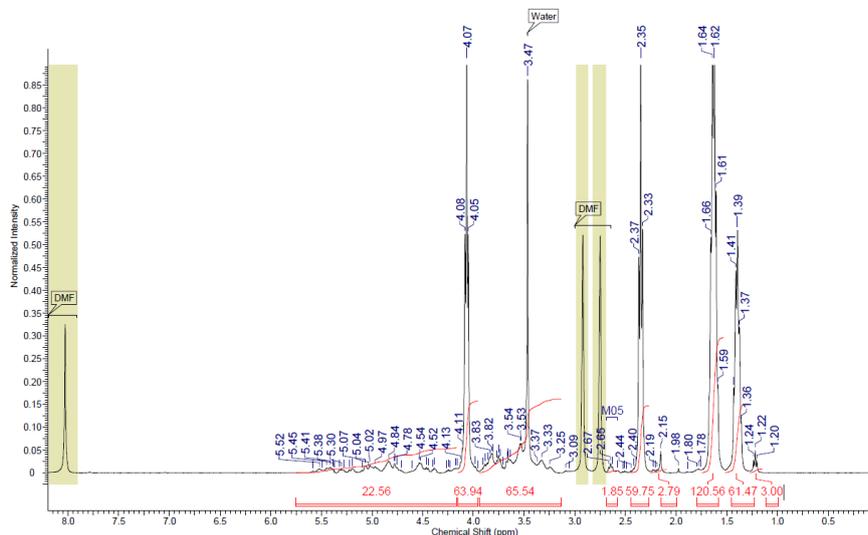


Fig. S12  $^1\text{H}$  NMR spectrum of  $\text{PCL}_{4100}\text{-}b\text{-XGOs}$

MALDI-TOF  $\text{MS}^+$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+ \text{C}_{232}\text{H}_{384}\text{N}_2\text{NaO}_{97}\text{S}$  ( $n=20$ ) / **DP7** Calculated  $m/z = 4807.49$  found = 4809.20 / **DP8** Calculated for  $\text{C}_{238}\text{H}_{394}\text{N}_2\text{NaO}_{102}\text{S}$  ( $n=20$ )  $m/z = 4969.54$  found = 4971.58 / **DP9** Calculated for  $\text{C}_{244}\text{H}_{404}\text{N}_2\text{NaO}_{107}\text{S}$  ( $n=20$ ) /  $m/z = 5131.59$  found = 5133.66

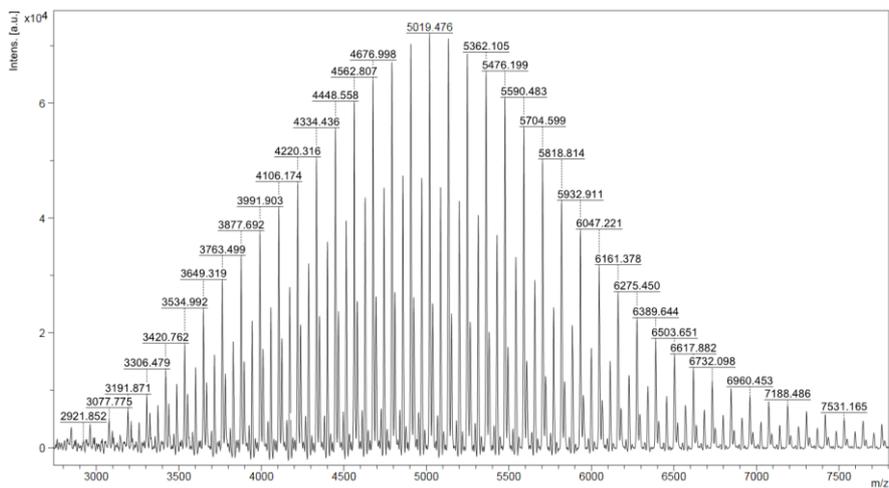


Fig. S13 MALDI-TOF mass spectrum of  $\text{PCL}_{4100}\text{-}b\text{-XGO}_{7/8/9}$

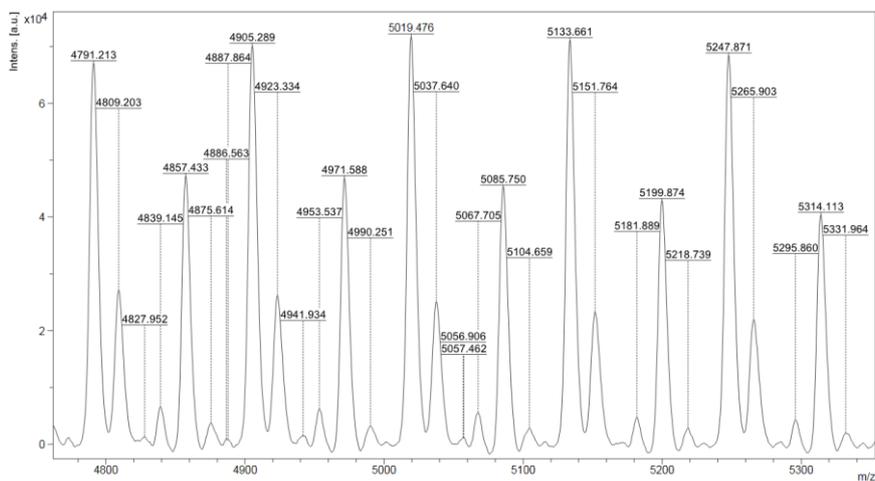
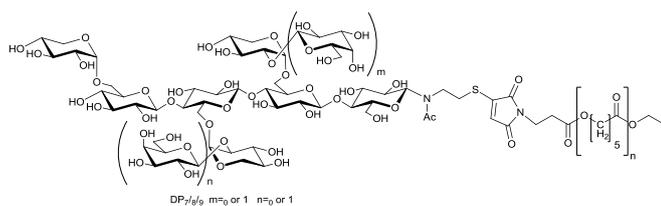


Fig. S14 Enlarged MALDI-TOF mass spectrum of PCL<sub>4100</sub>-b-XGO<sub>7/8/9</sub>



○ PCL<sub>4100</sub>(ene)-b-XGOs:

PCL<sub>4100</sub>(ene)-b-XGO<sub>7/8/9</sub>: Yield: 83%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMF) δ ppm 1.22 (t, J=7.1 Hz 3H, (PCL) -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) 1.39 (quin, J=7.09 Hz, 70 H, (PCL) -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) 1.59 - 1.68 (m, 133 H, (PCL) -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) 2.35 (t, J=7.34 Hz, 70 H, (PCL)- C(O)-CH<sub>2</sub>) 3.20-3.80 (m, 70H, Carbohydrate, -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CO-CH<sub>2</sub>-CH(S)-CO-) 3.95- 4.15 (m, 70 H, (PCL), -C(O)-O-CH<sub>2</sub>-) 4.20-5.60 (m, 23H, Carbohydrate, -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CO-CH<sub>2</sub>-CH(S)-CO-) 7.07 (s, 1H, -CH=C(S)-);

COPOLYMERES A BLOCS REDOX SENSIBLES POUR LE RELARGUAGE CONTROLÉ D'AGENTS HYDROPHOBES

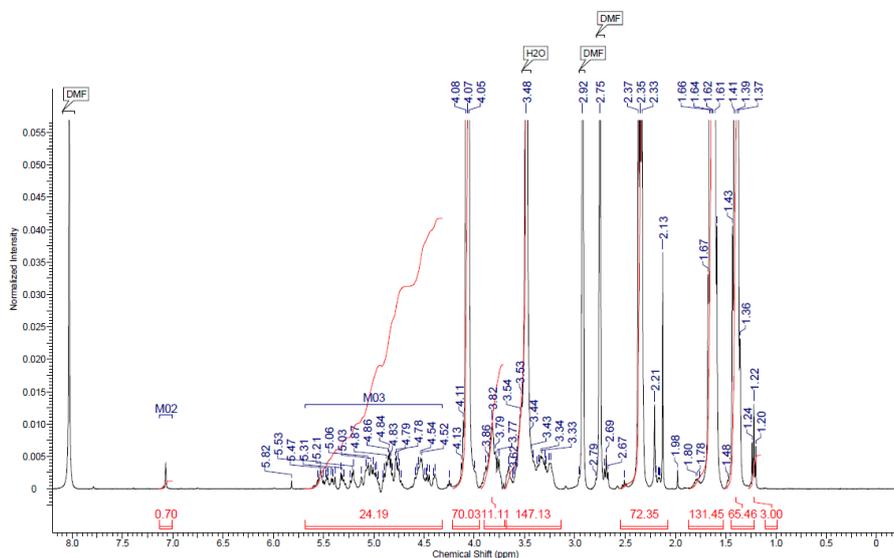


Fig. S15  $^1\text{H}$  NMR spectrum of  $\text{PCL}_{4100}(\text{ene})\text{-}b\text{-XGos}$

MALDI-TOF MS<sup>+</sup>:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  **DP7** calculated for  $\text{C}_{232}\text{H}_{382}\text{N}_2\text{NaO}_{97}\text{S}$  (n=20) / m/z = 4805.47 found = 4807.46 / **DP8** calculated for  $\text{C}_{238}\text{H}_{392}\text{N}_2\text{NaO}_{102}\text{S}$  (n=20) / m/z = 4967.52 found = 4969.10 / **DP9** calculated for  $\text{C}_{244}\text{H}_{402}\text{N}_2\text{NaO}_{107}\text{S}$  (n=20) m/z = 5130.58 found = 5131.31

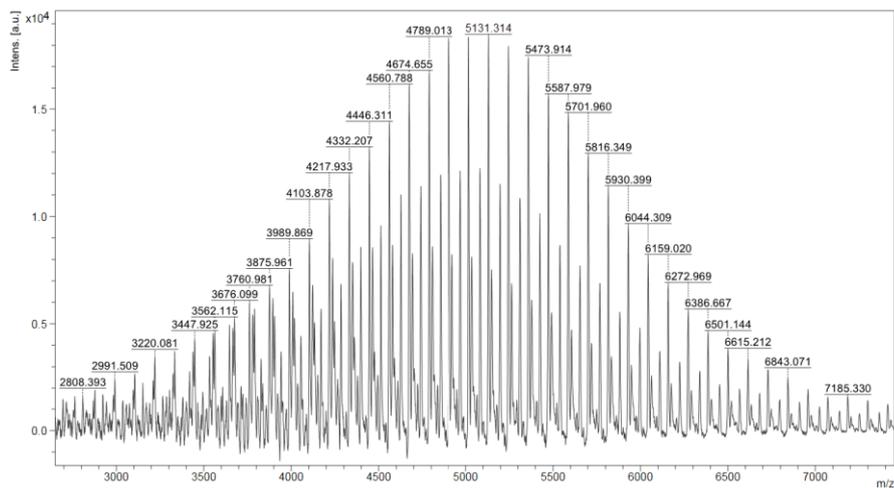


Fig. S16 MALDI-TOF mass spectrum of  $\text{PCL}_{4100}(\text{ene})\text{-}b\text{-XGos}$

COPOLYMERES A BLOCS REDOX SENSIBLES POUR LE RELARGUAGE CONTROLÉ D'AGENTS  
HYDROPHOBES

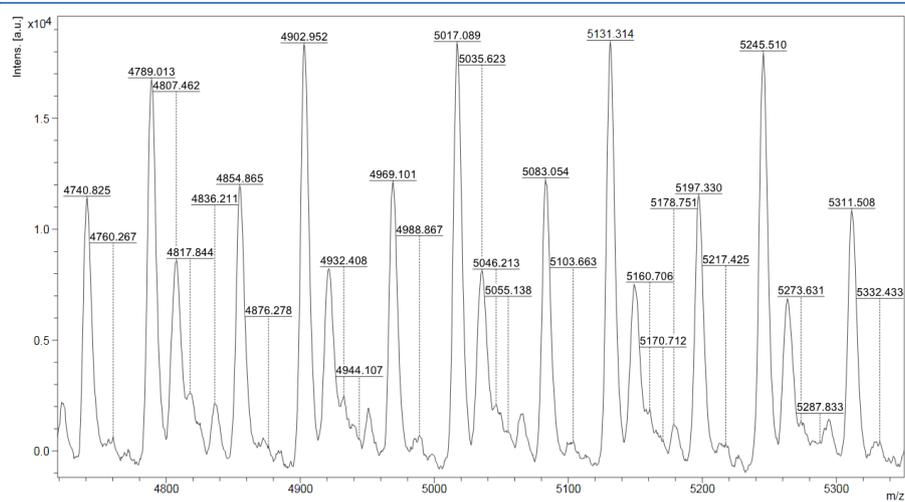


Fig. S17 Enlarged MALDI-TOF mass spectrum of PCL<sub>4100</sub>(ene)-*b*-XGOs

COPOLYMERES A BLOCS REDOX SENSIBLES POUR LE RELARGUAGE CONTROLÉ D'AGENTS HYDROPHOBES

o GPC analysis in DMF (LiCl)

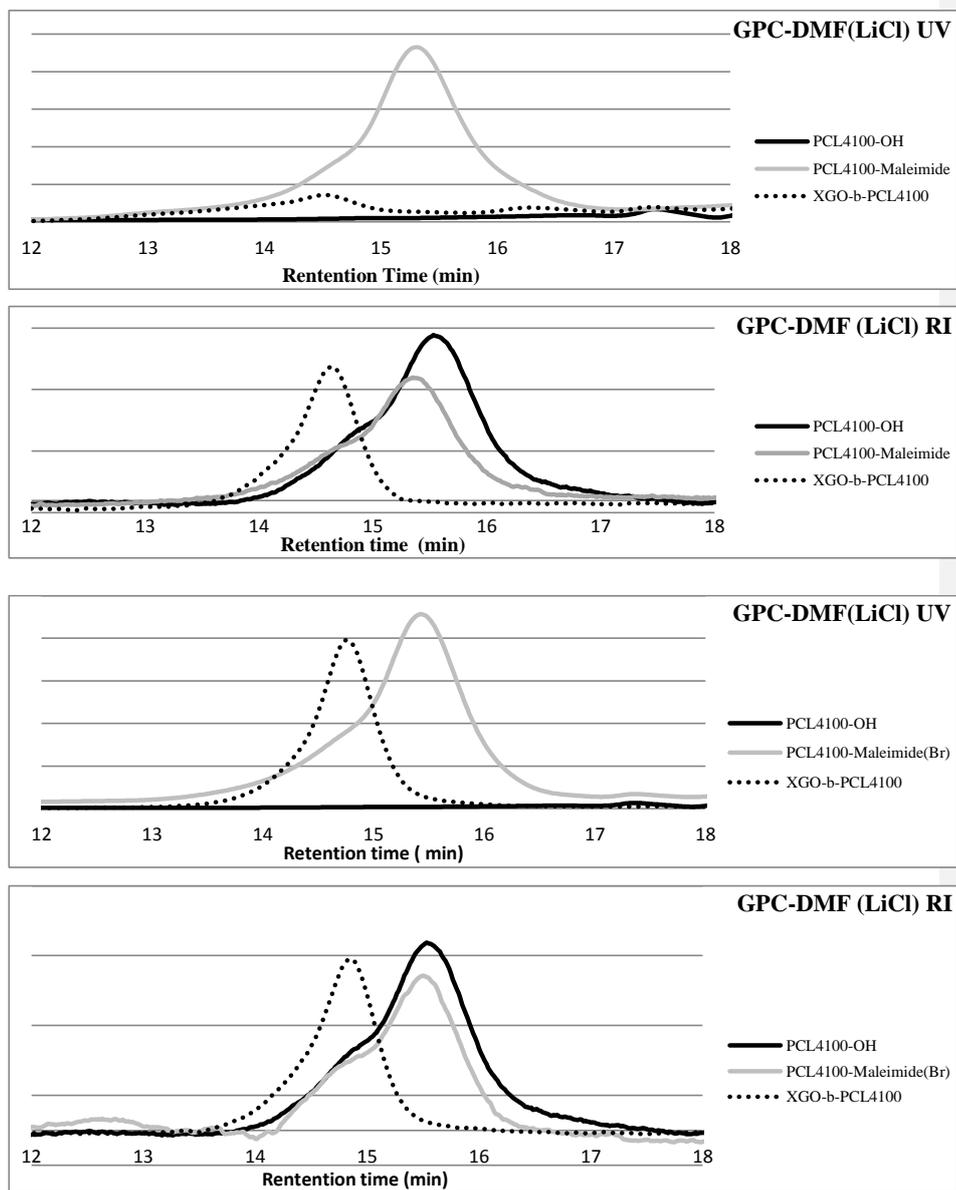
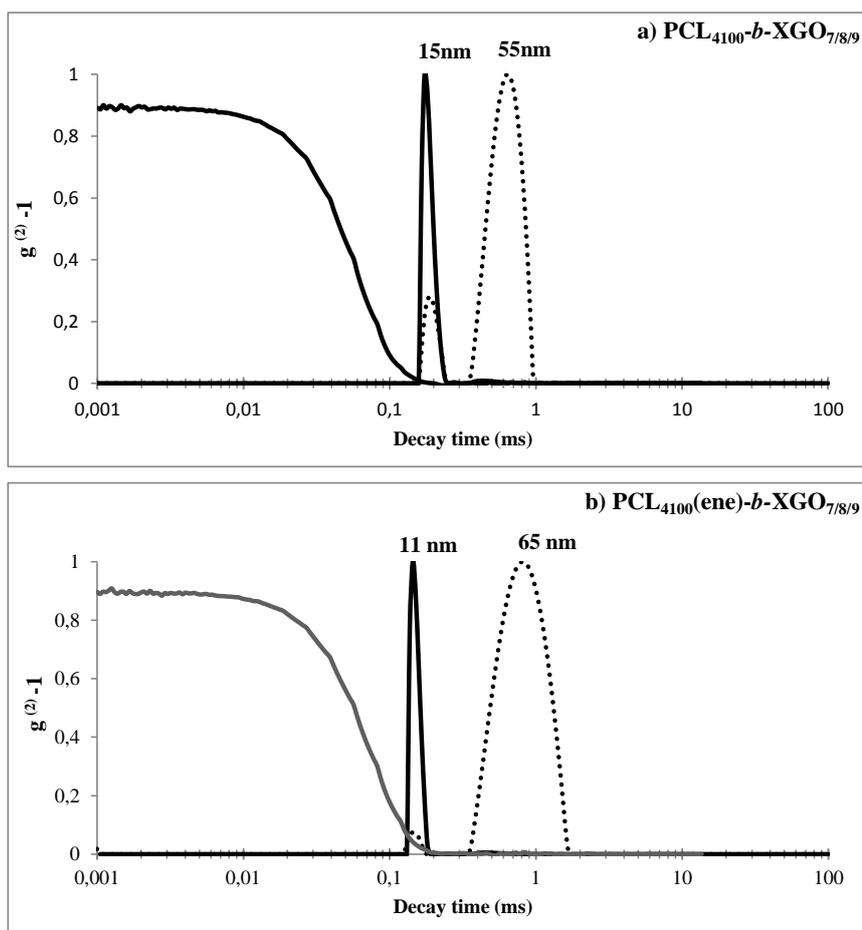
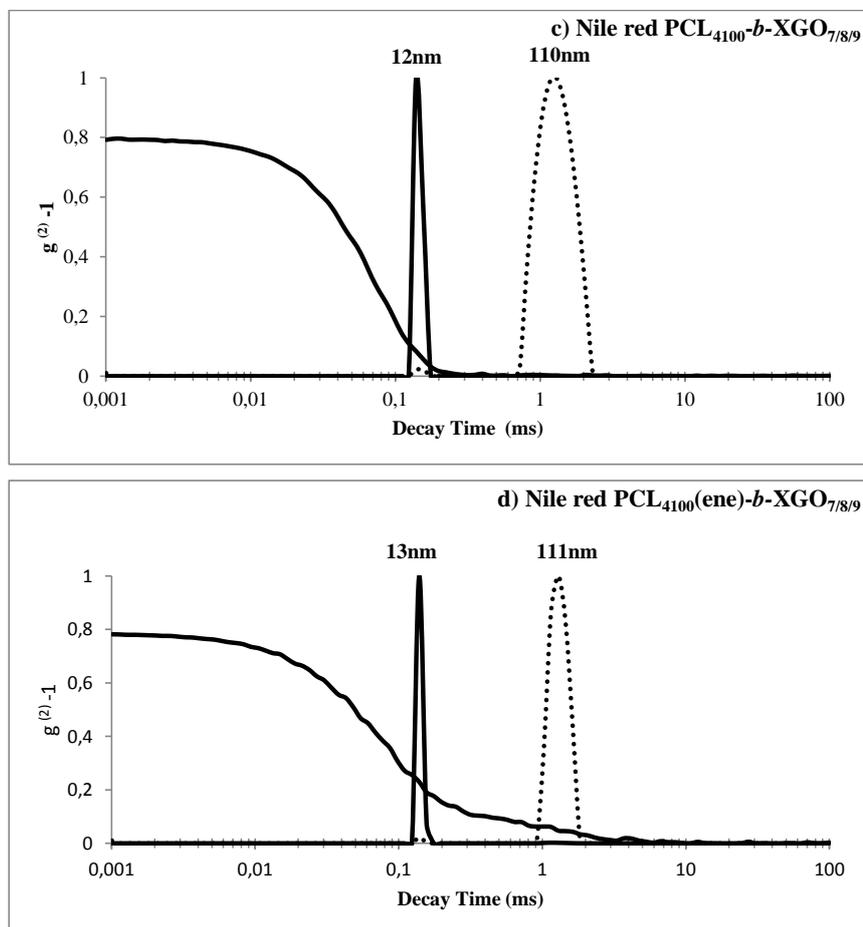


Fig. S18 GPC traces (DMF as eluent) of PCL<sub>4100</sub>-OH, PCL<sub>4100</sub>-maleimides, and PCL<sub>4100</sub> based block copolymers

○ Nanoparticles DLS analysis



**Fig. S19** DLS autocorrelation function ( $g^{(2)}-1$ ) at  $90^\circ$ , weight (dashed line) and number (plain line) radius distribution of the xyloglucan oligosaccharide PCL in phosphate buffer at  $25^\circ\text{C}$  ( $c=1\text{mg.mL}^{-1}$ )



**Fig. S20** DLS autocorrelation function ( $g^{(2)}-1$ ) at  $90^\circ$ , weight (dashed line) and number (plain line) radius distribution of Nile red encapsulated in XGO-*b*-PCL in phosphate buffer at  $25^\circ\text{C}$  ( $c=1\text{mg.mL}^{-1}$ )



## IV. Résultats supplémentaires

Lors de l'addition d'un thiol sur un maléimide bromé, on observe la conservation de la double liaison sur le maléimide, ouvrant la possibilité de l'addition d'un deuxième thiol.<sup>[150]</sup>

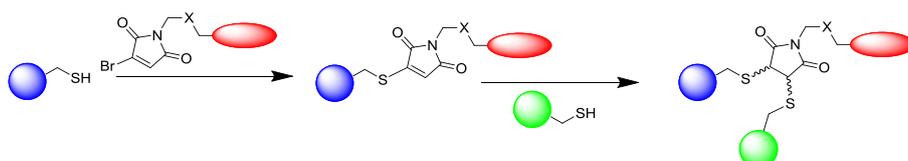


Figure 67 : Double addition sur les bromo maléimides

Cette stratégie a été explorée pour la préparation de copolymère à blocs « miktoarms » ou de copolymères à blocs poly-fonctionnalisés. Ce type de structure a un grand intérêt dans le domaine de la théranostique, car les nanoparticules transportant l'agent actif peuvent être suivies à l'aide d'un marqueur lié de manière covalente au copolymère.

L'ajout de deux équivalents de XGO<sub>7/8/9</sub>-SH sur le PCL-bromomaleimide a permis d'obtenir un mélange 1:1 de PCL-*b*-XGO et PCL-*b*-(XGO)<sub>2</sub>.

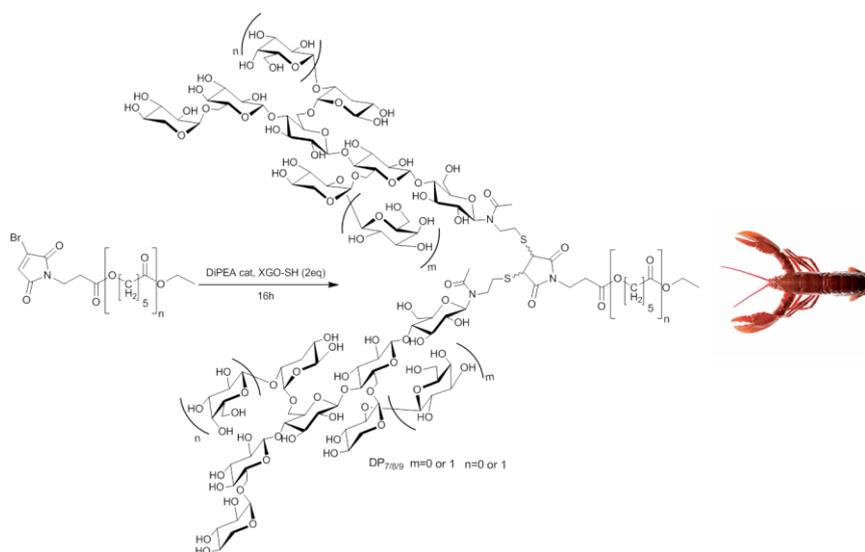


Figure 68 : Synthèse du copolymère myktoarm PCL-*b*-(XGO)<sub>2</sub>

L'analyse RMN du mélange n'a pas permis de déterminer complètement la structure du copolymère mais les résultats de spectrométrie de masse ont permis de caractériser le mélange obtenu.

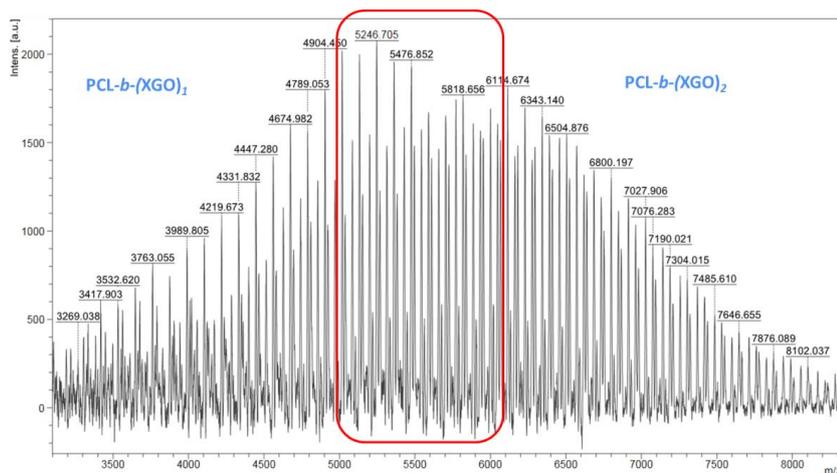


Figure 69 : MALDI-TOF du mélange PCL-*b*-XGO et PCL-*b*-(XGO)<sub>2</sub>

L'étude de ce spectre de masse permet de déterminer la composition du mélange de copolymères (figure 70). Chaque numéro correspond soit à un copolymère de PCL-*b*-XGO<sub>7/8/9</sub> lié à un des xylooligosaccharides de DP 7, 8 ou 9 (un seul numéro) ou à un copolymère bis-fonctionnalisé PCL-*b*-(XGO<sub>7/8/9</sub>)<sub>2</sub> lié à deux xylooligosaccharides de DP 7, 8 ou 9 respectivement (deux numéros ex : 7+9 correspondant au DP de chacun des xylooligosaccharides). La masse des thio-xylooligosaccharides de DP 9 (+1486 m/z) est un multiple de la masse de l'unité de répétition de la polycaprolactone (+114m/z) ce qui fait que les pics correspondants aux copolymères de type PCL-*b*-(XGO<sub>9</sub>XGO<sub>m</sub>) avec m = 7,8 ou 9 sont donc superposés avec PCL-*b*-XGO<sub>m</sub>.

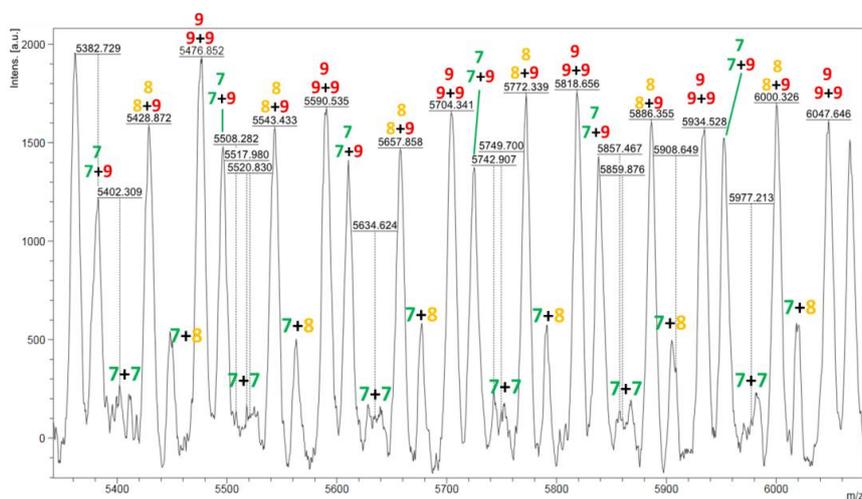


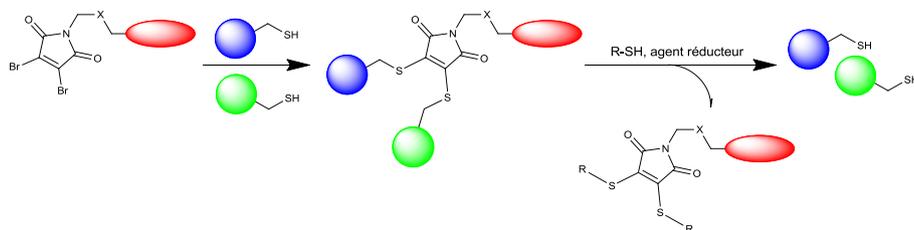
Figure 70 : Agrandissement du spectre MALDI-TOF des copolymères myktoarms de PCL-b-XGOs

Plusieurs essais en utilisant jusqu'à 5 équivalents de XGO-SH n'ont pas permis d'augmenter le ratio mono/di substitué. Les xylooligosaccharides étant des oligosaccharides fortement branchés des effets stériques limitent probablement les possibilités de di substitution. Néanmoins, le développement de bras espaceurs ou l'utilisation de sucres ou autre molécules moins encombrées permettrait d'obtenir des assemblages multifonctionnels intéressants.



## V. Conclusions et perspectives

Les réactions de Michael thiol-maleimide et thiol-bromomaleimide ont démontrés leurs efficacités pour la préparation de copolymères à blocs avec une liaison sensible au microenvironnement redox. Les nanoparticules biocompatibles obtenues ont montré une excellente stabilité dans les conditions redox des fluides extracellulaires et un relargage rapide de l'agent encapsulé dans les conditions mimant le microenvironnement réducteur tumoral. La liaison thiol-succinimide a une cinétique de relargage lente avec un temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) de 16h, alors que la liaison thiol-maleimide montre une cinétique plus rapide avec un  $t_{1/2}$  de 5h. Le  $t_{1/2}$  de relargage du système est de plus ajustable entre ces deux valeurs par mélange des deux types de copolymères avant encapsulation de l'agent hydrophobe. Ce nouveau système redox-sensible est prometteur pour la nano médecine bien que des précautions seraient à prendre pour valider l'innocuité des groupements maléimides qui peuvent être neurotoxiques. L'exploration des synthèses multivalentes par l'utilisation de maléimides bromés serait à effectuer afin de développer des nanoparticules multifonctionnelles par l'introduction d'un groupement fluorescent ou d'un radio-isotope. De plus, l'utilisation de maléimides di bromés permettrait en théorie de substituer deux fois le maléimide tout en maintenant le caractère thio-énol favorisant la réversibilité en milieu réducteur.



**Figure 71** : Double addition sur les dibromo-maléimides et réversibilité en présence de thiol libres

Cette approche pourrait ouvrir la voie à de super-nanoparticules transportant un agent actif livrable en fonction du micro environnement, et selon le choix du troisième groupement, soit avoir la possibilité de suivre la particule, soit ajouter une deuxième molécule active ou un motif de reconnaissance pour activement cibler une tumeur ou une bactérie.



## CHAPITRE IV. PREPARATION DE SUPPORTS D’AFFINITES D’ANTICORPS

---



## I. Introduction et objectifs

Après avoir développé une méthode de modification anomère d’oligosaccharides pour l’insertion d’une fonction thiol. L’objectif était d’introduire une autre fonction réactive en position anomère pour le couplage d’oligosaccharides complexes sur support solide. Les antigènes glucidiques supportés ont de nombreuses applications dans les domaines biomédicaux. La réaction de Diels Alder, qui constitue le deuxième type de réactivité des maléimides est un candidat prometteur pour le couplage d’oligosaccharides. Cette réaction a été décrite dans l’eau et elle est orthogonale aux groupements fonctionnels présents sur les oligosaccharides. Le choix s’est tourné vers le couple diène-diénophile furane-maléimide afin d’explorer la possibilité de couplage d’oligosaccharides bioactifs sur support solide par cette réaction. Le choix des oligosaccharides s’est porté vers les antigènes des groupes sanguins produits au sein de l’équipe CBO par ingénierie métabolique bactérienne. Ces épitopes classés selon leur type A, B ou H sont présents à la surface des globules rouges. Ils sont reconnus par des anticorps spécifiques anti-A ou anti-B déclenchant une réponse immunitaire responsable de l’incompatibilité des groupes sanguins entre eux. Le développement de supports d’affinité comportant à leur surface ces antigènes spécifiques permettrait la purification du plasma humain. Cette approche est une alternative thérapeutique aux maladies dont le traitement classique repose sur la plasmaphérese. L’objectif de ces travaux est de développer une méthode de couplage régiosélective, facile à mettre en œuvre, et ne nécessitant qu’un faible excès de réactifs.



## II. Efficient Production of Neoglycoconjugates as Affinity Adsorbents: Toward Antibody-free Universal Blood Plasma\*\*

Antoine Petrelli, Eric Samain, Sami Halila, and Sebastien Fort\*

\* Corresponding author. Tel.: +33-476-037-664; Fax: +33-476-547-203

E-mail address: [sebastien.fort@cermav.cnrs.fr](mailto:sebastien.fort@cermav.cnrs.fr)

### ABSTRACT

Glycan-protein interactions play a crucial role in physiological and pathological events. Hence, improving the isolation of carbohydrate-binding proteins (i.e. lectins and anti-glycan antibodies) from complex media can not only lead to a better understanding of their function, but also provide solutions for public health issues, such as water contamination or the need for universal blood plasma. Herein, we report a rapid and efficient method to produce carbohydrate affinity adsorbents combining enzymatic synthesis and metal-free click chemistry. Simple and complex glycans (maltose, blood group antigens A, B and H) were readily modified by the addition of a furyl group at their reducing end without protecting-group chemistry and then efficiently conjugated to maleimide-activated Sepharose beads via a Diels-Alder reaction. These neoglycoconjugates showed high efficiency for the purification of lectins (Concanavalin A and *Ulex europaeus* agglutinin) as well as for the capture of anti-A and anti-B blood-group antibodies, opening new prospects for glycoproteomics and for the development of universal blood plasma

### INTRODUCTION

All cells, and eukaryotic cells in particular, are coated by a glycocalyx constituted of glycoconjugates, i.e. glycolipids and glycoproteins, of extraordinary diversity. The glycan moieties are located on the external face of the cell membrane, and act as a recognition signal, thereby fulfilling unique biological functions. Specific interactions between these

[\*] Antoine Petrelli, Dr Eric Samain, Dr Sami Halila, and Dr Sébastien Fort  
CERMAV-CNRS  
601 Av de la chimie 38240 St Martin d’Hères  
E-mail: [sebastien.fort@cermav.cnrs.fr](mailto:sebastien.fort@cermav.cnrs.fr)

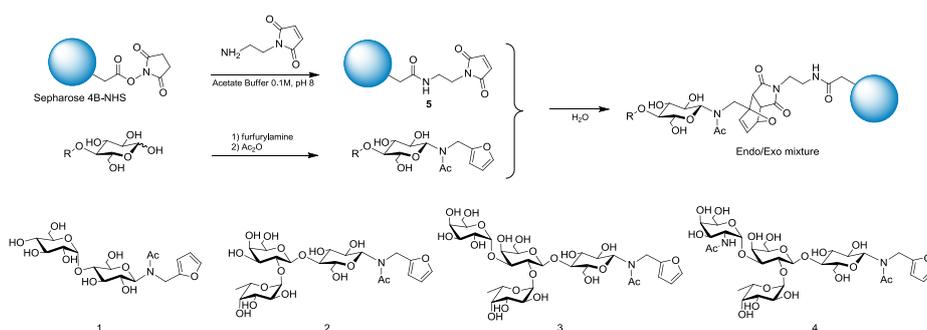
[\*\*] The authors thank the MENRT for the PhD fellowship to A. Petrelli as well as the CNRS, Carnot Institut Polynat and Labex Arcane (ANR-11-LABX-0003-01). Prof. B. Svensson is acknowledged for her generous gift of amyloglycosylase G2.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.angewandte.org> or from the author.

carbohydrates and lectins or anti-glycan antibodies are involved in many biological events in healthy and in diseased states of living organisms. In particular, carbohydrate-directed cell adhesion appears to be important in cellular communication, in the immune response and in infection by bacteria and viruses.<sup>[153]</sup> Synthetic neoglycoconjugates in which a glycan is covalently linked to a protein, a lipid or a solid matrix have proven to be efficient tools to study glycans structure-function relationships. They also have many practical applications for the diagnosis and treatment of various diseases. For example, immobilized carbohydrates constitute versatile affinity adsorbents for the purification of enzymes<sup>[21]</sup>, lectins<sup>[154]</sup> and antibodies.<sup>[155a, 155b]</sup> The depletion of anti-glycan antibodies in sera holds promise for therapeutic developments and analytical studies of autoimmune diseases, such as the Guillain Barré syndrome and Crohn’s disease. Carbohydrate-based immunoadsorbents have been shown to be efficient and safe in organ transplantation across the ABO blood group barrier.<sup>[156]</sup> They also hold promise for the development of a universal blood supply<sup>[157]</sup> alongside the ongoing research of enzymes converting A, B and AB red blood cells to the group O type.<sup>[158]</sup> However, the production of neoglycoconjugates is hindered by the lack of an efficient method to synthesize complex oligosaccharides and conjugate them without extensive protecting-group manipulation. Enzymatic syntheses, and particularly those employing microbial cell factories, have considerably improved access to complex oligosaccharides. High density culture of metabolically engineered *E. coli* cells can produce a wide range of mammalian molecules on a multigram scale, including gangliosides,<sup>[49]</sup> globosides<sup>[159]</sup> and Lewis antigens.<sup>[160]</sup> Current procedures used to immobilize oligosaccharides on solid matrices can be classified into two categories. The first involves the nucleophilic attack of any hydroxyl group present on the carbohydrate onto an electrophile, typically an epoxide<sup>[161]</sup>, a cyanate<sup>[162]</sup> or a vinyl sulfone<sup>[163]</sup> ester. The lack of regioselectivity of these reactions does not allow a controlled orientation of the ligand, thus restricting their use to commonly available and cheap mono- and disaccharides. The second strategy consists of the specific modification of the reducing end of the glycan by reductive amination<sup>[22]</sup> or by the formation of hydrazone<sup>[164]</sup> or oxime<sup>[165]</sup> linkages. Although these procedures are efficient on an analytical scale, large-scale applications have the major drawback of requiring the use of harmful chemicals. Furthermore, they also often lead to the loss of the cyclic structure of the modified sugar unit, which may result in a lower affinity for the target protein<sup>[62]</sup>. Herein, we describe an efficient protocol for the preparation of new carbohydrate affinity adsorbents using metal-free click chemistry. Blood group antigens A; B and H were produced in *E. coli* and readily turned into *N*-furfuryl-glycosylamides before being conjugated to maleimide-activated Sepharose beads via a Diels-Alder reaction. The resulting

## PREPARATION DE SUPPORTS D’AFFINITE D’ANTICORPS

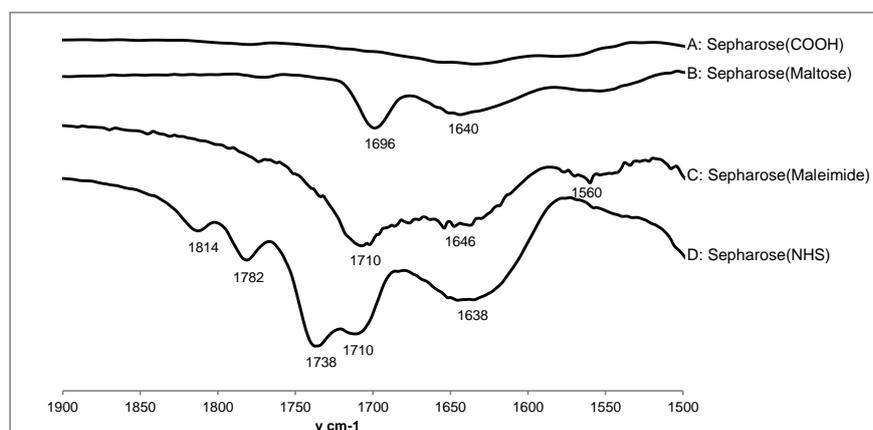
neoglycoconjugates were then assessed as affinity adsorbents for lectin and for antibody trapping and purification.



**Scheme 1.** General synthetic route for the preparation of glycan-supported Sepharose beads and structure of furyl modified: maltose (1), H antigen (2), B antigen (3) and A antigen (4)

## RESULTS AND DISCUSSION

The synthesis route for the new carbohydrate affinity adsorbents is depicted in Scheme 1. Sepharose 4B, which is a well-proven agarose gel filtration base matrix for affinity chromatography, was selected as the solid support. The commercially available succinimidylester-activated form was reacted with *N*-(2-aminoethyl)maleimide<sup>[166]</sup> to introduce a dienophile group which is amenable to a Diels-Alder reaction. The unreacted activated esters were then hydrolyzed in mild basic conditions to avoid the degradation of the maleimide moiety. The conversion yield was at least 85%, as determined by the conductimetric titration of unreacted and total theoretical reactive sites (see Supporting Information). Infrared (IR) spectroscopy analysis further confirmed the introduction of the maleimide groups by the absence of the characteristic succinimidyl ester peaks at 1738 and 1782 cm<sup>-1</sup> and the presence of the maleimide carbonyl peak at 1710 cm<sup>-1</sup> (figure 2). The modification and conjugation of carbohydrates were then investigated on maltose as a model before moving to more complex oligosaccharides. Furyl-maltose conjugate **1** was prepared in 84% yield (see Supporting Information). The procedure, which consists of the formation of a glycosylamine in neat amine solvent, followed by selective *N*-acetylation, was adapted from our previous work on the synthesis of alkynyl maltodextrins and xyloglucan oligosaccharides.<sup>[125]</sup> The furyl-maleimide Diels-Alder reaction was carried out in water under gentle stirring of the Sepharose beads with a fivefold excess of **1**. The time-course of the reaction was monitored by IR analysis.



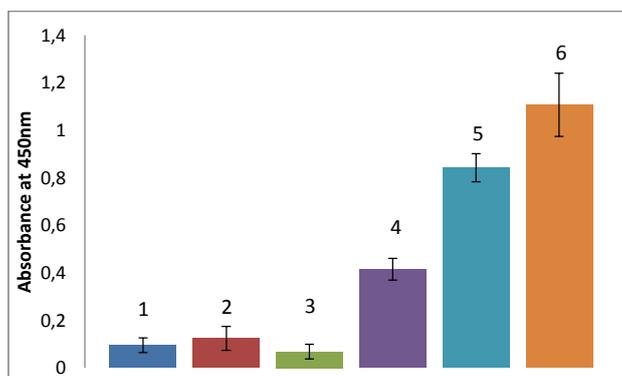
**Figure 2.** IR-ATR spectrum of modified Sepharose in the carbonyl region: A) Sepharose, B) Maltose-Sepharose, C) Maleimide-Sepharose, D) NHS-activated Sepharose.

During the conjugation, the alkene moiety of the maleimide was consumed in the cycloaddition, thus shifting the maleimide carbonyl signal from  $1710\text{ cm}^{-1}$  to  $1696\text{ cm}^{-1}$ . Although an excess of feryl-maltose **1** was required to drive the reaction to completion, it was recovered unaltered after rinsing the beads.

IR analysis suggested that all maleimide groups underwent complete reaction. For confirmation, we determined the maltose content on the solid matrix by enzymatic digestion. To do so, the beads were incubated with an excess of recombinant amyloglucosidase G2<sup>[167]</sup> and the amount of glucose released in the supernatant was assessed using the BCA reducing sugar assay. We thus confirmed that the Diels-Alder ligation in water proceeded with an extremely satisfactory yield of at least 85%. Moreover, the efficiency of enzymatic hydrolysis with amyloglucosidase also confirmed the availability of the immobilized carbohydrate moiety for protein binding.

To further characterize the maltose-Sepharose adsorbent, we examined its specificity for Concanavalin A (ConA) lectin in an enzyme-linked lectin assay.<sup>[168]</sup> The binding of horseradish peroxidase-ConA conjugate (ConA-HRP) onto the adsorbent showed a dose-dependent response of lectin until saturation. Two control experiments were carried out to assess binding specificity. The first one consisted in non-activated Sepharose beads (OH beads, see Supporting Information) with ConA-HRP to evaluate any possible non-specific adsorption. The second involved HRP-conjugated *Arachis hypogaea* (peanut) lectin (PNA-HRP), a galactose binding protein, which was incubated with the maltose-Sepharose beads to evaluate lectin specificity.

Neither experiment showed any colorimetric response, thus attesting to the specific recognition of the solid supported maltose groups by ConA lectin.

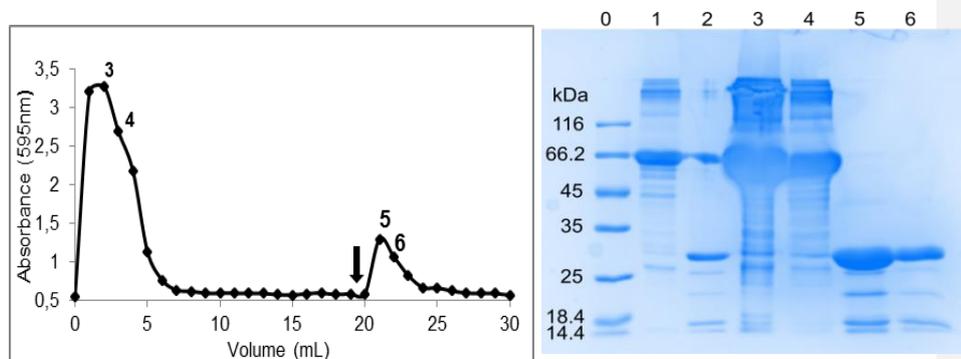


**Figure 3.** Enzyme-linked lectin assay absorbance at 450 nm of the supernatant after o-phenylenediamine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment: of 0.1mL of 1) Sepharose beads with 10 µg ConA-HRP 2) maltose-Sepharose beads with 10 µg peanut-HRP (PNA), 3-6) maltose-Sepharose beads with 0 µg (3), 5 µg (4), 10 µg (5) and 20 µg (6) of ConA-HRP

These findings prompted us to evaluate the maltose-Sepharose beads as an affinity chromatography matrix. Gel capacity was calculated by saturating 1 mL of maltose-conjugated beads with ConA (5mg) and after washing with PBS, eluting the lectin with a 0.2 M solution of free maltose. The protein content in the eluted fraction was determined using the Bradford method against a calibration curve. The gel showed a binding capacity of 2 mg of ConA lectin per milliliter of maltose-Sepharose. The same column was then incubated with a mixture composed of 1.5 mg of ConA and 3 mg of BSA for 1 h. After washing with PBS buffer until no protein was detectable in the eluate, the lectin was desorbed with a 0.2 M solution of maltose and quantified using a Bradford assay (Figure 4). According to the titration, 84% of ConA was recovered. The composition of the different fractions was analyzed by SDS-PAGE electrophoresis (Figure 4). As expected, the wash fractions contained BSA and little or no ConA was detected, confirming its strong and specific interaction on the matrix. Moreover, the electrophoretic bands in lanes 5 and 6 show only ConA (Figure 5) without any contaminant thus attesting to successful separation.

Maltose 0.2M

#### PREPARATION DE SUPPORTS D’AFFINITE D’ANTICORPS



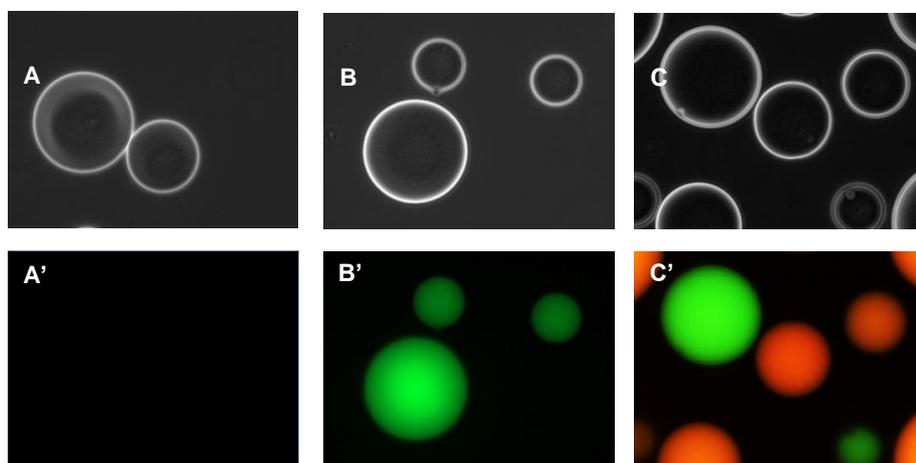
**Figure 4.** Purification of a Con-A/BSA

mixture 1:2 (w/w) using a maltose-Sepharose affinity column and SDS-PAGE of ConA/BSA Purification, line 0: size marker, lane 1: BSA, lane 2: conA standard, lane 3,4,5,6: fractions 3-6

These results obtained with maltose clearly demonstrate that the Diels-Alder reaction is a straightforward and efficient method for conjugating carbohydrates to Sepharose beads. Furthermore, the Sepharose-supported glycans were readily accessible for protein binding with enzymes and lectin.

Encouraged by these results, we adapted this process to the preparation of novel immunosorbents for serum purification by immobilization of the A, B and H glycan blood group antigens on Sepharose beads. The glycans were produced by bacterial synthesis in metabolically engineered *E. coli* cells and chemically modified with a furfuryl group as described above (see Supporting Information). Again, the anomeric functionalization occurred in high yields: 88%, 69% and 68% for the H, A and B antigens, respectively. Despite the more complex structure of the glycans, no tedious purification was required and glycoconjugates **2**, **3** and **4** showed high purity as demonstrated by their NMR spectra (see Supporting Information) after a simple extraction procedure. A Diels-Alder reaction with furyl conjugates **2**, **3** and **4** and maleimide-activated Sepharose afforded neoglycoconjugates which were evaluated for protein binding with *Ulex europaeus* agglutinin (UEA lectin), anti-B and anti-A antibodies for the H, B and A antigens, respectively. Anti-H monoclonal antibodies are not present in ABO blood groups, except for the rare Bombay phenotype<sup>[169]</sup> thus UEA lectin was used to probe the H-antigen matrix. UEA was labeled with the CF-488<sup>TM</sup> fluorescent staining kit according to the procedure indicated by the manufacturer and was used directly without any particular purification. As expected, UEA lectin did not show any affinity for the control maltose-Sepharose beads, but it was efficiently adsorbed onto the H antigen-Sepharose and then specifically eluted by a 0.2 M solution of free H-antigen trisaccharide (see Supporting

Information). The affinity of the A and B blood group antigen adsorbents was then assessed by fluorescence microscopy. Anti-blood group A and B monoclonal mouse antibodies were obtained as culture supernatants from Sigma-Aldrich. Since the discrimination between IgM antibodies is not possible by electrophoresis, they were labeled with two distinct fluorophores: CF-488™ (green) and CF-568™ (red) dyes for the anti-A and anti-B IgMs, respectively. The blood group adsorbents were individually incubated with the corresponding IgM, rinsed and observed under fluorescence microscopy. As shown in Figure 6, the antigen A-Sepharose beads were coated with a strong green fluorescence after being in contact with anti-A IgM, but the control maltose-beads remained unlabeled under the same conditions. These results once again confirm that the carbohydrate epitope on the solid matrix is available for protein binding and also that the interaction is highly specific, which is an important feature for potential medical applications. Anti-B antibodies were similarly specifically adsorbed onto the antigen B-Sepharose beads (see Supporting Information). Finally, Figure 6c shows a mixture of anti-A and anti-B labeled antibodies after simultaneous incubation with antigen-A beads and antigen-B beads. Despite the high structural analogy between A and B antigens, which differ only by an *N*-acetyl moiety, no cross-reactivity occurred and each antibody selectively recognized its corresponding antigen.



**Figure 6.** 20x microscopy image of sepharose supported maltose A with anti-A IgM: under bright field(A); with FITC filter(A'), supported antigen A beads incubated with anti-A IgM under bright field (B), with FITC filter (B'), blend of supported antigen A and B incubated with anti-A and anti B IgMs: under bright field(C) and with FITC filter and DS-red filter(C')

## CONCLUSION

In conclusion, we developed a rapid, high-yielding method for the anomeric functionalization of complex carbohydrates by introducing a furfuryl group and avoiding tedious protecting-group chemistry. The resulting glycoconjugates were efficiently immobilized on a solid Sepharose matrix via a Diels-Alder cycloaddition in water and in the absence of any catalyst. This method therefore constitutes an interesting alternative to CuAAC click chemistry. Furthermore, any valuable, unreacted oligosaccharides can be recovered unaltered after ligation. The glycan-Sepharose beads were then assessed as affinity adsorbents for carbohydrate-binding proteins. Lectins were purified with high efficiency and great ease, opening new prospects for high-throughput protein screening. Additionally, anti-blood group A and B antibodies were specifically adsorbed onto Sepharose beads conjugated with their respective antigens. Exciting applications of these immunosorbents include the preparation of antibody-free universal blood plasma. Expanding this approach to other glycan antigens may also offer new opportunities for the treatment of autoimmune diseases such as the Guillain-Barré syndrome.

**Keywords:** Affinity chromatography • antibodies purification • click chemistry • blood antigens • solid supported carbohydrates

### III. Supporting Information

#### EXPERIMENTAL

##### Materials:

NHS-activated Sepharose 4B, furfurylamine, maleic anhydride, acetic anhydride; ethylene diamine, ethanolamine, Di-tert-butyl dicarbonate, Mix-n-Stain™ CF™ 488A, Mix-n-Stain™ CF™ 568 antibody labeling kit were purchased from Sigma-Aldrich and used as received. Free and HRP-conjugated lectins (*Ulex europaeus* UEA-I, Concanavalin A from *Canavalia ensiformis* and *Arachis hypogaea agglutinin* PNA) were purchased from Sigma-Aldrich. Amyloglucosylase AM-G2 from *Aspergillus Niger* was generously provided by Prof. Birte Svensson<sup>[167]</sup>. Monoclonal anti-blood group A and anti-blood group B blood group antibodies produced in mouse were purchased from Sigma-Aldrich as culture supernatant and the buffer was exchanged to PBS using Centricon™ 10kDa centrifugal filtration units prior to use. Maltose hydrate was purchased from Fluka Biochemica and lyophilized prior to use. All solvents were purchased from Carlo Erba and were used without prior purification. *N*-tert-Butoxycarbonyl-ethylenediamine, *N*-(2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)ethyl)maleimide, and *N*-(2-Aminoethyl)maleimide Hydrochloride were synthesized according to literature<sup>[166]</sup>. Protein were titrated with BioRad coomassie-blue assay by mixing the diluted dye with 5 volumes of the protein solution, vortexing, incubating the sample 10min and reading the absorbance at 595nm. Protein sample were denatured by dissolving in TRIS HCl (0.1M), 20% Glycerol, 5% sodium dodecyl sulfate, 5% dithiothreitol and boiled for 5 min. Electrophoresis was carried on SDS-PAGE 12% at 35mA for one hour prior staining with coomassie blue.

##### Equipment:

Proton nuclear magnetic resonance (HNMR) analyses were recorded at 25°C on a Bruker Advance DRX400 spectrometer. Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in ppm. The solvent residual peaks of D<sub>2</sub>O, DMF(*d*<sub>7</sub>), and CDCl<sub>3</sub> were used as internal standards, at 4.75 ppm, 8.03 ppm and 7.27 ppm, respectively.

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) measurements were performed on a Bruker Daltonics Autoflex apparatus using 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) as a matrix. High resolution mass spectrometry was carried on a Waters Xevo™ G2-S QTOF (quadrupole hybrid with orthogonal acceleration time-of-flight) mass spectrometer apparatus.

## PREPARATION DE SUPPORTS D’AFFINITE D’ANTICORPS

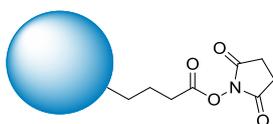
Fluorescence experiments were carried on a Perkin Elmer LS-50B spectrometer with a pulsed high pressure xenon source using Hellma® Analytix suprasil quartz cuvettes.

Fluorescence microscopy images were taken with a Zeiss Axio Vert.A1 epifluorescence microscope using either a FITC or DS-red filter.

UV-visible measurements were carried on a Varian® Carry 50 Bio spectrometer.

### Starting material analysis

- **NHS-Activated Sepharose 4B:**



IR (ATR neat,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3436(str,broad), 2928(med) 1816(wk, sharp) 1786(med, sharp) 1736(str, sharp) 1710(str, sharp) 1640(med, amide) 1468( med, sharp) 1376(med, sharp) 1064(str, med) 928(med, sharp)

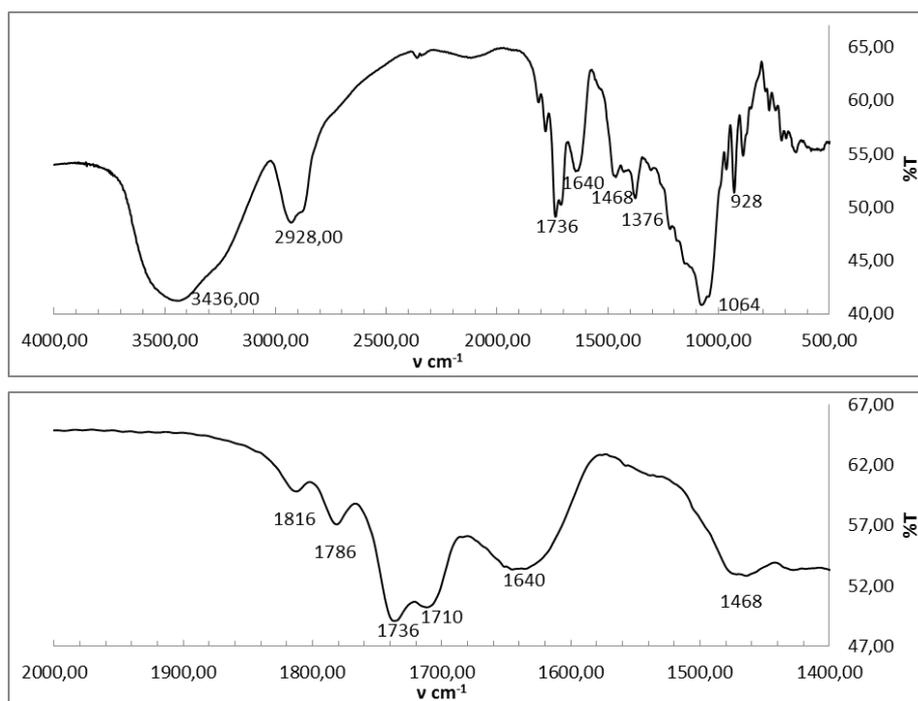
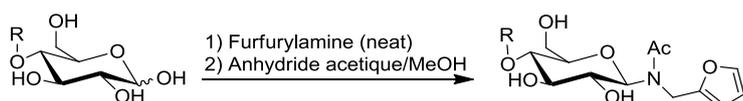
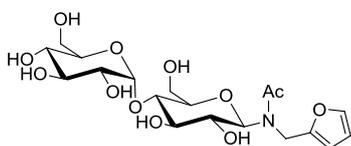


Figure 1 : IR spectra NHS-Sepharose Beads

## GENERAL PROCEDURES

**Synthesis of furyl glycoconjugates :****Figure 2:** General scheme for the synthesis of *N*-Acetamido-*N*-Furfuryl modified carbohydrates○ **(1) Maltosyl-*N*-Acetamido-*N*-Furfurylamine**

A solution of lyophilized maltose (10g, 29.2 mmol) in furfurylamine (20 mL) was stirred for 72h at 40°C and. The reaction mixture was precipitated with ethyl acetate (200 mL). The solid was filtrated, rinsed with ethyl acetate and taken back in methanol (200 mL). Acetic anhydride (30 mL) was slowly added at 0°C to the solution, the reaction mixture is then allowed to warm up to room temperature and stirred a further 16h. Toluene (200 mL) was added and the solvent was removed by evaporation under reduced pressure twice. The residue was dissolved in 100mL of water and extracted 5 times with ethyl acetate to remove any free *N*-acetyl furfurylamine. Maltosyl-*N*-acetamido-*N*-furfurylamine was then isolated by lyophilisation of the aqueous phase as a fluffy white solid with 84% yield (11,3g)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 2.16-2.36 (2s, *rotamers*, 3H, -NCOCH<sub>3</sub>) 3.30-3.95 (m, 12H, H<sub>2,3,4,5</sub><sup>Glc I-II</sup>) 4.42 - 4.70 (m, 2H, -N-CH<sub>2</sub>-C-) 5.09 (d, *J*= 8.80 Hz, *rotamers*, 1H, H1<sup>Glc I</sup>) 5.32-5.46 (m, 1H, H1<sup>Glc II</sup>) 5.51 (d, *J*= 8.80 Hz, *rotamers*, 1H, H1<sup>Glc I</sup>) 6.34 (d, *J*= 2.93 Hz, *rotamers*, 1H, -C=CH) 6.38-6.42 (m, *rotamers*, 1H, -O-CH=CH-) 6.42-6.47 (m, *rotamers*, 2H, -O-CH=CH- & -C=C-H-) 7.43 (s, *rotamers*, 1H, -O-CH=CH-) 7.49 (s, *rotamers*, 1H, -O-CH=CH)

PREPARATION DE SUPPORTS D’AFFINITE D’ANTICORPS

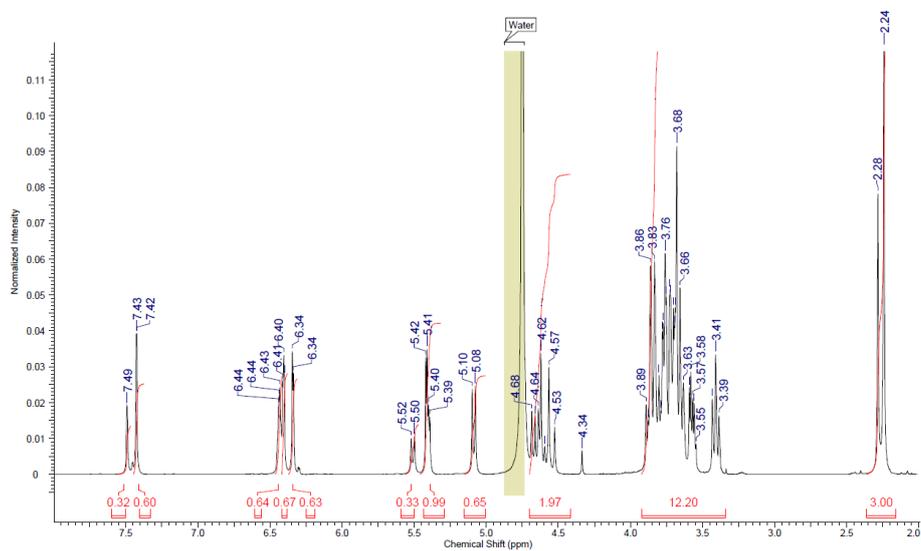


Figure 3: <sup>1</sup>H NMR of Maltose-furyl

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O)

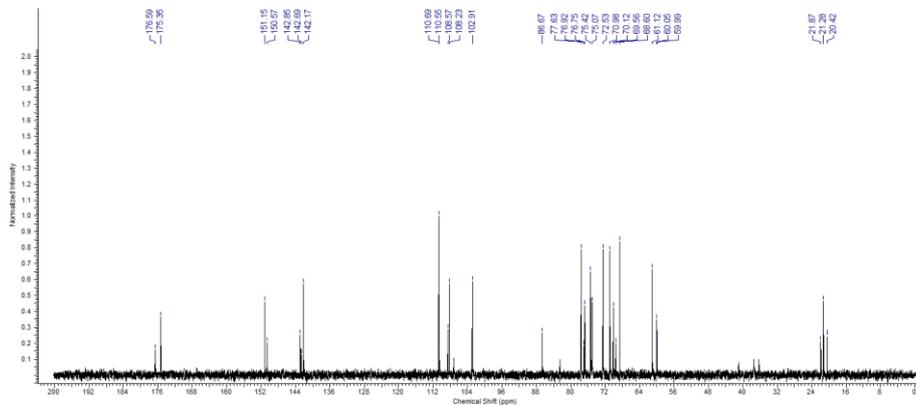


Figure 4: <sup>13</sup>C NMR of Maltose-furyl

HRMS TOF ES+:  $[M+Na]^+$  for  $C_{19}H_{29}NNaO_{12}$  Calculated  $m/z=486.1588$ ; found = 486.1584

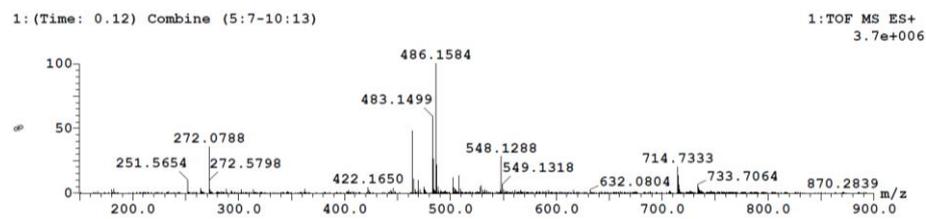
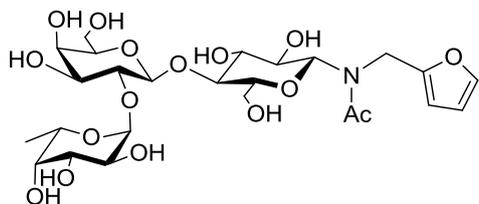


Figure 5: TOF HRMS ES+ spectra of (1)

- (2) Fuc- $\alpha$ (1-2)-Gal- $\beta$ (1-4)-Glc-  $\beta$ -N-acetamido-N-furfurylamine



Furyl modified 4-fucosyl lactose : 88% yield (1,1g)

$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  ppm 1.25 (d,  $J=6.60$ Hz, 3H,  $-CH_3^{Fuc}$ ) 2.20-2.30 (2s, *rotamers*, 3H,  $-N-C(O)-CH_3^{Glc}$ ) 3.30-4.00 (m, 21H, H-2,3,4<sup>Glc,Gal,Fuc</sup> H-5<sup>Glc,Gal</sup> H-6<sup>Glc,Gal</sup>) 4.23 (m, 1H, H-5<sup>Fuc</sup>) 4.50-4.70(m, 3H, H-1<sup>Gal</sup>,  $-N(COCH_3)-CH_2-$ ) 5.03 (d,  $J=9.0$ Hz, *rotamers*, 1H, H-1<sup>Glc</sup>) 5.31 (m, 1H, H-1<sup>Fuc</sup>) 5.5 (d,  $J=9.3$ Hz, *rotamers*, 1H, H-1<sup>Glc</sup>) 6.30-6.50 (m, *rotamers*, 2H,  $-O-CH=CH-$  &  $-C=C-H-$ ) 7.40-7.55 (m, *rotamers*, 1H,  $-O-CH=CH$ )

PREPARATION DE SUPPORTS D’AFFINITE D’ANTICORPS

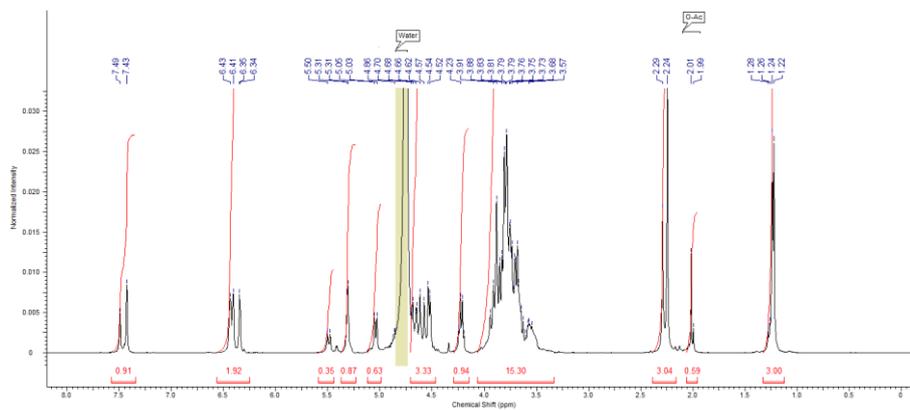


Figure 6:  $^1\text{H}$  NMR of 4-fucosyllactose

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

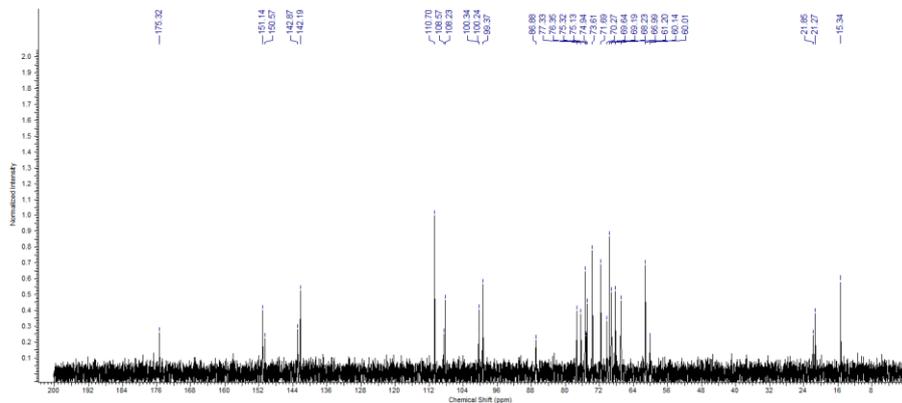


Figure 7:  $^{13}\text{C}$  NMR of 4-fucosyl lactose

HRMS TOF ES+:  $[M+H]^+$  for  $C_{25}H_{39}NNaO_{16}$  Calculated  $m/z=632.2167$ ; found = 632.2157

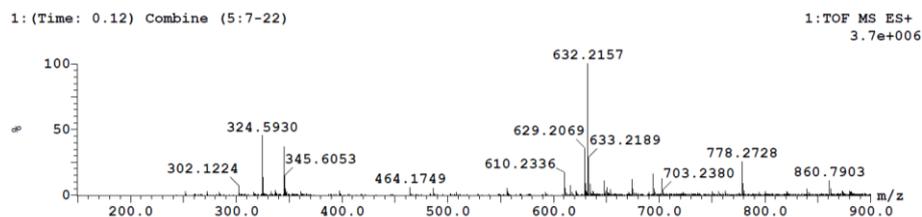
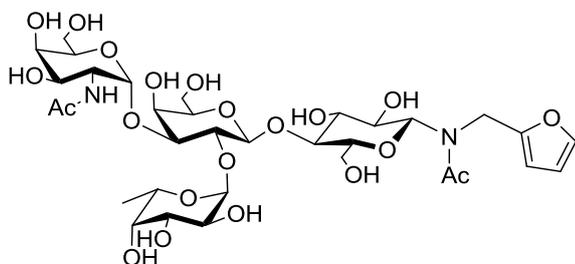


Figure 8: TOF HRMS ES+ spectra of (2)

- (3) GalNAc- $\alpha$ (1-3)-[Fuc- $\alpha$ (1-2)]-Gal- $\beta$ (1-4)Glc- $\beta$ -N-acetamido-N-furfurylamine



Furyl modified Antigen A : 69% yield (32mg)

$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  ppm 1.25 (d,  $J=6.60$ Hz, 3H,  $-CH_3^{Fuc}$ ) 2.03(s, 3H,  $-NH-C(O)CH_3^{Gal}$ ) 2.20-2.30 (2s, *rotamers*, 3H,  $-N-C(O)-CH_3^{Glc}$ ) 3.30-4.27 (m, 21H, H-2,3,4<sup>Glc,Gal,GalNac,Fuc</sup> H-5<sup>Glc,Gal,GalNac</sup> H-6<sup>Glc,Gal,GalNac</sup>) 4.32 (m, 1H, H-5<sup>Fuc</sup>) 4.50-4.70(m, 3H, H-1<sup>Gal</sup>,  $-N(COCH_3)-CH_2-$ ) 5.03 (d,  $J=9.0$ Hz, *rotamers*, 1H, H-1<sup>Glc</sup>) 5.17 (d,  $J=3.2$ Hz, 1H, H-1<sup>GalNac</sup>) 5.35 (m, 1H, H-1<sup>Fuc</sup>) 5.5 (d,  $J=9.3$ Hz, *rotamers*, 1H, H-1<sup>Glc</sup>) 6.30-6.50 (m, *rotamers*, 2H,  $-O-CH=CH-$  &  $-C=C-H-$ ) 7.40-7.55 (m, *rotamers*, 1H,  $-O-CH=CH$ )

PREPARATION DE SUPPORTS D’AFFINITE D’ANTICORPS

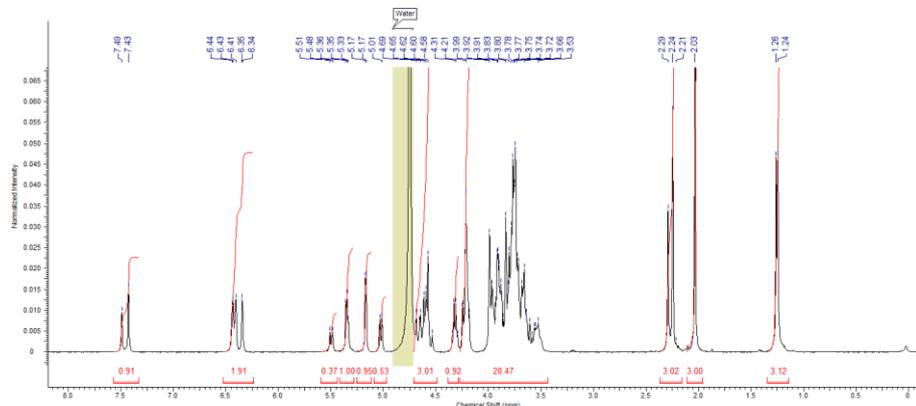


Figure 9: <sup>1</sup>H NMR of (3)

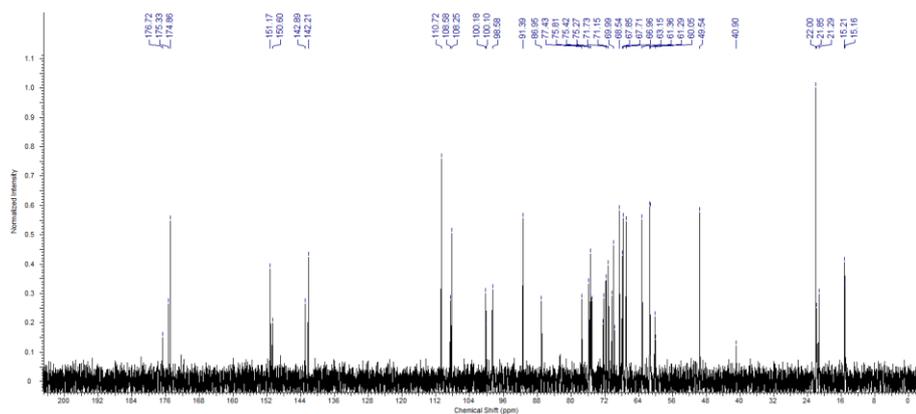


Figure 10: <sup>13</sup>C NMR of (3)

HRMS TOF ES+: [M+H]<sup>+</sup> for C<sub>33</sub>H<sub>52</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>21</sub> Calculated m/z= 835.2960 found = 835.2941

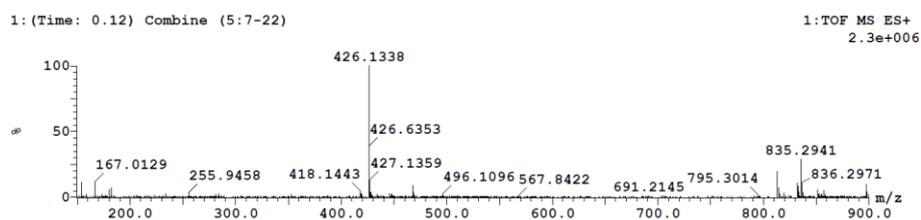
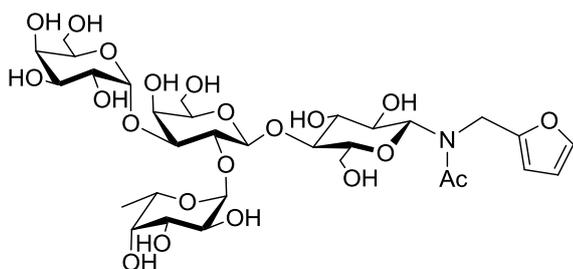


Figure 11: TOF HRMS ES+ spectra of (3)

PREPARATION DE SUPPORTS D’AFFINITE D’ANTICORPS

- (4)  $\alpha(1-3)\text{Gal}[\alpha(1-2)\text{-Fuc}]\text{-Gal-}\beta(1-4)\text{Glc-1-}N\text{-Acetamido-}N\text{-furfurylamine}$



Furyl modified Antigen B : 68% yield (37mg)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  ppm 1.24 (d,  $J=6.60\text{Hz}$ , 3H,  $-\text{CH}_3^{\text{Fuc}}$ ) 2.03(s, 3H,  $-\text{NH-C(O)CH}_3^{\text{Gal}}$ ) 2.20-2.32 (2s, *rotamers*, 3H,  $-\text{N-C(O)-CH}_3^{\text{Glc}}$ ) 3.30-4.27 (m, 21H, H-2,3,4<sup>Glc,Gal</sup> 2-3,Fuc H-5<sup>Glc,Gal</sup> 2-3 H-6<sup>Glc,Gal</sup>2-3) 4.32 (m, 1H, H-5<sup>Fuc</sup>) 4.50-4.70(m, 3H, H-1<sup>Gal</sup> 2,  $-\text{N(COCH}_3\text{)-CH}_2\text{-}$ ) 5.02 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , *rotamers*, 1H, H-1<sup>Glc</sup>) 5.23 (s, , 1H, H-1<sup>Gal</sup> 3 ) 5.32 (m, 1H, H-1<sup>Fuc</sup>) 5.49 (d,  $J=9.29\text{Hz}$ , *rotamers*, 1H, H-1<sup>Glc</sup>) 6.30-6.50 (m, *rotamers*, 2H,  $-\text{O-CH=CH-}$  &  $-\text{C=C-H-}$ ) 7.40-7.55 (m, *rotamers*, 1H,  $-\text{O-CH=CH-}$ )

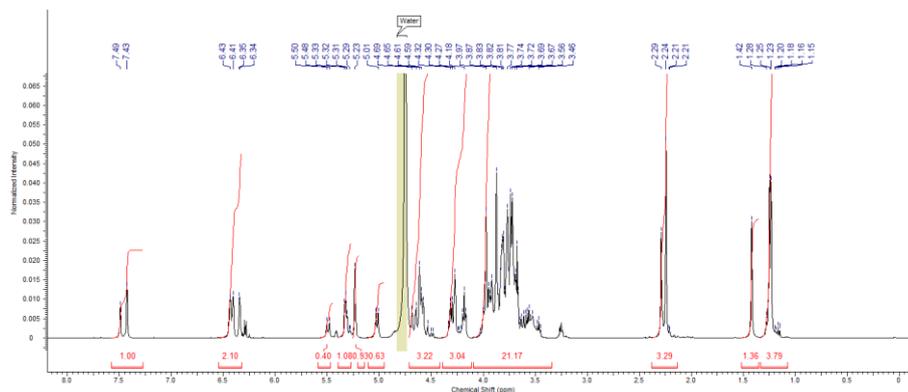


Figure 12: <sup>1</sup>H NMR of (4)

PREPARATION DE SUPPORTS D’AFFINITE D’ANTICORPS

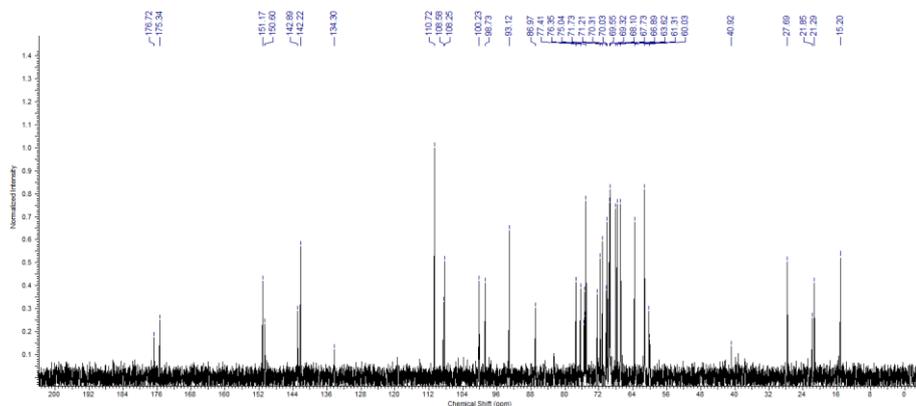


Figure 13:  $^{13}\text{C}$  NMR of (4)

HRMS TOF ES+:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  for  $\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{NNaO}_{21}$  Calculated  $m/z = 794.2694$  found = 794.2692

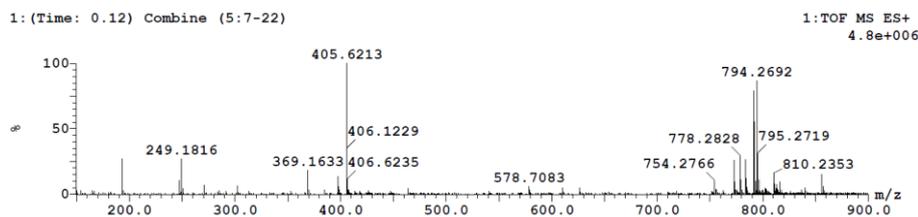
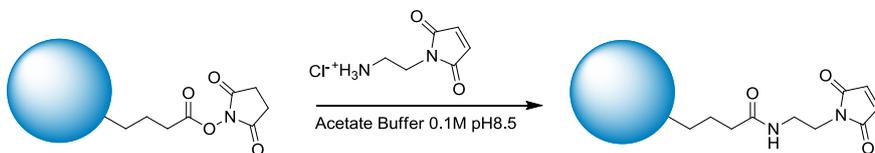


Figure 14: TOF HRMS ES+ spectra of (4)

o Functionalization of 4B-NHS Sepharose (5)

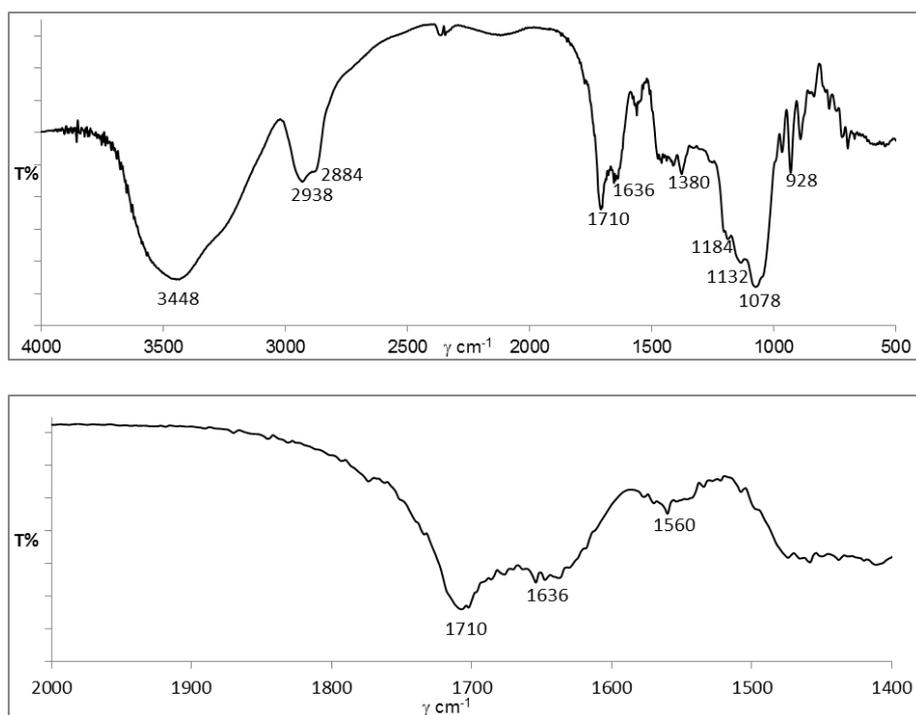


4B-NHS Sepharose 10ml (50% vol slurry in isopropanol) were pipetted into a Biorad Poly-Prep® column giving 5mL of dry packed beads (0.110mmol NHS-ester) prior to be washed four times with HCl (0.01M, 4 x 10mL) at 4°C. The beads are then rinsed with 5mL of AcONa buffered solution 0.1M pH 8.5 at 4°C then 1-(2-Amino-ethyl)-pyrrole-2,5-dione hydrochloride

## PREPARATION DE SUPPORTS D’AFFINITE D’ANTICORPS

salt (0.550mmol, 5eq) is added in 5mL of the same acetate buffer. After 4h in a rotary stirrer, the beads were washed with 10mL of water then briefly with 5mL of 4°C 0.1M NaOH solution to hydrolyze any unreacted NHS ester. The resin is then soaked in water with 0.1% sodium azide and stored at 4°C. A conductometric titration was carried with the following procedure: 1mL of beads is transferred to a titration vessel and the solution is made acidic by addition of 5mL of an 0.01M HCl solution and stirred for an hour. The solution is then titrated with 0.01M NaOH and the volume is plotted against the conductometry of the solution. The result was compared against hydrolyzed NHS-sepharose 4B for total acid content. By comparison, 85% of the free acids were successfully functionalized.

IR (  $\text{cm}^{-1}$  ) : 3448(str,broad), 2938(med) 1816 (wk, sharp) 1710(str, sharp) 1636(med, amide) 1560 (sml, sharp) 1380(med, sharp) 1078 (str, med) 928 (med, sharp)

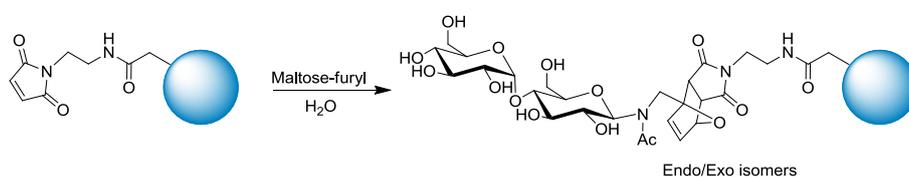


**Figure 15:** ATR-IR spectrum of (5)

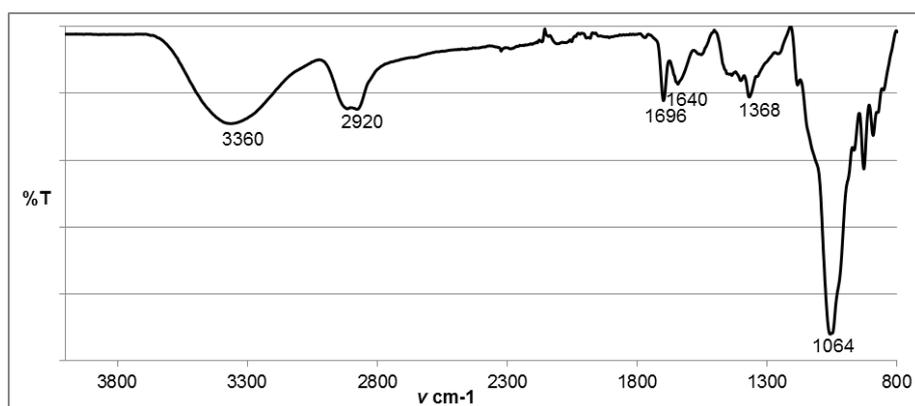
○ **General procedure for carbohydrate modification of sepharose**

2ml of Maleimide-Sepharose (**5**) (50%vol slurry in water) were pipetted into a Biorad Poly-Prep® column(1mL of dry packed beads 0.025mmol) prior to be washed with water (4x1mL) then furyl-modified oligosaccharide (5eq, 1.25mmol) was added in 1mL water. After 16h in a rotary stirrer at 40°C the beads were washed with 10mL of water. The resin is then stored in water containing 0.1% sodium azide at 4°C.

○ **Maltose-sepharose (6):**



IR (  $\text{cm}^{-1}$  ) : 3360(str,broad), 2920(med) 1696(str, sharp) 1640(med, amide) 1368(med, sharp) 1064 (str, med)



**Figure 16:** ATR-IR spectrum of (**6**)

○ **Enzymatic digestion:**

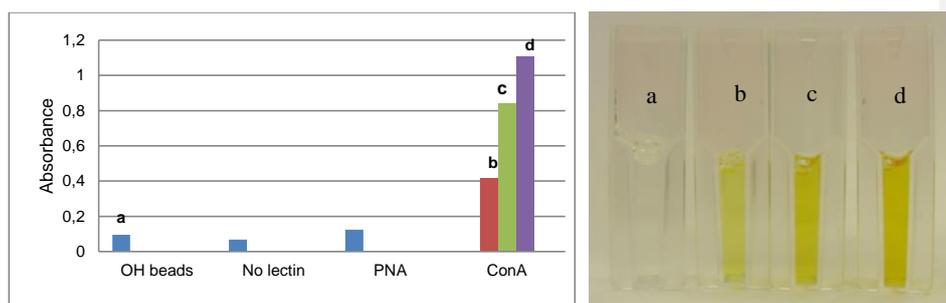
0.2mL of maltose-Sepharose beads are pipetted into a Biorad Poly-Prep® column, washed with acetate buffer (0.1M, pH5, 4x0.5mL) and soaked in 500 $\mu$ L of a 1mg.mL<sup>-1</sup> solution of Glucoamylase AMGII enzyme in the same buffer. The column was stirred 12h at 37°C. 100 $\mu$ L of the supernatant is then collected with a pipette and the released glucose was titrated using a BCA assay to evaluate the maltose content of the beads.

## PREPARATION DE SUPPORTS D’AFFINITE D’ANTICORPS

Results: 84% of released glucose by titration compared to theoretical maximum sugar incorporation (Initial NHS-Sepharose functionalized at  $0.22\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

### o ELLA protocol:

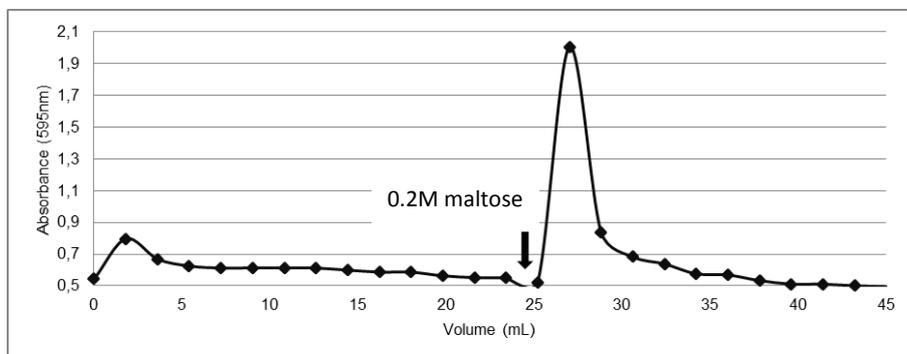
Carbohydrate modified beads 0.2ml (50% vol slurry) were pipetted into a Biorad Poly-Prep® column and washed with TBS buffer (TRIS 10mM, pH 7.6, 15mM NaCl, 1mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 1mM  $\text{Mg}^{2+}$ ) containing 3wt% bovine serum albumin (BSA). The beads were let to soak in 500 $\mu\text{L}$  of that same buffer for 10 min to block any non-specific binding site. Beads were then washed with TBS containing 0.3% BSA. The beads are then soaked in 0.5mL of fresh buffer containing a known amount of HRP conjugated lectin and incubated 1h at 37°C. The beads were thoroughly washed with TBS buffer and then transferred to 0.4mL of deionized water prior to add 200 $\mu\text{L}$  of OPD-sigmafast™ solution. After 10 min the overhead solution is transferred to 1mL cuvettes and the absorbance was measured at 450nm.



**Figure 17 :** Enzyme linked lectin assay on solid supported maltose (a) No lectin, (b) 5 $\mu\text{g}$  ConA-HRP, (c) 10 $\mu\text{g}$  ConA-HRP, (d) 20 $\mu\text{g}$  ConA-HRP, (e) PNA-HRP

### o Lectin affinity chromatography:

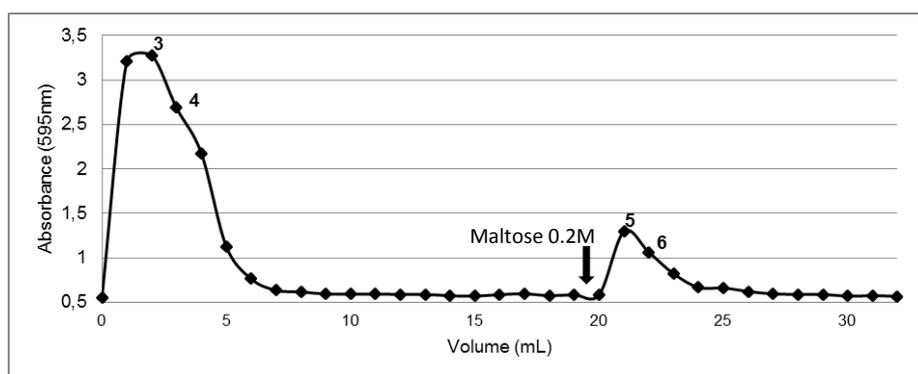
1ml of maltose-modified beads (50% vol slurry) were placed in Biorad Poly-Prep® column tubes and rinsed with PBS buffer (10mM, pH 6.8, 15mM NaCl, 1mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 1mM  $\text{Mg}^{2+}$ ). The beads are then soaked in 2mL of fresh buffer containing 5 mg of Concanavalin A and incubated 1h at 37°C. The beads were then eluted with PBS and fractions were collected for 50 column volume. The buffer was then swapped for a 0.2M maltose solution in PBS and the fraction collected. Each fraction was then titrated for protein content using the Bradford method in UV cuvettes and the absorbance of the solution read at 595nm.



**Figure 18:** Concanavalin A lectin affinity purification on maltose supported sepharose

○ **Lectin purification:**

1ml of maltose modified beads, (50% vol slurry) were placed in Biorad Poly-Prep® column tubes and rinsed with PBS buffer (10mM, pH 6.8, 15mM NaCl, 1mM Ca<sup>2+</sup>, 1mM Mg<sup>2+</sup>). The beads are then soaked in 2mL of fresh buffer containing 1 mg of Concanavalin A and 3mg of bovine serum albumin and then incubated 1h at 37°C. The beads were eluted with PBS and fractions were collected for 50 column volume. The buffer was then swapped for a 0.2M maltose solution in PBS and the fraction collected. Each fraction was then titrated for protein content using the Bradford method in UV cuvettes and the absorbance of the solution read at 595nm. Two fractions of each peaks were then analyzed by electrophoresis on SDS-PAGE.



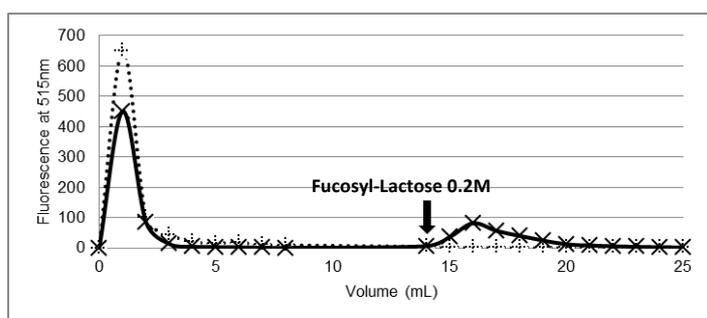
**Figure 19 :** Concanavalin A lectin affinity purification on maltose supported Sepharose with BSA.



**Figure 20:** SDS-PAGE of ConA/BSA purification

○ **Lectin affinity chromatography for antigen-H sepharose :**

1ml of H-antigen modified beads (50%vol slurry) were pipetted into a Biorad Poly-Prep® column tubes and rinsed with TRIS buffer (10mM, pH 7.6, 15mM NaCl). The beads are then soaked in 2mL of fresh buffer containing 100 µg of CF488A™ fluorescent-tagged Ulex Europaeus (H-group fucose binding lectin) and incubated for 1h at 37°C. The beads were rinsed with TBS and 1mL fractions were collected for 20 column volumes. The buffer was then swapped for a 0.2M fucosyl-lactose solution in TBS and the fractions collected. The fluorescence of each fraction was measured at 515nm with excitation at 488nm. The same protocol was applied to maltose modified beads for a control experiment.



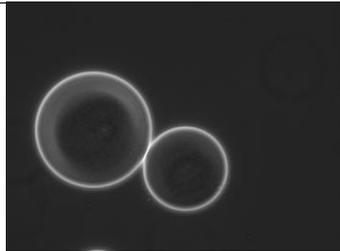
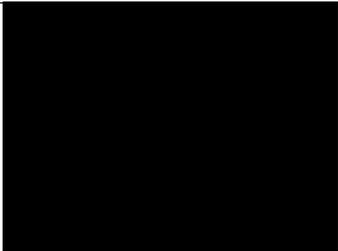
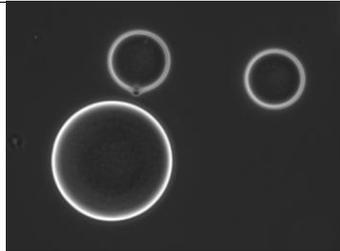
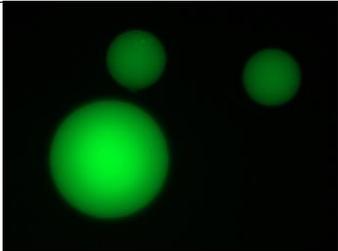
**Figure 21:** Affinity chromatography of fluorescent-UEA1 lectin on H-antigen (plain line) and maltose (dashed line) Sepharose beads

PREPARATION DE SUPPORTS D’AFFINITE D’ANTICORPS

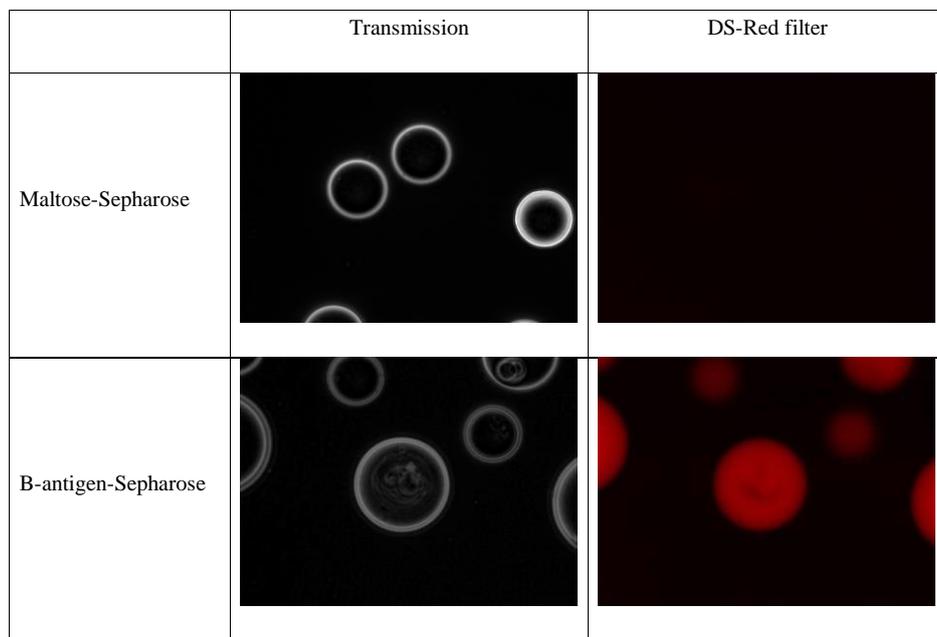
○ **Antibody binding assay:**

Monoclonal anti-blood group A and B antibodies (Sigma Aldrich produced in mouse) were fluorescent-tagged using Mix-n-Stain™ CF™ 488A antibody labeling kit and Mix-n-Stain™ CF™ 568 antibody labeling kit respectively.

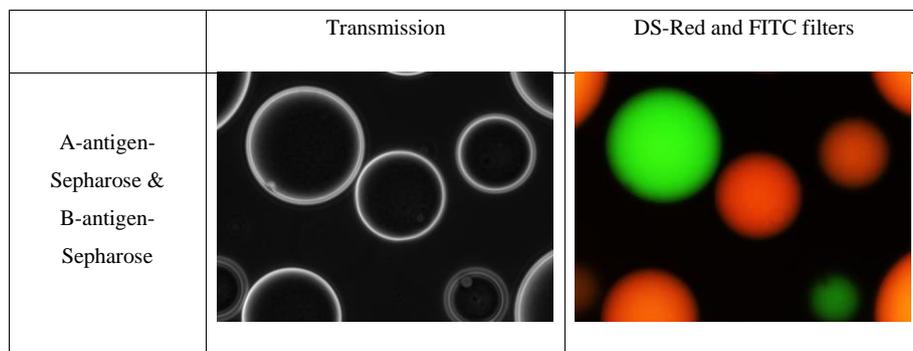
0.2ml of A-antigen modified beads (50%vol slurry) were transferred into a Biorad Poly-Prep® column and rinsed with TRIS buffer (50mM, pH 7.8, 150mM NaCl, 3x 0.5mL) at 4°C. The beads are then soaked in 200µL of fresh buffer containing 50 µL of CF488A™ fluorescent-tagged anti blood group A antibody and incubated for 1h at 4°C. The beads were rinsed with 5mL TBS then the beads were pipetted onto a glass slide and observed on an epifluorescence microscope. Maltose beads were treated with the same protocol as a control experiment.

	Transmission	FITC Filter
Maltose beads		
Antigen A beads		

**Figure 22** : Transmission and fluorescence imaging of maltose-Sepharose and A-antigen-Sepharose treated with fluorescent blood group A antibody.



**Figure 23:** Transmission and fluorescence imaging of maltose-Sepharose and B-antigen-Sepharose treated with fluorescent blood group B antibody.



**Figure 24 :** Transmission and fluorescence imaging of A-antigen-Sepharose and B-antigen-Sepharose treated with fluorescent blood group A & B antibodies



## IV. Conclusions et perspectives

Cet article décrit la modification anomère d’oligosaccharides libres par un groupement furyl avec de très bons rendements, puis leur couplage sur des billes de Sépharose par une réaction de Diels-Alder. Cette méthode permet le greffage efficace de glucides complexes dans l’eau sans utiliser de catalyseurs. Bien qu’un excès d’oligosaccharide soit nécessaire pour obtenir des taux de greffage élevés, ils sont récupérés intacts à la fin de la réaction. Les oligosaccharides greffés ont montré une bonne biodisponibilité pour l’interaction spécifique avec des lectines et des anticorps. Les antigènes des groupes sanguins A, B, H ont été fonctionnalisés puis greffés. Le support de Sépharose présentant un des antigènes des groupes sanguins fixe spécifiquement l’anticorps correspondant. L’accès à des anticorps purifiés permettrait d’évaluer la capacité de rétention du support pour d’éventuelles applications de purification du plasma sanguin.

Bien que la chimie des maléimides puisse être délicate à mettre en œuvre du fait de leur propension à l’hydrolyse en milieu basique, un contrôle strict du pH lors de la préparation de la Sépharose-maléimide permet d’éviter cette réaction parasite. Cette méthode représente une alternative efficace pour le greffage d’oligosaccharides complexes sur support solide, sans utiliser de large excès d’oligosaccharides ou de réactifs toxiques. Elle a l’avantage de ne pas altérer le sucre réducteur, ce qui permet la rétention totale de l’activité biologique du glucide greffé. Il est possible d’élargir le champ d’application de cette méthode au greffage d’oligosaccharides sur des supports variés ainsi que d’explorer la possibilité de réversibilité de la réaction de Diels Alder qui permettrait de récupérer les oligosaccharides-furyl ainsi que le support-maléimide intacts.

Commenté [ER6]: Pas clair

CONCLUSION GENERALE

---

CONCLUSION GENERALE

---

CONCLUSION GENERALE

---

## CONCLUSION GENERALE

Ces travaux de thèse effectués au sein du CERMAV en collaboration entre les équipes Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides (CBO) et Physico-Chimie des Glycopolymères (PCG) ont concerné le développement de fonctionnalisations anomère d'oligosaccharides libres ainsi que de méthodes de synthèse de glycoconjugués par chimie click non métallo-catalysée. Ce projet visait à élargir la gamme de réactions accessibles pour la ligation régiosélective d'oligosaccharides complexes tout en levant le verrou de l'utilisation de catalyseurs métalliques qui limitait le champ des potentielles applications ultérieures.

Ces travaux ont couvert plusieurs aspects, la modification anomère d'oligosaccharides complexes, la ligation des oses modifiés sur des polymères pour obtenir des glycoconjugués à visée biomédicale et finalement l'étude des propriétés physico-chimiques et biologiques des glyco-structures obtenues.

La modification anomère a été envisagée à partir des glycosylamides qui sont obtenues par condensation d'une amine sur l'aldéhyde du sucre. Cette méthode a été choisie par sa simplicité et par l'expertise du laboratoire quant à sa mise en œuvre. Une variante de cette réaction a permis d'introduire avec de bons rendements et à l'échelle du gramme soit une fonction thiol, soit un groupement furyl sur des oligosaccharides provenant de la biomasse ou sur des glycanes présents à la surface des cellules sanguines.

L'introduction de la fonction thiol sur les oligosaccharides de maltoheptaose et de xylooligosaccharides a permis d'évaluer la réaction de thiol-maléimide pour la préparation de copolymères à blocs polystyrène-*b*-sucre. Cette réaction s'est montrée aussi efficace pour la préparation de copolymères que la précédente méthode de synthèse par CuAAC déjà établie au laboratoire. Les nanoparticules obtenues avec cette méthode ont montré les mêmes propriétés physico-chimiques que celles obtenues par la chimie click au cuivre avec l'avantage de ne pas utiliser de catalyse métallique. Ce résultat permet d'envisager le changement de chimie de couplage dans les systèmes de copolymères à blocs précédemment décrits où la présence potentielle de traces de métaux est un frein pour leurs utilisations en microélectronique ou dans le domaine biomédical.

Dans une deuxième approche, les xylooligosaccharides fonctionnalisés avec une fonction thiol ont été couplés à un polymère de polycaprolactone comportant un groupement maléimide ou bromo-maléimide pour former deux copolymères PCL-*b*-XGO et PCL(ene)-*b*-XGO. Le rouge de Nile qui est un agent fluorescent hydrophobe et solvochromique a été encapsulé dans les nanoparticules obtenues avec chacun des deux copolymères et le relargage de ce composé a été

Commenté [ER7]: Ou physicochimique

## CONCLUSION GENERALE

---

suivi en fonction du caractère réducteur du milieu. Ce système de copolymère biocompatible a démontré une bonne stabilité en conditions physiologique et un relargage spécifique en présence d'un agent réducteur avec deux cinétiques, propres à la chimie de couplage utilisée. Ces nanoparticules redox-sensibles sont prometteuses pour la délivrance de médicaments au sein des cancers présentant un milieu intracellulaire réducteur. Des études *in vivo* permettraient d'évaluer la stabilité et l'internalisation de ces nanoparticules dans le milieu intracellulaire puis de comparer les cinétiques de relargage avec les résultats obtenus *in vitro*.

Un autre axe de recherche possible avec la chimie de thiol maléimide est la possibilité de bis-addition sur les bromo-maléimides. Les essais préliminaires ont donné un mélange 50:50 de copolymères PCL-*b*-XGO mono et diblocs. L'optimisation des conditions réactionnelles permettrait d'obtenir des copolymères plurifonctionnels innovants.

Le furane est le deuxième groupement fonctionnel introduit sur des oligosaccharides par réaction d'amidation entre les oligosaccharides et la furfurylamine. La réaction de Diels-Alder entre le sucre furyl et la Sépharose modifiée avec un groupement maléimide a permis le greffage du maltose, et des antigènes des groupes sanguins A, B et H. Le maltose greffé sur support solide a été utilisé avec succès pour la purification de Concanavalin A en présence de BSA. De plus, les anticorps des groupes sanguins ont été fixés de manière spécifique au support greffé avec l'antigène correspondant. Un axe de développement serait d'étudier la possibilité de retro Diels Alder pour relarguer les oligosaccharides supportés.

La synthèse chimio-enzymatiques d'antigènes spécifique de certaines maladies auto-immunes pour la préparation de nouveaux supports d'affinités permettrait d'envisager l'élimination spécifique d'anticorps du plasma sanguin afin d'en traiter les symptômes.

REFERENCES

---

REFERENCES

---

## REFERENCES

---

## Références

- [1] J. Courtois, *Curr. Opin. Microbiol.* **2009**, *12*, 261-273.
- [2] R. G. Crittenden, M. J. Playne, *Trends Food Sci. Technol.* **1996**, *7*, 353-361.
- [3] C. Grootaert, J. A. Delcour, C. M. Courtin, W. F. Broekaert, W. Verstraete, T. Van de Wiele, *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, *18*, 64-71.
- [4] J. W. Yun, *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, *19*, 107-117.
- [5] a) H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637-674; b) A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
- [6] W. I. Weis, K. Drickamer, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 441-473.
- [7] L. Lasky, *Science* **1992**, *258*, 964-969.
- [8] N. Yuki, K. Susuki, M. Koga, Y. Nishimoto, M. Odaka, K. Hirata, K. Taguchi, T. Miyatake, K. Furukawa, T. Kobata, M. Yamada, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 11404-11409.
- [9] E. A. Merritt, S. Sarfaty, F. van den Akker, C. L'Hoir, J. A. Martial, W. G. Hol, *Protein Science : A Publication of the Protein Society* **1994**, *3*, 166-175.
- [10] J. M. Daubenspeck, H. Zeng, P. Chen, S. Dong, C. T. Steichen, N. R. Krishna, D. G. Pritchard, C. L. Turnbough, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 30945-30953.
- [11] P. Anderson, M. E. Pichichero, R. A. Insel, *J. Clin. Invest.* **1985**, *76*, 52-59.
- [12] L. Schofield, M. C. Hewitt, K. Evans, M.-A. Siomos, P. H. Seeberger, *Nature* **2002**, *418*, 785-789.
- [13] D. B. Werz, P. H. Seeberger, *Chem. - Eur. J.* **2005**, *11*, 3194-3206.
- [14] D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nat Rev Drug Discov* **2005**, *4*, 477-488.
- [15] S. S. Pinho, C. A. Reis, *Nat Rev Cancer* **2015**, *15*, 540-555.
- [16] S. J. Danishefsky, Y.-K. Shue, M. N. Chang, C.-H. Wong, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 643-652.
- [17] M. C. Bryan, F. Fazio, H.-K. Lee, C.-Y. Huang, A. Chang, M. D. Best, D. A. Calarese, O. Blixt, J. C. Paulson, D. Burton, I. A. Wilson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc* **2004**, *126*, 8640-8641.
- [18] a) E. Bulard, A. Bouchet-Spinelli, P. Chaud, A. Roget, R. Calemczuk, S. Fort, T. Livache, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 1804-1811; b) O. Oyelaran, J. C. Gildersleeve, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 406-413.
- [19] I. Matsumoto, H. Kitagaki, Y. Akai, Y. Ito, N. Seno, *Anal. biochem.* **1981**, *116*, 103-110.

## REFERENCES

---

- [20] M. Caron, R. Joubert-Caron, J. R. Cartier, A. Chadli, D. Bladier, *J. Chromatogr.- A* **1993**, *646*, 327-333.
- [21] C. Orgeret, E. Seillier, C. Gautier, J. Defaye, H. Driguez, *Carbohydr. Res.* **1992**, *224*, 29-40.
- [22] K. Townson, J. Boffey, D. Nicholl, J. Veitch, D. Bundle, P. Zhang, E. Samain, T. Antoine, A. Bernardi, D. Arosio, S. Sonnino, N. Isaacs, H. J. Willison, *Glycobiology* **2007**, *17*, 294-303.
- [23] I. Braccini, S. Pérez, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 1089-1096.
- [24] K. Miyoshi, K. Uezu, K. Sakurai, S. Shinkai, *Chem. & Biodiversity* **2004**, *1*, 916-924.
- [25] K. Ferji, C. Nouvel, J. Babin, P.-A. Albouy, M.-H. Li, J.-L. Six, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2013**, *51*, 3829-3839.
- [26] K. Ferji, C. Nouvel, J. Babin, M.-H. Li, C. Gaillard, E. Nicol, C. Chassenieux, J.-L. Six, *ACS Macro Lett.* **2015**, 1119-1122.
- [27] U. G. Spizzirri, F. Iemma, G. Cirillo, I. Altimari, F. Puoci, N. Picci, *Pharm. Dev. Technol.* **2011**, *18*, 1026-1034.
- [28] V. v. Braunmuehl, G. Jonas, R. Stadler, *Macromolecules* **1995**, *28*, 17-24.
- [29] A. Narumi, K. Kawasaki, H. Kaga, T. Satoh, N. Sugimoto, T. Kakuchi, *Polym. Bull.* **2003**, *49*, 405-410.
- [30] C. Bonduelle, J. Huang, E. Ibarboure, A. Heise, S. Lecommandoux, *Chem. Comm.* **2012**, *48*, 8353-8355.
- [31] Z. Tuzar, P. Kratochvíl, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1976**, *6*, 201-232.
- [32] Y. Mai, A. Eisenberg, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5969-5985.
- [33] T. Smart, H. Lomas, M. Massignani, M. V. Flores-Merino, L. R. Perez, G. Battaglia, *Nano Today* **2008**, *3*, 38-46.
- [34] I. Otsuka, K. Fuchise, S. Halila, S. b. Fort, K. Aissou, I. Pignot-Paintrand, Y. Chen, A. Narumi, T. Kakuchi, R. Borsali, *Langmuir* **2009**, *26*, 2325-2332.
- [35] R. N. Goldberg, D. Bell, Y. B. Tewari, M. A. McLaughlin, *Biophys. Chem.* **1991**, *40*, 69-76.
- [36] J. Warrand, H. G. Janssen, *Carbohydr. polym.* **2007**, *69*, 353-362.
- [37] H. E. van Dam, A. P. G. Kieboom, H. van Bekkum, *Starch* **1986**, *38*, 95-101.
- [38] J. Szejtli, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743-1754.
- [39] E. Farkas, L. Janossy, J. Harangi, L. Kandra, A. Liptak, *Carbohydr. Res.* **1997**, *303*, 407-415.

## REFERENCES

---

- [40] W. S. York, L. K. Harvey, R. Guillen, P. Alberhseim, A. G. Darvill, *Carbohydr. Res.* **1993**, *248*, 285-301.
- [41] L. Duedahl-Olesen, K. Matthias Kragh, W. Zimmermann, *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 97-107.
- [42] X. Zhu, R. R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2009**, *48*, 1900-1934.
- [43] P. Sinaÿ, J.-C. Jacquinet, M. Petitou, P. Duchaussoy, I. Lederman, J. Choay, G. Torri, *Carbohydr. Res.* **1984**, *132*, C5-C9.
- [44] O. J. Plante, E. R. Palmacci, P. H. Seeberger, *Science* **2001**, *291*, 1523-1527.
- [45] N. O. L. Seto, M. M. Palcic, O. Hindsgaul, D. R. Bundle, S. A. Narang, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *234*, 323-328.
- [46] a) S. M. Hancock, M. D. Vaughan, S. G. Withers, *Curr. Op. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 509-519; b) L. F. Mackenzie, Q. Wang, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5583-5584.
- [47] M. Lopez, S. Fort, H. Bizot, A. Buléon, H. Driguez, *Carbohydr. polym.* **2012**, *88*, 185-193.
- [48] a) T. Endo, S. Koizumi, *Curr. Op. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 536-541; b) S. Koizumi, T. Endo, K. Tabata, A. Ozaki, *Nat. Biotech.* **1998**, *16*, 847-850.
- [49] T. Antoine, B. Priem, A. Heyraud, L. Greffe, M. Gilbert, W. W. Wakarchuk, J. S. Lam, E. Samain, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 406-412.
- [50] S. Drouillard, H. Driguez, E. Samain, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2006**, *45*, 1778-1780.
- [51] A. R. Khan, P. Forgo, K. J. Stine, V. T. D'Souza, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977-1996.
- [52] F. A. Quiocho, *Ann. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 287-315.
- [53] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1893**, *26*, 2400-2412.
- [54] R. U. Lemieux, S. Koto, *Tetrahedron* **1974**, *30*, 1933-1944.
- [55] a) A. K. Sanki, L. K. Mahal, *Synlett.* **2006**, *2006*, 0455-0459; b) N. Shaikh, L. Russo, L. Cipolla, F. Nicotra, *Mol. Divers.* **2011**, *15*, 341-345.
- [56] D. K. Roy, M. Bordoloi, *J. Carbohydr. Chem.* **2008**, *27*, 300-307.
- [57] B. Roy, B. Mukhopadhyay, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3783-3787.
- [58] A. V. Gudmundsdottir, M. Nitz, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3461-3463.
- [59] A. Lubineau, J. Le Gallic, A. Malleron, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5041-5044.
- [60] R. J. Williams, C. E. Paul, M. Nitz, *Carbohydr. Res.* **2014**, *386*, 73-77.
- [61] S. Danielson, G. Gray, *Glycoconj. J.* **1986**, *3*, 363-377.

## REFERENCES

---

- [62] K. Yamamoto, T. Tsuji, T. Osawa, *Carbohydr. Res.* **1982**, *110*, 283-289.
- [63] J. C. Gildersleeve, O. Oyelaran, J. T. Simpson, B. Allred, *Bioconj. chem.* **2008**, *19*, 1485-1490.
- [64] T. Yoshida, Y. C. Lee, *Carbohydr. Res.* **1994**, *251*, 175-186.
- [65] A. Guerry, J. Bernard, E. Samain, E. Fleury, S. Cottaz, S. Halila, *Bioconj. chem.* **2013**, *24*, 544-549.
- [66] C. Leteux, R. A. Childs, W. Chai, M. S. Stoll, H. Kogelberg, T. Feizi, *Glycobiology* **1998**, *8*, 227-236.
- [67] S. Peluso, B. Imperiali, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2085-2087.
- [68] S. Peluso, M. de L. Ufret, M. K. O'Reilly, B. Imperiali, *Chem.Biol.* **2002**, *9*, 1323-1328.
- [69] S. Park, M.-R. Lee, I. Shin, *Bioconj. chem.* **2009**, *20*, 155-162.
- [70] A. V. Gudmundsdottir, M. Nitz, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 749-752.
- [71] C. Jiménez-Castells, B. de la Torre, D. Andreu, R. Gutiérrez-Gallego, *Glycoconj J* **2008**, *25*, 879-887.
- [72] M. L. Wolfrom, A. Thompson, L. W. Georges, *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54*, 4091-4095.
- [73] P. Finch, Z. Merchant, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1975**, 1682-1686.
- [74] S. E. Cervigni, P. Dumy, M. Mutter, *Angew. Chem. Int. Edit.* **1996**, *35*, 1230-1232.
- [75] F. Peri, P. Dumy, M. Mutter, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 12269-12278.
- [76] S. Munneke, J. R. C. Prevost, G. F. Painter, B. L. Stocker, M. S. M. Timmer, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 624-627.
- [77] M. R. Carrasco, M. J. Nguyen, D. R. Burnell, M. D. MacLaren, S. M. Hengel, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5727-5729.
- [78] O. Renaudet, D. Boturyn, P. Dumy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3880-3883.
- [79] O. Lockhoff, P. Stadler, *Carbohydr. Res.* **1998**, *314*, 13-24.
- [80] W. Spevak, F. Dasgupta, C. J. Hobbs, J. O. Nagy, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3417-3422.
- [81] F. Pérez-Balderas, M. Ortega-Muñoz, J. Morales-Sanfrutos, F. Hernández-Mateo, F. G. Calvo-Flores, J. A. Calvo-Asín, J. Isac-García, F. Santoyo-González, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1951-1954.
- [82] S. Halila, M. Manguian, S. Fort, S. Cottaz, T. Hamaide, E. Fleury, H. Driguez, *Macromol. Chem. Phys.* **2008**, *209*, 1282-1290.
- [83] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [84] R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 604-637.

REFERENCES

---

- [85] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Edit.* **1963**, *2*, 633-645.
- [86] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [87] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128-1137.
- [88] J. D. Cushen, I. Otsuka, C. M. Bates, S. Halila, S. Fort, C. Rochas, J. A. Easley, E. L. Rausch, A. Thio, R. Borsali, C. G. Willson, C. J. Ellison, *ACS nano* **2012**, *6*, 3424-3433.
- [89] G. Pourceau, A. Meyer, Y. Chevolot, E. Souteyrand, J.-J. Vasseur, F. Morvan, *Bioconj. chem.* **2010**, *21*, 1520-1529.
- [90] F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397-14402.
- [91] L. D. Pachón, J. H. van Maarseveen, G. Rothenberg, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 811-815.
- [92] I. S. Park, M. S. Kwon, Y. Kim, J. S. Lee, J. Park, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 497-500.
- [93] A. Dumont, A. Malleron, M. Awwad, S. Dukan, B. Vauzeilles, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2012**, *51*, 3143-3146.
- [94] M. C. Cortizo, M. Fernandez Lorenzo de Mele, *Biol. Trace Elem. Res.* **2004**, *102*, 129-141.
- [95] a) N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047; b) J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688-3690.
- [96] D. H. Ess, G. O. Jones, K. N. Houk, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1633-1636.
- [97] J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486-11493.
- [98] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2285-2287.
- [99] a) C. Glaser, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1869**, *2*, 422-424; b) C. Glaser, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1870**, *154*, 137-171.
- [100] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015.
- [101] S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2005**, *44*, 5188-5240.
- [102] a) Z. Zhang, Q. Zhou, F. Ye, Y. Xia, G. Wu, M. L. Hossain, Y. Zhang, J. Wang, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 2277-2286; b) Z. Li, H. Cai, M. Hassink, M. L. Blackman, R. C. D. Brown, P. S. Conti, J. M. Fox, *Chem. Comm. (Cambridge, England)* **2010**, *46*, 8043-8045.
- [103] F. C. G. Plancher, *Atti reale accad. naz. Lincei* **1904**, *5*, 489.

## REFERENCES

---

- [104] P. O. Tawney, R. H. Snyder, C. E. Bryan, R. P. Conger, F. S. Dovell, R. J. Kelly, C. H. Stiteler, *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 56-60.
- [105] D. H. Rich, P. D. Gesellchen, D. Tong, A. Cheung, C. K. Buckner, *J Med Chem* **1975**, *18*, 1004-1010.
- [106] C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2010**, *49*, 1540-1573.
- [107] J. W. Chan, C. E. Hoyle, A. B. Lowe, M. Bowman, *Macromolecules* **2010**, *43*, 6381-6388.
- [108] A. B. Lowe, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 17-36.
- [109] J. Ni, S. Singh, L.-X. Wang, *Bioconj. Chem.* **2003**, *14*, 232-238.
- [110] L. M. Tedaldi, M. E. B. Smith, R. I. Nathani, J. R. Baker, *Chem. comm.* **2009**, 6583-6585.
- [111] O. Diels, K. Alder, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1928**, *460*, 98-122.
- [112] O. Diels, K. Alder, *Ber. Dtsch. Chem. Ges. (A and B Series)* **1929**, *62*, 2081-2087.
- [113] J. Sauer, R. Sustmann, *Angew. Chem. Int. Edit.* **1980**, *19*, 779-807.
- [114] R. B. Woodward, R. Hoffmann, *Angew. Chem.* **1969**, *81*, 797-869.
- [115] K. N. Houk, *Acc. Chem. Res.* **1975**, *8*, 361-369.
- [116] a) D. Sarma, S. S. Pawar, S. S. Deshpande, A. Kumar, *Tetrahedron lett.* **2006**, *47*, 3957-3958; b) D. C. Rideout, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7816-7817.
- [117] a) X.-L. Sun, C. L. Stabler, C. S. Cazalis, E. L. Chaikof, *Bioconj. Chem.* **2005**, *17*, 52-57; b) V. Froidevaux, M. Borne, E. Laborbe, R. Auvergne, A. Gandini, B. Boutevin, *RSC Advances* **2015**, *5*, 37742-37754; c) V. Pozsgay, N. E. Vieira, A. Yergey, *Org. lett.* **2002**, *4*, 3191-3194.
- [118] A. Gandini, *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 1-29.
- [119] V. Pozsgay, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5983-5999.
- [120] I. Otsuka, S. Tallegas, Y. Sakai, C. Rochas, S. Halila, S. Fort, A. Bsiesy, T. Baron, R. Borsali, *Nanoscale* **2013**, *5*, 2637-2641.
- [121] S. Tallegas, T. Baron, G. Gay, C. Aggrafeil, B. Salhi, T. Chevolleau, G. Cunge, A. Bsiesy, R. Tiron, X. Chevalier, C. Navarro, K. Aissou, I. Otsuka, S. Halila, S. Fort, R. Borsali, *physica status solidi (c)* **2013**, *10*, 1195-1206.
- [122] H.-S. Sun, Y.-C. Chiu, W.-Y. Lee, Y. Chen, A. Hirao, T. Satoh, T. Kakuchi, W.-C. Chen, *Macromolecules* **2015**, *48*, 3907-3917.
- [123] L. Mazzarino, G. Loch-Neckel, L. D. S. Bubniak, S. Mazzucco, M. C. Santos-Silva, R. Borsali, E. Lemos-Senna, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15*, 781-791.
- [124] A. Ghaffar, A. Scott, G. Scott, *Eur. Polym. J.* **1975**, *11*, 271-275.

## REFERENCES

---

- [125] A. Petrelli, R. Borsali, S. Fort, S. Halila, *Carbohydr. Polym.* **2015**, *124*, 109-116.
- [126] J. K. Kim, S. Y. Yang, Y. Lee, Y. Kim, *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 1325-1349.
- [127] S. R. Park, T. P., in *Functional polymer films Vol. 1* (Ed.: W. K. R. C. Advincula), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2011**, pp. 403-474.
- [128] M. A. Tasdelen, & Yagci, Y., in *Material science and technology, Vol. 1* (Ed.: C. J. H. In D. A. Schlueter, & J. Sakamoto), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2013**, pp. 315-350.
- [129] a) S. de Medeiros Modolon, I. Otsuka, S. Fort, E. Minatti, R. Borsali, S. Halila, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1129-1135; b) A. R. Fajardo, A. Guerry, E. A. Britta, C. V. Nakamura, E. C. Muniz, R. Borsali, S. Halila, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 2691-2700.
- [130] a) V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2009**, *48*, 9879-9883; b) F. Wolbers, P. ter Braak, S. Le Gac, R. Luttge, H. Andersson, I. Vermes, A. van den Berg, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 5073-5080.
- [131] C. E. Hoyle, A. B. Lowe, C. N. Bowman, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1355-1387.
- [132] S. P. S. Koo, M. M. Stamenović, R. A. Prasath, A. J. Inglis, F. E. Du Prez, C. Barner-Kowollik, W. Van Camp, T. Junkers, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2010**, *48*, 1699-1713.
- [133] G.-Z. Li, R. K. Randev, A. H. Soeriyadi, G. Rees, C. Boyer, Z. Tong, T. P. Davis, C. R. Becer, D. M. Haddleton, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1196-1204.
- [134] R. J. Pounder, M. J. Stanford, P. Brooks, S. P. Richards, A. P. Dove, *Chem. comm.* **2008**, 5158-5160.
- [135] C.-C. Tsai, C.-R. Lin, H.-Y. Tsai, C.-J. Chen, W.-T. Li, H.-M. Yu, Y.-Y. Ke, W.-Y. Hsieh, C.-Y. Chang, C.-Y. Wu, S.-T. Chen, C.-H. Wong, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 17689-17697.
- [136] H. S. N. Jayawardena, K. W. Jayawardana, X. Chen, M. Yan, *Chem. comm.* **2013**, *49*, 3034-3036.
- [137] S. Fry, *Biochem. Soc. Symp.* **1994**, 5-14.
- [138] Z. Wang, in *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, Inc., **2010**.
- [139] L.-T. T. Nguyen, M. T. Gokmen, F. E. Du Prez, *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 5527-5536.
- [140] I. Otsuka, M. Osaka, Y. Sakai, C. Travelet, J.-L. Putaux, R. Borsali, *Langmuir* **2013**, *29*, 15224-15230.
- [141] I. Otsuka, C. Travelet, S. Halila, S. Fort, I. Pignot-Paintrand, A. Narumi, R. Borsali, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1458-1465.

## REFERENCES

---

- [142] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 271-284.
- [143] S. E. Mastroianni, T. H. Epps, *Langmuir* **2013**, *29*, 3864-3878.
- [144] A. Fernández-Tejada, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, *ChemMedChem*. **2015**, *10*, 1291-1295.
- [145] L. Mazzarino, I. Otsuka, S. Halila, L. d. S. Bubniak, S. Mazzucco, M. C. Santos-Silva, E. Lemos-Senna, R. Borsali, *Macromol. Biosci.* **2014**, n/a-n/a.
- [146] K. M. Zepon, I. Otsuka, C. Bouilhac, E. C. Muniz, V. Soldi, R. Borsali, *Biomacromolecules* **2015**.
- [147] Q. Zhang, N. Re Ko, J. Kwon Oh, *Chem. comm.* **2012**, *48*, 7542-7552.
- [148] a) B. D. Mather, K. Viswanathan, K. M. Miller, T. E. Long, *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 487-531; b) A. B. Mabire, M. P. Robin, H. Willcock, A. Pitto-Barry, N. Kirby, R. K. O'Reilly, *Chem. comm.* **2014**, *50*, 11492-11495.
- [149] a) A. D. Baldwin, K. L. Kiick, *Bioconj. Chem.* **2011**, *22*, 1946-1953; b) B.-Q. Shen, K. Xu, L. Liu, H. Raab, S. Bhakta, M. Kenrick, K. L. Parsons-Reponte, J. Tien, S.-F. Yu, E. Mai, D. Li, J. Tibbitts, J. Baudys, O. M. Saad, S. J. Scales, P. J. McDonald, P. E. Hass, C. Eigenbrot, T. Nguyen, W. A. Solis, R. N. Fuji, K. M. Flagella, D. Patel, S. D. Spencer, L. A. Khawli, A. Ebens, W. L. Wong, R. Vandlen, S. Kaur, M. X. Sliwkowski, R. H. Scheller, P. Polakis, J. R. Junutula, *Nat Biotech* **2012**, *30*, 184-189; c) R. P. Lyon, J. R. Setter, T. D. Bovee, S. O. Doronina, J. H. Hunter, M. E. Anderson, C. L. Balasubramanian, S. M. Duniho, C. I. Leiske, F. Li, P. D. Senter, *Nat Biotech* **2014**, *32*, 1059-1062.
- [150] M. E. B. Smith, F. F. Schumacher, C. P. Ryan, L. M. Tedaldi, D. Papaioannou, G. Waksman, S. Caddick, J. R. Baker, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1960-1965.
- [151] C. P. Ryan, M. E. B. Smith, F. F. Schumacher, D. Grohmann, D. Papaioannou, G. Waksman, F. Werner, J. R. Baker, S. Caddick, *Chem. comm.* **2011**, *47*, 5452-5454.
- [152] D. H. Rich, P. D. Gesellchen, A. Tong, A. Cheung, C. K. Buckner, *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 1004-1010.
- [153] G. W. Hart, R. J. Copeland, *Cell* **2010**, *143*, 672-676.
- [154] *Lectins Methods and Protocols, Vol. 1200*, Humana Press, **2014**.
- [155] a) E. Kaltgrad, S. Sen Gupta, S. Punna, C.-Y. Huang, A. Chang, C.-H. Wong, M. G. Finn, O. Blixt, *ChemBioChem*. **2007**, *8*, 1455-1462; b) T. Pochechueva, A. Chinarev, M. Spengler, E. Korchagina, V. Heinzelmann-Schwarz, N. Bovin, R. Rieben, *Analyst* **2011**, *136*, 560-569.
- [156] L. Rydberg, A. Bengtsson, O. Samuelsson, K. Nilsson, M. Breimer, *Transpl Int* **2005**, *17*, 666-672.
- [157] L. Lindberg, K. Theinert, J. Liu, J. Holgersson, *Transfusion* **2012**, *52*, 2356-2367.

## REFERENCES

---

- [158] Z. Sun, A. Ilie, M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2015**, n/a-n/a.
- [159] T. Antoine, C. Bosso, A. Heyraud, E. Samain, *Biochimie* **2005**, *87*, 197-203.
- [160] C. Dumon, C. Bosso, J. P. Utille, A. Heyraud, E. Samain, *ChemBioChem.* **2006**, *7*, 359-365.
- [161] G. S. Murthy, N. R. Moudgal, *J. Biosci.* **1986**, *10*, 351-358.
- [162] D. Pepper, in *Practical Protein Chromatography, Vol. 11* (Eds.: A. Kenney, S. Fowell), Humana Press, **1992**, pp. 173-196.
- [163] V. Lavanya Latha, K. A. Kulkarni, R. Nagender Rao, N. Siva Kumar, K. Suguna, *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2006**, *62*, 163-165.
- [164] M.-r. Lee, I. Shin, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4269-4272.
- [165] A. Lohse, R. Martins, M. R. Jørgensen, O. Hindsgaul, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2006**, *45*, 4167-4172.
- [166] H. Akizawa, M. Imajima, H. Hanaoka, T. Uehara, S. Satake, Y. Arano, *Bioconj. Chem.* **2013**, *24*, 291-299.
- [167] B. Svensson, K. Larsen, A. Gunnarsson, *Eur. J. Biochem.* **1986**, *154*, 497-502.
- [168] S. F. H. James B. Sumner, *J. Bacteriol.* **1936**, *32*, 227-237.
- [169] E. J. Yunis, J. M. Svardal, R. A. Bridges, *Genetics of the Bombay Phenotype, Vol. 33*, **1969**.

## REFERENCES

---

ANNEXES

---

ANNEXES

---

ANNEXES

---

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Fonctions de reconnaissance des glycoconjugués .....	20
<b>Figure 2</b> : Le pentasaccharide GM1 lié à la sous unité B de la toxine de <i>vibrio cholerae</i> <sup>[9]</sup> ...	22
<b>Figure 3</b> : Structure du GPI ( <b>a</b> ) et du tétrasaccharide de B anthracis ( <b>b</b> ) .....	23
<b>Figure 4</b> : Structure du vaccin anti-malaria GPI-KLH <sup>[13]</sup> .....	23
<b>Figure 5</b> : Structure du sialyl Tn ( <b>a</b> ) et de Globo H ( <b>b</b> ).....	24
<b>Figure 6</b> : Modification anomère du globo H.....	25
<b>Figure 7</b> : Glycoconjugué KLH-globo H pour une approche de vaccin anticancer .....	26
<b>Figure 8</b> : Structure général d'un biocapteur .....	26
<b>Figure 9</b> : Antigène Globo-H supporté sur une plaque de micro titration et réaction de relargage du ligand <sup>[17]</sup> .....	27
<b>Figure 10</b> : Principe de purification par chromatographie d'affinité .....	28
<b>Figure 11</b> : Thiocelotriose greffée sur Sépharose 4B .....	28
<b>Figure 12</b> : Ganglioside GM1 greffé sur une bille de Sépharose .....	29
<b>Figure 13</b> : Structure des différentes familles de copolymères à bloc hybrides .....	30
<b>Figure 14</b> : Synthèse des copolymères Dextran-g-PDECholA par ATRP .....	31
<b>Figure 15</b> : Synthèse du chitosan-g-PNIPAM .....	32
<b>Figure 16</b> : Synthèse de copolymère PS-g-Amylose par polymérisation enzymatique sur le maltopentaose <sup>[29]</sup> .....	32
<b>Figure 17</b> : Synthèse de glycopolypeptides décorés avec des oligosaccharides de dextran ou d'acide hyaluronique <sup>[30]</sup> .....	33
<b>Figure 18</b> : Exemples d'architecture de copolymères à blocs .....	34
<b>Figure 19</b> : Fraction massique des blocs polymériques et types de structures obtenues en solution <sup>[33]</sup> .....	35

## ANNEXES

<b>Figure 20</b> : Stratégie de synthèse d'un copolymère dibloc par la méthode du « grafting onto » .....	35
<b>Figure 21</b> : PNIPAM-b-Maltoheptaose copolymères pour la préparation de nanocapsules thermo réversibles <sup>[34]</sup> .....	36
<b>Figure 22</b> : Profil HPAEC de l'hydrolyse de l'amidon à 90°C dans 0.45M HCL a différent temps de réactions .....	38
<b>Figure 23</b> : Structure de la $\beta$ -cyclodextrine .....	39
<b>Figure 24</b> : Profil HPEAC des produits obtenus par hydrolyse d'amidon de pomme de terre par l'amylase BT-21, 30min pH 9.5 a 55°C <sup>[41]</sup> .....	40
<b>Figure 25</b> : Position d'hydrolyse du xyloglucan des graines de tamarin par la cellulase 3042A .....	41
<b>Figure 26</b> : Mécanisme général de la glycosylation chimique .....	41
<b>Figure 27</b> : Synthèse automatique sur support solide d'une sous unité $\beta$ -glucane d'un éliciteur de la phytoalexine. <sup>[44]</sup> .....	42
<b>Figure 28</b> : Synthèse enzymatique <i>in vitro</i> de l'antigène B du groupe sanguin <sup>[45]</sup> .....	43
<b>Figure 29</b> : Réaction de transglycosylation par une glycoside-hydrolase native .....	44
<b>Figure 30</b> : Transglycosylation catalysée par une glycosynthase.....	44
<b>Figure 31</b> : Préparation d'un oligosaccharide de xyloglucane de DP20 par synthèse enzymatique <i>in vitro</i> <sup>[47]</sup> .....	45
<b>Figure 32</b> : Système de production du globotriose par couplage de bactéries recombinantes perméabilisées <sup>[48a, 48b]</sup> .....	46
<b>Figure 33</b> : Production du 2-fucosyllactose <i>in vivo</i> par <i>E.Coli</i> génétiquement modifiée <sup>[50]</sup> ...	46
<b>Figure 34</b> : Modification anomère d'oligosaccharide .....	47
<b>Figure 35</b> : Equilibre hemiacétal cyclique, aldéhyde du glucose $\alpha$ et $\beta$ .....	48
<b>Figure 36</b> : Préparation du propargyl-( $\alpha$ )D-O-propargyl par glycosylation de Fischer <sup>[56]</sup> .....	49
<b>Figure 37</b> : Glycosylation par <i>N</i> -glycosylsulfonohydrazide <sup>[58]</sup> .....	49

## ANNEXES

<b>Figure 38</b> : Assistance du groupe protecteur en C2.....	49
<b>Figure 39</b> : Schémas réactionnel de l'amination réductrice .....	50
<b>Figure 40</b> : Fonctionnalisation anomère de chitooligosaccharides par une aniline propargylée <sup>[65]</sup> .....	51
<b>Figure 41</b> : Couplage de la glycosylamine- <i>N</i> -acétylée sur un peptide par liaison hydrazine .	51
<b>Figure 42</b> : Fonctionnalisation de surface avec l'hydrazine suivie du couplage avec le maltose .....	52
<b>Figure 43</b> : Condensation d'hydroxylamine sur le glucose .....	53
<b>Figure 44</b> : Modification du Lewis-X par condensation d'oximes <sup>[76]</sup> .....	53
<b>Figure 45</b> : Synthèse de lactose- <i>N</i> (Ac)-allylamine peracétylé .....	54
<b>Figure 46</b> : Fonctionnalisation des Xylooligosaccharides par la propargylamine <sup>[82]</sup> .....	55
<b>Figure 47</b> : Exemples de réactions de chimie click .....	57
<b>Figure 48</b> : Cycloaddition dipolaire thermique de Huisgen .....	58
<b>Figure 49</b> : Mécanisme de la CuAAC proposé par Sharpless <i>et al.</i> <sup>[87]</sup> .....	58
<b>Figure 50</b> : Structure des LPS bactériens avec les sites d'insertion et la structure de KDO- $N_3$ .....	60
<b>Figure 51</b> : Exemples de cyclooctynes utilisées pour la cycloaddition azide-alcyne, R = position utilisée pour la fonctionnalisation .....	61
<b>Figure 52</b> : Marquage <i>in vitro</i> de cellules présentant des groupements SiaNaz avec le DIBO-biotine <sup>[98]</sup> .....	61
<b>Figure 53</b> : Synthèse de Tawney des maléimides.....	63
<b>Figure 54</b> : Panel de réactions possibles sur la fonction maléimide.....	63
<b>Figure 55</b> : Hydrothiolation d'un alcène activé.....	63
<b>Figure 56</b> : Substrats activés pour la réaction thiol-Michael.....	64
<b>Figure 57</b> : Mécanisme proposé de l'addition de thiol-Michael catalysé par une base.....	64

---

<b>Figure 58</b> : Cycle catalytique proposé par Lowes pour la thiol-Michael catalysée par les trialkylphosphines <sup>[107]</sup> .....	65
<b>Figure 59</b> : Ligation thiol maléimide du peptide VIH-20 avec un oligosaccharide de mannose .....	66
<b>Figure 60</b> : Ligation réversible de la Cystéine protégée sur un bromomaleimide <sup>[110]</sup> .....	66
<b>Figure 61</b> : Mécanisme proposé pour le relargage du thiol en solution .....	66
<b>Figure 62</b> : La cycloaddition de Diels-Alder.....	67
<b>Figure 63</b> : Approches des réactifs conduisant aux adduits <i>exo</i> et <i>endo</i> de la réaction entre les groupements furane et maléimide .....	67
<b>Figure 64</b> : Couplage d'oligorhamnose sur l'albumine humaine par réaction de Diels Alder <sup>[117c]</sup> .....	68
<b>Figure 65</b> : Approche thiol-ène pour la préparation de copolymère à blocs .....	73
<b>Figure 66</b> : Stratégie «target and delivery » pour la nano livraison d'agents actifs .....	116
<b>Figure 67</b> : Double addition sur les bromo maléimides .....	146
<b>Figure 68</b> : Synthèse du copolymère myktoarm PCL- <i>b</i> -(XGO) <sub>2</sub> .....	146
<b>Figure 69</b> : MALDI-TOF du mélange PCL- <i>b</i> -XGO et PCL- <i>b</i> -(XGO) <sub>2</sub> .....	147
<b>Figure 70</b> : Agrandissement du spectre MALDI-TOF des copolymères myktoarms de PCL- <i>b</i> -XGOs.....	148
<b>Figure 71</b> : Double addition sur les dibromo-maléimides et réversibilité en présence de thiol libres .....	150

## SYNTHESE PAR CHIMIE CLICK NON METALLO-CATALYSEE DE GLYCOCONJUGUES MACROMOLECULAIRES D'INTERET MEDICAL

L'objectif de ce travail est de développer de nouvelles méthodes de modification et de couplage régiosélectif d'oligosaccharides pour la préparation de glycoconjugués par une chimie « click » sans catalyse métallique. Les glycoconjugués ont actuellement de nombreuses applications potentielles dans les domaines de la santé et de la nanotechnologie. Un verrou actuel à leur développement est l'utilisation de métaux lors de leur synthèse pouvant entraîner une contamination des produits finaux et limiter le champ d'utilisation de ces molécules. D'où la nécessité de développer une méthode efficace de synthèse de glycoconjugués sans catalyseur métallique.

Dans le cadre de cette thèse, deux approches de modification puis couplage non metallo-catalysée d'oligosaccharides complexes sur des polymères ont été développées, permettant la synthèse de glyco-polymères et de glyco-adsorbants de manière efficace. Les glycopolymères ont été obtenus avec de bons rendements par une réaction entre un oligosaccharide fonctionnalisé par un groupement thiol et un polymère fonctionnalisé par un groupement (bromo)-maléimide ou maléimide. Les nanoparticules obtenues par autoassemblage des copolymères dans l'eau ont été caractérisées par des méthodes physico-chimiques. Des copolymères polycaprolactone-*b*-xylooligosaccharides ayant une liaison réversible en milieu réducteur ont été préparés et les nanoparticules correspondantes ont été évaluées comme modèle de relargage contrôlé d'agents actifs en fonction du potentiel redox du milieu. Le relargage sélectif de l'agent encapsulé dans les milieux réducteurs en fait un système prometteur pour les stratégies d'encapsulation et relargage d'agent anticancéreux au sein des cellules tumorales. Des glyco-adsorbants ont été préparés par une réaction de Diels Alder entre des oligosaccharides fonctionnalisés par un groupement furyl et une matrice modifiée avec un groupement maléimide. Les supports d'affinités ainsi synthétisés ont permis l'accrochage puis la purification sélective de lectines. Le greffage des antigènes des groupes sanguins (A, B) a permis un piégeage sélectif des anticorps correspondants sur le support. Ce type d'immuno-adsorbants a des applications dans le traitement de maladies auto-immunes comme le syndrome de Guillain Barré ou pour la préparation de plasma universel.

Pour conclure, deux méthodes de modification et de couplage d'oligosaccharides efficaces ont été développées, ouvrant la voie à de nouvelles voies de synthèses de glycoconjugués.

**Mots Clés :** Oligosaccharides, chimie click, glycoconjugués, nanomédecine, copolymères, immuno-adsorbants, encapsulation, vectorisation

## METAL FREE CLICK CHEMISTRY SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE NEO- GLYCOCONJUGATES.

The aim of the project is to develop new anomeric modification of oligosaccharides for the synthesis of glycoconjugates by metal-free click chemistry. Synthetic glycans have shown a great potential in medical and nanotechnology related fields. The current use of metallic catalyst during synthesis and the risk of contamination of the final product represent a drawback which could restrain their applications. Therefore an efficient metal free synthesis of glycoconjugates could be of great interest to circumvent this obstacle.

Two distinct synthetic strategies have been explored for the metal free coupling of complex oligosaccharides on polymers to yield block-copolymers and glycoadsorbants. The glycopolymers were synthesized by a Michael addition between a thiol functionalized oligosaccharide and a maleimide or bromo-maleimide functionalized polymer. The nanoparticles obtained from the self-assembly of these amphiphilic copolymers in water were characterized. The polycaprolactone-*b*-xylooligosaccharides copolymers presenting a reducible linkage were self-assembled into nanoparticles and assessed as model for the delivery of hydrophobic drugs. This system showed a selective release of the entrapped molecules in reducing environment making it an interesting system for the intratumoral delivery of anti-cancer drugs. Glycoadsorbents were prepared by a Diels Alder reaction between a solid matrix displaying a maleimide moiety and furyl functionalized oligosaccharides. The affinity matrices obtained allowed the selective purification of lectins. The blood group antigen (A;B) grafted matrices displayed good properties for the trapping of corresponding anti-A or anti-B antibodies. These types of immuno-adsorbants have great potential for the treatment of immune diseases like the Guillain-Barré syndrome.

To conclude, two efficient anomeric modification and coupling strategies of oligosaccharides have been developed, opening the way to the metal free synthesis of various glycoconjugates.

**Keywords :** Oligosaccharides, click chemistry, block copolymers, nanoparticles, vectorisation, immuno-adsorbants, affinity chromatography