



THESE

présentée en vue de l'obtention
du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Spécialité : Chimie organique

par

Christelle ZANDANEL

Ingénieur E.C.P.M.

Préparation de polymères imprimés de sucres par mini-émulsion « one pot » et l'approche semi-covalente en surface

Soutenue le 28 avril 2009 devant la commission d'examen :

**Professeur
Professeur
Docteur
Docteur
Docteur
Docteur**

**D. Uguen
J.M. Beau
V. Pichon
R. Baati
C. Mioskowski
A. Wagner**

**Rapporteur interne
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Membre invité-Encadrant
Directeur de thèse (décédé)
Directeur de thèse**



*A mes parents,
mes grand-parents
mes amis fidèles.....*

«pour qu'elles se reconnaissent, deux molécules doivent s'ajuster comme une clé et une serrure. La bonne clé peut rentrer dans la serrure et l'ouvrir : c'est l'image géométrique de la reconnaissance moléculaire, qui bien sûr s'est beaucoup compliquée depuis. »

Emil Fischer, 1894

Sommaire

Remerciements	13
Abréviations.....	15
Notations	17
Introduction	18
Chapitre 1 : Introduction générale.....	21
I. Historique des empreintes moléculaires.....	23
II. Principe des empreintes moléculaires	24
III. Les différents types de polymérisation	25
III.1 Polymérisation en masse	25
III.2 Polymérisation en suspension	26
III.3 Polymérisation par précipitation	27
III.4 Polymérisation par émulsion et mini-émulsion.....	28
III.5 Autres méthodes de polymérisation	31
III.6 Récapitulatif des principales caractéristiques de chaque technique de polymérisation	31
IV. Les paramètres fondamentaux dans la polymérisation	32
IV.1 Influence du solvant dans la polymérisation en masse.....	32
IV.2 Influence de la température	32
IV.3 Influence de la nature de l'agent de réticulation	33
V. Des différents modes d'impression moléculaire	35
V.1 Approche covalente	35
V.1.1 Les liaisons covalentes réversibles.....	35
V.1.1.a Les bases de Schiff	35
V.1.1.b Les acétals/cétals	36
V.1.1.c Les esters boroniques	37
V.1.2 Les liaisons covalentes fortes.....	39
V.2 Approche semi-covalente	40
V.3 Impression semi-covalente avec un espaceur.....	42
V.4 Impression non covalente	44
V.4.1 Les interactions électrostatiques et liaisons hydrogènes	45
V.4.2 Les liaisons purement hydrophobes	47
V.4.3 Les liaisons de coordination avec un métal	49
V.5 Récapitulatif des caractéristiques des différents modes d'impression moléculaire.....	51
V.6 Impression dans la masse du polymère ou en surface ?.....	53
VI. Caractérisation physique des polymères imprimés.....	56
VI.1 Microscopie Electronique à Transmission : MET.....	56

VI.2 Taille et polydispersité des particules	57
VI.3 Spectrométrie Infra-Rouge	57
VI.4 Surface spécifique par BET	58
VI.5 Analyse XPS.....	59
VII. Reconnaissance et stabilité.....	61
VII.1 Conditions standards d'étude de binding	61
VII.2 Quantification du binding.....	61
VII.3 Caractérisation du binding.....	62
VII.4 Effet d'empreinte et sélectivité	66
VII.5 Traitement chimique des empreintes moléculaires.....	68
VII.6 Stabilités thermique et mécanique des polymères.....	68
VIII. Applications des polymères imprimés.....	69
VIII.1 Chromatographie liquide.....	69
VIII.2 Extraction sur support solide.....	69
VIII.3 Détecteurs.....	70
VIII.4 Catalyse.....	70
VIII.5 Synthèse.....	71
IX. Les empreintes moléculaires appliquées aux sucres : état de l'art	73
IX.1 Impression covalente.....	73
IX.2 Impression non covalente par liaisons hydrogènes et électrostatiques.....	75
IX.3 Impression non covalente par liaisons de coordination.....	82
IX.4 Récepteurs artificiels de sucres non basés sur des polymères imprimés	85
IX.5 Récepteurs naturels de sucres.....	87
IX.6 Récapitulatif des constantes de dissociation.....	88
X. Sujet de thèse	89
<i>Chapitre 2 : Synthèse des templates et des molécules nécessaires au binding ..</i>	93
I. Synthèse des templates des mono et disaccharides.....	95
I.1 Première synthèse développée au laboratoire	95
I.2 Etude et optimisation de la réaction de perméthacrylation	96
I.2.1 Introduction.....	96
I.2.2 Généralités sur les sucres.....	97
I.2.2.a Mutarotation des sucres.....	97
I.2.2.b Effets stériques et anomériques.....	99
I.2.2.c Conséquences de l'effet anomérique	100
I.2.2.d Conséquences sur la peracétylation des sucres	100
I.2.3 Etude de la perméthacrylation de sucres.....	101
I.2.3.a Premiers essais avec le glucose	102
I.2.3.b Perméthacrylation de sucres.....	103
I.3 Etude de la réactivité des sucres perméthacrylés	112
I.3.1 Glycosylation directe avec $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	112

I.3.2 Glycosylation directe du mannose perméthacrylé α	115
I.3.3 Halogénéation en position anomérique.....	116
I.3.4 Hydrolyse en position anomérique	116
I.3.5 Acétylation de la position anomérique	118
I.3.6 Introduction du groupement trichloroacétimide	120
I.4 Glycosylation de substrats activés par un groupement trichloroacétimide en position anomérique.....	122
I.5 Déprotection de la fonction benzylique	125
I.6 Introduction de la fonction O-sulfonate	127
I.7 Rendements globaux et récapitulatif.....	130
II. Synthèse de molécules cibles pour les études de binding	132
II.1 Synthèse de monosaccharides.....	133
II.2 Synthèse de disaccharides	135
III. CONCLUSION :.....	143
<i>Chapitre 3 : Polymères imprimés avec des dérivés de monosaccharides</i>	<i>145</i>
I. Polymères imprimés avec un dérivé de glucose	148
I.1 Premiers polymères imprimés synthétisés.....	148
I.1.1 Paramètres du système de polymérisation.....	148
I.1.2 Mode opératoire	148
I.1.3 Clivage du template 5.....	153
I.1.4 Préparation des polymères de contrôle.....	156
I.1.4.a Influence de la matrice styrène/DVB.....	156
I.1.4.b Influence des acides carboxyliques en surface.....	159
I.1.5 Etude du binding.....	163
I.1.6 Etude de sélectivité de MIPglu1c	166
I.1.7 Post fonctionnalisation et inhibition du binding.....	172
I.1.8 Influence du groupement présent en position anomérique dans la reconnaissance polymère-substrat.....	173
I.1.9 Tentative de quantification du template dans le processus polymérisation/clivage	175
I.1.10 Conclusion 1 :	182
I.2 Optimisation de la formulation des polymères imprimés avec un dérivé de glucose ...	183
I.2.1 Paramètres étudiés	183
I.2.2 Etude des capacités en fonction du rapport styrène/DVB et capath.....	185
I.2.3 Etude de la sélectivité en fonction du rapport styrène/DVB et capath	196
I.2.4 Caractérisation des polymères imprimés par MET	204
I.2.5 Mesure de la polydispersité et de la taille des particules	205
I.2.6 Evolution de la surface spécifique des polymères imprimés	207
I.2.7 Conclusion 2 :	209
II. Polymères imprimés avec différents monosaccharides.....	211
II.1 Polymère imprimé avec un dérivé de mannose	211
II.2 Polymère imprimé avec un dérivé de xylose	218

Conclusion 3	221
Chapitre 4 : Polymères imprimés avec des dérivés de disaccharides	227
I. Polymères imprimés avec un dérivé du maltose	229
I.1 Etude du lot MIPmalt1c	231
I.2 Etude des lots MIPmalt1c2 et MIPmalt1c2'	243
I.3 Optimisation du process de polymérisation/clivage	243
I.4 Caractérisation du polymère MIPmalt7c3	250
I.4.1 MET, polydispersité et BET	250
I.4.2 Etude du binding, de la cinétique et calcul de la constante de dissociation.....	251
I.4.2.a Etudes de binding	251
I.4.2.b Détermination de la constante de dissociation.....	253
I.4.2.c Etudes de l'influence des chaines lipidique en position anomérique de l'analyte et du solvant d'incubation.....	256
I.4.2.d Etude de la sélectivité.....	262
I.5 Conclusion 1:.....	265
II. Polymères imprimés avec un dérivé de cellobiose	266
II.1 Caractérisation des polymères	268
II.2 Etudes de binding.....	270
II.3 Etudes du batch MIPcello2c1 :.....	272
II.3.1 Détermination du facteur d'impression :.....	272
II.3.2 Détermination de la constante de dissociation dans le chloroforme :.....	273
II.3.3 Influence du solvant d'incubation :.....	274
II.3.4 Etude de la sélectivité :.....	277
II.3.5 Conclusion 2:	279
II.4 Etudes de la capacité maximale en fonction du taux de réticulation:	280
II.5 Etude de la sélectivité en fonction du taux de réticulation et du solvant d'incubation :	281
II.6 Conclusion 3 :	284
Conclusion générale	289
Partie expérimentale	293
I. General procedure for permethacrylation of totally deprotected sugars	295
General procedure for Method 1:.....	295
General procedure for Method 2:.....	298
General procedure for Method 3:.....	299
II. General procedure for glycosidation with BF₃.Et₂O on permethacrylated carbohydrates.....	300
III. General procedure for selective hydrolysis in anomeric position	302

IV. General procedure for trichloroacetimidate synthesis.....	304
V. General procedure for glycosidation with TMSNTf ₂ on activated permethacrylated carbohydrates:.....	306
VI. General procedure for debenzylation.....	308
VII. General procedure for surfactant synthesis.....	312
VIII. General procedure for peracetylation carbohydrates synthesis.....	316
IX. General procedure for glycosidation with BF ₃ .Et ₂ O on peracetylated carbohydrates.....	318
X. General procedure for acetate hydrolysis.....	322
XI. General procedure for glycosidation with AgOTf:	328
XII. General procedure for glycosilation with TMSOTf	330
XIII. General procedure for anomeric hydrolysis.....	332
XIV. General procedure for the Schmidt reagent synthesis:.....	333
XV. Other procedures.....	334
XVI. General procedure for amide bond formation:.....	337
XVII. General optimized procedure for mini-emulsion polymerization with monosaccharides templates:	338
XVIII. General optimized procedure for mini-emulsion polymerization with surfactant monomers, for the preparation of control polymers.....	340
XIX. General optimized procedure for mini-emulsion polymerization with disaccharides templates:.....	341
XX. Polymer cleavages:	342
XXI. Polymer characterizations:.....	343
XXII. Binding experiments using the batch process and HPLC analysis:	344
<i>Bibliographie</i>	347

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie des Systèmes Fonctionnels de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg sous la direction des Dr Charles Mioskowski et Alain Wagner. Je tiens à rendre hommage à Miko et à le remercier de m'avoir permise de réaliser une thèse dans son laboratoire sur un sujet aussi innovant que les empreintes moléculaires. Merci de m'avoir fait confiance alors que je ne connaissais rien aux polymères.

Je tiens à remercier pour les idées et le renouveau qu'il a apporté à mon sujet de thèse, le Dr. Alain Wagner, arrivé au laboratoire au moment où rien ne fonctionnait.

Je voudrais également remercier le Dr Rachid Baati pour son investissement dans mes travaux de thèse et les corrections; le Dr Stéphane Meunier pour ses conseils; Michel Mosser, pour la réparation du matériels et tous les trucs et astuces qui m'ont permis d'avancer.

Je tiens à remercier Mme Nathalie Hammerschmidt et Mme Liliane Italiano, pour toutes les démarches administratives.

Je souhaite remercier tous les membres du jury d'avoir pris de leur temps pour juger mon travail et d'être présents aujourd'hui.

J'exprime ma gratitude à toutes les personnes qui ont collaboré de près ou de loin dans mon sujet de thèse : les Dr Joseph Selb et Pascal Marie pour les discussions scientifiques concernant la technique de mini-émulsion ; le Dr Marc Schmutz, Mme Christime Ruhlmann pour les photos de MET ; les conseils avisés du Dr Béatrice Heurtault pour les analyses par diffusion de la lumière, le Dr Dominique Bégin pour les mesures de surface spécifique ; Dr. Pierre Bernhardt pour l'analyse par XPS et le Dr Christian Muller pour les analyses par FACS.

Je tiens à remercier le service d'analyse de la Faculté de Pharmacie, Mr Cyril Antheaume pour les analyses RMN, Mr Patrick Werhumb et Mme Pascale Buisine pour les analyses de masse.

Un grand merci à Pasquale mon super coach qui m'a tout appris sur les polymères et qui n'a pas perdu son sang froid face à mes tableaux en format A3.

Je tiens à remercier tous mes amis qui m'ont soutenu de près ou de loin dans cette aventure qu'est la thèse. A Herrade, bien plus qu'une « Waschemacherinfreundin » et Cynthia qui m'ont soutenu dans les moments difficiles au labo quand rien ne fonctionnait, dans la rédaction et dans les corrections. Merci également à Hélène qui m'a soutenu dans des moments clés.

A la super de bandes des cinq de l'ECPM (Johanna, Sandrine, Eugénie et Herrade) et aux super moments qu'on a passés ensemble, à Belen, pour sa bonne humeur, à mes amis de longue date.

A tous les anciens du labo (Vanessa, Carine, Corinne...) qui m'ont aidé, d'un point de vue personnel ou professionnel.

Sans oublier mes collègues de labo actuels....(je ne vais pas tous les citer parce que je risquerai d'en oublier !!!) et un remerciement particulier à Manu et Alex pour les photos express de microscopie, à Emmanuelle dont la maîtrise de l'info m'a évité bien des tracas, ainsi qu'à toutes les personnes qui ont corrigé cette thèse (Cynthia, Johanna...sans oublier ma mère).

Merci également à ma prof de sciences expérimentales qui m'a donné l'envie de faire de la chimie.

Finalement, je voudrais tout particulièrement remercier mes parents et mes grand-parents grâce à qui je suis arrivée ici et qui me donnent toujours l'envie d'aller plus loin.

Abréviations

Ac : acétyle

Acr : méthacrylate

AIBN : azoisobutyronitrile

AMBN : azoisométhylbutyronitrile

cata : catalytique

CCM : chromatographie sur couche mince

CLHP : chromatographie liquide haute performance (HPLC en anglais)

cyclo : cyclohexane

DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène

DCM : dichlorométhane

DDQ : 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMSO : diméthoxysulfoxyde

DVB : divinylbenzène

EDC : *N*-(3-Diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide

EDMA: éthylène diméthacrylate

EGDMA: éthylène glycol diméthacrylate

éq ou equiv. : équivalent

h : heure

K₂CO₃ : bicarbonate de potassium

Na₂SO₄ : sulfate de sodium

NHS : N-hydroxysuccinimide

ppm : partie par million

Py : pyridine

r^2 : coefficient de corrélation

rdt : rendement

SDS : dodécylsulfate de sodium

TA : température ambiante

THF : tétrahydrofurane

TMS : triméthylsilyl

Tf : triflate

Notations

Pyr : forme pyranose

Fur : forme furanose

Capath : capacité théorique des polymères imprimés

Capaexp : capacité expérimentale déterminée par les expériences de binding par la méthode du « batch process »

La capacité représente la quantité d'analyte liée par gramme de polymère (en $\mu\text{mol/g}$)

$C_{\text{max}(i)}$: concentration en analyte i pour laquelle le binding maximum est atteint (en mM)

Tous les polymères imprimés préparés seront notés **MIPXi** avant clivage et **MIPXicj** après clivage, avec :

- X : le template qui a servi à imprimer la matrice polymérique
- i : le n° du lot de polymère imprimé
- cj le clivage n°j correspondant au lot de polymère **MIPXi**

Les polymères de contrôle seront notés **Ci**, avec i le n° du lot de polymère de contrôle

Introduction

Les glucides constituent une des familles de composés la plus abondante dans la nature. Elle comprend des unités simples, tels que des monosaccharides et des structures plus complexes, comme les oligosaccharides ou les polysaccharides. Les glucides interviennent dans la reconnaissance cellulaire, la prolifération de cellules, les infections virales et bactériennes.¹

Ces multiples applications en ont fait des cibles de choix pour les chimistes. Cependant, la synthèse chimique d'oligosaccharides est compliquée. La présence de nombreux groupements hydroxyyles implique des protections et déprotections successives, ce qui multiplie les étapes de synthèse.

Ainsi, afin de pallier à ces étapes de protections/déprotections successives, nous avons cherché à étudier la possibilité de réaliser des couplages glycosydiques régio- et stéréosélectives dans des empreintes moléculaires,

Pour ce faire, nous avons développé une nouvelle technique de polymérisation en mini-émulsion « one pot », par l'approche semi-covalente, permettant de réaliser des impressions en surface. Des particules sphériques dont la taille varie entre 50 et 200 nm, sont obtenues par mini-émulsion sans étapes de broyage et de tamisage. L'impression en surface devrait permettre une meilleure accessibilité pour l'extraction du template et des sites de reconnaissance lors des étapes de binding.

Cette nouvelle technique a, dans un premier temps, été employée pour préparer des polymères imprimés avec des dérivés de monosaccharides, avec comme système modèle un template du glucose. Une optimisation menée sur la formulation de ces premiers polymères en faisant varier deux paramètres (la quantité de template et le pourcentage d'agent de réticulation) a permis d'aboutir à un compromis entre capacité et sélectivité pour une formulation nommée « idéale ».

La technique de polymérisation a été étendue à la préparation de polymères imprimés avec d'autres templates de monosaccharides.

Une première application de ces polymères imprimés avec un template du glucose consiste à les utiliser comme groupements protecteurs temporaires. Le piégeage d'un monosaccharide, suivi de l'activation de la position anomérique en vue d'un couplage

glycosydique permettra de vérifier l'accessibilité de cette position anomérique, située à la surface des particules.

La formulation dite « idéale » a dans une seconde étape été appliquée à la préparation de polymères imprimés de disaccharides. Des études croisées de binding ont été réalisées afin de vérifier l'accessibilité des sites de reconnaissances pour des disaccharides puis, pour des monosaccharides.

La dernière étape du projet consiste à utiliser ces polymères imprimés avec des dérivés de disaccharides comme nanoréacteurs afin de réaliser un couplage glycosydique régio- et stéréosélective, à partir deux unités monosaccharides en présence d'un activateur spécifique.

Chapitre 1 : Introduction générale

I. Historique des empreintes moléculaires

Dans la nature, les phénomènes de reconnaissance moléculaire jouent un rôle important dans un grand nombre de processus biologiques comme la communication cellulaire, la régulation des phénomènes de transcription, les réactions de défense de l'organisme. La complémentarité structurale quasi parfaite, dans les systèmes anticorps-antigènes, récepteurs-ligands, enzymes-substrats, associée aux interactions spécifiques, rend ces phénomènes de reconnaissance très sélectifs. Ces systèmes biologiques ont fortement inspiré les chimistes qui essaient, depuis plusieurs années, de construire des récepteurs synthétiques mimant les systèmes naturels.

C'est dans ce contexte que la première publication sur les empreintes moléculaires est rapportée, en 1940, par Pauling et Dickey² qui utilisent du gel de silice pour créer un matériau affiné à un colorant (le méthylorange ou hélinathine). Il a fallu attendre une trentaine d'années plus tard pour que deux grands groupes, menés par Mosbach³ d'un côté, et Wulff⁴ de l'autre, développent le concept d'empreintes moléculaires basé sur des matrices polymériques. Depuis, le nombre de publications sur le sujet n'a cessé d'augmenter de façon quasi exponentielle (**Figure 1**). En essayant de produire des matériaux synthétiques imitant les phénomènes naturels de reconnaissance moléculaire, les scientifiques espèrent ainsi pouvoir approfondir les connaissances et la compréhension de ces mécanismes naturels sélectifs.

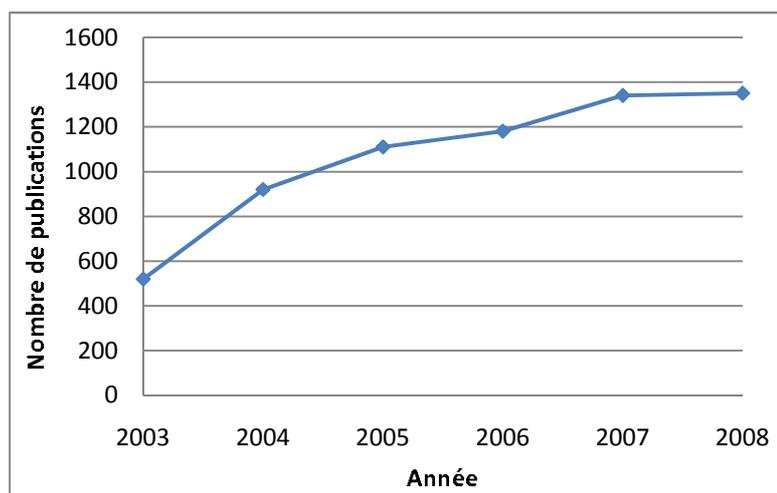


Figure 1: Evolution du nombre de publications sur les empreintes moléculaires depuis 2003 d'après une recherche SciFinder

II. Principe des empreintes moléculaires

Le principe des empreintes moléculaires repose sur l'impression d'une molécule, appelée molécule cible, ligand ou template, dans une matrice synthétique polymérique (**Figure 2**). L'impression peut être covalente, ce qui nécessite la synthèse d'un template possédant des fonctions polymérisables. L'impression peut également être non covalente, dans ce cas, le complexe de prépolymérisation est formé in situ via des liaisons hydrogènes, ioniques, de Van der Waals, ou de coordination avec un métal. Après polymérisation en présence d'un agent de réticulation, d'un initiateur de radicaux et d'un solvant, une matrice polymérique est obtenue, contenant la molécule cible. L'extraction du template, dans des conditions plus ou moins drastiques, conduit à la formation de sites laissés vacants possédant une complémentarité de forme par rapport à la molécule cible. Cette matrice doit remplir certains critères notamment de rigidité, pour assurer une bonne sélectivité, tout en gardant une certaine flexibilité pour l'accès aux sites. Ces polymères imprimés doivent également posséder une stabilité mécanique et thermique satisfaisante.⁵ De nombreuses templates sont actuellement utilisées pour synthétiser des polymères imprimés : des oligosaccharides, des acides aminés, des peptides, des protéines et d'autres composés biologiquement actifs.⁶

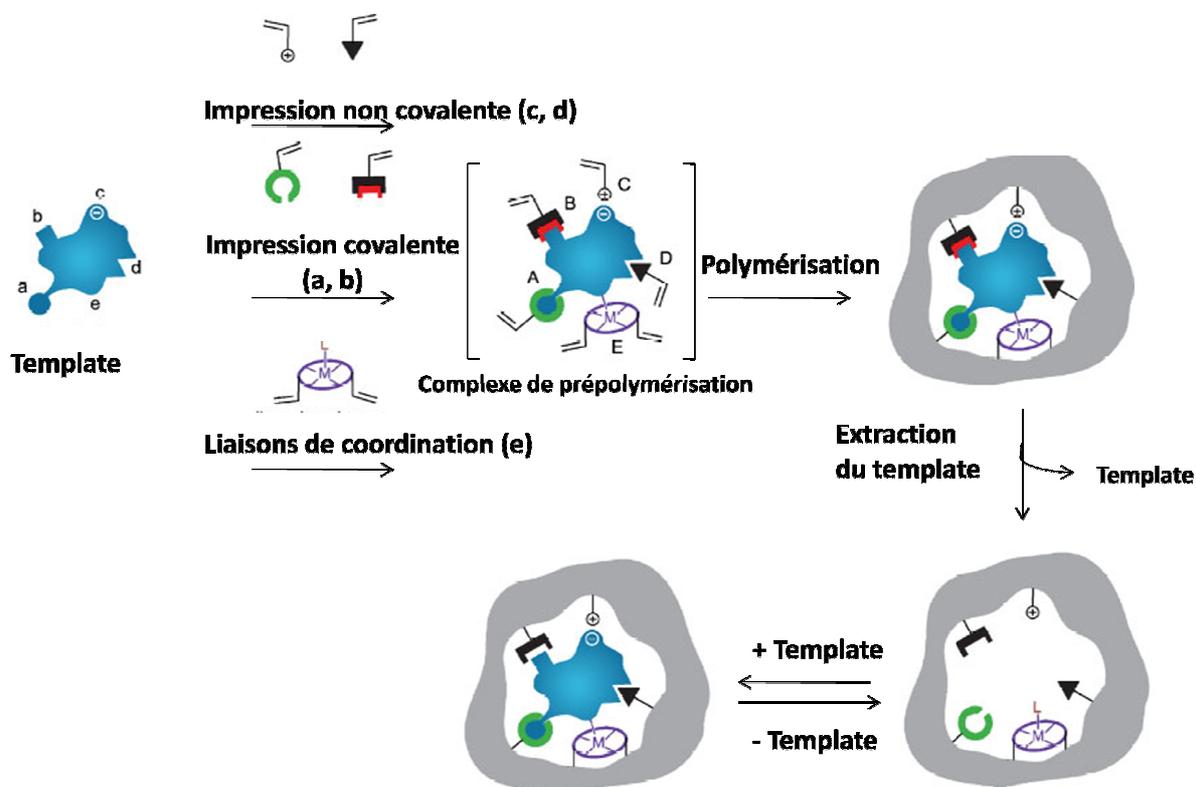


Figure 2: Schéma général de la synthèse d'empreintes moléculaires (réf. 6)

III. Les différents types de polymérisation

De nos jours, différentes méthodes de polymérisation sont utilisées dans le domaine des empreintes moléculaires, telles que la polymérisation en masse ou « bulk », en suspension, par précipitation ou en émulsion. D'autres techniques plus élaborées comme la polymérisation en film ou sur particules de silice ont également été étudiées.⁷

III.1 Polymérisation en masse

La polymérisation en masse a été employée dans la première synthèse d'empreintes moléculaires^{8,9} et reste, actuellement, la plus répandue. C'est une méthode simple à mettre en œuvre et universelle.¹⁰ Elle consiste à mélanger tous les composants (template, monomères, agent de réticulation, solvants organiques, initiateur de radicaux) et à initier la polymérisation par voie thermique ou photochimique (**Figure 3**). Il en résulte un bloc de polymère qu'il est nécessaire de broyer.

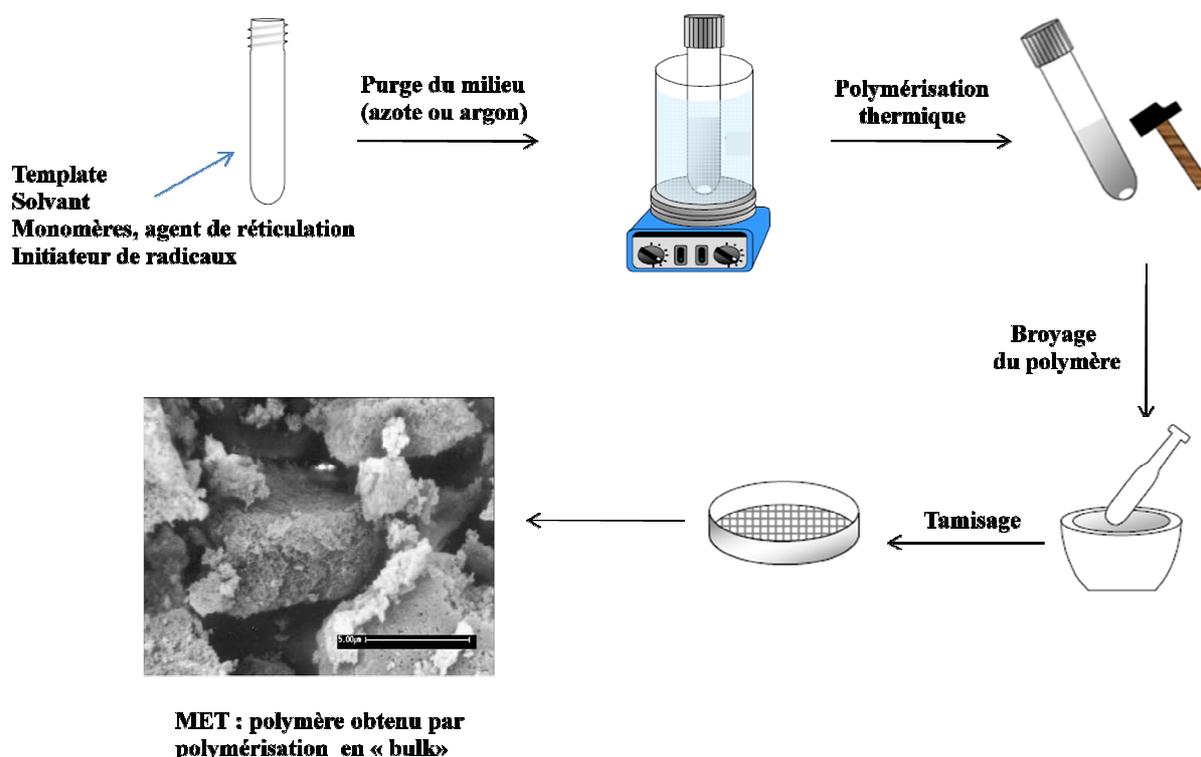


Figure 3 : Principe de la polymérisation en masse initiée thermiquement

La taille moyenne des particules ainsi obtenues est de 20 à 50 μm en fonction du broyage. Les principaux inconvénients de cette technique sont la taille et la forme irrégulière des particules, la perte d'une grande partie du polymère lors de l'étape de tamisage et l'hétérogénéité de la matrice comme le montre la photographie obtenue par Microscopie Electronique par Transmission (MET).

III.2 Polymérisation en suspension

L'emploi de la polymérisation en suspension dans les empreintes moléculaires a été rapporté par Mayes et Mosbach.¹¹ C'est une méthode rapide qui permet de synthétiser des particules par initiation photochimique ou thermique.¹⁰ Le template, les monomères et l'initiateur sont mis en suspension dans un solvant perfluoré qui permet la dispersion des particules formées pour éviter la formation d'un bloc comme dans le cas de la polymérisation en masse (**Figure 4**).

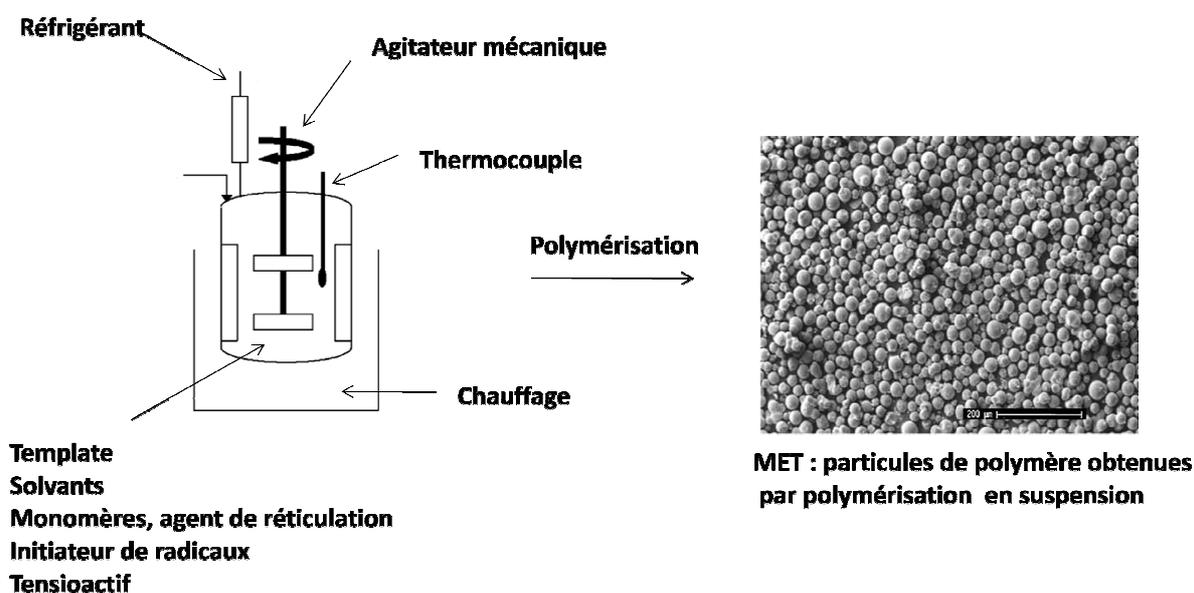


Figure 4: Principe de la polymérisation en suspension par voie thermique

La taille des particules obtenues, comprise entre 5 et 50 μm , dépend de la vitesse d'agitation et de la quantité de tensioactif utilisée. Le solvant perfluoré peut facilement être recyclé par distillation afin de diminuer le coût de la polymérisation qui reste son principal inconvénient.

III.3 Polymérisation par précipitation

La polymérisation par précipitation est une autre technique, qui a été rapportée par Ye et Mosbach.^{12,13} Le template, les monomères, l'agent de réticulation, l'initiateur de radicaux sont dissous dans un solvant organique (ex : toluène) et additionnés lentement dans une grande quantité de solvant non miscible au précédent (environ vingt fois plus que dans le cas de la polymérisation en masse). Par initiation thermique ou photochimique, les particules de polymères croissent, elles deviennent insolubles dans le milieu et finissent par précipiter.¹⁴ La rigidité de la matrice polymérique empêche le phénomène de coalescence et donc aucun tensioactif n'est nécessaire (**Figure 5**).

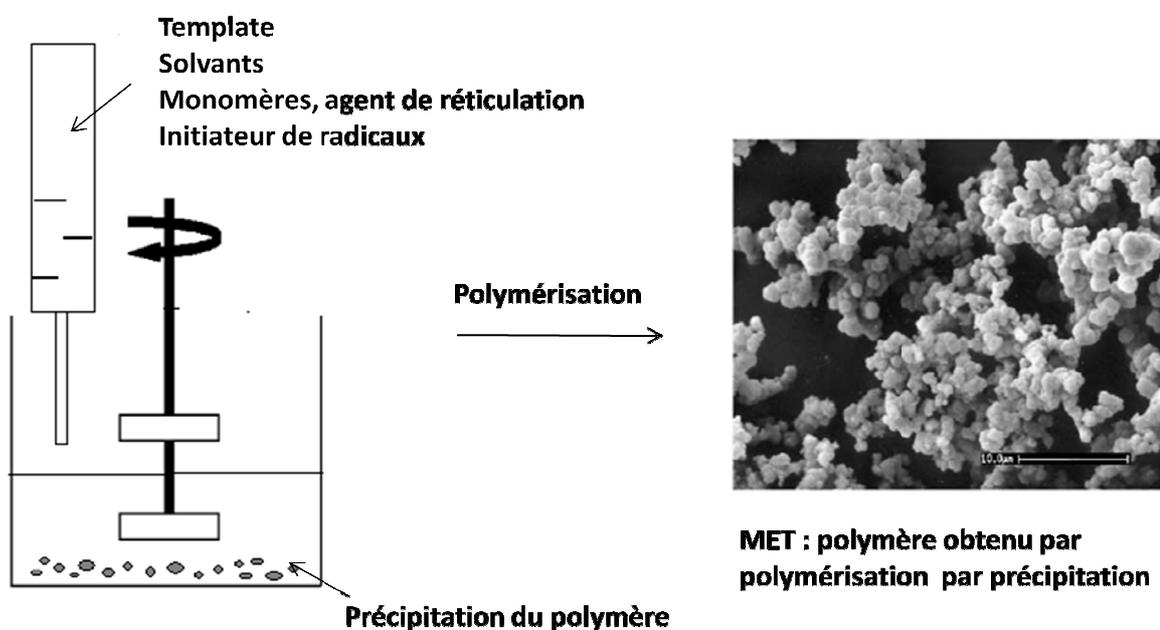


Figure 5: Principe de la polymérisation par précipitation

Cette technique permet l'obtention de particules de polymère de la taille du micromètre (entre 0,3 et 10 μm) par haute dilution.

III.4 Polymérisation par émulsion et mini-émulsion

Cette technique a été rapportée pour la première fois dans le domaine des empreintes moléculaires :

- par le groupe de Hayinaka et *coll.*^{15,16} pour la polymérisation en « two stage swelling »
- par Whitcombe et *coll.*^{17,18} pour la polymérisation par mini-émulsion en deux étapes
- par Tovar and *coll.*¹⁹ pour un procédé de mini-émulsion, en une étape

La technique de polymérisation en mini-émulsion en une étape a été appliquée très récemment par Tong et *coll.*²⁰ pour préparer des polymères imprimés en surface avec des protéines.

Le principe consiste à mélanger, dans un premier temps, le monomère, l'agent de réticulation et l'initiateur de radicaux. Ceci constitue la phase organique. Dans une seconde phase, une solution aqueuse de tensioactif est ajoutée lentement à la phase organique. Après une agitation mécanique très rapide, une émulsion « huile dans eau » (émulsion directe) est obtenue, puis mise à polymériser (**Figure 6**).

Le principe d'émulsion directe ou inverse (« eau dans huile ») (**Figure 6**) dépend de la solubilité du monomère, de l'agent de réticulation et du template. Pour un template soluble en phase organique, une émulsion directe sera utilisée, l'émulsion sera donc créée par un tensioactif soluble dans l'eau comme le SDS (dodecylsulphate de sodium).

Pour le cas d'émulsion inverse, le template, le monomère (ex : acide acrylique) et l'agent de réticulation sont solubles dans la phase aqueuse ; l'émulsion est, par conséquent, créée par un tensioactif soluble dans une phase organique comme le cyclohexane ou l'hexadécane.

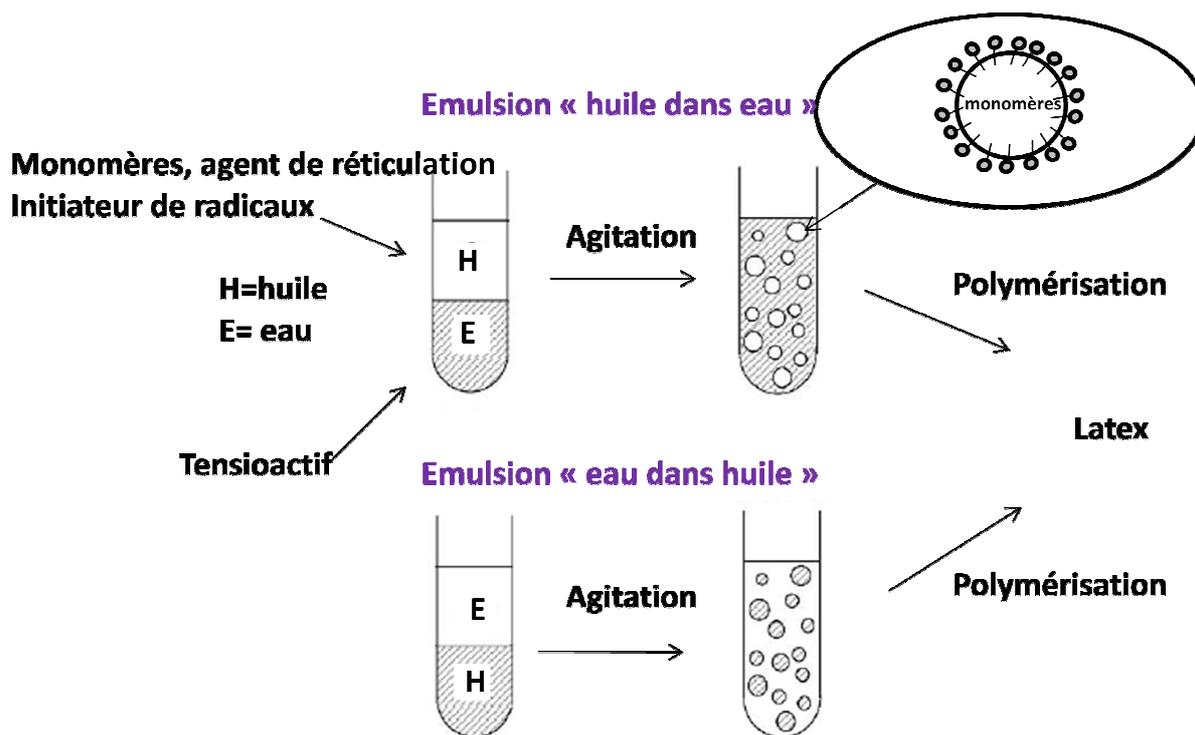


Figure 6: Principe de la polymérisation en émulsion

Les différentes techniques d'émulsion ne diffèrent que peu dans leur procédé de mise en œuvre. Dans le cas de l'impression moléculaire par polymérisation en « two stage swelling », « two stage » ou « core-shell », deux étapes de polymérisation successives sont réalisées. Dans la première étape, des particules de styrène/DVB sont formées et la seconde polymérisation permet de positionner le template à proximité de la surface^{17,21} ou à la surface¹⁸ des particules en évitant la diffusion à l'intérieur de la matrice polymérique (**Figure 7**).

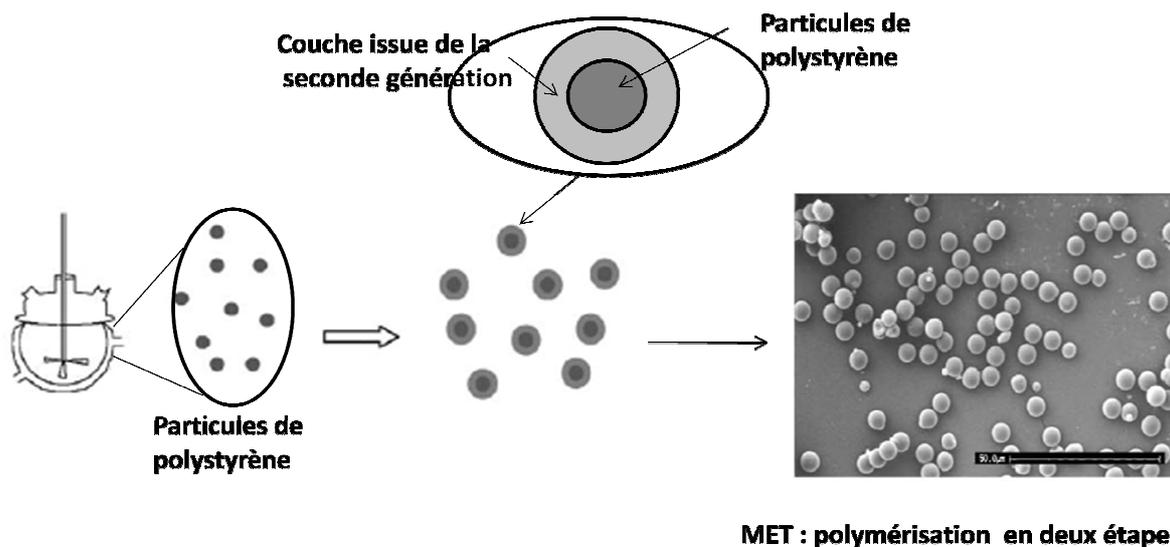


Figure 7 : Polymérisation en émulsion en deux étapes

Dans le cas de la polymérisation en une étape ou « one stage », le monomère, l'agent de réticulation, l'initiateur, le template constituent la phase organique. Dans ce cas le template est polymérisé dans la matrice mais pas forcément à la surface.

Dans les deux types de mini-émulsion, la taille des particules varie entre 200 nm et 1 μm .

Pour diminuer encore la taille des particules obtenues, il faut supprimer les phénomènes de diffusion pour rendre l'émulsion plus stable, appelée dans ce cas mini-émulsion. Les nanoparticules sont stabilisées par un agent hydrophobe (ex : hexadécane) pour éviter le phénomène de mûrissement d'Ostwald²² qui se produit au cours du vieillissement des émulsions. La différence de pression de Laplace qui existe entre des gouttelettes de diamètres différents va provoquer une migration des molécules constituant la goutte de plus petite taille à travers la phase continue, jusqu'à la goutte de plus grande taille. Ce phénomène entraîne une augmentation de la taille moyenne des gouttelettes dans le milieu de polymérisation.

Des particules de taille plus petite (entre 50 et 200 nm) sont obtenues en utilisant le procédé de sonication ou en appliquant des forces de cisaillement à l'aide d'un ultra-turax.²³ Trois paramètres influencent la taille des particules: le temps de sonication, le pourcentage de tensioactif et la quantité d'agent hydrophobe utilisée.²⁴

Le seul inconvénient majeur de cette technique concerne la stabilité des templates en milieu aqueux.

III.5 Autres méthodes de polymérisation

D'autres méthodes de polymérisation sont aussi utilisées comme la synthèse de films²⁵ ou la polymérisation sur particules de silice.²¹

III.6 Récapitulatif des principales caractéristiques de chaque technique de polymérisation

Dans le **Tableau 1**, sont regroupées les principaux avantages, inconvénients et caractéristiques de chaque technique de polymérisation :

Polymérisation	Avantages	Inconvénients	Taille des particules
masse	Facilité de mise en oeuvre	Broyage, tamisage Perte de polymère importante	Très irrégulière
suspension		Coût du solvant perfluoré Perte d'une partie du template	5-50 μm
précipitation	Ni broyage, ni tamisage nécessaire		0,3-10 μm
émulsion		Stabilité des templates en milieux aqueux	1 μm -200 nm
mini-émulsion			<200 nm

Tableau 1: Récapitulatifs des principales caractéristiques des différentes techniques de polymérisation

IV. Les paramètres fondamentaux dans la polymérisation

Dans cette partie, nous nous limiterons à l'étude des paramètres importants pour la synthèse de polymères imprimés, c'est-à-dire l'influence du solvant, utilisé comme porogène dans la polymérisation en masse, l'influence de la température, de l'agent de réticulation pour toutes les autres techniques de polymérisation.

IV.1 Influence du solvant dans la polymérisation en masse

Au cours de la polymérisation, une proportion importante du solvant agit uniquement comme porogène, afin d'obtenir des polymères macroporeux, facilitant la diffusion des substrats. En effet, en l'absence de porogène, les polymères obtenus sont très denses et solides, d'où une accessibilité réduite aux sites de reconnaissance.²⁶ Le choix et la quantité de solvant utilisé affectent à la fois le procédé d'impression moléculaire, la structure du polymère, l'hétérogénéité et la distribution de la taille des particules.²⁷ L'effet du solvant sur la morphologie des polymères peut être déterminé par des mesures physiques telles que la surface spécifique, le diamètre ou le volume des pores.²⁸ La sélectivité des interactions polymère-substrat est peu affectée par la nature du solvant de polymérisation.^{29,30} Certains solvants, trop volatils, sont à proscrire, car ils forment des polymères non poreux ce qui diminue nettement les propriétés de binding.²⁶

IV.2 Influence de la température

La décomposition thermique d'azoinitiateur est la technique la plus utilisée pour produire des radicaux permettant d'initier la polymérisation. Le plus employé est l'AIBN (AzobisIsoButyroNitrile) dont la température de décomposition est de 65 °C.

L'instabilité des complexes de prépolymérisation et de certains templates à des températures élevées nécessite de polymériser à basse température. Les radicaux sont, alors, formés par décomposition photochimique⁶ ou en utilisant des initiateurs se décomposant à plus basse température. Ce type d'activation peut être utilisé pour des azoinitiateurs qui ont des températures de décomposition plus basses que l'AIBN, comme, par exemple, l'ABDV

(2,2'-azo-bis-(2,4-diméthylvaléronitrile) dont la température de décomposition est de l'ordre de 40 °C.³¹

D'autres voies de décomposition existent comme l'oxydoréduction, mais sont moins utilisées car plus difficiles à mettre en œuvre.³²

Dans l'approche non covalente (cf. VI.4) la température de polymérisation joue un rôle majeur sur les interactions polymère-substrat. En effet, plusieurs études menées ont montré que la sélectivité des polymères imprimés par l'approche non covalente diminue avec l'augmentation de la température de polymérisation pour un même polymère.³³

IV.3 Influence de la nature de l'agent de réticulation

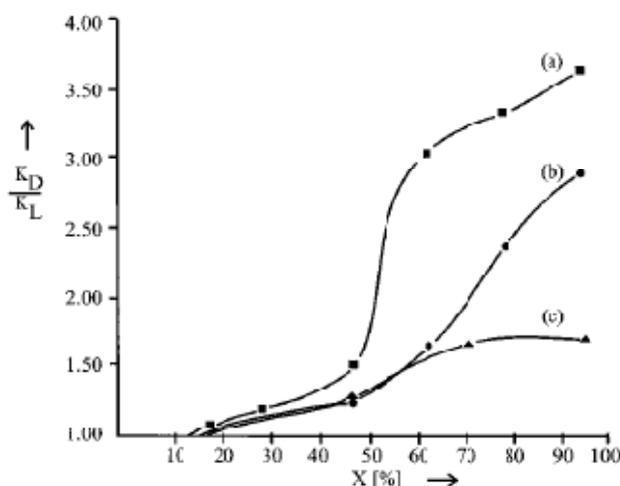
Les agents de réticulation disponibles sont variés ; les plus utilisés dans la préparation des polymères imprimés sont le DVB (divinylbenzène) et l'EGDMA (éthylène glycol diméthacrylate). Le choix de l'agent de réticulation dépend souvent du mode d'impression envisagé. Il joue un rôle majeur dans la structure tridimensionnelle de la matrice polymérique et n'est pas sans conséquence quant à la sélectivité de l'empreinte synthétisée. Wulff et *coll.* ont comparé l'influence du taux de réticulation et de la nature de l'agent de réticulation sur la sélectivité des polymères imprimés.^{9,34,35} Ils ont montré que plus la matrice est rigide, plus la sélectivité est élevée (**Figure 8**).

X : agent de réticulation

(a) éthylènediméthacrylate ;

(b) tetraméthylène diméthacrylate ;

(c) divinylbenzène



(a) et (b) polymères imprimés préparés en présence de méthylméthacrylate et (c) en présence de styrène

Figure 8: Sélectivité des polymères imprimés pour le phényl-D,L-mannopyranoside en fonction de la quantité et de l'agent de réticulation (réf. 9)

Il est fondamental de conserver la forme de la cavité après extraction du template ce qui est directement relié au taux de réticulation.

Une matrice trop réticulée n'est cependant pas toujours recommandée pour l'accessibilité des sites, surtout dans le cas d'une polymérisation en masse, mais elle reste discutable dans le cas d'une impression en surface (cf. V.6). Un compromis est donc indispensable entre rigidité du polymère, synonyme de sélectivité, et accessibilité qui dépend du mode d'impression utilisé (polymérisation en surface ou dans la masse du polymère).

V. Des différents modes d'impression moléculaire

Il existe trois grands modes d'impression : covalent, semi-covalent, ou non covalent. Ces trois modes dépendent :

- du type d'interactions entre le template et les entités polymérisables, aussi appelé complexe de prépolymérisation
- du type d'interactions qui interviennent dans le binding entre le polymère imprimé et l'analyte

V.1 Approche covalente

Dans cette approche, le template est lié de manière covalente à la matrice polymérique par un ou plusieurs points d'ancrage, ce qui nécessite la synthèse d'un template polymérisable.

Les fonctions polymérisables étant greffées directement sur le template, le complexe de prépolymérisation est donc stable.

La reconnaissance polymère-substrat, aussi appelée binding, a lieu par la formation de liaisons covalentes. Les cinétiques de binding sont dans la plupart des cas, lentes.

V.1.1 Les liaisons covalentes réversibles

Les liaisons covalentes réversibles les plus utilisées sont les bases de Schiff, les acétals/cétals et les esters boroniques.

V.1.1.a Les bases de Schiff

Les bases de Schiff, ou imines, sont utilisées pour synthétiser des empreintes moléculaires d'amino acides^{36,37} ou d'aldéhydes^{38,39} (**Figure 9**).

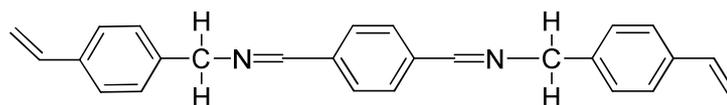


Figure 9: Exemple de template polymérisable avec des bases de Schiff (réf. 39)

Des polymères fortement réticulés (en présence d'EGDMA) ont ainsi été synthétisés en présence du monomère de la **Figure 9**. L'hydrolyse des aldéhydes est effectuée dans des conditions douces. Le binding est effectué dans l'acétonitrile avec 2,5 % d'eau légèrement acidifiée avec de l'acide p-toluène sulfonique.

Le binding, basé sur la formation de bases de Schiff entre les trois analytes de la **Figure 10** et le polymère imprimé, a donc été testé.

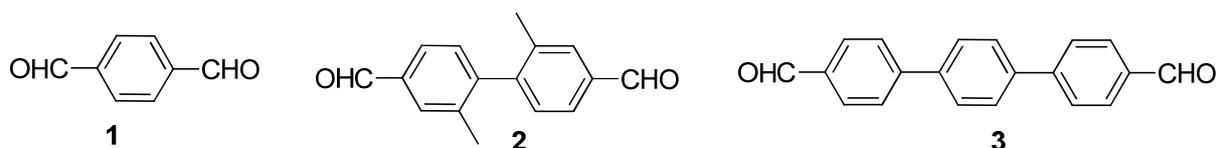


Figure 10: Analytes utilisés pour déterminer la sélectivité (réf. 39)

Les facteurs de sélectivité obtenus sont élevés, $\alpha_{1,2} = 4,6$ et $\alpha_{2,3} = 5,4$. La sélectivité de ce type de polymères est basée sur la distance entre les deux groupes fonctionnels.

V.1.1.b Les acétals/cétals

Les cétals sont employés pour la synthèse d'empreintes moléculaires de diols ou de composés carbonylés. Shea et *coll.* ont ainsi imprimé des cétones et dicétones^{40,41,42} en utilisant le template de la **Figure 11**.

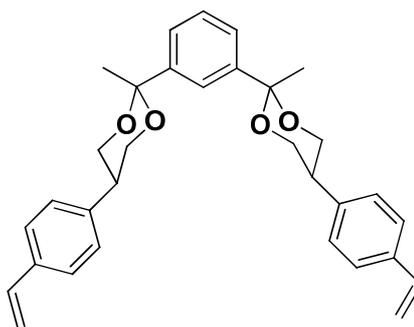


Figure 11: Exemple de cétales utilisés avec le 1,3-diacétylbenzène (réf. 40)

Les polymères ont été préparés par polymérisation en masse. L'extraction est effectuée dans un mélange méthanol/eau/acide sulfurique. Le pourcentage d'extraction varie en fonction du template utilisé et de la réticulation de la matrice polymérique (agent de réticulation : DVB). Pour des matrices fortement réticulées, l'extraction est comprise entre 0 et 55 %. Pour des matrices non réticulées, l'extraction du template est comprise entre 67 et 100 %.

V.1.1.c Les esters boroniques

Les liaisons covalentes réversibles les plus utilisées restent les esters boroniques, développés par Wulff et *coll.*^{43,44} pour la synthèse de polymères imprimés de sucres⁴⁵ (**Figure 12**). Cet exemple sera développé ultérieurement dans le chapitre 1, IX.

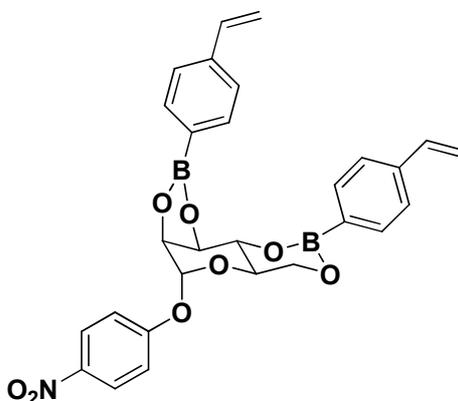


Figure 12: Exemple d'utilisation d'esters boroniques (réf. 45)

De nombreuses molécules ont été imprimées avec cette approche : l'acide glycérique,⁴⁶ l'acide salicylique,⁴⁷ des acides aminés,^{48,49} des monosaccharides (mannose,^{50,51} galactose, fructose^{52,53}), la L-DOPA,⁵⁴ des nucléotides⁵⁵ ou des stéroïdes⁵⁶ (**Figure 13**).

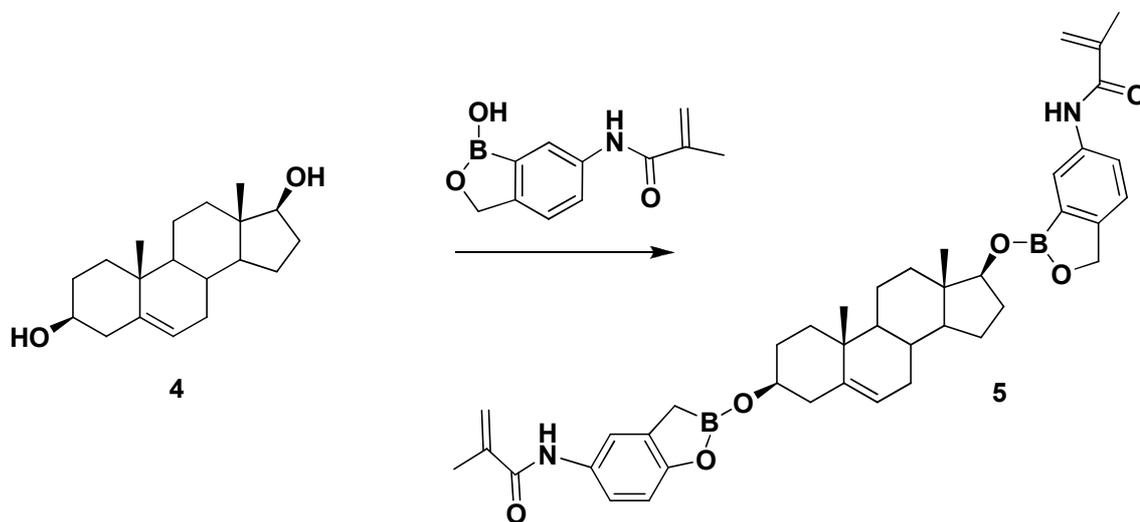


Figure 13 : Exemple de template d'ester boronique utilisé dans la synthèse de polymères imprimés d'un stéroïde (réf. 56)

Un polymère imprimé a été préparé avec le composé **5**, par polymérisation en masse, en présence de DVB à 55 % à 60 °C. Le template est extrait grâce à un Soxhlet avec un mélange EtOH/H₂O. Le taux d'extraction du template est de l'ordre de 90 à 95 %. Le binding, effectué dans du chloroforme avec l'analyte **4**, est de 85 % par rapport aux nombres de sites théoriques.

Les esters boroniques ont une cinétique d'hydrolyse assez rapide, ce qui permet leur utilisation en chromatographie et de nombreuses séparations chirales ont ainsi été réalisées.¹¹

L'utilisation de cette approche nécessite, cependant, la présence d'un 1,2- ou 1,3-diol sur la molécule cible est un prérequis ce qui constitue la principale limitation de cette technique.

V.1.2 Les liaisons covalentes fortes

L'impression de molécules par des liaisons covalentes fortes a été développée conjointement par deux équipes : Damen et Neckers,^{57,58,59} d'un côté, et Shea et Thompson^{60,61} de l'autre (**Figure 14**).

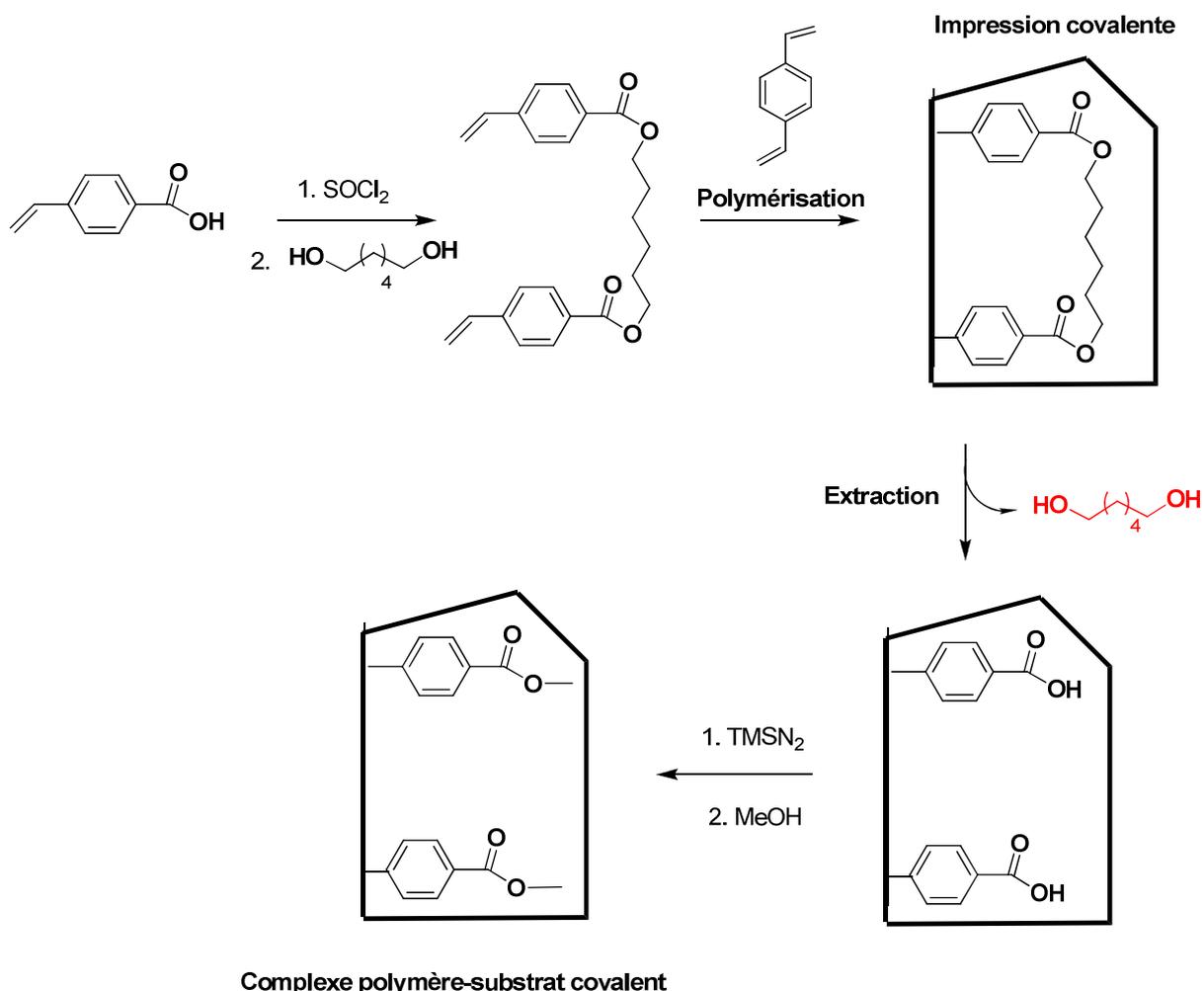


Figure 14: Exemple d'utilisation de liaisons covalentes fortes (réf. 61)

Les polymères, obtenus par polymérisation en masse, sont réticulés à 55 % avec du DVB. Plusieurs conditions d'extraction du template ont été testées. La plus efficace est un mélange MeOH/HCl, pendant 8 heures à reflux, qui permet d'hydrolyser entre 8 et 24 % du template. La prolongation du temps d'hydrolyse ne permet pas d'améliorer cette extraction.

L'utilisation d'esters ou d'amides donne accès à un plus large choix de molécules cibles.

L'extraction du template est difficile, même dans des milieux fortement acides ou basiques. Une simple saponification n'est, parfois, pas suffisante pour l'extraction.

Des polymères imprimés à base de stéroïdes ont été synthétisés par polymérisation en masse avec 55% de DVB, par Byström et *coll.*⁶² (**Figure 15**).

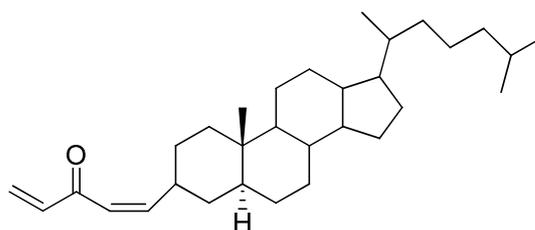


Figure 15: Structure d'un stéroïde polymérisable (réf. 62)

L'hydrolyse des esters acryliques, polymérisés dans la matrice de DVB, s'est révélée impossible dans des conditions basiques et l'emploi d'hydrures d'aluminium a été nécessaire pour l'extraction de la molécule cible. L'extraction du template a été évaluée à 50 % lorsqu'aucun solvant n'est utilisé comme porogène dans la polymérisation. L'utilisation du chloroforme permet un gonflement du polymère de plus de 200 % ; l'extraction du template atteint donc 80 %. Aucune étude de binding n'est menée sur ces polymères. Ils sont uniquement utilisés dans l'étude de la réduction du cholestérol.

V.2 Approche semi-covalente

Ce mode d'impression a été rapporté, pour la première fois, par Sellergren et *coll.*⁶³ (**Figure 16**). Dans le cadre de cette approche, le template est lié de manière covalente, à la matrice polymérique par un ou plusieurs esters métha- ou acryliques, alors que le binding est basé sur des interactions non covalentes.

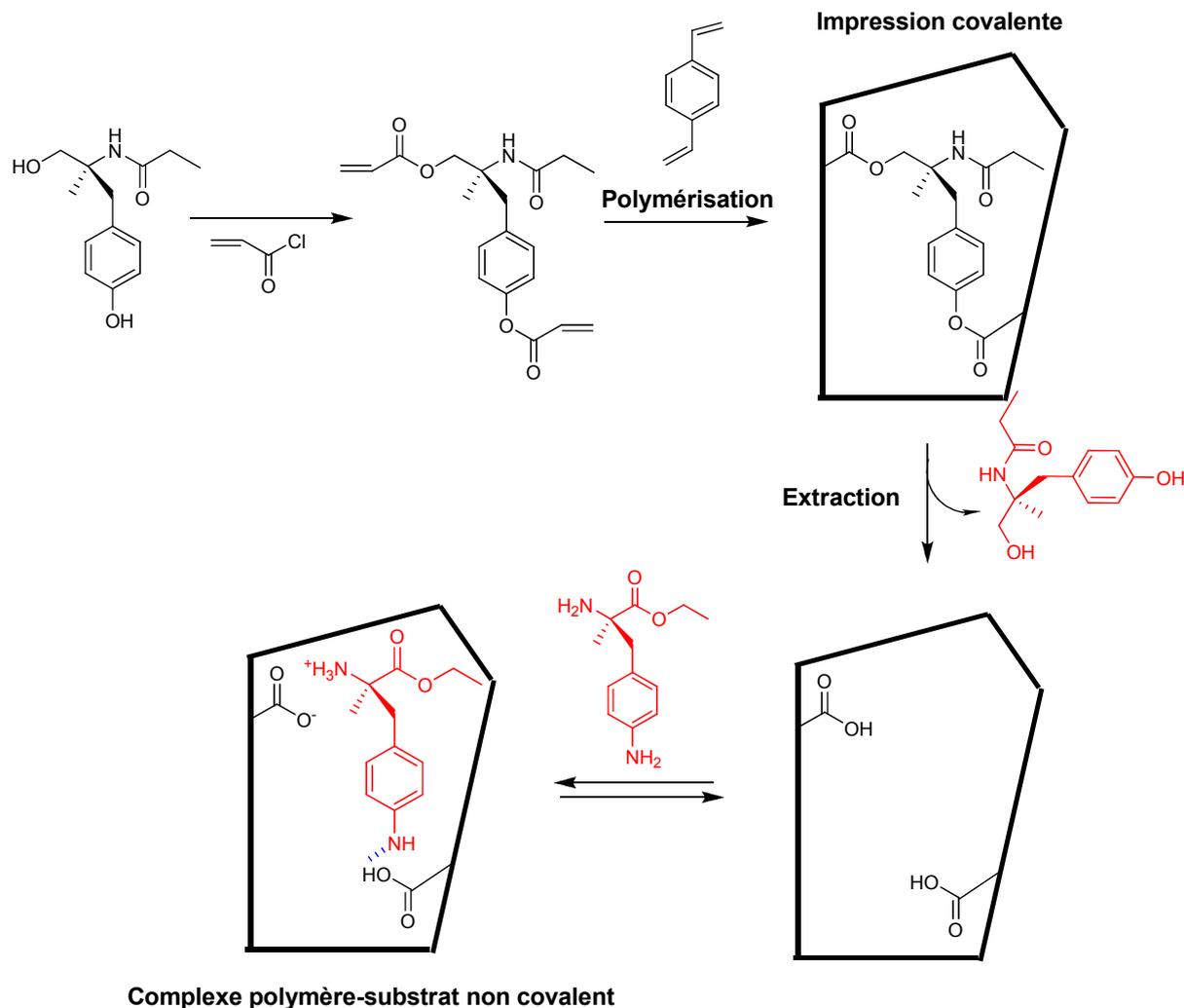


Figure 16: Exemple d'utilisation de l'impression semi-covalente dans la préparation de polymères imprimés (réf. 63)

Dans le cas de l'impression d'acides aminés, les polymères, préparés par polymérisation en masse, sont réticulés à 55 % avec du DVB. L'extraction du template est réalisée dans un mélange 1/1 MeOH/NaOH (10 M), 20 heures à reflux.

Le cholestérol a également été imprimé par cette approche semi-covalente⁶⁴ (Figure 17).

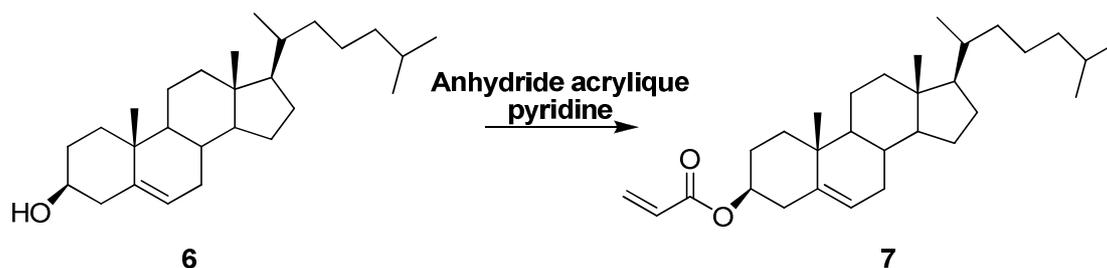


Figure 17: Cholestérol polymérisable pour la synthèse de polymères imprimés par l'approche semi-covalente (réf. 64)

Les polymères ont été obtenus par polymérisation en masse, dans des matrices faiblement réticulées (9 % de N,N'-diacryloylpipérazine), en présence de monomères à base de cyclodextrines polymérisables. L'extraction du template est effectuée dans des basiques, NaOH (5 M), pendant sept jours. La capacité théorique des polymères est de 90 $\mu\text{mol/g}$. Le binding du cholestérol est effectué dans l'eau. La capacité expérimentale a été évaluée à 38-50 $\mu\text{mol/}$ de polymère contre 6-9 $\mu\text{mol/g}$ pour les polymères de contrôle.

De manière générale, l'extraction du template est tout aussi difficile que dans le cas des liaisons covalentes fortes.

Afin d'éviter d'augmenter la taille des cavités et de diminuer les phénomènes de contraction des polymères, l'introduction d'un espaceur a été proposé par le groupe de Whitcombe et *coll.*

V.3 Impression semi-covalente avec un espaceur

Cette technique a été rapportée pour la première fois par Whitcombe et *coll.* qui a utilisé un carbonate d'ester dissymétrique comme espaceur pour l'impression du cholestérol⁶⁵ (**Figure 18**).

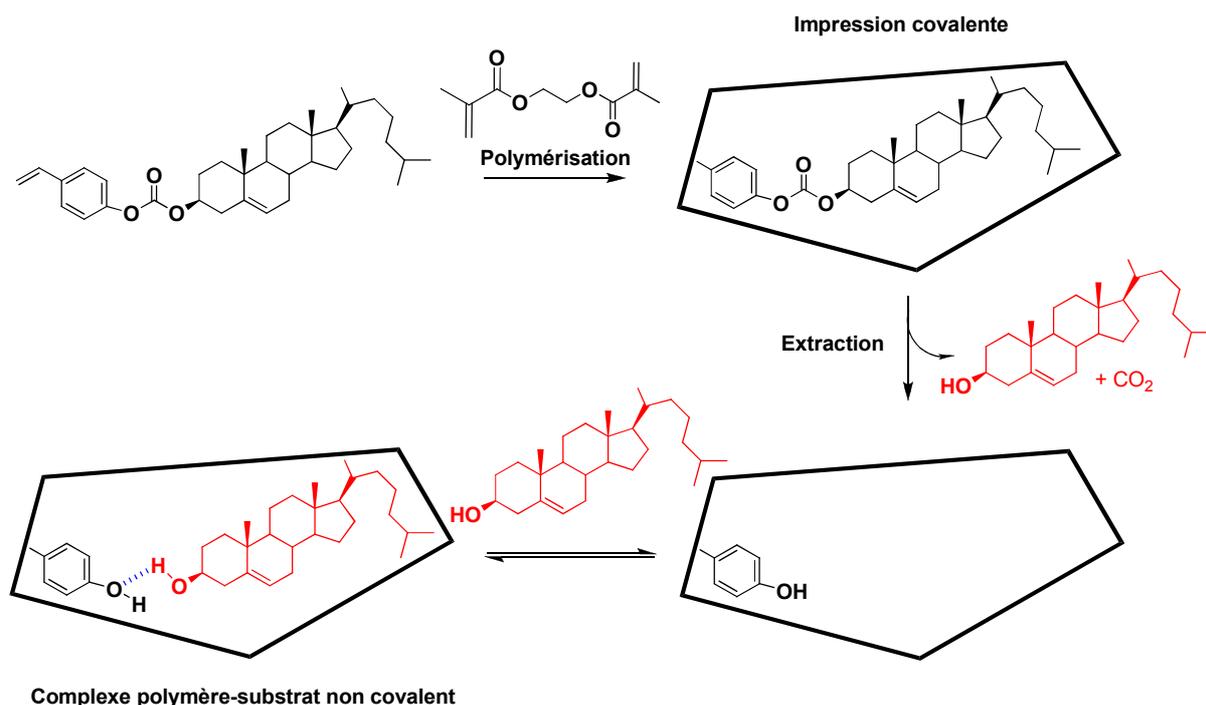


Figure 18: Exemple d'utilisation d'un espaceur dit « sacrifié » (réf. 65)

Tous les polymères sont préparés par polymérisation en masse, et sont 100 % réticulés avec de l'EGDMA. L'hydrolyse dans des conditions basiques, MeOH/NaOH (1 M), à reflux libère la molécule de cholestérol et du dioxyde de carbone. L'extraction du template est de 92 %. Le binding peut alors s'effectuer via des liaisons hydrogènes dans des solvants non polaires. La charge initiale en template est de 250 $\mu\text{mol/g}$. Dans l'hexane, le binding maximum du cholestérol a été évalué à 114 $\mu\text{mol/g}$ de polymère, soit 45 % des sites théoriques.

Cet espaceur, du type carbonate ou carbamate principalement, est utilisé pour pallier aux problèmes de contraction du polymère liés à l'approche semi-covalente. Il est éliminé lors de l'extraction de la molécule cible afin d'éviter les gênes stériques lors du binding non covalent. Il possède l'avantage également d'être facilement hydrolysable pour éviter les problèmes d'extraction de la molécule cible comme dans le cas de l'approche semi-covalente.

Les groupements carbonates et carbamates sont, par ailleurs, peu sensibles en milieu aqueux ce qui permet l'utilisation de la polymérisation en suspension dans l'eau,⁶⁶ ou en émulsion.⁶⁷

L'utilisation de l'approche semi-covalente avec un espaceur a permis de nettes améliorations pour l'utilisation des empreintes moléculaires dans les séparations chromatographiques⁶⁸ ou comme capteurs.^{69,70}

L'introduction d'un groupement carbonate ou carbamate, comme espaceur, n'est cependant pas possible avec tous les templates.

V.4 Impression non covalente

Dans l'approche non covalente, la molécule cible est liée à la matrice polymérique, soit par des liaisons hydrogènes, des interactions électrostatiques, des interactions purement hydrophobes, soit par des liaisons de coordination autour d'un métal. Il n'est par conséquent pas nécessaire de synthétiser un template polymérisable.

Le problème majeur de ce type d'approche est la stabilité du complexe de prépolymérisation. En effet les forces de liaison de liaisons hydrogènes, de Van der Waals ou hydrophobes sont faibles par rapport à l'énergie des liaisons covalentes (**Tableau 2**). Les liaisons de coordination autour d'un métal apparaissent comme une autre alternative puisque leurs énergies de liaison, toujours inférieures à celle d'une liaison covalente, peuvent être modulées par un choix approprié du métal et du template.⁷¹

Liaisons	Energie en kJ/mol
Covalente	~300
de coordination autour d'un métal	~200-300
Ionique	~20-70
Hydrogène	~12-30
Hydrophobe	~20
Van der Waals	~0,4-5

Tableau 2 : Energies de différents types d'interaction et de liaisons

L'extraction de la molécule cible s'effectue par une succession de lavages. Le binding non covalente s'effectue avec des cinétiques de reconnaissance rapides, ce qui explique l'utilisation très courante de cette approche pour l'impression moléculaire de polymère.

V.4.1 Les interactions électrostatiques et liaisons hydrogènes

Mosbach et *coll.* a été le premier à utiliser ce mode d'impression non covalente, par interactions électrostatiques^{72,73} et via des liaisons hydrogènes.^{74,75,76} La L-phénylalanine anilide a, ainsi, été imprimée en présence d'acide méthacrylique (**Figure 19**).

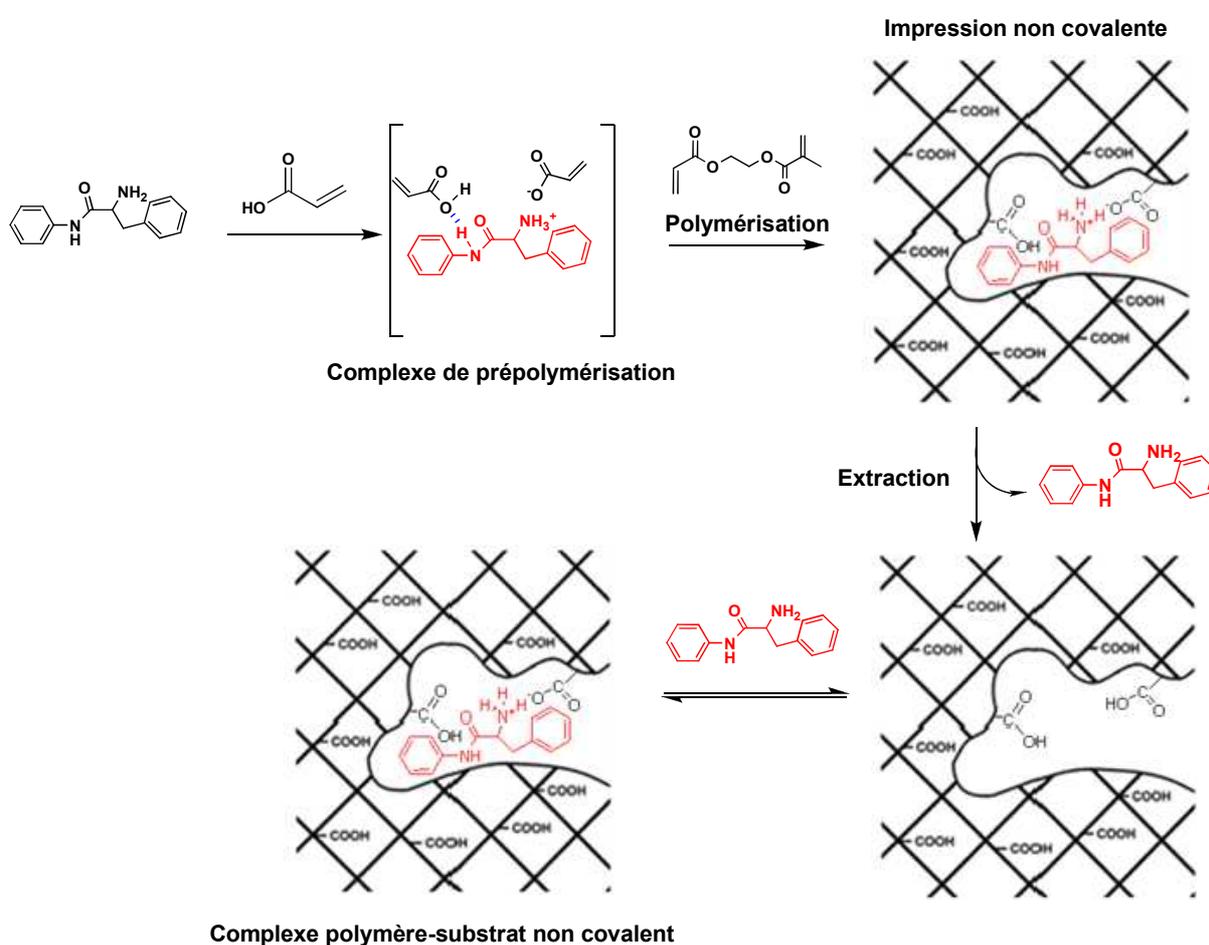


Figure 19: Exemple d'impression non covalente (réf. 73)

D'après les auteurs, après extraction du template, très peu de sites sont disponibles⁷⁷ du fait de la compression de la matrice.⁷⁸ De plus, l'excès d'acides carboxyliques est réparti aléatoirement dans la matrice ce qui entraîne de la reconnaissance non spécifique.

Du fait de la facilité de mise en œuvre et aux cinétiques de binding rapides, de nombreuses molécules ont été imprimées par l'approche non covalente avec l'acide méthacrylique: l'hydroquinidine,⁷⁹ des stéroïdes,⁸⁰ des nucléotides⁸¹ ou des peptides.⁸² D'autres monomères ont, par la suite, été utilisés comme l'acide 4-vinylbenzoïque⁸³ ou l'acide méthatrifluoroacrylique.⁸⁴

Le cholestérol a ainsi été imprimé par cette approche non covalente par liaisons hydrogène⁸⁵ (Figure 20).

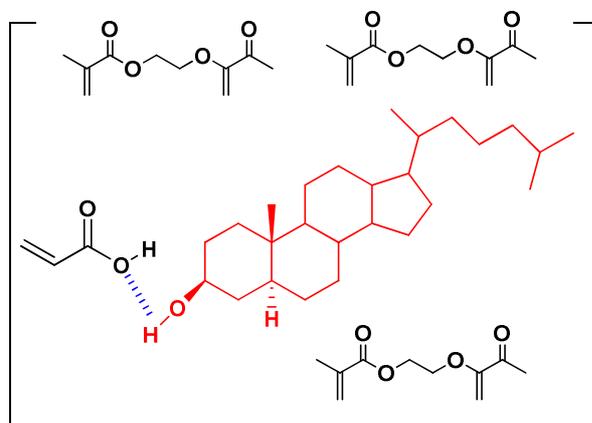


Figure 20: Complexe de prépolymérisation utilisé pour synthétiser des polymères imprimés par l'approche non covalente (réf. 85)

Après polymérisation en masse, dans une matrice réticulée à 85 % avec de l'EGDMA, le template est extrait par sonication dans un mélange $\text{CHCl}_3/\text{AcOH}$ puis extraction au Soxhlet. La charge théorique des polymères imprimés est de $590 \mu\text{mol/g}$. Les extractions sont de l'ordre de 80 à 90 %. Le binding est effectué dans le toluène et varie entre 300 et $445 \mu\text{mol/g}$ de polymère selon le porogène utilisé. Le binding non spécifique varie entre 180 et $190 \mu\text{mol/g}$ de polymère, ce qui constitue la principale limitation de cette méthode d'impression.

De plus, le complexe de prépolymérisation est généralement instable et ne reste pas figé au cours de la polymérisation, entraînant une hétérogénéité des sites de reconnaissance et du binding non spécifique. En effet, les interactions électrostatiques ou les liaisons

hydrogènes ont des constantes d'équilibre de dissociation élevées qui dépendent de la polarité du solvant et de la température. La polymérisation, généralement en milieu non aqueux, s'effectue donc à température plus basse que dans le cas de l'impression covalente afin d'éviter la dissociation du complexe de prépolymérisation. La formation du complexe molécule cible/monomère peut être étudiée par spectroscopie UV-visible⁸⁶ ou par spectroscopie de RMN.⁸⁷ L'utilisation d'une quantité stœchiométrique de molécule cible et de monomère entraîne une faible complexation du template. Dans ce cas, un excès de monomère peut permettre de déplacer l'équilibre vers la formation du complexe (Loi de Le Chatelier), mais entraîne également de la reconnaissance non spécifique non négligeable.

Une seconde génération de monomères polymérisables a été synthétisée pour rendre les interactions monomère/molécule cible plus fortes et donc diminuer le rapport monomère/template. Par exemple, des amidines⁸⁸ et des amidopyridines⁸⁹ sont utilisées pour former des interactions fortes avec des phosphonates ou des acides carboxyliques. Dans ce cas, l'utilisation d'un mélange équimolaire de monomère/groupe fonctionnel de la molécule cible est suffisant pour avoir des propriétés de reconnaissance accrues ce qui s'apparente plus à l'approche covalente sans nécessiter de synthèse complexe de template. Les interactions monomères-template étant plus fortes, la reconnaissance non spécifique est plus faible que dans le cas de l'approche non covalente classique.

V.4.2 Les liaisons purement hydrophobes

Cette approche a été développée pour la première fois par Hosoya et *coll.*⁹⁰ Ils ont en effet remarqué que des matrices polymériques possédaient la mémoire du solvant qui avait été utilisé au cours de la polymérisation, appelé effet d'empreinte du porogène.

Des polymères préparés par polymérisation par émulsion en deux étapes, utilisant des particules de polystyrène dans une première étape et uniquement de l'EDMA, en présence de *o*-, *m*- et *p*-xylènes dans une seconde étape. Après lavages avec du méthanol et du THF, les polymères sont utilisés comme phase stationnaire pour la séparation de polychlorobenzène (PCB) (**Figure 21**).

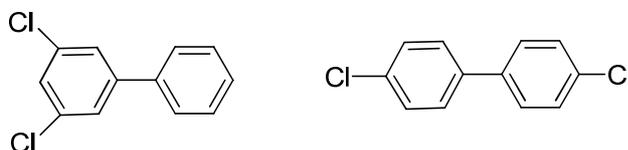


Figure 21: PCB testés sur les polymères imprimés avec du *m*- et *p*-xylènes (réf. 90)

Le biaryl possédant les deux chlores en para est plus retenu par le polymère synthétisé avec du *p*-xylène tandis que celui avec des deux chlores en méta est plus retenu sur le polymère imprimé avec du *m*-xylène.

De la même manière, Sellergren et *coll.* a rapporté la synthèse de polymères imprimés de cholestérol par cette approche non covalente par liaisons hydrophobes⁹¹ (**Figure 22**).

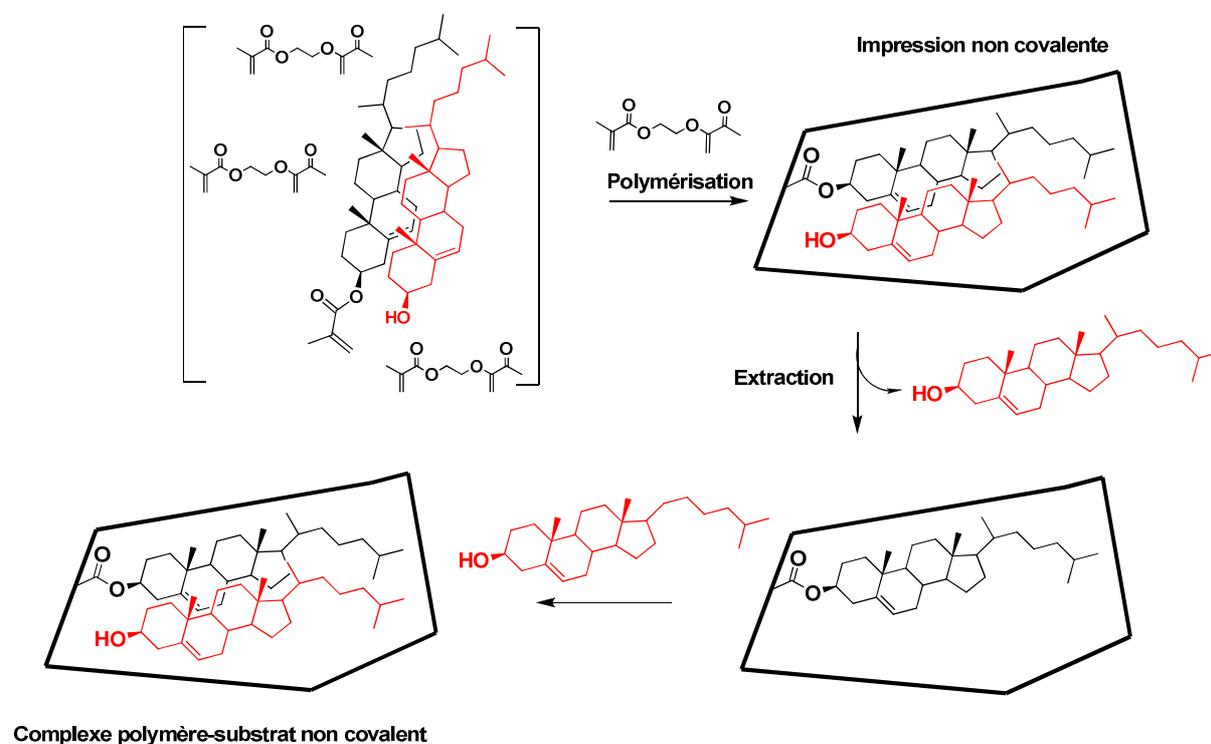


Figure 22: Exemple d'utilisation d'interactions hydrophobes pour la préparation de polymères imprimés avec du cholestérol (réf. 91)

Le polymère imprimé est préparé en présence de cholestérol d'un dérivé de cholestérol polymérisable (**Figure 22**). L'extraction du template est effectuée par lavages avec du méthanol à température ambiante. L'extraction est de l'ordre de 50 %. Le nombre de sites théoriques est de 234 $\mu\text{mol/g}$ de polymère. La capacité du polymère imprimé à lier le

cholestérol, dans un milieu aqueux (pH = 7,5) est de 45 $\mu\text{mol/g}$ tandis que celle du polymère de contrôle, polymérisé en l'absence de cholestérol, est de 33 $\mu\text{mol/g}$ de polymère.

Le binding non spécifique reste donc élevé et cette technique n'est pas applicable qu'aux templates fortement hydrophobes.

V.4.3 Les liaisons de coordination avec un métal

L'utilisation de liaisons de coordination pour la synthèse d'empreinte moléculaire a été rapportée pour la première fois par le groupe de Fujii et *coll.* pour la synthèse de polymères imprimés d'acides aminés à l'aide de complexes de cobalt.⁹²

Des complexes de Zn(II) (**Figure 23**) ont également servi à synthétiser les empreintes de créatinine, de thymine⁹³ ou de dérivés d'adénine.⁹⁴ Des complexes de Ni(II) (**Figure 23**) ont été utilisés par Hart et Shea pour les empreintes de peptides.⁹⁵

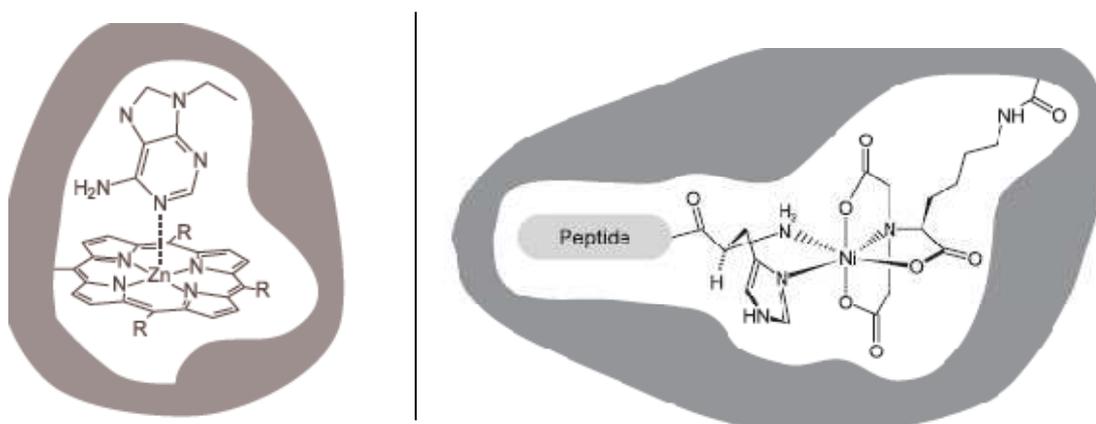


Figure 23: Exemple d'utilisation de métaux pour les complexes de prépolymérisation (réf. 93 et 95)

Des complexes de Cu(II) ont été développés par Striegler et *coll.*, pour l'impression de mono- et disaccharides.⁹⁶ Cet exemple sera développé ultérieurement dans le chapitre 1, IX.3.

L'utilisation de métaux de transition pour fixer des complexes de prépolymérisation offre de nombreuses opportunités. En effet, la force d'une liaison de coordination est plus

élevée que n'importe quelles autres liaisons non covalentes et peut être modulée en fonction de la nature des ligands et du métal.

La présence de plusieurs sites de complexation sur les templates est nécessaire afin de créer des complexes suffisamment rigides pour éviter les problèmes de reconnaissance non spécifique.

V.5 Récapitulatif des caractéristiques des différents modes d'impression moléculaire

Dans le **Tableau 3**, sont réunis les avantages et les inconvénients de chaque mode d'impression moléculaire :

Procédé	Impression	Binding	Avantages	Inconvénients
covalent	covalente réversible	covalente réversible	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilité du complexe de prépolymérisation • Extraction du template: conditions douces • Cinétique de binding rapide 	<ul style="list-style-type: none"> • Synthèse du template difficile • Template sensible à l'eau • Pas compatible avec la polymérisation en émulsion
	covalente irréversible	covalente irréversible	<ul style="list-style-type: none"> • Template stable • Stabilité du complexe de prépolymérisation • Compatible avec la polymérisation en émulsion 	<ul style="list-style-type: none"> • Synthèse du template difficile • Extraction du template: conditions drastiques • Cinétique de binding lente
semi-covalent	covalent irréversible	non covalent	<ul style="list-style-type: none"> • Template stable • Stabilité du complexe de prépolymérisation • Compatible avec la polymérisation en émulsion • Cinétique de binding rapide 	<ul style="list-style-type: none"> • Synthèse du template difficile • Extraction du template: conditions drastiques
non covalent	non covalent	non covalent	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de synthèse de template • Template stable • Compatible avec la polymérisation en émulsion • Extraction du template: conditions douces • Cinétique de binding rapide 	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilité du complexe de prépolymérisation dépend du monomère et de l'agent de réticulation utilisés • Reconnaissance non spécifique souvent élevée due à l'excès de monomère utilisé

Tableau 3: Caractéristiques des différents modes d'impression moléculaire

Afin de comparer l'apport de chaque mode d'impression, les caractéristiques de différents polymères imprimés avec des stéroïdes sont regroupés dans le **Tableau 4**.

Entrée	Impression	Quantification de l'extraction du template	Binding	Capacités $\mu\text{mol/g}$		
				Théorique	Polymère imprimé	Polymère de controle
1	Covalent Esters boroniques	90-95 %	chloroforme	197	167 (85 %) ^a	non précisé
2	Covalent Esters acryliques	50-80 %	/	/	/	/
3	Semi-covalent sans espaceur	non quantifié	milieu aqueux	90	38-50 (55 %)	6-9
4	Semi-covalent avec un espaceur	92 %	hexane	250	114 (45 %)	<10
5	Non covalent Liaisons hydrogènes	80-90 %	toluène	590	300-445 (75 %)	180-190 (32 %)
6	Non covalent Interactions hydrophobes	50 %	milieu aqueux pH=7,5	234	45 (19 %)	33 (14 %)

^a Pourcentage de binding par rapport aux nombres de sites théoriques

Tableau 4: Tableau comparatif des différents modes d'impression du cholestérol ou de dérivés de stéroïdes

Tous les polymères sont préparés par polymérisation en masse et sont fortement réticulés, avec du DVB dans le cas des entrées 1,2 et 4 et avec de l'EGDMA pour les entrées 5 et 6. Uniquement les polymères imprimés par l'approche semi-covalente (**Tableau 4**, entrée 3) sont faiblement réticulés (9 %).

Dans toutes les méthodes, le taux d'extraction est de l'ordre de 90 % sauf dans le cas des interactions de types hydrophobes (de l'ordre de 50 %, **Tableau 4**, entrée 6).

Le binding non spécifique est élevé pour l'approche non covalente (**Tableau 4**, entrées 5 et 6).

V.6 Impression dans la masse du polymère ou en surface ?

Quelle que soit la technique de polymérisation utilisée (polymérisation en masse, en suspension, en précipitation ou en émulsion), l'impression des templates est répartie aléatoirement dans la matrice polymérique, aussi bien en profondeur qu'en surface. Le template imprimé en profondeur est difficilement accessible pour l'extraction. De plus, les phénomènes de diffusion empêchent les templates d'accéder aux sites de reconnaissance présents en profondeur dans la matrice polymérique.

Pour pallier à ce problème, l'impression en surface a été développée dans l'optique d'améliorer les performances des empreintes moléculaires et de faciliter, à la fois, l'extraction de la molécule cible et le binding.⁹⁷ Cette méthode facilite également la diffusion des templates du solvant vers les polymères et inversement.

Différentes techniques permettent une impression en surface : la formation de films,⁹⁸ le greffage de particules de silice⁹⁹ ou la polymérisation en émulsion, en deux étapes.¹⁰⁰ Pérez et coll. ont, ainsi, imprimé en surface le cholestérol par polymérisation en émulsion en deux étapes.⁶⁷ Dans un premier temps, des particules de polymère, faiblement réticulées, de 50-100 nm ont été synthétisées; puis une seconde étape de polymérisation en présence d'un dérivé polymérisable du cholestérol **T1** a lieu (**Figure 24**).

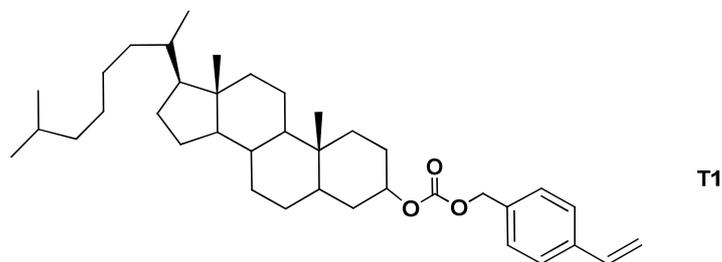
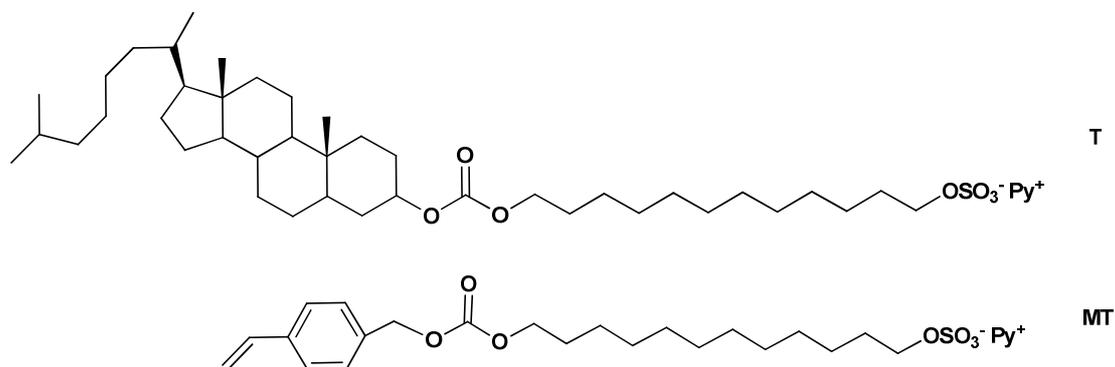


Figure 24 : Template utilisé pour l'impression en surface du cholestérol par polymérisation en émulsion en deux étapes (réf. 67)

Après hydrolyse de la fonction carbonate dans un mélange MeOH/NaOH (1 M), le binding du cholestérol est effectué dans l'isohexane, à une concentration de 1,1 mM. Selon le monomère ou l'agent de réticulation utilisé, la capacité des polymères imprimés atteint 57 % par rapport aux nombres de sites théoriques avec 4,5 % de binding non spécifique.

En comparaison avec la polymérisation en masse du même type de template (**Tableau 4**, entrée 4), l'impression en surface permet d'améliorer légèrement la capacité des polymères imprimés.

Pour améliorer davantage le procédé d'impression en surface, Whitcombe et *coll.* a rapporté l'impression non covalente par interactions hydrophobes d'un dérivé tensioactif du cholestérol **T2** par un procédé de double polymérisation en émulsion et en surface.¹⁰¹ Dans ce cas, l'introduction d'une partie amphiphile permet à la molécule cible de se positionner à l'interface des phases aqueuse et organique. La molécule cible est copolymérisée avec un monomère également tensioactif **MT** comportant une fonction carbonate (**Figure 25**).



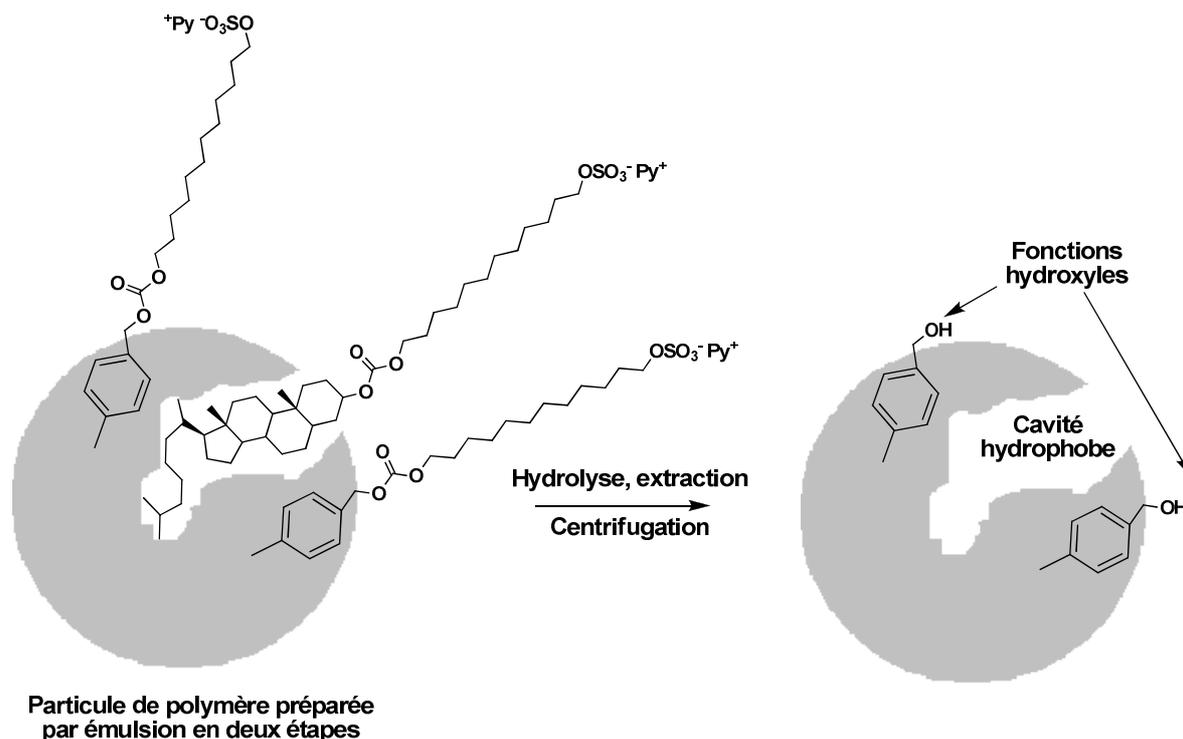


Figure 25: Exemple d'impression en surface (réf. 101)

Après extraction du template et hydrolyse des fonctions carbonates, des cavités sont libérées à la surface des particules, ainsi que des fonctions alcools.

Le binding est effectué en milieu aqueux. Plusieurs polymères ont été synthétisés de cette manière en faisant varier le rapport T/MT. La capacité de tous ces polymères imprimés à reconnaître le cholestérol reste faible, de l'ordre de 2 à 8 % par rapport aux nombre de sites théoriques et diminue quand le rapport T/MT augmente.

En comparaison avec la polymérisation en masse d'un template du cholestérol par des interactions purement hydrophobes (**Tableau 4**, Entrée 6), l'impression en surface ne semble pas améliorer la capacité des polymères.

VI. Caractérisation physique des polymères imprimés

Parmi toutes les caractérisations possibles de polymères, nous avons choisi la microscopie électronique à transmission (MET), la mesure de la taille et de la polydispersité des particules par diffusion de la lumière, la spectrométrie Infra-Rouge, la surface spécifique par la méthode de Brunauer, Emmett et Teller (BET) ainsi que l'analyse de la surface par diffraction des rayons X (XPS).

VI.1 Microscopie Electronique à Transmission : MET

C'est la méthode la plus simple et la plus rapide pour caractériser la morphologie d'un polymère. Cette technique de microscopie consiste à analyser le faisceau d'électrons transmis à travers un échantillon très mince.

Une suspension de polymère est directement déposée sur les grilles de carbone ; aucune coloration, pour le contraste, n'est nécessaire. Les processus d'interaction entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une image dont le grossissement peut atteindre 5 000 000 (**Figure 26**).

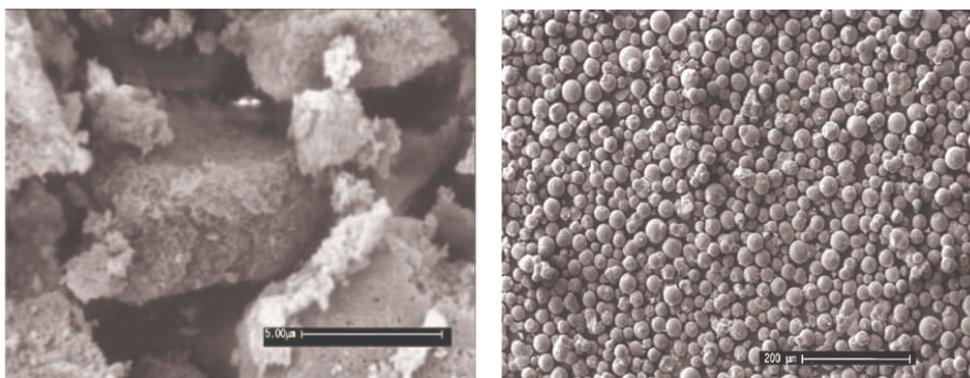


Figure 26 : Photographie de polymère par MET

L'inconvénient de cette technique est que les photographies prises des échantillons ne sont pas représentatives de la globalité du matériau.

VI.2 Taille et polydispersité des particules

La taille des particules est déterminée par diffraction de la lumière. L'angle de diffraction est inversement proportionnel à la taille : les grosses particules diffractent de fortes quantités de lumière sur des petits angles alors que les petites particules diffractent de très faibles quantités de lumière qui s'étalent de façon croissante de 0° à des angles plus larges. Le diamètre mesuré est le diamètre hydrodynamique qui rend compte du diamètre propre de la particule et de sa couche de double solvatation.

Une faible quantité de polymère (de l'ordre de 1 à 2 mg) est dispersée dans un solvant (eau, éthanol...) et analysée par diffusion de la lumière. Les résultats sont transcrits en pourcentage par nombre de particules, par volume et par intensité (**Figure 27**).

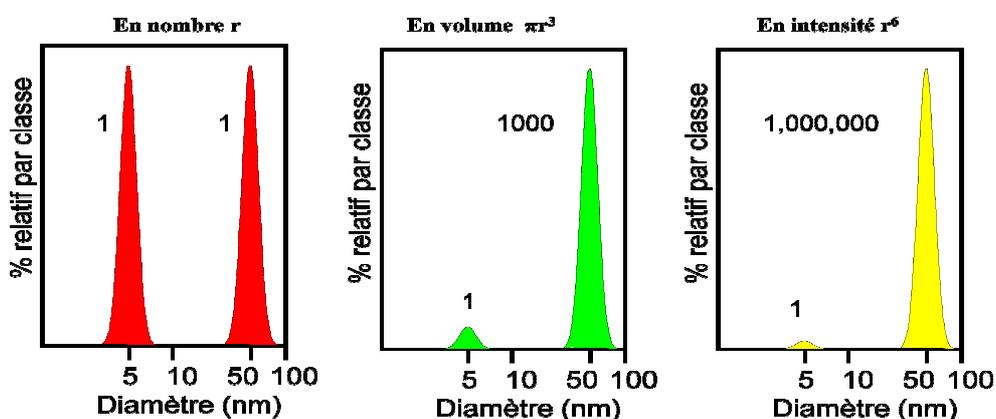


Figure 27: Exemple de résultats donnés par diffusion de la lumière

Echantillon contenant deux populations de particules à 5 et 50 nm en nombre, le volume étant proportionnel à r^3 et l'intensité à r^6 , les pourcentages relatifs en volume et en intensité varient nettement par rapport au pourcentage relatif en nombre.

L'inconvénient majeur de cette technique réside dans la mise en suspension des polymères dans un solvant adéquat afin d'éviter la formation d'agrégats.

VI.3 Spectrométrie Infra-Rouge

La spectrométrie Infra-Rouge est une technique très simple et rapide d'utilisation pour caractériser les interactions entre template et monomère.

Ainsi la copolymérisation du template avec un monomère de façon covalente peut être suivie par disparition de la double liaison C=C dont la bande d'absorption est caractéristique aux environs de 1630 cm^{-1} .

Des interactions non covalentes entre le monomère et le template peuvent également être suivi par Infra Rouge par le déplacement de bandes caractéristiques, par exemple la bande d'absorption du carbonyle des fonctions acides carboxyliques.

VI.4 Surface spécifique par BET

La surface spécifique représente la surface accessible par unité de masse. Elle correspond à la somme des surfaces externes et internes, c'est-à-dire à la surface géométrique des grains et à la surface développée par les parois des pores. Cette surface spécifique est déterminée par la méthode d'adsorption de Brunauer, Emmett et Teller (BET) qui consiste à adsorber un gaz, généralement un mélange d'azote et d'hélium (gaz vecteur), à la surface du matériau à une température de 77 K. La physisorption est un phénomène réversible qui n'a pas lieu dans les conditions standards de température et pression. C'est pourquoi il faut se placer, à 77 K, soit la température de liquéfaction de l'azote.

De manière concrète, une isotherme d'adsorption est déterminée par l'introduction séquentielle de quantités connues de gaz dans un porte-échantillon contenant le matériau à analyser. Cette isotherme donne accès au volume de gaz adsorbé V_m . La surface spécifique S_{BET} est alors calculée par la formule suivante :

$$S_{BET} = \frac{V_m * N * \sigma}{V_M}$$

Equation 1

V_m exprimé en $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (le volume de gaz adsorbé)

V_M : le volume molaire

N : le nombre d'Avogadro

$\sigma = 16,2 \text{ \AA}^2$ pour l'azote

VI.5 Analyse XPS

L'analyse XPS (X-ray photoelectron microscopy) est couramment utilisée pour l'analyse chimique de différentes couches déposées sur des matériaux (traitement de surface, nettoyage...). Elle permet également de déterminer des pollutions présentes à la surface des matériaux comme la corrosion. La profondeur sondée est de l'ordre de 1-5 nm. Le principe de l'analyse repose sur l'excitation de la surface du polymère par des rayons X. On analyse ensuite les photoélectrons émis en énergie.

Ce type d'analyse peut être appliqué dans le cas des polymères imprimés afin de caractériser leur état de surface. De manière concrète, les échantillons sont placés dans un premier compartiment où un vide de 10^{-7} mbar est établi. L'échantillon est alors transféré dans un second compartiment où l'analyse XPS peut débuter. Pour un matériau contenant de l'oxygène et du carbone, on observe le spectre suivant :

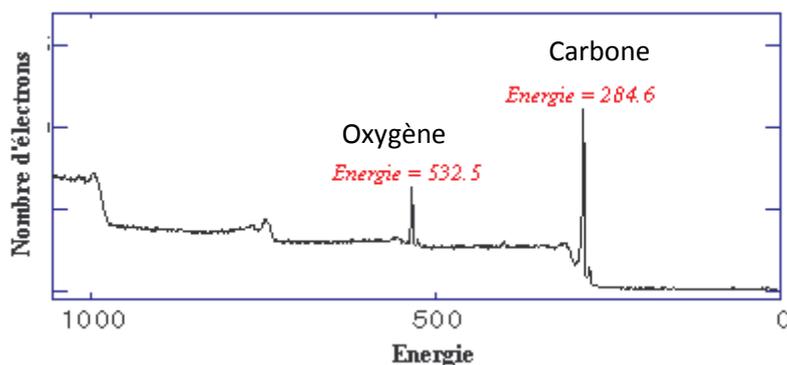


Figure 28: Exemple de spectre obtenu par analyse XPS

Tous les atomes peuvent être détectés (sauf l'hydrogène) mais pour l'analyse quantitative, les éléments légers et les éléments présents dans l'air sont difficilement quantifiables comme l'azote, l'oxygène, car physisorbés de toute façon à la surface des matériaux.

Il existe une correspondance entre cette énergie et l'atome émetteur. On peut calculer le rapport de concentrations de deux éléments A et B par la formule :

$$\frac{C_A}{C_B} = \frac{I_A * \sigma_B * E_C B}{I_B * \sigma_A * E_C A}$$

Equation 2

C la concentration

I la surface du pic

σ la section efficace d'ionisation

E_c l'énergie cinétique moyenne.

VII. Reconnaissance et stabilité

VII.1 Conditions standards d'étude de binding

De manière générale, pour les polymères imprimés préparés par polymérisation en masse, par précipitation et par suspension, les meilleures conditions de binding sont observées dans le solvant qui a servi à synthétiser le polymère.

Dans le cas des polymères préparés par émulsion dans l'eau, le solvant utilisé pour le binding va dépendre du mode d'impression : pour une impression non covalente basée sur des interactions de type Van der Waals, l'eau pourra être utilisée comme solvant, ce qui n'est pas le cas pour une impression semi-covalente, où l'eau devrait totalement inhiber le binding en établissant des liaisons hydrogènes avec les sites d'interactions hydrophiles.

Les études de binding sont réalisées dans les conditions du « batch process » : le polymère imprimé est mis en contact de la molécule cible, dans un solvant donné, à température constante, avec ou sans agitation pendant un temps d'incubation donné, généralement 24 heures¹⁰² (**Figure 29**).

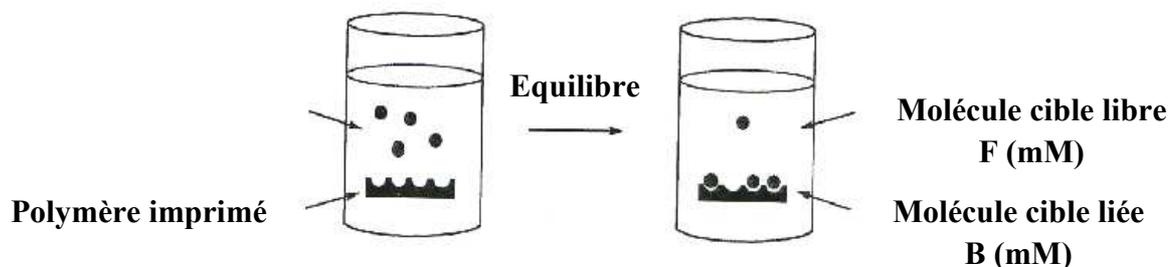


Figure 29: Batch process

VII.2 Quantification du binding

La méthode la plus facile à utiliser est la CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance). La présence d'un chromophore sur la molécule utilisée pour le binding permet une détection aisée à l'aide d'une barette d'iode ou le détecteur UV. L'absence de chromophore nécessite l'utilisation d'un DEDL (Détecteur Evaporatif à Diffusion de Lumière) où la corrélation aire-concentration est cette fois quadratique.

D'autres méthodes sont aussi utilisées comme des analyses élémentaires d'hétéroatomes (phosphore, soufre, azote) ou la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) à l'état solide pour caractériser par exemple, la formation de cétal dans le cas de l'impression covalente.¹⁰³ Un titrage volumétrique peut être utilisé dans le cas d'un polymère imprimé via un métal.¹⁰⁴ La fluorescence est aussi très employée, que ce soit par détection d'une molécule fluorescente pour le binding¹⁰⁵ ou par étude du quenching de fluorescence.¹⁰⁶

VII.3 Caractérisation du binding

Une première caractéristique du binding peut être déterminée rapidement. En effet, le tracé de B en fonction de F est linéaire dans le cas d'un binding non spécifique et une isotherme est obtenue dans le cas d'un binding spécifique par un polymère imprimé¹⁰⁷ (**Figure 30**).

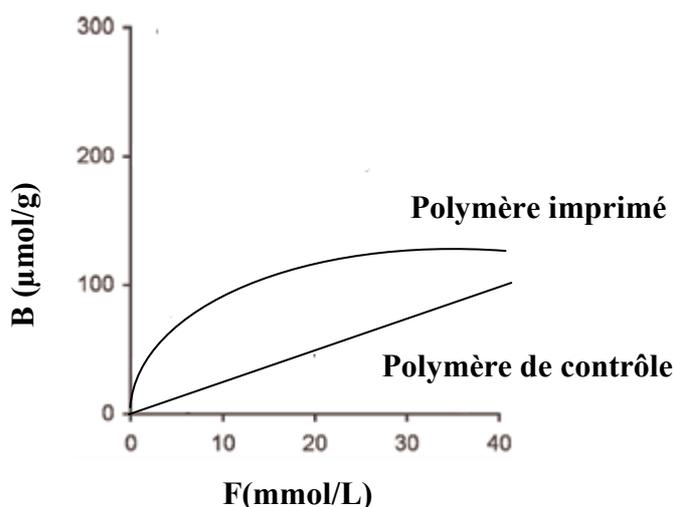


Figure 30: Allure générale des courbes de binding entre un polymère imprimé ou de contrôle avec un analyte

Une seconde caractéristique du binding est la cinétique. En mesurant la capacité des polymères à différents temps d'incubation, on détermine le temps au bout duquel l'équilibre de binding est atteint.

Une fois le temps d'équilibre déterminé, le tracé de l'isotherme de binding de Langmuir est possible. La capacité B des polymères imprimés est déterminée au temps d'équilibre à différentes concentrations F en molécule cible libre en solution (**Figure 31**).

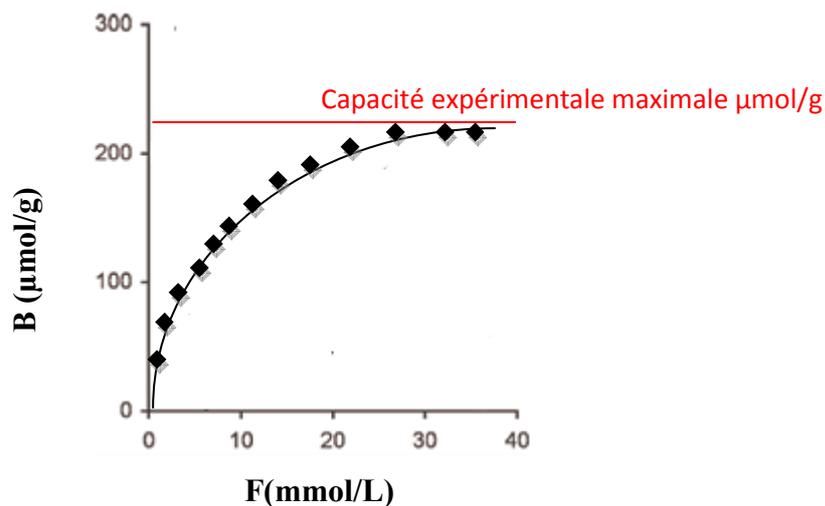


Figure 31 : Isotherme du binding de Langmuir

Le traitement de ces données par des méthodes développées en biologie, et adaptées aux polymères imprimés, permet de caractériser les propriétés du binding et mesurer l'hétérogénéité des sites de reconnaissance.¹⁰⁸

Le premier modèle est celui de Langmuir pour les systèmes homogène. Les données de l'isotherme de binding sont traitées de manière à rapporter sur l'axe des abscisses les capacités, **B**, en $\mu\text{mol/g}$ et sur l'axe des ordonnées, le rapport **B/F** où **F** représente la concentration libre en analyte après incubation, pour donner la droite de Scatchard correspondante (Figure 32).

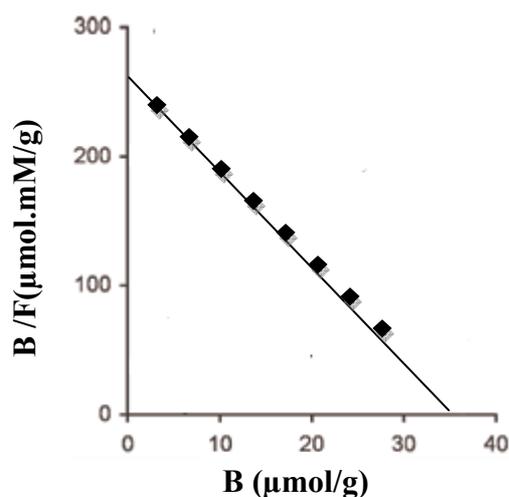


Figure 32 : Exemple de droite de Scatchard obtenue dans le cas d'un système homogène

Dans le cas de la **Figure 32**, les sites de binding sont parfaitement homogènes. La pente de la droite donne accès à la constante d'association K_a et l'intersection avec l'origine permet de calculer le nombre de sites de binding N selon l'**Equation 3** :

$$\frac{B}{F} = K_a * N - K_a * B$$

Equation 3

Dans la plupart des cas, les polymères imprimés ne présentent pas des sites homogènes. Le tracé de B/F en fonction de B n'est plus une ligne droite ce qui met en évidence une hétérogénéité dans les sites de binding.

Il est, dans ce cas, parfois, possible de délimiter deux régions linéaires représentant d'une part, des sites à haute affinité et d'autre part, des sites à faible affinité (**Figure 33**). Deux constantes d'affinité peuvent alors être déterminées en utilisant l'**Equation 3**.

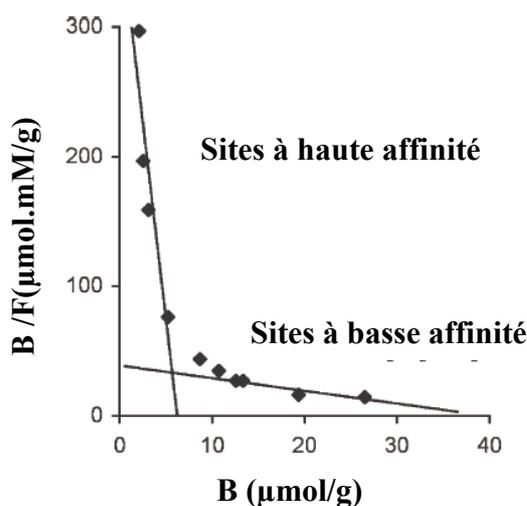


Figure 33: Exemple de droites de Scatchard obtenues dans le cas d'un système hétérogène

Lorsque le modèle de Langmuir n'est pas applicable, le modèle de Freundlich est utilisé (**Figure 34**). Ce modèle n'est applicable que dans la région où le tracé de $\log B$ en fonction de $\log F$ est linéaire.

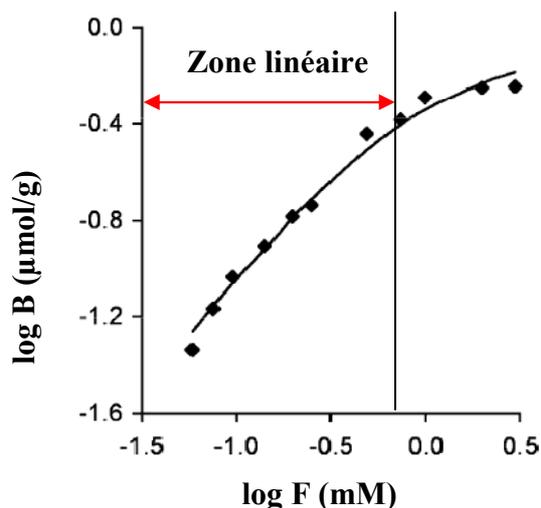


Figure 34 : Applications du modèle de Freundlich

Ce tracé de $\log B$ en fonction de $\log F$ donne accès à deux paramètres m et a selon l'Equation 4 :

$$\log B = m * \log F + \log a$$

Equation 4

m est appelé index d'hétérogénéité, il est compris entre 0 et 1. Plus il est proche de 1, plus le système présente des sites de binding homogènes et inversement. Le paramètre a est une mesure de la capacité du polymère imprimé. Les paramètres a et m donnent accès à une courbe distribution des constantes d'association $N(K) = f(\log K)$ (Figure 35).

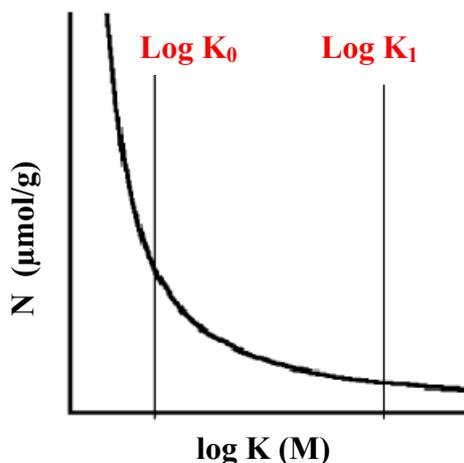


Figure 35 : Courbe de distribution des constantes d'association

En se fixant deux limites, $K_0 = 1/F_{\max}$ et $K_1 = 1/F_{\min}$, une constante d'association Kamoy peut être calculée comme étant une moyenne du nombre de sites compris entre K_0 et K_1 (**Equation 5**).

$$K_{Amoy}(K_0 - K_1) = \left(\frac{m}{m-1}\right) * \left(\frac{K_0^{(1-m)} - K_1^{(1-m)}}{K_0^{(-m)} - K_1^{(-m)}}\right)$$

Equation 5

Si K_0 et K_1 sont identiques pour plusieurs polymères imprimés, des comparaisons peuvent être effectuées au niveau des constantes d'association K_{Amoy} .

VII.4 Effet d'empreinte et sélectivité

Après avoir caractérisé les sites de binding, d'autres caractéristiques des polymères imprimés peuvent être évaluées. Il s'agit du facteur d'empreinte et des facteurs de sélectivité.

Le facteur d'empreinte est un paramètre qui rend compte du réel effet d'empreinte créée dans un polymère imprimé par rapport à un polymère de contrôle.

Pour calculer ce facteur d'empreinte, il faut dans un premier temps évaluer les coefficients de partage définis par la formule suivante :

$$K_P = \frac{C_j}{F}$$

Equation 6

C_j : concentration d'analyte liée au polymère imprimé ou au polymère de contrôle ($\mu\text{mol/g}$)

F : concentration d'analyte libre après incubation (mM)

L'analyte utilisé dans ce cas est une molécule mimant le template utilisé lors de l'impression moléculaire.

Le facteur d’empreinte est alors défini comme le rapport du coefficient de partage d’un polymère imprimé et celui du polymère de contrôle correspondant (**Equation 7**).

$$I = \frac{K_P \text{ polymère imprimé}}{K_P \text{ polymère de contrôle}}$$

Equation 7

Un autre paramètre important dans le domaine des polymères imprimés est la détermination des facteurs de sélectivité.

Deux définitions du facteur de sélectivité sont rapportées dans la littérature. Une première définition a été proposée par Striegler et coll.¹⁰⁹ (**Equation 8**)

$$\alpha_{j,k} = \frac{C_j - C_{nj}}{C_k - C_{nk}}$$

Equation 8

C_j : concentration d’analyte j liée au polymère imprimé MIPX_jc

C_{nj} : concentration d’analyte j liée au polymère de contrôle C_jc

C_k : concentration d’un second analyte k liée au polymère imprimé MIPX_jc

C_{nk} : concentration d’un second analyte k liée au polymère de contrôle C_jc

Une seconde définition ne tient pas compte de la reconnaissance des polymères de contrôle. Dans ce cas, le facteur de sélectivité est défini comme le rapport de deux coefficients de partage deux analytes différents.

Après avoir défini tous ces paramètres, un traitement chimique des polymères imprimés peut être envisagé afin de vérifier l’implication de groupes fonctionnels dans le binding polymère-substrat.

VII.5 Traitement chimique des empreintes moléculaires

La post-fonctionnalisation des groupements nécessaires à la reconnaissance permet de sonder l'implication ou non de groupements fonctionnels dans le binding et ceci dans le cas d'une impression covalente²⁹ ou semi-covalente.⁶⁵

Dans le cas des polymères imprimés avec du cholestérol (cf. V.3), par l'approche semi-covalente, Whitcombe et *coll.* a montré qu'une post-fonctionnalisation de la fonction phénol présente dans les cavités par un groupement acétyle ou benzyle, inhibe le binding (**Figure 36**). La capacité des polymères imprimés, initialement de 114 $\mu\text{mol/g}$ de polymère est quasi-nulle après post-fonctionnalisation (inférieure à 10 $\mu\text{mol/g}$ de polymère).⁶⁵

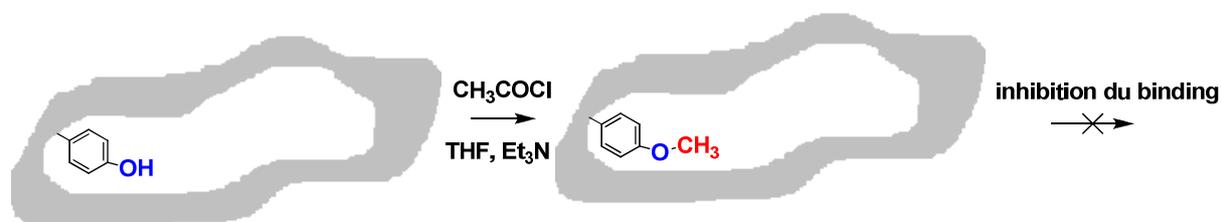


Figure 36 : Exemple de post- fonctionnalisation de polymères imprimés avec du cholestérol (réf. 65)

VII.6 Stabilité thermique et mécanique des polymères

Les polymères synthétisés sont généralement stables quel que soit le mode de polymérisation et le type d'impression utilisé, à hautes températures¹¹⁰ ou dans des conditions extrêmes de pH.¹¹¹ Il est décrit que ces polymères peuvent être recyclés sans problème, après les études de binding, tout en conservant leur propriété de reconnaissance.^{112,113}

VIII. Applications des polymères imprimés

Les applications des empreintes moléculaires sont diverses. Historiquement, elles ont été utilisées comme phase stationnaire de chromatographie, puis pour l'extraction sur support solide, comme capteurs, ou encore en catalyse et en synthèse.

VIII.1 Chromatographie liquide

L'utilisation des polymères imprimés comme phases stationnaires dans des colonnes chromatographiques a été la première application des empreintes moléculaires.¹¹⁴ C'était la méthode la plus évidente pour tester les capacités de reconnaissance de ces polymères. De nombreuses publications décrivent le développement de phases stationnaires basées sur des empreintes moléculaires, mais aucune de ces phases stationnaires n'est actuellement commercialisée. Les empreintes moléculaires sont, la plupart du temps, basées sur l'approche non covalente ou covalente réversible avec des esters boroniques pour permettre des cinétiques de binding rapides.⁹ Même si les premières phases stationnaires étaient basées initialement sur des empreintes moléculaires préparées par polymérisation en masse, les polymérisations en suspension, en émulsion ou en précipitation sont actuellement préférées pour leur homogénéité de taille de particules et des pics plus fins en CLHP.^{115,116}

VIII.2 Extraction sur support solide

L'utilisation des empreintes moléculaires dans l'extraction sur support solide est l'application la plus courante actuellement pour des analyses cliniques ou environnementales.^{117,118,119,120} Il faut que les empreintes utilisées aient une très bonne capacité afin de pouvoir absorber un maximum du composé désiré. L'extraction sur support solide a été développée pour la première fois pour l'élimination de la pentamidine des urines.¹²¹

VIII.3 Détecteurs

L'utilisation des empreintes moléculaires comme détecteurs est aussi l'une des applications possibles.¹²² Le binding entre l'analyte et l'empreinte peut être détecté par différentes méthodes : électrochimique, calorimétrique, pHmétrique ou fluorescence. Des détecteurs de glucose (**Figure 37**),¹²³ de caféine,¹²⁴ de morphine¹²⁵ et de nombreux autres composés¹²⁶ ont été synthétisés.

Pour détecter le glucose en milieu biologique, un polymère, fortement réticulé, d'un dérivé du glucose a été synthétisé par l'approche non covalente, avec liaisons de coordination, par polymérisation en masse (**Figure 37**).

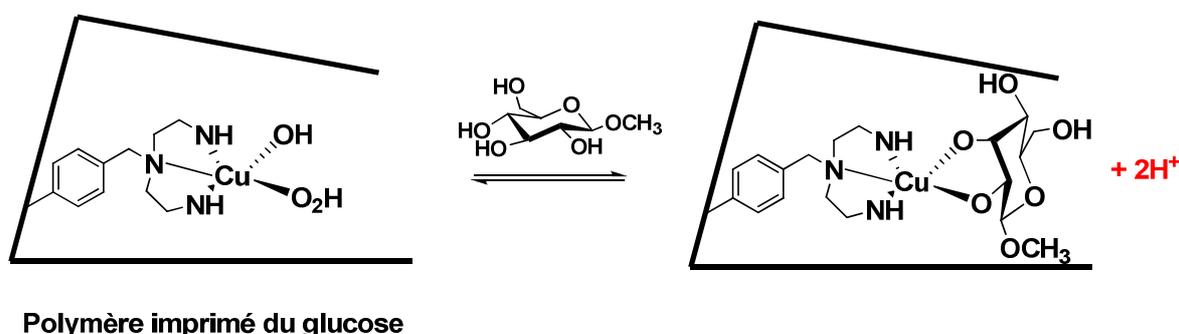


Figure 37 : Principe de détection du glucose dans des milieux biologiques par pHmétrie (réf. 123)

La détection du glucose se fait par pHmétrie, par ajout de faibles quantités de glucose en parallèle de l'ajout de base afin que le pH du milieu reste constant.

En effet, la complexation du glucose libère des protons qui sont neutralisés par l'ajout de base. Selon la quantité de base additionnée, la quantité de glucose complexé au cuivre peut donc être déterminée. L'équilibre de complexation est très rapide (quelques secondes) ce qui devrait permettre d'utiliser ce polymère comme détecteur de glucose.

VIII.4 Catalyse

Les résultats obtenus avec les anticorps catalytiques induits par des analogues d'états de transition^{127,128} ont motivé l'utilisation des polymères imprégnés comme catalyseur. De

nombreux exemples illustrent la préparation de polymères imprimés basée sur l'impression d'un analogue de l'état de transition de réactions telles que l'hydrolyse d'esters¹²⁹ (**Figure 38**), des réactions d'élimination¹³⁰ et la formation de liaisons carbone-carbone.¹³¹ Plusieurs revues décrivent l'utilisation des polymères imprimés comme catalyseurs.^{132,133,134}

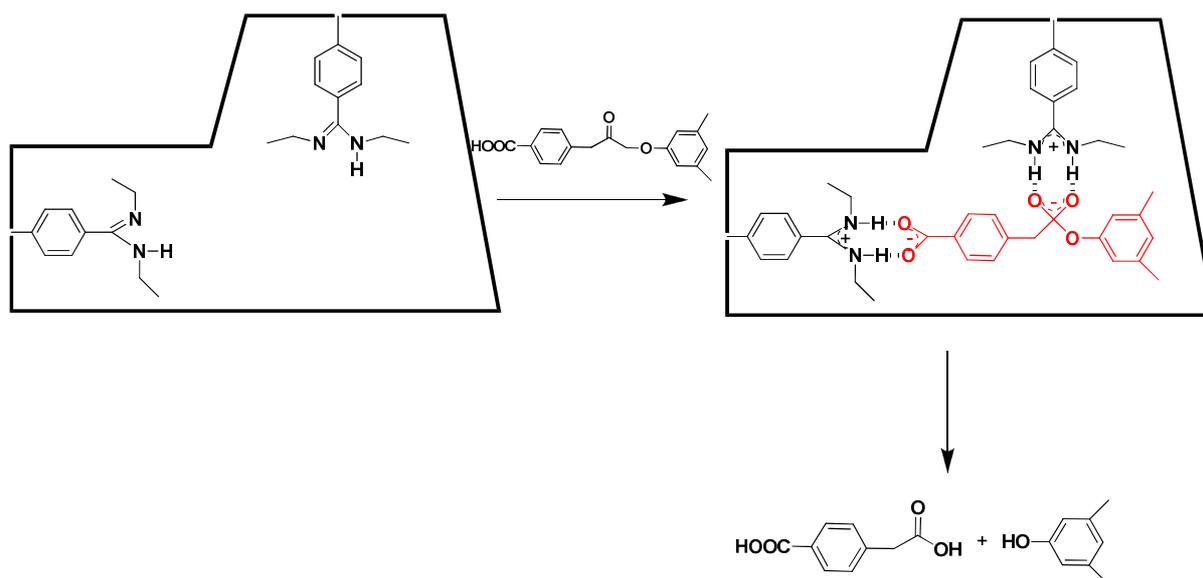


Figure 38 : Exemple d'utilisation des polymères imprimés dans l'hydrolyse de fonction ester (réf. 129)

VIII.5 Synthèse

Les polymères imprimés peuvent également être utilisés comme micro-réacteurs. En effet, l'orientation spatiale bien définie des groupements dans les sites actifs offre la possibilité d'utiliser ces empreintes en synthèse asymétrique. Shea et *coll.* ont synthétisé des cyclopropanes d'acides carboxyliques dans une empreinte mais l'excès énantiomérique obtenu reste faible (0,05 %). Quelques réactions sont décrites dans les empreintes comme des alkylations,^{135,136} des condensations aldoliques ou des cycloadditions 1,3-dipolaires de Huisgen.¹³⁷ Les empreintes moléculaires peuvent également servir de groupes protecteurs temporaires de fonctions hydroxyles¹³⁸ (**Figure 39**).

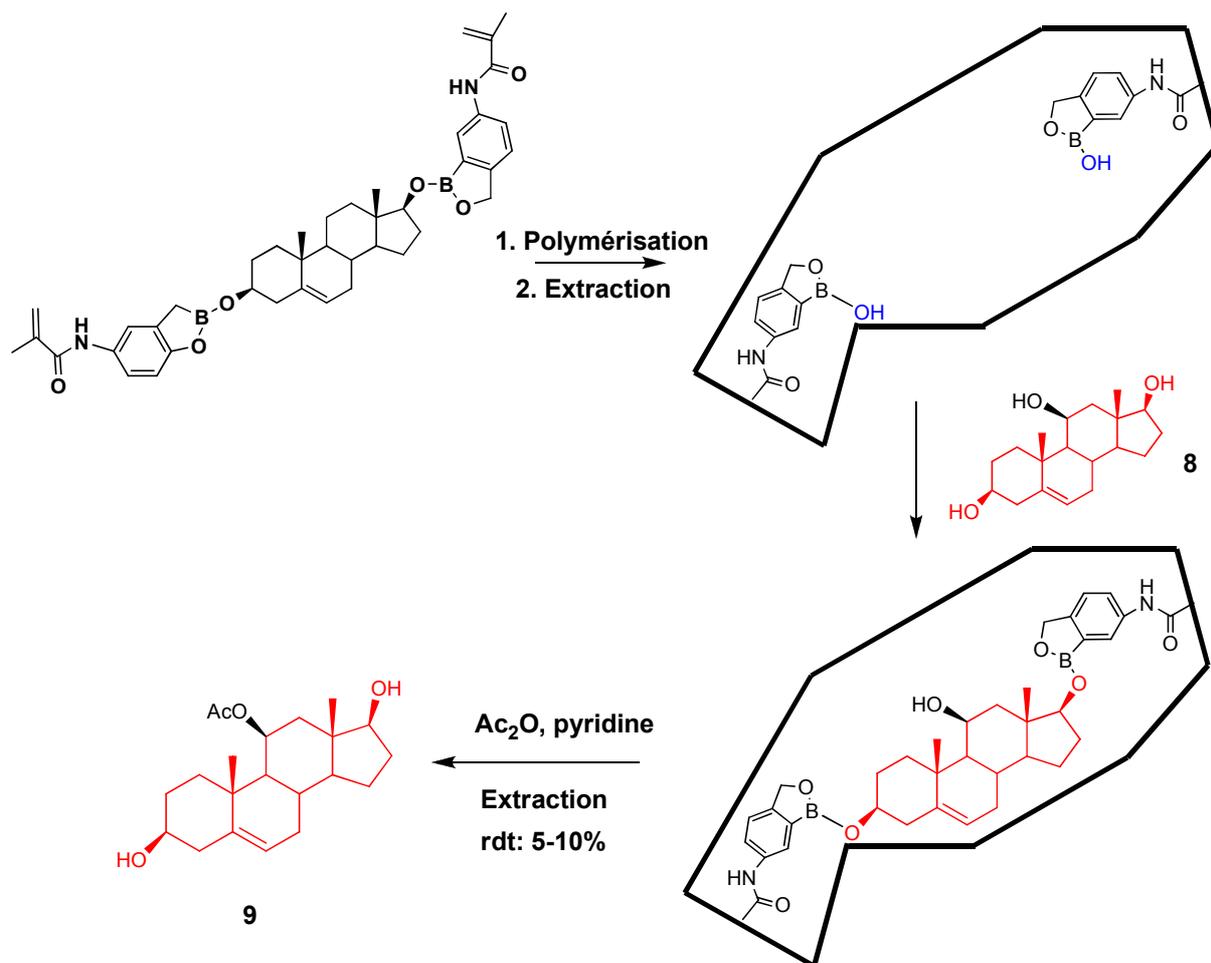


Figure 39: Utilisation des empreintes comme groupement protecteur temporaire (réf. 138)

Selon les auteurs, le rendement faible d'acétylation est attribué à l'accessibilité des sites, dans la matrice polymérique fortement réticulée.

IX. Les empreintes moléculaires appliquées aux sucres : état de l'art

Ce descriptif non exhaustif sur l'utilisation des empreintes moléculaires laisse entrevoir de nombreuses perspectives et applications. Pour la suite de notre étude, nous allons plus particulièrement nous intéresser aux empreintes de mono et disaccharides. Trois types d'impressions ont déjà été utilisés, l'impression covalente, non covalente via des liaisons électrostatiques ou des liaisons hydrogènes et des liaisons de coordination avec un métal. Toutes ses approches ont été étudiées par polymérisation en masse uniquement.

IX.1 Impression covalente

Wulff et *coll.* rapportent, en 1991, l'impression covalente du D-fructose, D-galactose et du phényl α -D-mannose. Un ester boronique polymérisable, le (4-vinylphényl)boronate, est greffé sur les différents monosaccharides qui sont ensuite polymérisés en masse⁴⁵ (**Figure 40**).

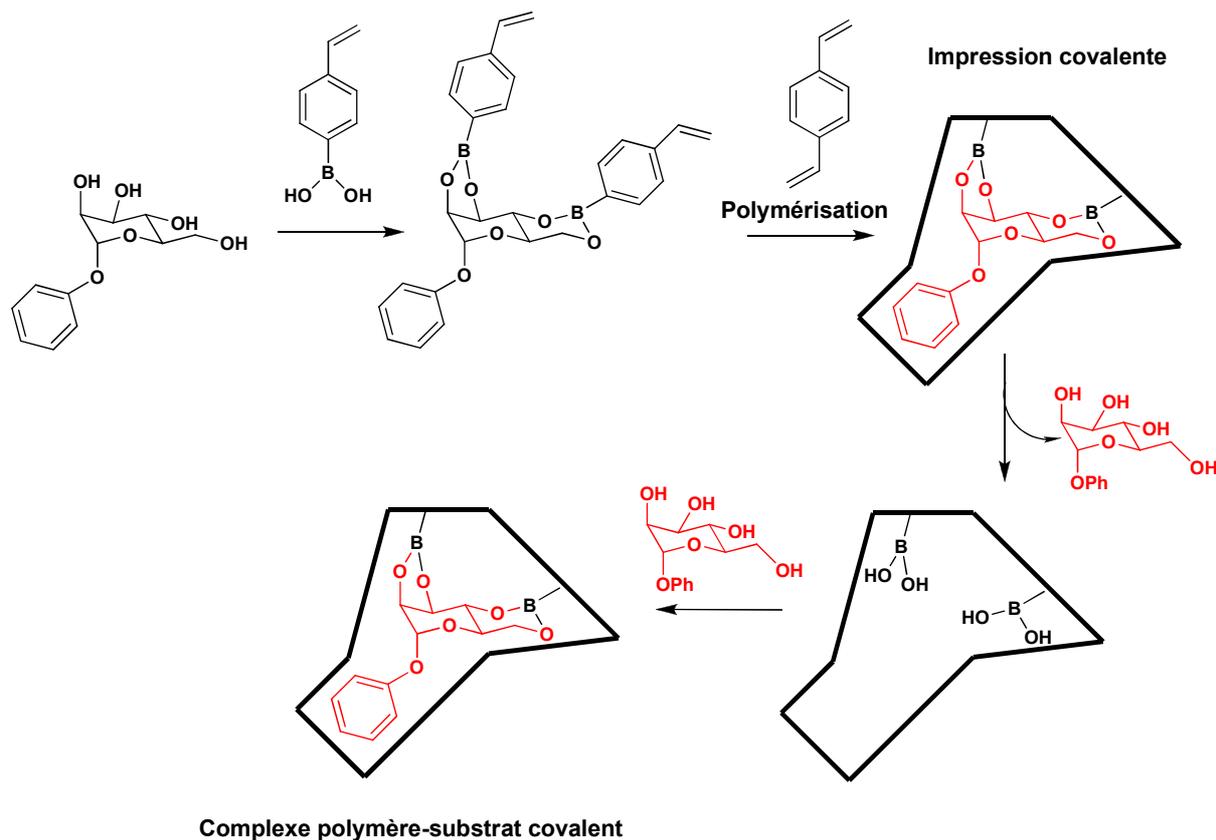


Figure 40: Impression covalente d'un dérivé du mannose (réf. 45)

Tous les polymères sont préparés, par polymérisation en masse à 65 °C pendant 48 heures, avec de l'EGDMA (100 %) utilisé comme agent de réticulation et du THF comme porogène.

L'extraction du template, effectuée en milieu méthanol/acide sulfurique dilué, est comprise entre 62 et 99 %.

Les sélectivités des polymères sont calculées en incubant un mélange racémique D et L du galactose, du mannose, du phényl α mannopyranose et du fructose par la méthode du « batch process ». Les incubations sont réalisées dans du méthanol et la capacité expérimentale des polymères imprimés est fixée à 50 % des sites théoriques. Les facteurs de sélectivité sont obtenus par le calcul des coefficients de partage (Tableau 5).

Polymères imprimés avec	Template pour le binding	Facteur de sélectivité D/L
le D-galactose	D,L-galactose	1,19
le D-fructose	D,L-fructose	1,63
le phényl D-mannopyranoside	phényl D,L-mannopyranoside	2,96

Tableau 5 : Facteurs de sélectivité obtenus par Wulff et *coll.* (réf. 45)

Le facteur de sélectivité D/L le plus élevé est obtenu pour le polymère imprimé avec le phényl D-mannopyranoside.

IX.2 Impression non covalente par liaisons hydrogènes et électrostatiques

L'approche non covalente a été utilisée, pour la première fois, en 1994, par Mosbach et *coll.* pour imprimer des dérivés du α et β galactose et du fucose avec de l'acide méthacrylique, par polymérisation en masse¹³⁹ (**Figure 41**).

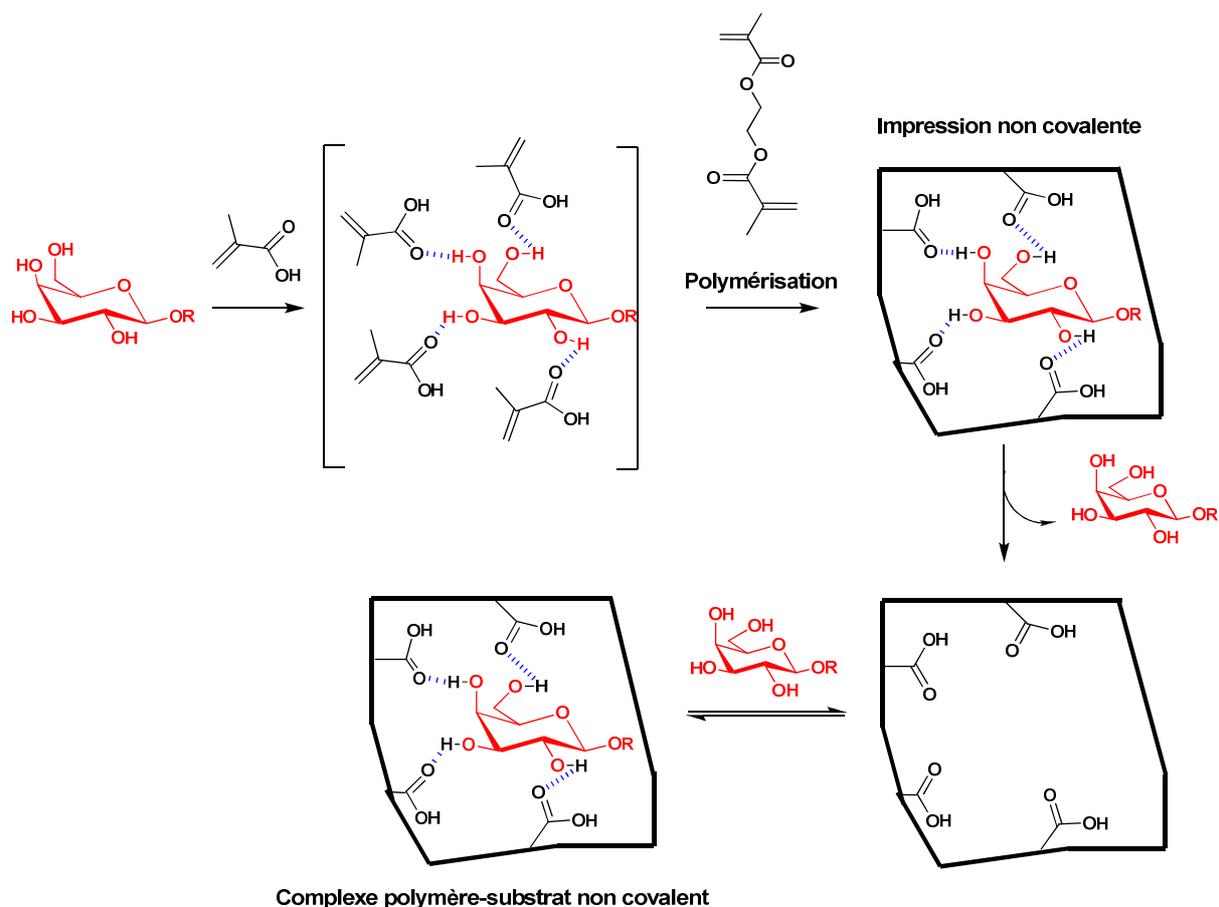


Figure 41: Approche non covalente pour la synthèse de polymères imprimés avec des dérivés de galactose (réf. 139)

Tous les polymères sont fortement réticulés avec plus de 80 % d'EGDMA et l'acide méthacrylique est utilisé comme monomère fonctionnel. La polymérisation a lieu dans l'acétonitrile, à 45 °C pendant 16 heures.

L'extraction du template est effectué dans un mélange MeOH/ H₂SO₄ dilué.

Afin de tester les sélectivités anomériques, les différents polymères imprimés ont été utilisés comme phase stationnaire en HPLC (phase mobile acétonitrile/eau). Les temps de rétention sont déterminés et montrent une très bonne discrimination anomérique (**Tableau 6**).

Polymères imprimés avec	Template pour le binding	Facteurs de sélectivité α/β
du p-nitrophényl- α -D-galactoside	α et β p-nitrophényl-D-galactoside	4,3
du p-nitrophényl- α -D-fucoside	α et β p-nitrophényl-D-fucoside	5,45

Tableau 6: Facteurs de sélectivité obtenus par Mosbach et *coll.* (réf. 139)

Par ailleurs, Mosbach et *coll.* rapportent, également, en 1995, l'impression non covalente via des interactions électrostatiques de dérivés peracétylés de galactose, par polymérisation en masse en présence d'acide méthacrylique comme monomère fonctionnel et l'EGDMA comme agent de réticulation¹⁴⁰ (Figure 42).

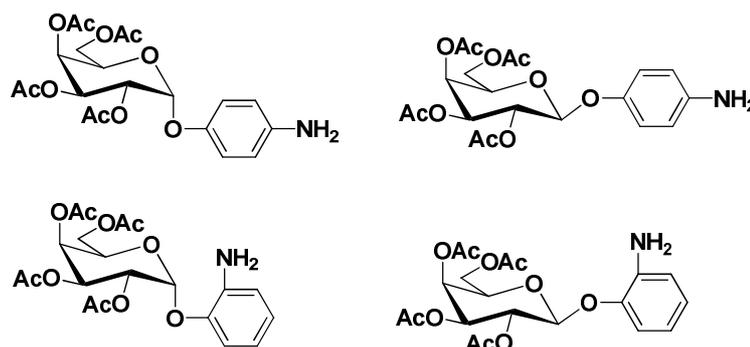


Figure 42: Monosaccharides utilisés pour l'impression non covalente via des interactions électrostatiques (réf. 140)

Les matrices polymériques sont fortement réticulées, l'EDMA étant utilisé comme agent de réticulation. Les polymères sont préparés à 0 °C par polymérisation en masse en présence de chloroforme.

L'extraction du template est effectuée dans un milieu MeOH/acide acétique dilué.

Ces polymères sont ensuite utilisés pour la fabrication de colonnes CLHP (phase mobile acétonitrile/eau) pour évaluer les facteurs de sélectivités anomériques (Tableau 7).

Polymères imprimés avec	Template pour le binding	Facteur de sélectivité β/α
du p-aminophényl- β -D-galactoside	α et β p-aminophényl-D-galactoside	1,27
du o-aminophényl- β -D-galactoside	α et β o-aminophényl-D-galactoside	1,06

Tableau 7: Facteurs de sélectivité obtenus par Mosbach et coll. (réf. 140)

Les polymères imprimés avec les dérivés α du galactose ne présentent aucune sélectivité anomérique.

En 2004, Kofinas et coll. rapportent la préparation de polymères hydrogèles imprimés avec un dérivé de glucose, basé sur un sel de barium en position 6 et sur la poly(allylamine.HCl).¹⁴¹ Le polymère est réticulé avec de l'épichlorohydrine. Après gélification pendant 10-15 min, l'extraction du template s'effectue en milieu basique (4 M NaOH).

Ces polymères sont testés par la méthode du « batch process » dans l'eau après 24 heures d'incubation. Le facteur de sélectivité glucose-fructose, obtenu lors d'expériences de compétition, est de 7,15.

En 2005, Shimidzu et coll., ont rapporté la synthèse de polymères imprimés de dérivés de monosaccharides basée sur des complexes de zinc-porphirine¹⁴² (**Figure 43**).

En 2006, Garcia et *coll.* ont préparé des polymères imprimés d'un dérivé de glucose possédant un groupement sulfate en position 6¹⁴³ (**Figure 44**).

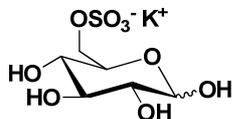


Figure 44 : Dérivé de glucose utilisé pour préparer des polymères imprimés par l'approche non covalente (réf. 143)

Les différents polymères ont tous été préparés par polymérisation en masse dans des matrices fortement réticulées (plus de 80 % d'EGDMA) avec comme monomères fonctionnels le 2-aminoethyl méthacrylamide et le méthacrylamide, en présence de DMSO, utilisé comme porogène. La polymérisation a lieu à 50 °C pendant 24 heures.

L'extraction du template s'effectue avec de l'eau et est suivi par CLHP.

La capacité expérimentale des polymères et les sélectivités sont déterminées par la méthode du « batch process » dans le DMSO ou dans l'eau, après 24 heures d'incubation.

80 % des sites théoriques sont occupés par le template d'origine lors des expériences de binding tandis que un dérivé de galactose substitué en position 6 par un groupement sulfate ne se lie au même polymère que faiblement (environ 5 %).

Le même type d'approche a été utilisé pour préparer des polymères imprimés avec du cellobiose¹⁴⁴ (**Figure 45**).

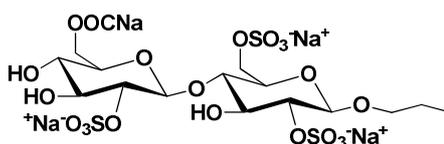


Figure 45: Template du cellobiose utilisé pour la préparation de polymère imprimé basé sur l'approche non covalente (réf. 144)

Les polymères imprimés sont préparés par polymérisation en masse, avec le template de la **Figure 45**, en présence de 2-aminoethyl méthacrylamide et le méthacrylamide comme monomères fonctionnels et d'EGDMA comme agent de réticulation. Les capacités expérimentales des polymères imprimés sont plus faibles que les polymères de contrôle équivalent.

Une publication en 2009, de Okutuku et *coll.*¹⁴⁵, rapporte la préparation de polymères imprimés de galactose par l'approche non covalente en utilisant comme monomère fonctionnel l'acrylamide et comme agent de réticulation EGDMA. Les matrices préparées, fortement réticulées, sont obtenues par polymérisation en masse en présence de DMSO comme porogène. La polymérisation a lieu pendant 12 heures à 50 °C.

L'extraction du template est effectuée dans un milieu méthanol/acide acétique et libère 95 % des sites théoriques.

La capacité expérimentale a été évaluée par la méthode du « batch process », après 4 heures d'incubation dans l'eau. 35 % des sites théoriques sont occupés lors des expériences de binding. Le facteur d'empreinte, calculé en utilisant les coefficients de partage, est évalué à 783. Le traitement des données de l'isotherme de binding par le tracé de la droite de Scatchard donne accès à une constante de dissociation K_D de 10,5 mM.

Les facteurs de sélectivité, obtenus en incubant séparément chaque sucre sont élevés (**Tableau 9**).

Polymères imprimés avec du	Facteurs de sélectivité	
galactose	$\alpha_{gal/glu} = 4,4$	$\alpha_{gal/man} = 33,5$

Tableau 9: Facteurs de sélectivité (réf. 145)

IX.3 Impression non covalente par liaisons de coordination

L'utilisation de liaisons de coordination pour la synthèse d'empreintes moléculaires de mono- et disaccharides a été rapportée par Striegler.^{109,146,147} L'étude rapporte la synthèse d'un ligand polymérisable, tridentate afin d'introduire un atome de cuivre qui se lie aux différents mono et disaccharides pour établir un complexe de prépolymérisation stable (**Figure 46**).

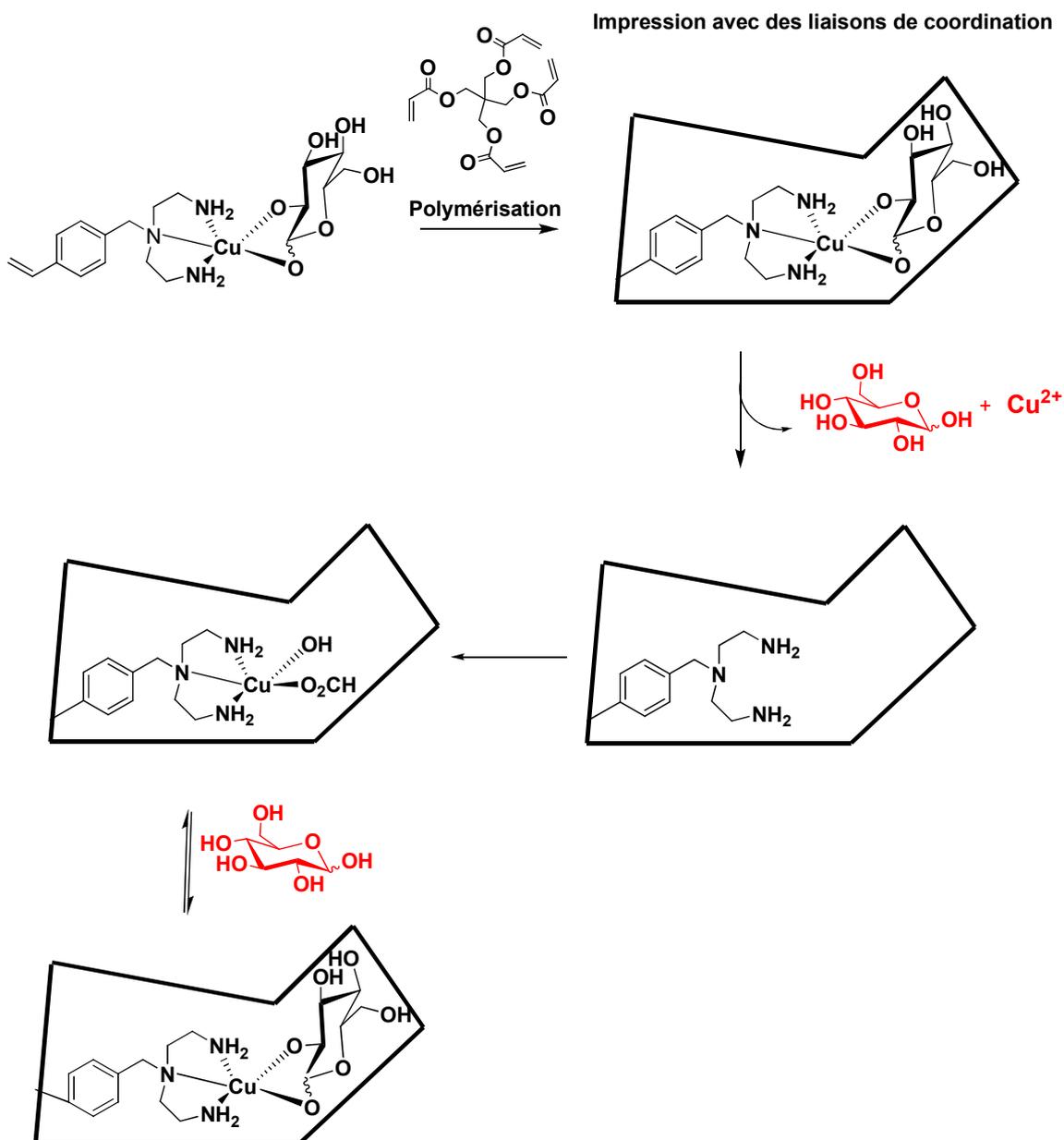


Figure 46: Utilisation de liaisons de coordination pour la préparation de polymères imprimés de glucose (réf. 109)

Après polymérisation en masse, par photo initiation, en présence uniquement d'un agent de réticulation, le pentaérythritol tetraacrylate, l'extraction du template s'effectue par simple lavage, en présence d'EDTA et d'acide chlorhydrique diluée. L'extraction du glucose est estimée à 98 %.

Les études de binding sont effectuées dans l'eau à un pH physiologique après 24 heures d'incubation, à 25°C, sur 100 mg de polymère à une concentration de 0,92 mM en sucre. Le polymère de contrôle, polymérisé en absence de complexe, a une capacité expérimentale quasi-nulle. Le facteur d'empreinte, recalculé à l'aide des données de la publication, en utilisant les coefficients de partage est d'environ 10.

Les sélectivités sont déterminées par compétitions, à 24 heures, à 25 °C, dans l'eau, sur 100mg de polymère à une concentration de 0,2 mM en sucre (**Tableau 10**).

Polymères imprimés avec du	capaexp/capath	Facteurs de sélectivité	
glucose	30 %	$\alpha_{\text{glu/gal}} = 5,5$	$\alpha_{\text{glu/man}} = 12,4$
galactose	30 %	$\alpha_{\text{gal/glu}} = 1,7$	/
mannose	26 %	$\alpha_{\text{man/glu}} = 1,5$	/

Tableau 10: Facteurs de sélectivité obtenus par Striegler pour des polymères imprimés à base de monosaccharides (réf. 109)

Contrairement aux polymères imprimés par Wulff, la sélectivité est ici due à l'orientation des groupements fonctionnels à l'intérieur du polymère imprimé.

De la même manière, cette technique d'impression a été utilisée pour synthétiser des polymères imprimés de disaccharides, notamment de maltose et de cellobiose.¹⁴⁶

L'extraction du template est évaluée à environ 80 %. Le binding a aussi été effectué dans l'eau, après 24 heures d'incubation, à 20 °C sur 100 mg de polymère à une concentration de 0,45 mM en sucre. Les sélectivités ont été déterminées en compétition de la même manière que les capacités (**Tableau 11**). Le facteur d'empreinte a été évalué à environ 10.

Polymères imprimés avec du	capaexp/capath	Facteurs de sélectivité
maltose	10 %	$\alpha_{\text{malto/cello}} = 1,2$
cellobiose	10 %	$\alpha_{\text{cello/malto}} = 1,7$

Tableau 11: Facteurs de sélectivité obtenus pour des polymères imprimés avec des dissaccharides (réf. 146)

De façon surprenante, bien que l'extraction du template soit de l'ordre de 80 %, le rapport capaexp/capath n'est que de 10 % environ pour les polymères imprimés avec des disaccharides.

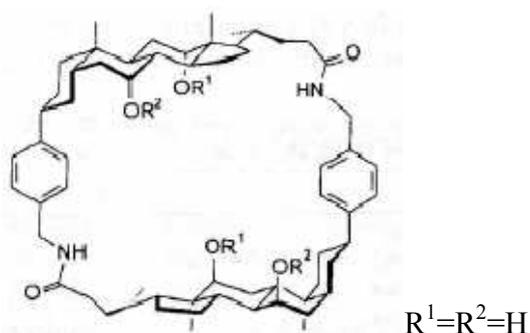
Pour le polymère imprimé avec du maltose, une compétition maltose/glucose a été effectuée. Dans ce cas, plus de 80 % des sites théoriques sont occupés par du glucose. Les auteurs assignent cette différence de sélectivité à la nature hydrophobe de la matrice polymérique.

Afin d'améliorer la capacité expérimentale des polymères imprimés avec des disaccharides, des matrices plus hydrophiles ont été employées. Striegler a montré que le nombre de liaisons hydrogènes entre les disaccharides et la matrice polymérique augmente, plus la capacité expérimentale augmente et pour atteindre un rapport capaexp/capath de 73 % environ.¹⁴⁷

IX.4 Récepteurs artificiels de sucres non basés sur des polymères imprimés

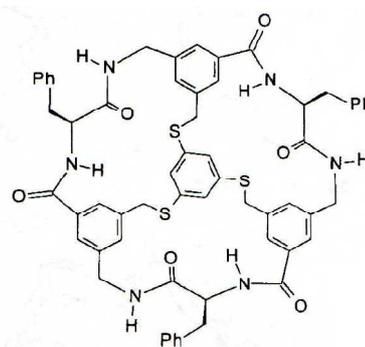
De nombreux récepteurs artificiels de sucres, non basés sur des matrices polymériques ont été synthétisés. Ce paragraphe n'a pas pour but de recenser tous les récepteurs artificiels.

Voici quelques exemples de structures qui ont été utilisées comme récepteurs synthétiques.¹⁴⁸ Les constantes d'association et les sélectivités sont déterminées à 25 °C (Tableau 12).



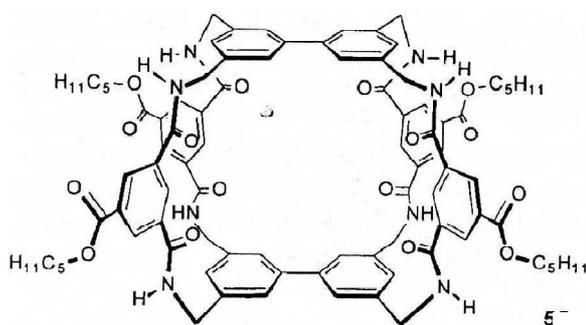
Cholaphanes

(Tableau 12, entrée 1)



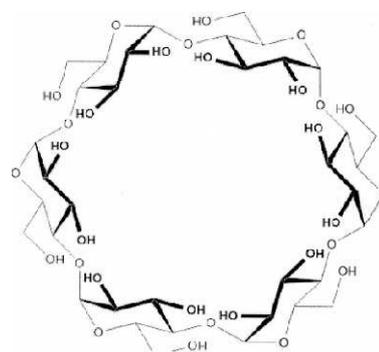
Récepteur macrotricyclique

(Tableau 12, entrée 2)



Structure basée sur des cages : 4

(Tableau 12, entrée 3)



Cyclodextrine : 5

(Tableau 12, entrée 5)

Entrée	Structures	Constante de dissociation du glucose (μM)	Sélectivité
1 ^a	les cholaphanes : structure à base de stéroïdes	0,71 et 1,42	Glucose : $\beta/\alpha=5,5$ D/L=3,0
2 ^a	Récepteur macrotricyclique	0,66	glu/gal=2,76 glu/man=7,69
3 ^a	Structures basées sur des cages	$3.33 \cdot 10^{-3}$	glu/gal=2,77
4 ^b	Structures phosphates	0,22	/
5 ^c	Cyclodextrines	27,8	glu/gal=2,40 glu/man=0,61 glu/xyl=1,00

^a déterminé dans le chloroforme ; ^b dans l'acétonitrile ; ^c dans l'eau

Tableau 12: Récepteurs artificiels de sucres (réf. 148)

Les constantes de dissociation sont élevées sauf dans le cas des structures phosphates où la valeur obtenue est de l'ordre de $3.33 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$.

Les cholaphanes donnent des bons facteurs de sélectivité β/α et D/L qui sont supérieurs à ceux obtenus par Mosbach (cf. IX.2) et Wulff (cf. IX.1).

Les facteurs de sélectivité glucose/galactose sont de l'ordre de 2. Aucune discrimination entre le glucose et le xylose n'est faite avec les cyclodextrines. Par contre, une bonne sélectivité glucose/mannose est observée pour les récepteurs macrotricycliques.

IX.5 Récepteurs naturels de sucres

De nombreuses classes de protéines jouent le rôle de récepteurs naturels de sucres : les enzymes, les anticorps, les lectines et les bactéries.¹⁴⁹

Les constantes de dissociation des lectines pour les monosaccharides sont élevées, d'un point de vue biologique, de l'ordre de 0,1 à 1 μM , alors que pour les bactéries, elles sont beaucoup plus faibles de l'ordre de 10^{-3} - 10^{-4} μM .

Les interactions entre les récepteurs naturels de types lectines ou bactéries, et les sucres font intervenir de type liaisons hydrogènes en complément d'interactions purement hydrophobes. Les complexes anticorps-sucres sont basés sur des liaisons hydrogènes avec les groupements amides. Ce sont des interactions multivalentes.

Parmi tous ces récepteurs naturels, ce sont les lectines qui sont généralement les plus étudiées.¹⁴⁵ La sélectivité de ces récepteurs dépend de :

- l'orientation des fonctions alcools. Par exemple une très bonne sélectivité mannose/galactose est obtenue pour des ligands du mannose
- l'exclusion stérique

De manière générale, les lectines sont incapables de distinguer si les sucres sont liés par une simple unité glycosidique ou par un oligosaccharide.

Les constantes d'association peuvent varier du millimolaire, pour une interaction monovalente au nanomolaire pour une interaction trivalente.

IX.6 Récapitulatif des constantes de dissociation

Dans le **Tableau 13**, sont réunis les ordres de grandeur des différentes constantes de dissociation, pour des polymères imprimés, des récepteurs artificiels et naturels de sucres.

Polymère imprimé	Récepteurs artificiels	Récepteurs naturel	
		Bactéries	Lectines
~10 mM	1 à 10 ⁻³ μM	10 ⁻³ -10 ⁻⁴ μM	0,1 à 1 μM

Tableau 13: Comparaison des constantes de dissociations des polymères imprimés, de récepteurs artificiels et de récepteurs naturel (réf. 145, 148, 149)

Les récepteurs naturels ont des constantes de dissociation plus faibles que la plupart des récepteurs artificiels synthétisés à ce jour. Seuls les récepteurs artificiels basés sur des structures de types cages ont de constantes de dissociation du même ordre de grandeur que les lectines.

X. Sujet de thèse

Objectif :

Le but de mes travaux de thèse est de synthétiser de nouveaux récepteurs artificiels de mono- et disaccharides en utilisant une nouvelle méthode de polymérisation en mini-émulsion, en une étape, par l'approche semi-covalente en surface.

Des mono- et disaccharides ont donc été rendus polymérisables et une chaîne hydrophile a été introduite en position anomérique afin de positionner les templates à la surface des particules de polymère.

Descriptif de la technique de polymérisation:

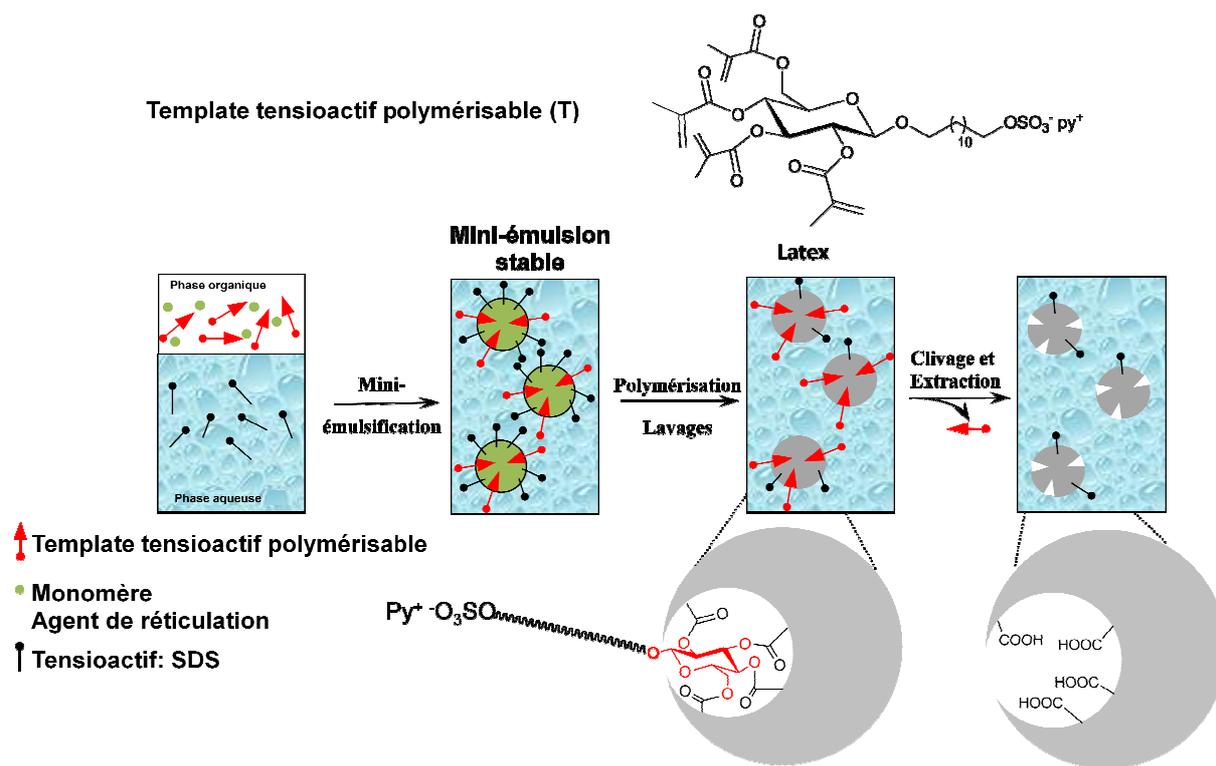


Figure 47 : Schéma général de la technique de polymérisation envisagée

La technique de polymérisation par mini-émulsion en une étape consiste à créer une émulsion « huile dans eau » en présence du template (en rouge, **Figure 47**), d'un monomère,

d'un agent de réticulation (en vert, **Figure 47**) et d'un initiateur d'une part et d'une solution de tensioactif d'autre part (en noir, **Figure 47**). Après mini-émulsification, les fines gouttelettes obtenues, polymérisent, après initiation thermique, comme des nanoréacteurs. Un latex blanc (particules de polymères en suspension) est récupéré en fin de polymérisation, contenant des particules stabilisées à la surface par le template tensioactif d'une part et le SDS d'autre part. Le clivage est effectué dans des conditions basiques afin de libérer des sites à la surface des particules de polymère. Des particules homogènes en taille, entre 50 et 200 nm, sont obtenues, avec une surface spécifique élevée et une meilleure accessibilité des sites.

L'approche semi-covalente a été choisie afin de combiner la stabilité du template polymérisable en milieux aqueux et une cinétique rapide de binding non covalent. L'extraction du template, qui reste la principale limitation de cette technique d'impression, pourrait être améliorée par l'utilisation de la polymérisation en mini-émulsion.

Applications :

Cette technique de polymérisation a donc été utilisée pour la préparation de polymères imprimés de différents mono- et disaccharides, utilisé comme système modèle. De telles particules imprimées mimeraient la multivalence rencontrée dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire et pourraient, par exemple, présenter un intérêt pour le diagnostique. La synthèse de templates polymérisables a donc du être envisagée. Les templates comportent une partie hydrophobe polymérisable avec des esters méthacryliques (triangle rouge, **Figure 47**) et une tête polaire hydrophile permettant au template de se positionner la surface des particules.

Hypothèses avancées sur les avantages de cette nouvelle technique de polymérisation:

La technique de polymérisation en mini-émulsion permettrait de préparer des particules nanométriques, homogènes en taille sans les étapes de broyage et tamisage, qui entraînent la perte d'une grande quantité de polymère.

L'impression en surface devrait permettre une meilleure accessibilité des sites. L'extraction du template, lié par plusieurs fonctions esters dans la matrice polymérique,

devrait donc être effectuée dans des conditions basiques afin de libérer les sites en surface et les acides carboxyliques.

Le nombre de points d'ancrages, dans les sites de reconnaissance, est élevé (quatre pour les monosaccharides et sept pour les disaccharides) ce qui devrait permettre d'augmenter la sélectivité des polymères imprimés.

Avant de tester cette nouvelle technique de polymérisation, nous avons, dans un premier temps, développé une nouvelle méthodologie pour la synthèse de templates polymérisables tensioactifs de mono- et disaccharides (Chapitre 2).

Le chapitre 3 rapporte la préparation et l'optimisation de polymères imprimés à base de glucose, leur application éventuelle comme groupement protecteur permanent et la préparation de polymères imprimés à base de dérivés de mannose et de xylose

Dans le chapitre 4, nous poursuivrons avec la synthèse de polymères imprimés des dérivés de disaccharides à base de maltose et de cellobiose.

Remarque :

La présence de quatre ou sept acides carboxyliques dans les cavités peut entraîner une contraction importante des polymères comme signalé en introduction. Afin d'éviter ces phénomènes de compression, l'introduction d'un espaceur dit « sacrifié » a été proposée par Whitcombe.

Afin de ne pas compliquer la synthèse des templates, nous avons, cependant choisi de ne pas introduire d'espaceurs pour éviter ces phénomènes de contractions.

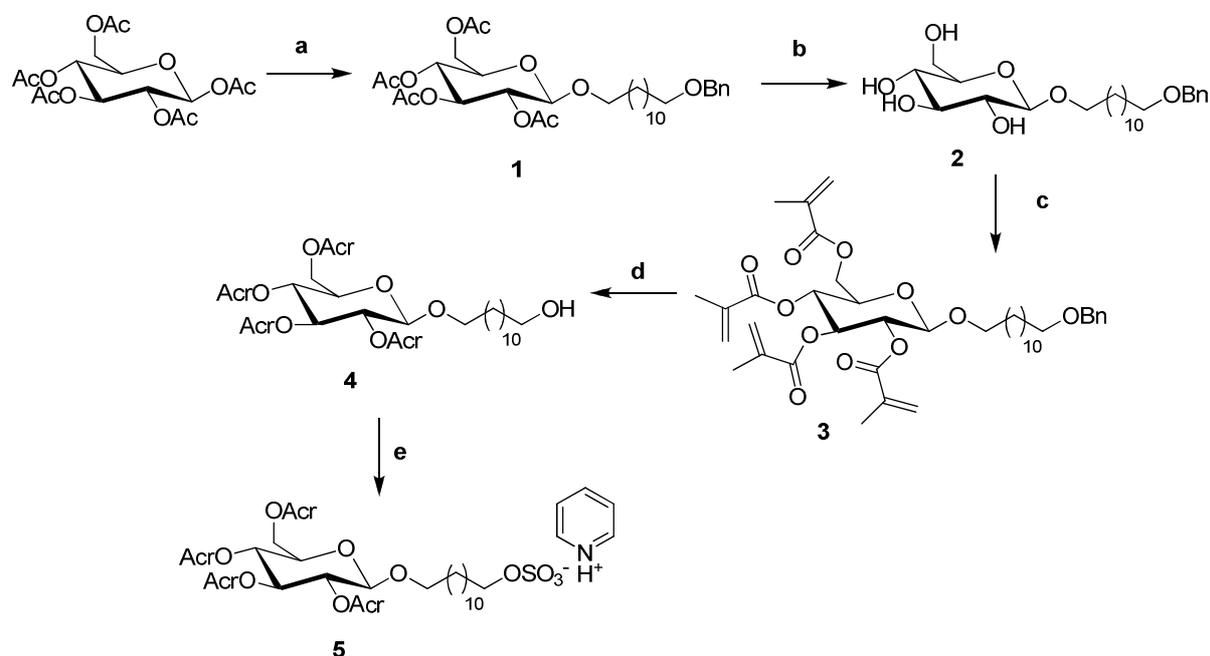
Chapitre 2 : Synthèse des templates et des molécules nécessaires au binding

Ce chapitre traite de la synthèse des différents templates, ainsi que de la synthèse de mono- et disaccharides nécessaires pour les études de binding avec les polymères imprimés.

I. Synthèse des templates des mono et disaccharides

I.1 Première synthèse développée au laboratoire

Au laboratoire, une synthèse du template **5** du glucose avait déjà été mise au point par Pasquale Curcio (Schéma 1).



a) $\text{HO}(\text{CH}_2)_{12}\text{OBn}$ (3 éq), $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (3,3 éq), CH_2Cl_2 , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{TA}$, 48 %; b) MeOH , NaOMe (0,4 éq), CH_2Cl_2 , TA , 94 %; c) anhydride méthacrylique (10 éq), Et_3N (10 éq), DMAP (0,1 éq), CH_2Cl_2 , 33 %; d) DDQ (5 éq), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (10:1), 90 %; e) $\text{Py} \cdot \text{SO}_3$ (2 éq), CHCl_3 , reflux, 76 %.

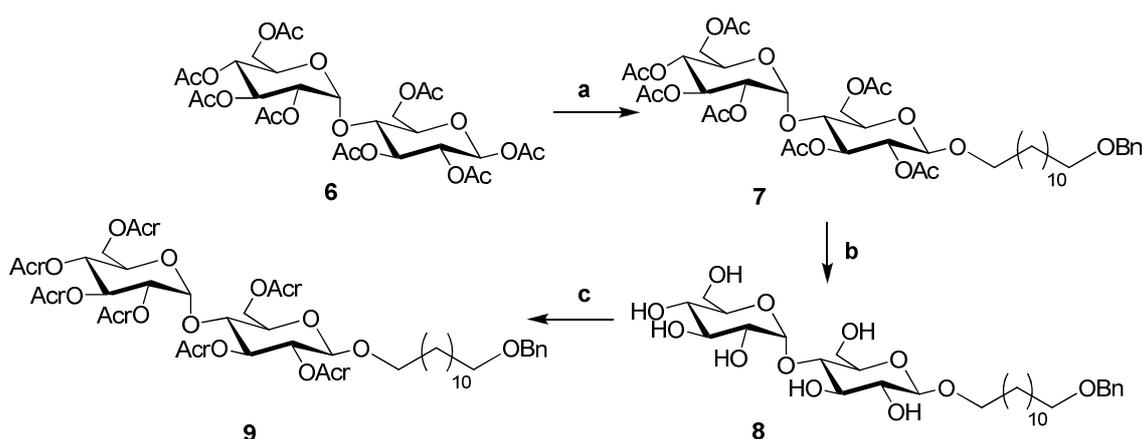
Schéma 1: Première voie de synthèse du template du glucose

Le rendement global de cette synthèse en cinq étapes est de 12 %. Une première étape de glycosylation avec $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, suivie d'une déprotection avec NaOMe/MeOH dans les conditions de Zemplén,¹⁵⁰ donne le composé **2**, avec un rendement global sur deux étapes de 46 %. L'obtention du composé **3** par perméthacrylation des quatre fonctions alcools est l'étape limitante. Quelque soit les conditions testées, le rendement n'excède pas 33 %.

Pour la déprotection de la fonction benzyle, la présence de fonctions alcènes ne permet pas l'utilisation de la méthode classique d'hydrogénation catalysée par du palladium. L'emploi de DDQ dans un mélange dichlorométhane/eau a permis d'obtenir le produit désiré avec un très bon rendement sans réaction secondaire au niveau des fonctions méthacrylates.

La fonction alcool est transformée en sel de pyridinium avec de bon rendement par réaction à reflux dans le dichlorométhane.¹⁸ Notons à nouveau la compatibilité chimique du composé perméthacrylé **4** dans les conditions de formation de la molécule **5**.

Cette même synthèse a été appliquée à un disaccharide, le maltose (**Schéma 2**). L'étape de perméthacrylation donne des rendements encore plus faibles que ceux obtenus pour le glucose, de l'ordre de 15 %. Il s'avérait donc nécessaire de chercher une autre voie de synthèse plus performante pour l'obtention des templates de disaccharides.



a) HO(CH₂)₁₂OBn (3 éq), BF₃.Et₂O (3,3 éq), CH₂Cl₂, 0 °C → TA, 38 %; b) MeOH, NaOMe (0,4 éq), TA, 95 %; c) anhydride méthacrylique (10 éq), Et₃N (10 éq), DMAP (0,1 éq), CH₂Cl₂, 15 %.

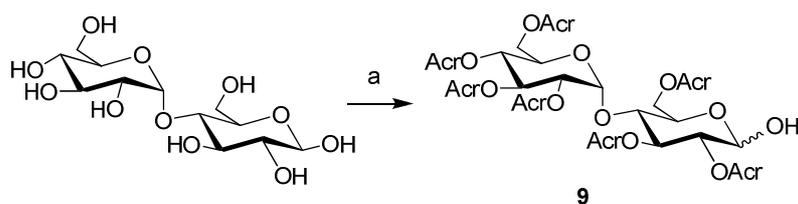
Schéma 2: Première voie de synthèse pour le template du maltose

1.2 Etude et optimisation de la réaction de perméthacrylation

1.2.1 Introduction

Le point faible de la synthèse du template **5** réside dans la position de la réaction de perméthacrylation du composé **2** dans la séquence réactionnelle (**Schéma 1**). L'introduction de la réaction de perméthacrylation en début de synthèse nous permettrait de travailler sur des

produits de départ commerciaux peu coûteux. La perméthacrylation est une réaction peu décrite dans la littérature.¹⁵¹ Seule une publication a été rapportée à ce jour, employant la pyridine comme solvant et base pour la perméthacrylation du glucose et du maltose. La première tentative de perméthacrylation du maltose utilisant ces conditions a conduit à la perméthacrylation du maltose, avec une fonction hydroxyle en position anomérique (composé **9**, Schéma 3).



a) anhydride méthacrylique (1 éq), pyridine (2 éq), 65 °C, 3 h, 35 %

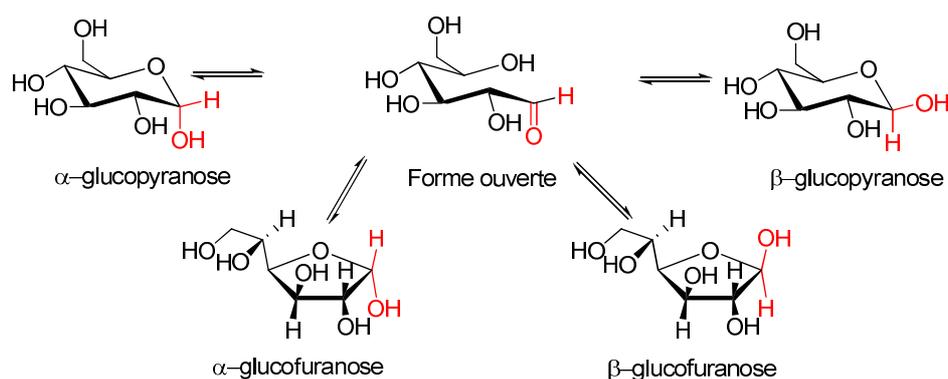
Schéma 3: Réaction de perméthacrylation dans les conditions décrites dans la littérature

Suite à ce résultat peu satisfaisant, nous avons décidé d'investiguer la synthèse et d'étudier la réactivité des sucres perméthacrylés en la comparant à celles des sucres peracétylés.

I.2.2 Généralités sur les sucres

I.2.2.a Mutarotation des sucres

La mutarotation des sucres est une propriété intrinsèque aux hydrates de carbone qui permet un équilibre entre les formes α et β pyranoses et furanoses en solution, dans des solvants amphotères ou dans un mélange acide-basique¹⁵² (**Figure 48**).


Figure 48: Mutarotation du glucose

La mutarotation dépend de la coplanarité pour les hexoses (monosaccharides à 6 carbones) et de l'effet anomérique pour les pentoses (monosaccharides à 5 carbones), et plus généralement de la température, de la force ionique, du pH et de la nature du solvant (Tableau 14).

Sucres	Forme majoritaire dans l'eau
Glucose	β pyranose (65 %)
Galactose	β pyranose (66 %)
Mannose	α pyranose (67 %)
Xylose	β pyranose (63 %)
Ribose	β pyranose (58 %)

Tableau 14: Forme majoritaire de différents monosaccharides, dans l'eau à 20 °C

De nombreuses études ont été menées sur les paramètres influençant cet équilibre de mutarotation mais de nombreuses zones d'ombre persistent.^{153, 154}

Un comportement très différent a été constaté entre les hexoses et les pentoses. Ainsi le rapport β/α est indépendant de la température et varie très peu en fonction de la

concentration dans l'eau. Par contre, pour le ribose, les rapports β/α pyranoses et pyranose/furanose diminuent quand la température augmente tandis que le rapport pyranose/furanose augmente avec la concentration dans l'eau ou dans le DMSO à 25 °C.¹⁵⁵

La mutarotation du α -D-glucose en β -D-glucose, dans un mélange eau/éthanol est, par exemple, accélérée par l'effet des micro-ondes.¹⁵⁶

I.2.2.b Effets stériques et anomériques

La conformation la plus stable d'un cyclohexane monosubstitué est la conformation chaise où le substituant X est en position équatoriale afin d'empêcher des interactions 1,3-diaxiales^{157,158} (**Figure 49**).

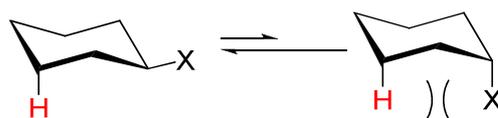


Figure 49 : Interactions 1-3 diaxiales

Lorsqu'un élément électronégatif est adjacent au substituant X, des répulsions électrostatiques et des recouvrements orbitaux interviennent.

En effet, la présence de deux moments dipolaires, créés par la présence de l'oxygène d'une part et de l'élément X d'autre part, entraîne une stabilisation du conformère axial malgré les interactions 1-3 diaxiales: c'est l'effet anomérique (**Figure 50**).

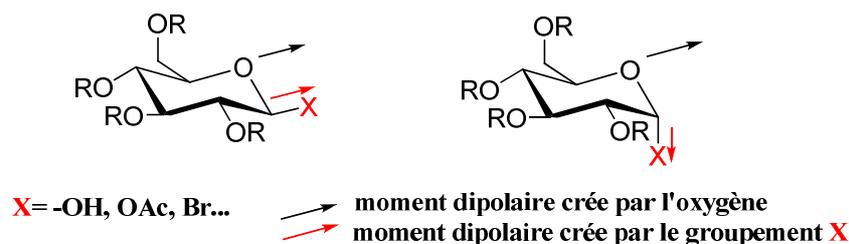


Figure 50: Effet anomérique

D'autre part, d'un point de vue orbitalaire, l'orbitale du doublet non liant de l'oxygène peut transférer ses électrons dans l'orbitale anti-liante de la liaison C-O. Ceci n'est possible que lorsque les deux orbitales sont antipériplanaire, ce qui est le cas dans le conformère α . Ceci entraîne donc une stabilisation supplémentaire par transfert d'électron de l'anomère α (Figure 51).

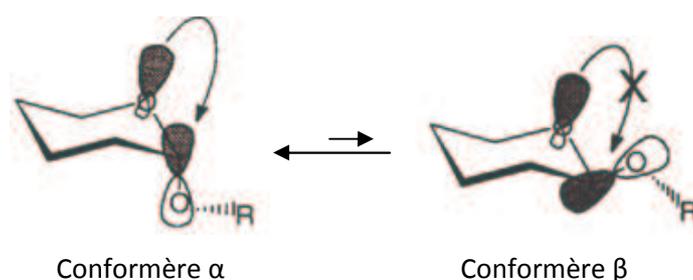


Figure 51 : Recouvrement orbitalaire qui stabilise le conformère α

L'ensemble de ces effets entraîne une stabilisation du conformère α au détriment du conformère β .

I.2.2.c Conséquences de l'effet anomérique

Les conséquences de l'effet anomérique se traduisent en termes de réactivité. Quel que soit le substituant électro-négatif en position anomérique (-OH, -OAc), le conformère β , moins stable, réagit plus rapidement que le conformère α , plus stable lors d'une réaction impliquant le carbone anomérique.

I.2.2.d Conséquences sur la peracétylation des sucres

Dans le cas particulier de la réaction de peracétylation du glucose par exemple, à température ambiante, c'est donc le conformère β qui réagit plus rapidement pour donner le sucre peracétylé β correspondant. Ce sucre peracétylé β devrait donc être formé majoritairement lors de la réaction de peracétylation.

D'après le paragraphe I.2.2.a, la température et l'effet des micro-ondes, à concentration fixe dans un même solvant, influent sur l'équilibre de mutarotation en milieu

aqueux. C'est probablement également le cas en milieu organique. Ces deux paramètres peuvent donc également influencer le rapport β/α lors de la peracétylation.

De plus, la présence d'une base lors de la réaction de peracétylation peut provoquer une épimérisation de la position anomérique, par le phénomène de mutarotation simple donc une évolution du rapport β/α pyranose. La formation de cycle à cinq carbones peut également être observée (produit cinétique).

Résumé des facteurs influençant le rapport β/α lors de la réaction de peracétylation :

Les différents facteurs influençant le rapport β/α lors de la peracétylation de sucres, à concentration fixe dans un même solvant, sont donc :

- la température
- la force de la base utilisée
- l'effet des micro-ondes

En tenant compte de tous ces paramètres, l'étude de la perméthacrylation de sucres pouvait débuter.

1.2.3 Etude de la perméthacrylation de sucres

La synthèse de composés perméthacrylés est délicate due à la présence de plusieurs fonctions polymérisables sur la même molécule. Donc, nous avons décidé de tester des conditions douces pour les premiers essais de perméthacrylation. Une étude de la bibliographie sur la peracétylation de sucres a permis de constater que le système triéthylamine/DMAP¹⁵⁹ ou l'acétate de sodium¹⁶⁰ était couramment utilisé. L'agent d'acétylation généralement employé est l'anhydride acétique.

Pour les premiers essais, nous avons choisi le glucose comme modèle.

Le but de nos travaux est d'obtenir le glucose perméthacrylé sous la forme β pyranose afin de pouvoir envisager une glycosylation directe pour la suite de la synthèse des templates.

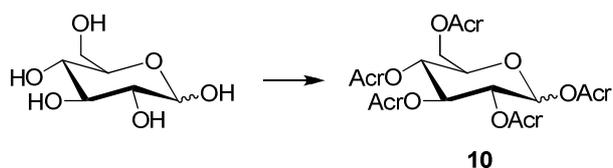
I.2.3.a Premiers essais avec le glucose

Quatre conditions différentes ont été retenues pour les premiers essais de perméthacrylation du glucose. L'agent de perméthacrylation utilisé, dans chaque cas, est l'anhydride méthacrylique.

Dans la première méthode, la réaction a lieu à température ambiante, pendant 12 heures, en présence du mélange triéthylamine/DMAP dans la dichlorométhane. La réaction est suivie par CCM. Après disparition totale du substrat, un work up classique avec deux lavages à l'eau est effectué, suivi d'un séchage sur Na₂SO₄. Après évaporation du solvant, le brut de réaction est purifié par chromatographie sur gel silice. Les rendements indiqués sont obtenus après purification. Le rapport β/α est déterminé par intégration des protons du glucose perméthacrylé, à 5,87 ppm pour l'anomère β et à 6,46 ppm pour l'anomère α (**Tableau 15**).

Dans la méthode 2, la température de réaction est fixée à -10 °C, dans le dichlorométhane, en gardant les mêmes réactifs que précédemment. Le traitement et la purification sont identiques à la méthode 1.

Dans les méthodes 3 et 4, la réaction de perméthacrylation est testée sans solvant, uniquement en présence d'anhydride méthacrylique et d'acétate de sodium. Pour la méthode 3, la température a été fixée à 110 °C tandis que pour la méthode 4, l'effet des micro-ondes a été testé (5 minutes, 140 °C pour les monosaccharides et 180 °C pour les disaccharides). Aucun work up n'est nécessaire, le brut de réaction étant purifié par chromatographie sur gel de silice.



Produit	Méthode 1			Méthode 2			Méthode 3			Méthode 4		
	Rdt (%)	Pyr/Fur	Pyr β/α									
<p style="text-align: center;">10</p>	59	1/0	1/1	40	1/0	1/4	40	1/0	4/1	41	1/0	5/1

Tableau 15: Premiers essais de perméthacrylation du glucose

D'après les résultats expérimentaux, reportés dans le **Tableau 15**, les rendements de perméthacrylation sont compris entre 40 et 59 %. Aucune trace des formes furanoses n'a été détectée, quelle que soit la méthode utilisée.

Plus la température augmente, plus l'anomère β est majoritaire (méthodes 3 et 4). L'effet des micro-ondes a permis d'améliorer le rapport β/α à 5/1 (méthode 4).

Le glucose perméthacrylé **10**, a donc été synthétisé, avec un rendement satisfaisant de 41 %, avec 80 % d'anomère β en utilisant la méthode 4.

Encouragés par ce résultat, nous avons poursuivi notre étude de la réaction de perméthacrylation avec d'autres mono- et disaccharides.

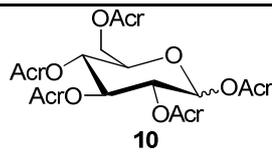
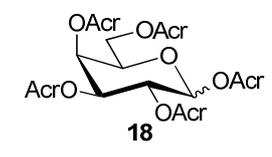
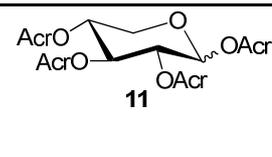
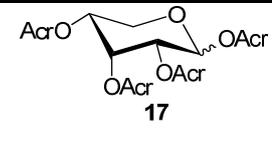
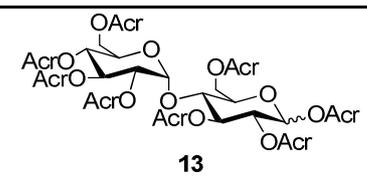
I.2.3.b Perméthacrylation de sucres

Comme précédemment, le but est d'obtenir les sucres perméthacrylés sous la forme β pyranose majoritaire ou exclusive afin de permettre une glycosylation directe pour la suite de la synthèse de templates.

La réaction de perméthacrylation du xylose, du mannose, du ribose, du galactose, du maltose, du lactose, du cellobiose et du saccharose, a donc été testée dans un premier temps avec la méthode 1 (**Tableau 18**).

Il a été constaté que, lorsque la perméthacrylation fonctionne, le milieu réactionnel, initialement hétérogène, devient homogène après 12 heures de réaction ou moins, ce qui signifie que la conversion du réactif de départ est totale.

Les rapports Pyr/Fur et β/α sont déterminés par la RMN du ^1H ; les déplacements chimiques des protons anomériques sont donnés dans le **Tableau 16**. Pour certains composés (les dérivés de xylose, ribose et lactose) des corrélations protons-carbones, du type HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) ont été nécessaires pour identifier les protons anomériques.

Entrée	Produit	Déplacements chimiques du proton anomérique en ppm (300MHz, RMN du ^1H)			
		Pyr β	Pyr α	Fur β	Fur α
1	 10	5,87	6,46	-	-
2	 18	5,89	6,50	-	6,52
3	 11	-	6,30	-	-
4	 17	6,17	6,28	-	-
5	 13	5,76	6,33	-	-

Entrée	Produit	Déplacements chimiques du proton anomérique en ppm (300MHz, RMN du ^1H)			
		Pyr β	Pyr α	Fur β	Fur α
6	 15	5,77	-	-	-
7	 14	5,70	6,30	-	-

Tableau 16 : Déplacements des protons anomériques

Dans le cas du xylose, du ribose, du lactose et du saccharose, la détection des formes furanose s'effectue sur la RMN du ^{13}C , ce qui donne une indication sur les rapports pyranose/furanose et β/α pyranoses sans toutefois permettre de calculer un rapport précis des deux anomères ou des deux formes (Tableau 17).

Entrée	Produit	Déplacements chimiques du carbone anomérique en ppm (300MHz, RMN du ^{13}C)			
		Pyr β	Pyr α	Fur β	Fur α
1	 11	92,3	89,4	98,6	-
2	 12	-	91,1	-	-
3	 17	91,5	88,7	98,7	-

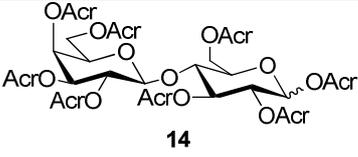
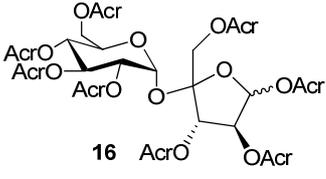
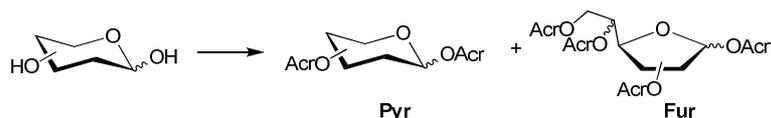
Entrée	Produit	Déplacements chimiques du carbone anomérique en ppm (300MHz, RMN du ^{13}C)			
		Pyr β	Pyr α	Fur β	Fur α
4	 14	92,2	89,6	102,0	104,5
5	 16	-	-	-	104,2

Tableau 17: Déplacement des carbones anomériques

Les résultats des réactions de perméthacrylation avec les différentes méthodes 1, 2, 3 et 4 sont regroupés dans le **Tableau 18**. Les rendements donnés dans le **Tableau 18**, sont calculés après purification par colonne de chromatographie sur gel de silice. Les anomères α et β des formes pyranoses et furanoses ne sont pas séparables sur colonne de silice.



Entrée	Produit	Méthode 1			Méthode 2			Méthode 3			Méthode 4		
		Rdt (%)	Pyr/Fur	Pyr β/α	Rdt (%)	Pyr/Fur	Pyr β/α	Rdt (%)	Pyr/Fur	Pyr β/α	Rdt (%)	Pyr/Fur	Pyr β/α
1		59	1/0	1/1	40	1/0	1/4	40	1/0	4/1	41	1/0	5/1
2		-	1/0	α maj	71	1/0	0/1	non testé			-	Fur maj	-
3		23	1/0	0/1	non testé			non testé			non testé		
4		42	1/0	5/1	non testé			non testé			non testé		
5		36	1/0	3/1	non testé			60	0/1	-	non testé		
6		traces			non testé			non testé			32	1/0	1/0
7		pas de réaction			non testé			5	0/1	0/1	35	0/1	0/1
8		-	Fur maj	-	43	1/0	5/1	non testé			non testé		
9		69	66/34	7/4	25	66/34	1/1	28	66/34	1/1	15	95/5	5/1

Tableau 18 : Etude de la réaction de perméthacrylation

Pour le **xylose** (**Tableau 18**, entrée 2), le milieu réactionnel devient homogène après 3 heures de réaction à température ambiante (méthode 1). Le milieu réactionnel n'a pas été purifié. Aucune trace des formes furanoses n'a été détectée par la RMN du ^{13}C du brut réactionnel et le pyranose α est majoritaire.

Comme attendu, étant donné les résultats obtenus pour la perméthacrylation du glucose, la perméthacrylation du xylose avec la méthode 2, à $-10\text{ }^\circ\text{C}$, donne l'anomère α exclusivement avec un rendement de 71 %.

Etant donné que c'est l'anomère β qui est recherché dans notre étude, nous avons procédé à la perméthacrylation du xylose avec la méthode 4. Malheureusement, le spectre RMN du ^{13}C du brut réactionnel montre un mélange pyranose/furanose.

Par conséquent, seules les méthodes 1 et 2 peuvent être utilisées pour perméthacryler le xylose sous les formes pyranoses, mais dans les deux cas, c'est l'anomère α qui est a été obtenu majoritairement. Il est intéressant de noter que la méthode 2 permet d'obtenir l'anomère α exclusivement.

Pour le **mannose** (**Tableau 18**, entrée 3), le milieu réactionnel est homogène après 12 heures de réaction. Le mannose perméthacrylé **12** a pu être obtenu avec 23 % de rendement. Aucune trace de furanose n'a été détectée et le produit **12** est uniquement sous la forme du pyranose α . Le pyranose α est largement favorisé par rapport au pyranose β du fait de l'effet anomérique d'une part, et de l'antipériplanarité par rapport au carbone C2 d'autre part.

De plus, il est connu que la peracétylation du mannose est à $110\text{ }^\circ\text{C}$ (méthode 3) sans solvant donne un mélange pyranose/furanose.¹⁶⁰ Nous n'avons donc pas trouvé nécessaire de tester les méthodes 3 et 4 pour la perméthacrylation du mannose.

En ce qui concerne les disaccharides, le **maltose** perméthacrylé **13** (**Tableau 18**, entrée 4) a été obtenu, avec un rendement de 42 %, sous la forme β pyranose uniquement en utilisant la méthode 1. Etant donné que la formation exclusive de le forme β pyranose désirée, nous n'avons pas testé les méthodes 2, 3 et 4.

Pour le **lactose** (**Tableau 18**, entrée 5), le milieu réactionnel est toujours hétérogène après 12 heures de réaction à température ambiante (méthode 1) ; la perméthacrylation n'est pas totale. Le lactose perméthacrylé **14** a été récupéré avec un rendement de 36 %, avec un rapport β/α de 3/1. Aucune trace des formes furanoses n'a été détectée et la forme α pyranose a été récupérée majoritairement.

Afin d'améliorer le rapport β/α , nous avons procédé à la perméthacrylation du lactose avec la méthode 3. Malheureusement, l'augmentation de la température n'a pas permis d'améliorer le rapport β/α pyranose et la formation des formes α et β furanoses exclusivement a été observée avec la méthode 3.

A nouveau, comme dans le cas du xylose (**Tableau 18**, entrée 2), le lactose ne peut être perméthacrylé qu'avec la méthode 1, pour donner la forme α pyranose majoritaire. Etant donné que cette réaction n'est déjà pas totale à température ambiante, nous n'avons pas cherché à diminuer la température de réaction. La méthode 2 n'a donc pas été testée.

Pour le **cellobiose** (**Tableau 18**, entrée 6), seules des traces du composé perméthacrylé ont été détectées par CCM avec la méthode 1. Plusieurs solvants ont été testés, dichlorométhane, tétrahydrofurane, acétonitrile, mais aucun changement n'a été constaté. Le même résultat a été observé pour le **saccharose** (**Tableau 18**, entrée 7) qui est totalement non réactif à température ambiante (méthode 1).

Afin d'améliorer la réactivité, la perméthacrylation du cellobiose et du saccharose a donc été réalisée avec la méthode 3. Pour le saccharose perméthacrylé **16**, aucune trace de produit n'est détectée par CCM au bout de 30 minutes de réaction. Après 48 heures, le milieu réactionnel est homogène mais très visqueux et seul 5 % de saccharose perméthacrylé **16** a pu être récupéré.

Par conséquent, la perméthacrylation du saccharose et du cellobiose a donc été testée avec la méthode 4. Le cellobiose perméthacrylé **15** et le saccharose perméthacrylé **16** ont pu être synthétisés avec respectivement 32 et 35 % de rendement (**Tableau 18**, entrées 6 et 7). Le cellobiose perméthacrylé a été obtenu, sans aucune trace de furanose, sous la forme β pyranose uniquement tandis que le saccharose perméthacrylé est récupéré sous la forme α furonase uniquement.

La réactivité du cellobiose et du saccharose a donc pu être améliorée grâce à l'emploi de micro-ondes (méthode 4).

Pour le **ribose** (**Tableau 18**, entrée 8) et le **galactose** (**Tableau 18**, entrée 9), la conversion s'est avérée totale après 12 et 1 heures de réaction respectivement. Dans le cas du ribose, le spectre RMN du ^{13}C a montré la présence d'un mélange pyranose/furanose, et dans le cas du galactose, un mélange pyranose/furanose de 66/34 a été évalué par RMN du ^1H .

Afin d'éviter la formation des formes furanoses, la température de réaction a été diminuée à $-10\text{ }^\circ\text{C}$ (méthode 2). Il est en effet connu que l'équilibre de mutarotation peut être bloqué en diminuant la température.¹⁵⁵ De manière intéressante, le ribose perméthacrylé **17** a pu être obtenu avec 43 % de rendement, sans aucune trace de furanose, sous la forme β pyranose majoritaire (**Tableau 18**, entrée 8). Par contre, le spectre RMN du ^1H du galactose perméthacrylé a montré un mélange persistant pyranose/furanose de 66/34 (**Tableau 18**, entrée 9).

Afin de diminuer le temps de réaction et donc d'éviter que l'équilibre de mutarotation soit atteint, la perméthacrylation du galactose a été testée avec la méthode 3. Un mélange pyranose/furanose de 66/34 a encore une fois été obtenu. La dernière solution envisagée a été de tester l'effet des micro-ondes avec la méthode 4. Une fois encore, un mélange pyranose/furanose a été formé. Cependant le rapport pyranose/furanose est de 95/5, donc nettement amélioré par l'effet des micro-ondes.

En résumé, chaque sucre requière une procédure particulière pour la réaction de perméthacrylation.

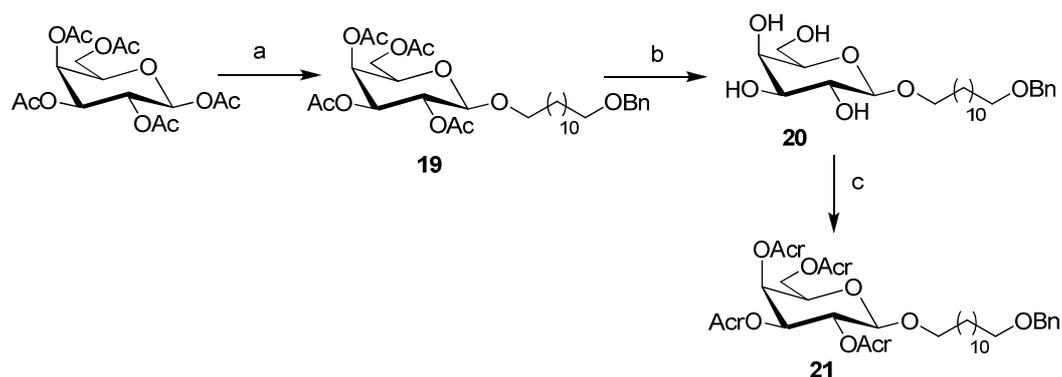
La méthode 1 a permis de perméthacryler le xylose, le mannose, le lactose avec succès ; c'est l'anomère α est obtenu majoritairement. Seul le maltose a pu être récupéré sous la forme β pyranose majoritaire avec la méthode 1.

Le manque de réactivité du cellobiose et du saccharose à température ambiante a pu être résolu en utilisant les micro-ondes (méthode 4). Le cellobiose perméthacrylé a été obtenu sous la forme β pyranose uniquement et le saccharose perméthacrylé sous la forme α furanose exclusivement.

La diminution de température (méthode 2) a permis de récupérer le ribose perméthacrylé **17** sous la forme majoritaire β pyranose.

Par contre, dans le cas particulier du galactose, aucune des quatre méthodes n'a permis d'éviter la formation des formes furanoses.

En analysant les résultats obtenus précédemment pour le lactose, composé d'une unité galactose et d'une unité glucose, nous avons remarqué que le lactose perméthacrylé **14** avait pu être synthétisé grâce à la méthode 1, sans observer la formation des formes furanoses à température ambiante. Par conséquent, la réaction de perméthacrylation avec la méthode 1 a été tentée sur le dérivé du galactose **20** (Schéma 4). Le composé **21** a pu être synthétisé avec 35 % de rendement sous la forme β pyranose uniquement sans aucune trace de formes furanoses.



a) $\text{HO}(\text{CH}_2)_{12}\text{OBn}$ (3 éq), $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (3,3 éq), CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{TA}$, 46 %; b) MeOH , NaOMe (0,4 éq), TA , 77 %; c) Anhydride méthacrylique (10 éq), Et_3N (10 éq), DMAP (0,1 éq), CH_2Cl_2 , 35 %;

Schéma 4: Synthèse du dérivé du galactose 21

En conclusion, en bloquant la position anomérique du galactose, la perméthacrylation a pu être réalisée avec la méthode 1, sans la formation des formes furanoses et de l'anomère α .

Nous avons donc résolu tous les problèmes de réactivité et d'épimérisations rencontrés lors de la réaction de perméthacrylation. En jouant sur la température, sur l'effet des micro-

ondes ou en bloquant la position anomérique, chaque sucre a pu être perméthacrylé avec des rendements compris entre 23 et 70 %.

Certains sucres ont pu être obtenus sous la forme majoritaire β pyranose (les dérivés perméthacrylés du glucose, maltose, ribose et cellobiose), ce qui va permettre de tester la glycosylation directe.

Dans le cas des dérivés perméthacrylés du mannose, xylose et du lactose, le conformère α pyranose a été récupéré majoritairement, ce qui va nécessiter une activation préalable de la position anomérique.

1.3 Etude de la réactivité des sucres perméthacrylés

Une fois les conditions de perméthacrylation mises au point, nous avons cherché à tester la réactivité de la position anomérique de ces nouveaux sucres perméthacrylés. Les réactions classiques en position anomérique, pour les sucres peracétylés, sont la glycosylation directe, l'halogénéation ou encore l'hydrolyse anomérique. Aucune de ces réactions n'est décrite à ce jour dans la littérature, sur des sucres perméthacrylés. Nous avons donc testé différentes conditions représentatives de la littérature, concernant les sucres peracétylés, pour activer et fonctionnaliser nos substrats perméthacrylés.

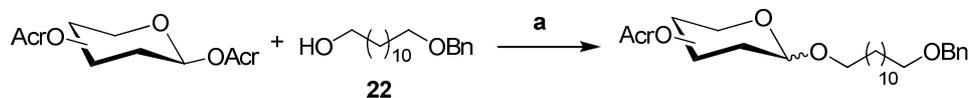
1.3.1 Glycosylation directe avec $BF_3 \cdot Et_2O$

La glycosylation directe est la méthode la plus simple pour introduire un groupement en position anomérique. Cette méthode n'est utilisée que sur les sucres β peracétylés.¹⁵⁶

Par conséquent, pour les composés perméthacrylés **10**, **13**, **15** et **17**, où l'anomère β est majoritaire, nous avons testé les conditions de glycosylation directe avec $BF_3 \cdot Et_2O$, dans le dichlorométhane à température ambiante pendant 12 heures.¹⁶¹ Dans le cadre de la synthèse des templates, le dodécane diol mono-protégé **22** a été introduit en position anomérique.

Les sucres perméthacrylés ont été dissous dans le dichlorométhane, puis l'alcool **22** a été ajouté. Le milieu réactionnel est refroidi à 0 °C puis $BF_3 \cdot Et_2O$ est additionné lentement. Après 12 heures d'agitation à température ambiante, un work up classique avec deux lavages à l'eau est effectué, suivi d'un séchage sur Na_2SO_4 . Après évaporation du solvant, le brut de

réaction est purifié par chromatographie sur gel de silice. Les rendements indiqués, dans le **Tableau 19** sont obtenus après purification.



a) alcool **22** (1,2 éq), $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (1,5 éq), DCM, 12 h

Entrée	Substrat	Produit	Rdt (%)	Rapport (β/α)
1	 10 $\beta/\alpha = 5/1$	 3	15	1/0
2	 13 $\beta/\alpha = 5/1$	 23	37	3/1
3	 15 $\beta/\alpha = 1/0$	 24	40	1/0
4	 17 $\beta/\alpha = 5/1$	 25	46	0/1

Tableau 19: Réaction de glycosylation avec $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$

Dans tous les cas, la réaction de glycosylation n'est pas totale, l'analyse par CCM après 12 heures de réaction, montre toujours la présence des substrats. Ceci est aussi vrai dans le cas de la glycosylation de sucres peracétylés.

Le dérivé **3** du glucose perméthacrylé a été récupéré avec de faibles rendements compris entre 9 et 15 % (**Tableau 19**, entrée 1). Des rendements corrects sont obtenus pour les dérivés perméthacrylés du maltose **23** (37 %), du cellobiose **24** (40 %) et du ribose **25** (46 %) (**Tableau 19**, entrées 2, 3 et 4).

Par comparaison, la glycosylation directe, en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, du glucose et du maltose peracétylé avec le diol monoprotégé **22**, dans les mêmes conditions, donne des rendements compris entre 35 et 40 % (**Schéma 2**).

Le sous-produit principal est consécutif à l'hydrolyse de la position anomérique mais n'a jamais été quantifié. Ceci a aussi été constaté pour la glycosylation directe du maltose peracétylé **6** (**Schéma 2**).

L'assistance anchimérique (**Figure 53**) du groupement méthacrylate permet d'obtenir l'isomère β majoritairement dans le cas du maltose (**Tableau 19**, entrée 2), voire exclusivement pour le glucose (**Tableau 19**, entrée 1) et le cellobiose (**Tableau 19**, entrée 3) comme dans le cas des sucres peracétylés. Seul le dérivé **25** du ribose a été obtenu sous la forme α pyranose.

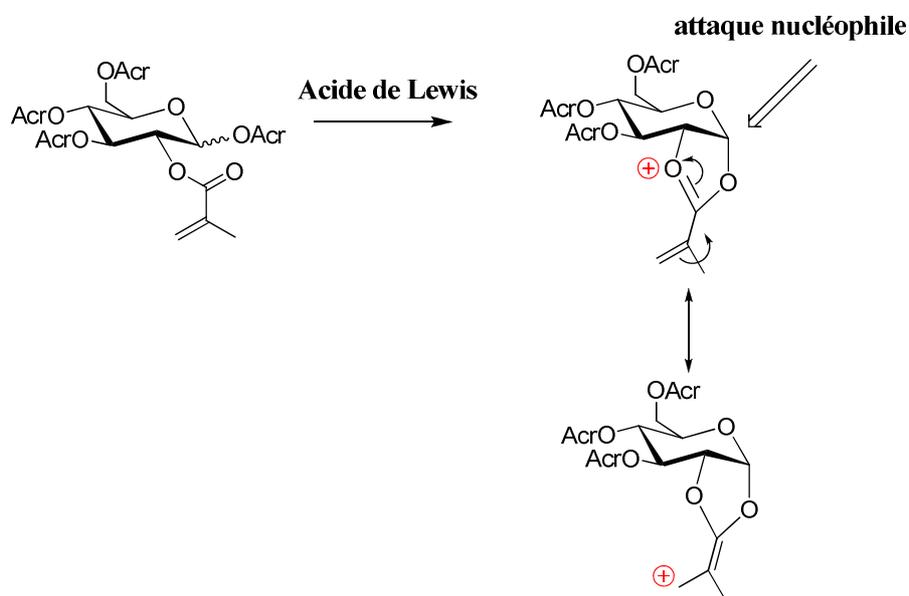


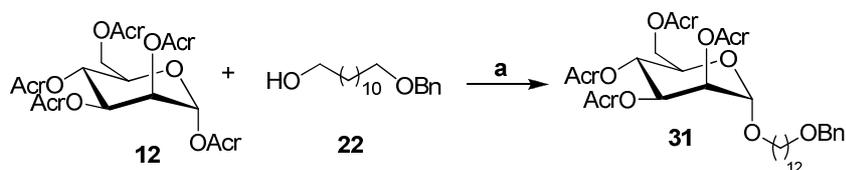
Figure 52: Assistance anchimérique du groupement méthacrylate

Le manque de réactivité du groupement méthacrylate pourrait s'expliquer par la présence de la double liaison carbone-carbone qui entraîne une délocalisation de

l'oxocarbénium. Cependant, le gain d'énergie est probablement faible étant donné la formation du carbocation primaire.

1.3.2 Glycosylation directe du mannose perméthacrylé α

Dans le cas du mannose perméthacrylé **12**, obtenu sous forme α uniquement, différentes conditions de glycosylation directe ont été testées mais sans succès (**Tableau 20**).



a) alcool **22** (1,2 éq); $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (1,5 éq); DCM

<i>Entrée</i>	<i>T</i>	<i>Temps</i>	<i>Composé 31</i>
1	25 °C	1 h	Réactif de départ inchangé
2	45 °C	12 h	traces
3	100 °C monde	5 min	traces

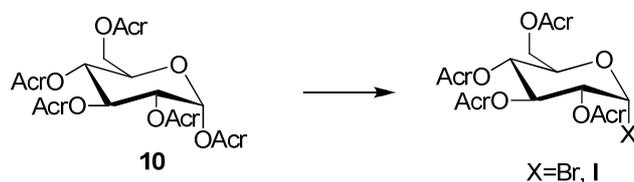
Tableau 20 : Conditions de glycosylation du composé 12

Seules des traces de produit **31** ont pu être détectées par analyse de la CCM. Le conformère α n'est donc pas du tout réactif.

Par conséquent, pour les substrats perméthacrylés **10**, **11** et **14**, où l'isomère α est majoritaire, voir exclusif pour le substrat **12**, la position anomérique doit être activée pour être par la suite glycosylée. Le premier type d'activation testé, est l'introduction d'un halogène en position anomérique.

1.3.3 Halogénéation en position anomérique

L'halogénéation de la position anomérique α , par conséquent, été testée dans deux conditions différentes avec le glucose perméthacrylé **10** (Tableau 21).



<i>Entrée</i>	<i>T</i>	<i>Temps</i>	<i>Réactifs</i>
1	0 °C	1 h	TMSI/MgO
2	25 °C	12 h	PBr ₃ /H ₂ O

Tableau 21: Conditions d'halogénéation de la position anomérique du dérivé 6

Dans les deux cas, ni TMSI/MgO¹⁶² ni PBr₃/H₂O¹⁶³ ont conduit au produit désiré et aucune transformation du substrat n'a été observée.

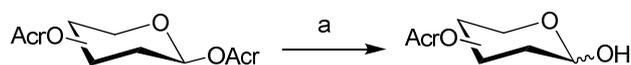
Par comparaison, en présence du mélange PBr₃/H₂O dans le dichlorométhane, l'introduction du brome en position anomérique sur le glucose peracétylé est quantitative.¹⁵⁸ De même, l'introduction d'un iode en position anomérique avec TMSI est également quantitative.¹⁵⁰

Face à cette réactivité réduite du groupement méthacrylate en position anomérique, l'hydrolyse anomérique a été menée. Ceci permettra par la suite d'introduire un groupement trichloroacétimide, facilement activable, en position anomérique.

1.3.4 Hydrolyse en position anomérique

L'hydrolyse de la position anomérique a été menée dans les mêmes conditions que celle utilisées pour les sucres peracétylés en présence de benzylamine, dans le tétrahydrofurane, à température ambiante, pendant 24 heures.¹⁶⁴

Les substrats **10**, **11**, **12** et **14** ont été dissous dans le tétrahydrofurane, puis la benzylamine a été additionnée. Après 24 heures de réaction, le milieu réactionnel est évaporé à sec et purifié par chromatographie sur gel de silice. Les rendements indiqués, dans le **Tableau 22** sont obtenus après purification.



a) BnNH_2 , THF, 24 h, TA

<i>Entrée</i>	<i>Substrat</i>	<i>Produit</i>	<i>Eq</i> <i>BnNH₂</i>	<i>Rdt</i> <i>(%)</i>	<i>Rapport</i> <i>(β/α)</i>
1	 10 $\beta/\alpha = 1/1$	 26	1,2	48	0/1
2 ^b	 11 $\beta/\alpha = 0/1$	 27	1,5	38	0/1
3	 12 $\beta/\alpha = 0/1$	 28	1,2	36	0/1
4	 14 $\beta/\alpha = 1/3$	 29	2,2	54	1/3

^b une faible proportion de forme furanose β a été observée d'après le spectre RMN du ^{13}C

Tableau 22: Réaction d'hydrolyse de la position anomérique

Les rendements d'hydrolyse sont acceptables et compris entre 36 et 54 %. Une faible proportion de furanose α a été détecté par RMN du ^{13}C du xylose (**Tableau 22**, entrée 2). Dans le cas de sucres peracétylés, les rendements d'hydrolyse anomérique sont plus élevés;

dans le cas du glucose peracétylé par exemple, le rendement de l'hydrolyse anomérique est de 80 %.^{159,165}

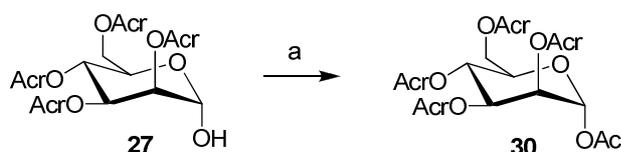
Ceci prouve une fois de plus que la réactivité du groupement méthacrylate est réduite par rapport aux acétates correspondants.

Le conformère α a été récupéré exclusivement dans le cas des dérivés du glucose, mannose et ribose (**Tableau 22**, entrées 1, 2 et 3) et majoritairement dans le cas du lactose (**Tableau 22**, entrée 4).

Nous avons tenté de comprendre si cette réactivité réduite est due uniquement à la présence du groupement méthacrylate en position anomérique ou à l'ensemble des fonctions méthacrylates présentes sur les sucres.

1.3.5 Acétylation de la position anomérique

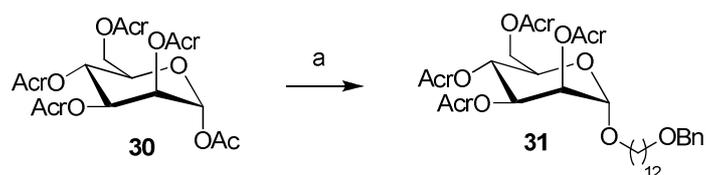
Le dérivé du mannose perméthacrylé **27** a été traité, dans un premier temps, dans des conditions classiques d'acétylation, en présence d'anhydride acétique, de triéthylamine, d'une quantité catalytique de DMAP, dans le dichlorométhane à TA pendant 1 heure. L'isomère α a été obtenu exclusivement avec un rendement quasi quantitatif (98 %) (**Schéma 5**).



a) Ac_2O (2 éq), Et_3N (2 éq), DMAP (cata), DCM, 12 h, TA, 98 %

Schéma 5: Acétylation du composé 27

La glycosylation du composé **30** a été testée dans des conditions identiques à celles menées avec les substrats perméthacrylés **10**, **12**, **13**, **15** et **17** en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (**Tableau 23**).



a) alcool **22** (1,2eq), BF₃.Et₂O (3éq), CH₂Cl₂.

<i>Entrée</i>	<i>Substrat</i>	<i>T</i>	<i>Temps</i>	<i>Composé 31 (%)</i>
1		25 °C	1 h	pas de réaction
				traces
2		45 °C	12 h	traces
				traces
3		100 °C, micro-onde	5 min	traces
				38

Tableau 23: Conditions de glycosylation testées sur le composé **30**

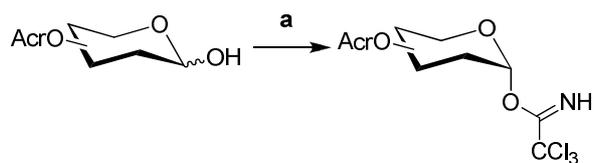
Aucune différence de réactivité par rapport au groupement méthacrylate n'a été notée à température ambiante et à reflux. En revanche, l'utilisation de micro-ondes a permis d'obtenir le composé **31** avec un rendement moyen de 38 %.

La différence de réactivité entre les sucres peracétylés et perméthacrylés n'est donc pas due à l'ensemble des fonctions méthacrylates mais probablement qu'à celles présentes en position anomérique.

1.3.6 Introduction du groupement trichloroacétimide

Les composés **26**, **27**, **28** et **29** ont été placés dans les conditions classiques de la synthèse du « réactif de Schmidt », à savoir l'introduction d'un groupement trichloroacétimide en position anomérique.

Les substrats **26**, **27**, **28** et **29** sont dissous dans le dichlorométhane, du trichloracétonitrile et une base (DBU), sont additionnés. Le milieu réactionnel est agité pendant 3 heures à température ambiante puis évaporé à sec et purifié par colonne chromatographique sur gel de silice. Les rendements isolés après purification sont regroupés dans le **Tableau 24**.



a) trichloroacétonitrile (3 éq), DBU (0,1 éq), DCM, 3 h, TA

<i>Entrée</i>	<i>Substrat</i>	<i>Produit</i>	<i>Rdt (%)</i>	<i>Rapport (β/α)</i>
1	<p>26 β/α = 0/1</p>	<p>32</p>	73	0/1
2	<p>27 β/α = 0/1</p>	<p>33</p>	66	0/1
3	<p>28 β/α = 0/1</p>	<p>34</p>	60	0/1
4	<p>29 β/α = 1/3</p>	<p>35</p>	55	0/1

Tableau 24: Synthèse des « réactifs de Schmidt »

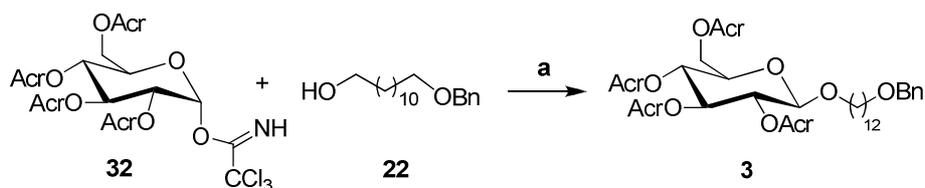
Les produits **32**, **33**, **34** et **35** sont obtenus avec de bons rendements compris entre 55 et 73 %, sous forme α uniquement, ce qui est en accord avec les résultats de la littérature pour les sucres peracétylés.

1.4 Glycosylation de substrats activés par un groupement trichloroacétimide en position anomérique

Une fois la synthèse des différents composés **32**, **33**, **34** et **35** réalisée, nous avons cherché à réaliser des réactions de glycosylation avec le dodécane diol mono protégé **22**.

De nombreux agents d'activation sont connus pour le groupement trichloroacétimide : $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$,¹⁵⁶ TMSOTf ,¹⁶⁶ TBDMSOTf ,¹⁶⁷ Tf_2O ,¹⁶⁸ ZnBr_2 ,¹⁶⁹ AgOTf .¹⁷⁰ Plusieurs agents d'activation ont été testés avec le glucose perméthacrylé **32**.

Le composé **32** est dissous dans le dichlorométhane et le diol monoprotégé **22** est additionné. Le milieu réactionnel est refroidi à 0 °C et 0,5 équivalent d'agent d'activation est ajouté lentement. Après une agitation de 30 minutes à 1 heure à 0 °C, le milieu réactionnel est évaporé à sec et purifié par plaque préparative de silice. Les résultats sont regroupés dans le **Tableau 25** après purification.



a) alcool **22** (1,2 éq), agent d'activation (0,5 éq), DCM, 1 h, 0 °C

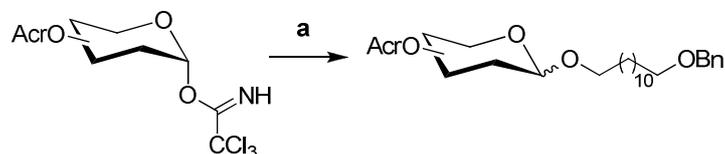
<i>Entrée</i>	<i>Agent d'activation</i>	<i>Rdt (%)</i>
1	TMSOTf	44
2	BF ₃ .Et ₂ O	51
3	Tf ₂ O	44
4	TMSNTf ₂	42

Tableau 25: Différentes conditions de glycosilation avec le composé 32

Quel que soit l'agent d'activation utilisé, la conversion du réactif de départ **32** est totale. Les rendements de glycosylation obtenus sont de 44 % pour TMSOTf, 51 % pour BF₃.Et₂O et 44 % pour Tf₂O. Le seul produit secondaire détecté par CCM est le produit d'hydrolyse anomérique.

Dans le cadre de cette étude de glycosilation, nous avons testé un autre agent : le N-triméthylsilyl-bis(trifluorométhanesulfonyl)imide : TMSNTf₂. Ce réactif n'a jamais été utilisé dans des réactions de glycosylation auparavant. Ce dérivé silylé est connu comme activateur des réactions de Diels Alder¹⁷¹ et comme catalyseur dans les condensations de Mukaiyama¹⁷² ou les alkylations de composés α,β insaturés.¹⁷³ C'est un catalyseur plus doux mais plus actif que TMSOTf par exemple.¹⁷⁴ Nous avons donc procédé à la synthèse de ce catalyseur,²² par réaction de l'allyltriméthylsilane et du trifluorométhaneimide, et testé sa réactivité, dans un premier temps, vis-à-vis du composé **32**, dans les mêmes conditions réactionnelles que les précédents activateurs (**Tableau 25**). Le composé **3** a pu être obtenu avec 42 % de rendement, du même ordre de grandeur que ceux obtenus avec les activateurs classiques TMSOTf, BF₃.Et₂O ou Tf₂O.

Nous avons donc procédé à la glycosylation des composés **32**, **33**, **34** et **35** avec ce nouvel agent d'activation (**Tableau 26**).



a) alcool **22** (1,2 éq), TMSNTf₂ (0,5 éq), DCM, 1 h, 0 °C

<i>Entrée</i>	<i>Substrat</i>	<i>Produit</i>	<i>Rdt (%)</i>	<i>Rapport (β/α)</i>
1	 32 β/α = 0/1	 3	41	1/0
2	 33 β/α = 0/1	 31	40	0/1
3	 34 β/α = 0/1	 36	35	2/1
4	 35 β/α = 0/1	 37	23	1/0

Tableau 26: Glycosylation avec TMSNTf₂ des dérivés perméthacrylés **32, **33**, **34** et **35****

Les produits glycosylés sont obtenus avec des rendements convenables, compris entre 23 et 41 %. Comparativement, les rendements de glycosylation avec TMSOTf sur des sucres

peracétylés activés par un groupement trichloroacétimide en position anomérique sont de l'ordre de 70-80 %.¹⁷⁵

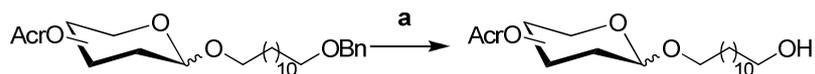
L'isomère β est obtenu exclusivement dans le cas du glucose et du lactose (**Tableau 26**, entrées 1 et 4), majoritairement dans le cas du xylose (**Tableau 26**, entrée 3). Dans le cas du mannose, l'assistance anchimérique du groupement méthacrylate α en position 2, entraîne uniquement la formation de l'isomère α (**Tableau 26**, entrée 2).

Pour les besoins de la préparation des templates pour la synthèse des polymères imprimés, nous avons procédé à la déprotection du groupement benzyle en vue de la réaction d'O-sulfonation.

1.5 Déprotection de la fonction benzylique

La fonction benzyle, présente sur les composés **3**, **21**, **24**, **25**, **31**, **36**, **37** a donc été déprotégée en présence de 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-quinone (DDQ). L'emploi de DDQ, pour la déprotection du groupement benzylique, en présence d'un alcène a été décrit dans la littérature.¹⁷⁶ La présence des fonctions méthacrylates ne permet pas, en effet, l'utilisation de la méthode classique d'hydrogénation en présence de palladium sur charbon.

Les différents substrats sont dissous dans le dichlorméthane; DDQ et 10 % d'eau en volume sont additionnés au milieu. Après 12 heures de réaction, plusieurs lavages sont effectués avec une solution saturée de NaHCO_3 et NaHSO_4 . Après séchage sur Na_2SO_4 et évaporation, le brut réactionnel est purifié par colonne chromatographique sur gel de silice. Les rendements isolés sont regroupés dans le **Tableau 27**.



a) DDQ (5 éq), DCM/H₂O, 12 h, TA

<i>Entrée</i>	<i>Substrat</i>	<i>Produit</i>	<i>Rdt (%)</i>	<i>Rapport (β/α)</i>
1	 3	 4	86	1/0
2	 31	 38	65	0/1
3	 21	 39	69	1/0
4	 36 β/α = 2/1	 40	43	2/1
5	 25	 41	39	0/1
6	 37 β/α = 3/1	 42	78	3/1
7	 24	 43	55	1/0

Tableau 27: Débenzylation avec DDQ

Les rendements de déprotection sont compris entre 39 et 86 %. Les rapports β/α restent identiques aux substrats.

Par comparaison, la déprotection de la fonction benzylique sur le dérivé peracétylé du glucose **1** (Schéma 5) a été effectuée dans les mêmes conditions réactionnelles que précédemment.

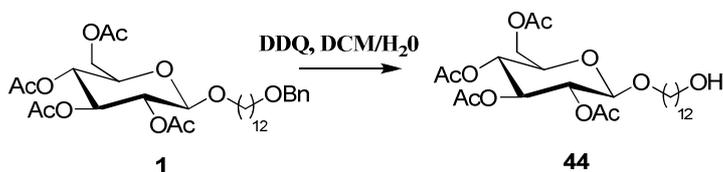


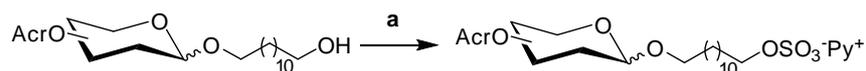
Schéma 5 : Débenzylation avec DDQ

Le rendement obtenu après purification est de 53 %, donc du même ordre de grandeur que ceux obtenus sur les dérivés perméthacrylés.

1.6 Introduction de la fonction O-sulfonate

La dernière étape de la synthèse des templates nécessite l'introduction de la fonction O-sulfonate.

Les différents substrats **4**, **38** à **43**, sont traités dans le dichlorométhane par le complexe de pyridine trioxyde de soufre (PySO_3). La réaction a lieu à 59 °C pendant 1 heure. Après refroidissement à 0 °C, l'excès de PySO_3 est filtré. Le filtrat est évaporé puis repris dans un mélange éther/pentane où le tensioactif précipite. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **Tableau 28**.


 a) PySO_3 (2 éq), DCM, 1 h, 59 °C

<i>Entrée</i>	<i>Substrat</i>	<i>Produit</i>	<i>Rdt (%)</i>	<i>Rapport (β/α)</i>
1			59	1/0
2			70	0/1
3			87	1/0
4			80	2/1
	$\beta/\alpha = 2/1$			
5			98	0/1
6			75	3/1
	$\beta/\alpha = 3/1$			
7			100	1/0

Tableau 28: Synthèse des tensioactifs

Les rendements de déprotection sont compris entre 39 et 86 %. Les rapports β/α restent identiques aux substrats. La pureté des templates évaluée par LC-MS, est comprise entre 95 et 100 %.

A titre de comparaison, la O-sulfonation a été menée sur le dérivé du glucose peracétylé **44** dans les mêmes conditions que précédemment (**Schéma 6**).



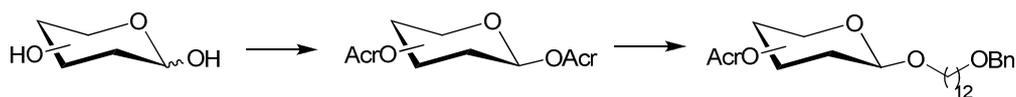
Schéma 6: O-sulfonation

Le rendement, obtenu après évaporation et reprecipitation dans un mélange éther/pentane, est de 99 %.

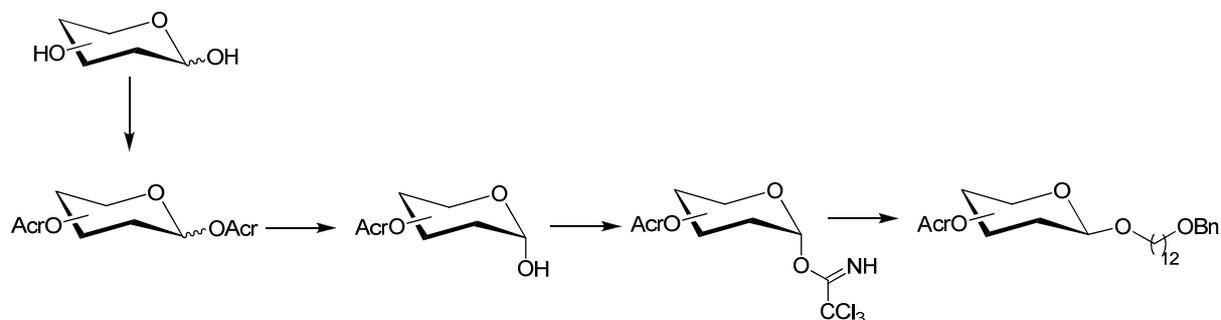
1.7 Rendements globaux et récapitulatif

Les trois voies de synthèse différentes utilisées pour la synthèse des templates sont les suivantes:

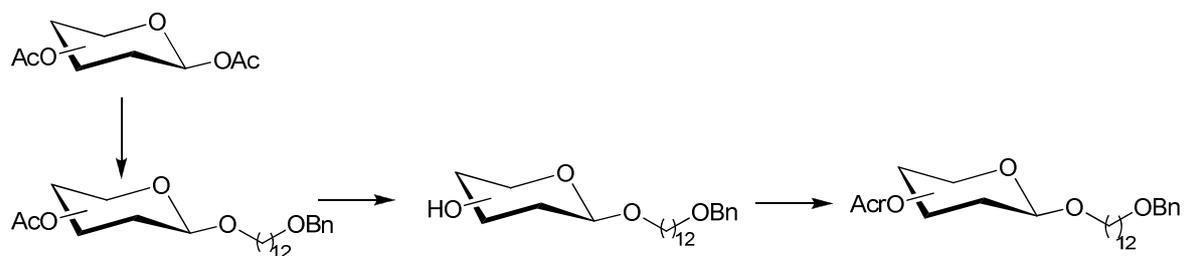
Voie de synthèse 1:



Voie de synthèse 2:



Voie de synthèse 3:



Les rendements globaux oscillent entre 1 et 13 % selon les voies de synthèse utilisées et les sucres (**Tableau 29**).

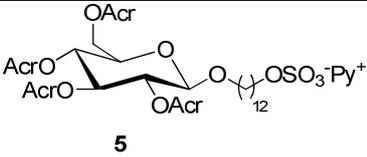
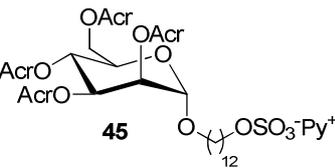
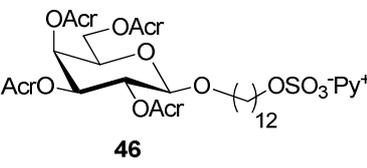
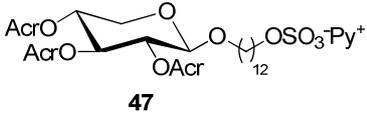
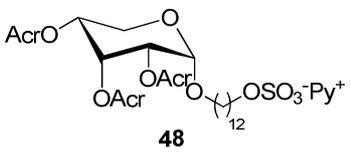
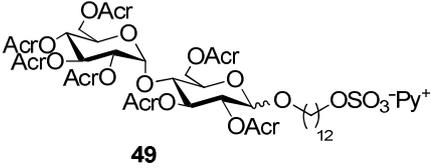
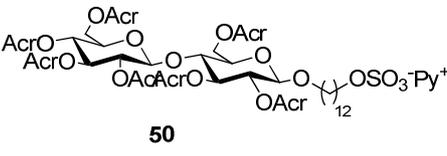
<i>Entrée</i>	<i>Produits</i>	<i>Rendement global (%)</i>		
		<i>Voie 1</i>	<i>Voie 2</i>	<i>Voie 3</i>
1	 5	3	4	12
2	 45	/	1	/
3	 46	/	/	7
4	 47	/	3	/
5	 48	7	/	/
6	 49	13	/	3
7	 50	7	/	/

Tableau 29: Rendements selon les voies de synthèse utilisées

Dans cette partie est abordée la synthèse des molécules cibles pour les études de binding.

II. Synthèse de molécules cibles pour les études de binding

A titre de rappel, l'efficacité de l'impression moléculaire se fait pas mesure du binding entre le polymère et un composé mimant la molécule cible ayant servi à former l'empreinte dans le polymère (**Schéma 7**).

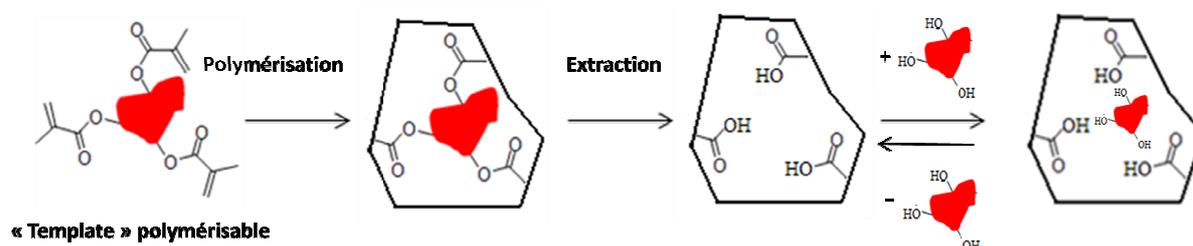


Schéma 7: Impression semi-covalente

Dans le cas de l'approche semi-covalente, le binding s'effectue par liaisons hydrogènes entre le polymère et l'analyte. Les solvants du type méthanol ou eau, peuvent inhiber ces liaisons hydrogènes. Les essais de binding seront effectués dans des solvants favorisant les interactions de type liaisons hydrogènes. Nous avons choisi, par conséquent, de mener des études de binding dans l'acétonitrile ou le chloroforme, bien que ce dernier soit connu pour déformer les polymères par gonflement.¹⁷⁷ Ces deux solvants ont par ailleurs des points d'ébullition de respectivement 81 et 61 °C, ils ne sont donc pas susceptibles de s'évaporer lors des incubations qui seront menées à 10 °C.

Différents groupements hydrophobes ont donc été introduits en position anomérique afin de rendre les molécules cibles solubles dans l'acétonitrile ou le chloroforme.

Les molécules synthétisées doivent être suffisamment solubles pour préparer des solutions mères dont la concentration peut atteindre 4,4 mM. Des tests de solubilité rapides seront donc menés afin de pouvoir déterminer visuellement la solubilité des molécules synthétisées dans l'acétonitrile ou le chloroforme. Dans ce but, pour chaque molécule synthétisée, une solution à la concentration de 4,4 mM sera préparée. Après 15 minutes de

sonication dans un bain, les molécules seront classées en deux catégories : (-) non soluble ou faiblement soluble; (*) entièrement soluble.

Afin de détecter et de quantifier la concentration des molécules par CLHP, l'introduction d'un groupement chromophore en position anomérique est nécessaire.

Pour étudier les phénomènes de reconnaissance moléculaire entre les polymères imprimés et une molécule cible, plusieurs substrats ont été préparés.

II.1 Synthèse de monosaccharides

Nous avons, dans un premier temps, introduit un groupement phénol en position anomérique. Il s'agit des composés les plus simples à synthétiser pour des études de reconnaissance. Les différents monosaccharides sont représentés dans la **Figure 53**.

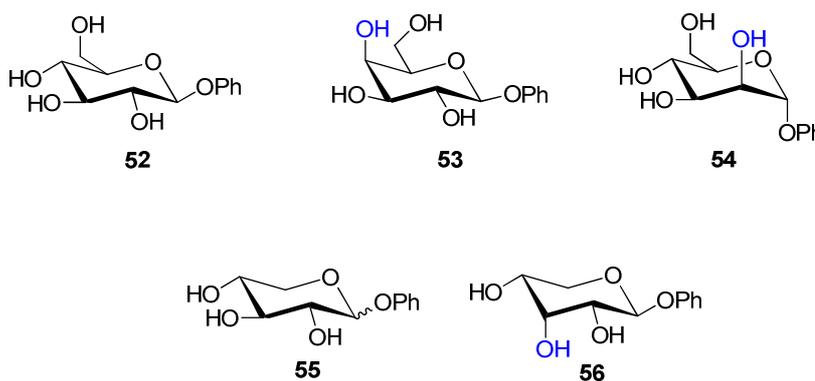
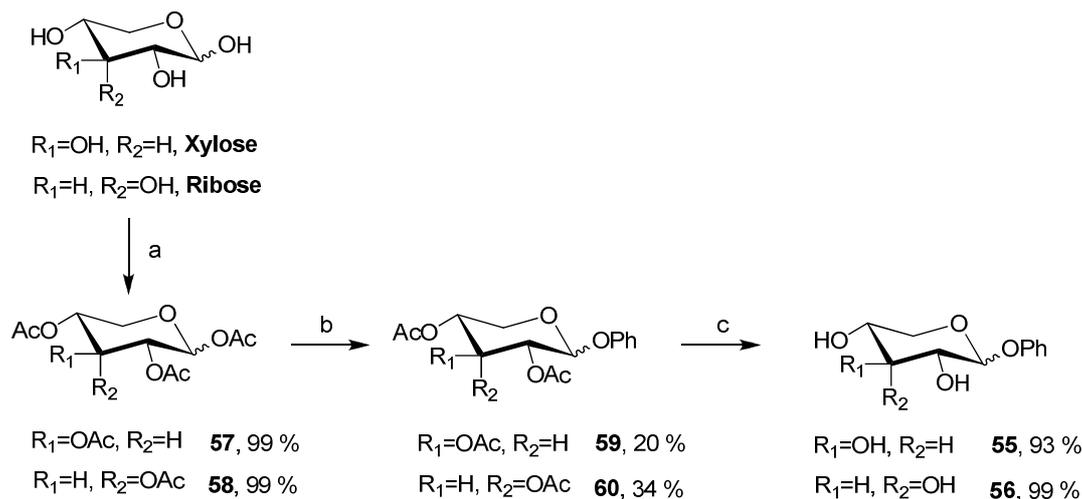


Figure 53: Monosaccharides pour les études de binding et de sélectivité

composé	Solubilité pour la préparation d'une solution à 4,4 mM	
	dans l'acétonitrile	dans le chloroforme
52	*	-
53	*	-
54	*	-
55	*	-
56	*	-

Les composés **52**, **53** et **54** avaient déjà été synthétisés au laboratoire par Pasquale Curcio. Cette synthèse repose sur une réaction de glycosylation classique en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ des monosaccharides peracétylés, suivi d'une déprotection dans les conditions de Zemplén. Nous avons donc procédé à la synthèse des composés **55** et **56** dans les mêmes conditions (**Schéma 8**).



a) Ac_2O (2 éq/-OH), Et_3N (2 éq/-OH), DMAP, DMC, 2 h, 0 °C ; b) PhOH (1,2 éq), $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (3 éq), DCM, 12 h, 0 °C \rightarrow TA ; c) NaOMe (cata), MeOH, 30 min, TA.

Schéma 8: Synthèse des monosaccharides pour le binding

Les rendements globaux sont de 18 % pour le composé **55** et de 31 % pour le composé **56**. Un mélange de pyranoses est obtenu pour le composé **55** (β/α compris entre 0/1 et 1/1), tandis que le composé **56** est obtenu sous la forme α pyranose uniquement.

Les deux composés **55** et **56** sont entièrement solubles dans l'acétonitrile, comme leurs analogues, les dérivés **52**, **53** et **54**.

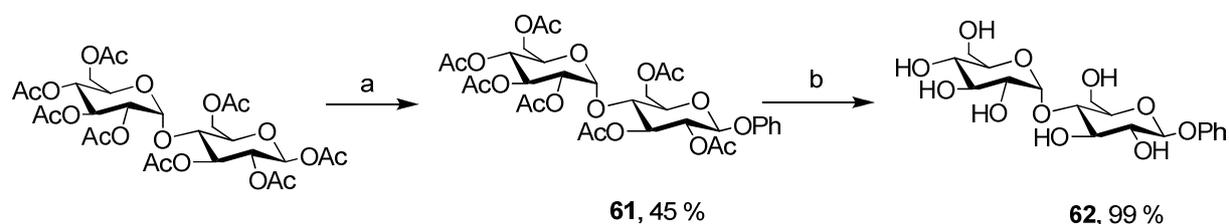
Aucun de ces monosaccharides n'est, cependant, soluble dans le chloroforme.

Des études de binding, pour les polymères imprimés avec des dérivés de monosaccharides, seront, par conséquent, menées dans l'acétonitrile avec les analytes **52**, **53**, **54**, **55** et **56**.

II.2 Synthèse de disaccharides

Par similarité avec les composés synthétisés pour les études de reconnaissance des polymères imprimés avec des monosaccharides, nous avons dans un premier temps, cherché à introduire simplement un phénol en position anomérique, pour l'étude du binding des polymères imprimés de disaccharides.

Nous avons, donc, préparé le dérivé **62** du maltose selon un schéma conventionnel de synthèse, par glycosylation directe, suivie d'une déprotection dans les conditions de Zemplén (Schéma 9).



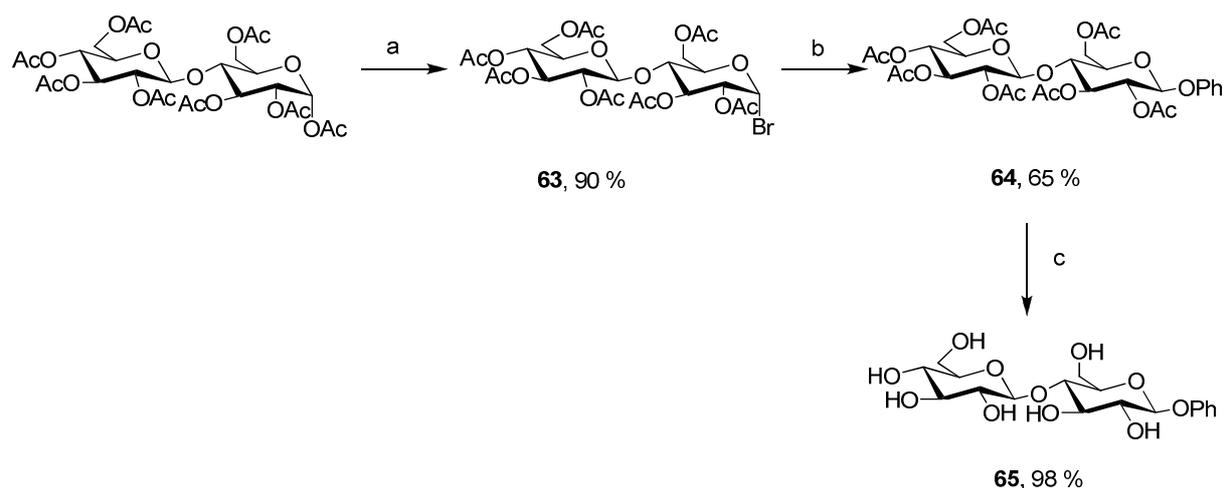
a) PhOH (1,2 éq), BF₃·Et₂O (3 éq), DCM, 12 h, 0 °C → TA ; b) NaOMe (cata), MeOH, 30 min, TA.

Schéma 9: Synthèse du dérivé 62 du maltose

Solubilité pour la préparation d'une solution à 4,4 mM		
composé	dans l'acétonitrile	dans le chloroforme
62	-	-

Le composé **62** a pu être obtenu avec un rendement global de 44 %. Ce disaccharide est ni soluble dans l'acétonitrile, ni dans le chloroforme.

En parallèle, le dérivé du cellobiose **65** a également été synthétisé (Schéma 10).



a) PBr_3 (1,5 éq), $\text{DCM}/\text{H}_2\text{O}$, 12 h, TA ; b) PhOH (1,2 éq), AgOTf (1,5 éq), DCM , 12 h, $-40\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{TA}$; c) NaOMe (cata), MeOH , 30 min, TA.

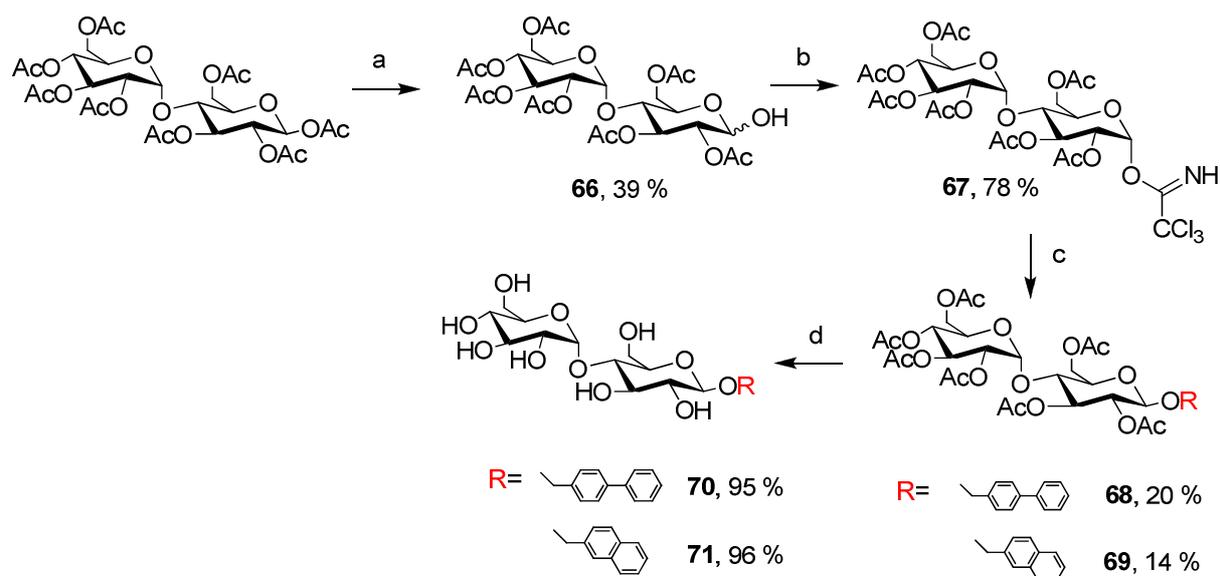
Schéma 10: Synthèse du dérivé du cellobiose 65

Solubilité pour la préparation d'une solution à 4,4 mM		
composé	dans l'acétonitrile	dans le chloroforme
65	-	-

Le composé **65** a pu être obtenu avec un rendement global de 57 %. Ce disaccharide, comme son homologue **62**, est ni soluble dans l'acétonitrile, ni dans le chloroforme.

La solubilité des disaccharides totalement déprotégés portant uniquement un groupement plus hydrophobe en position anomérique a donc été étudiée.

Dans un premier temps, étant donné la forte polarité des sucres, nous avons cherché à améliorer le caractère hydrophobe des molécules en augmentant le nombre de groupements aromatiques en position anomérique. Les composés **70** et **71** ont été synthétisés (**Schéma 11**).



a) BnNH_2 (1,2 éq), THF, 12 h, TA ; b) trichloroacétonitrile (3 éq), DBU (0,1 éq), DCM, 2 h, TA ; c) alcool (1,2 éq), TMSOTf (0,5 éq), DCM, 2 h, $-30\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{TA}$; c) NaOMe (cata), MeOH, 30 min, TA.

Schéma 11: Synthèse des composés 70 et 71

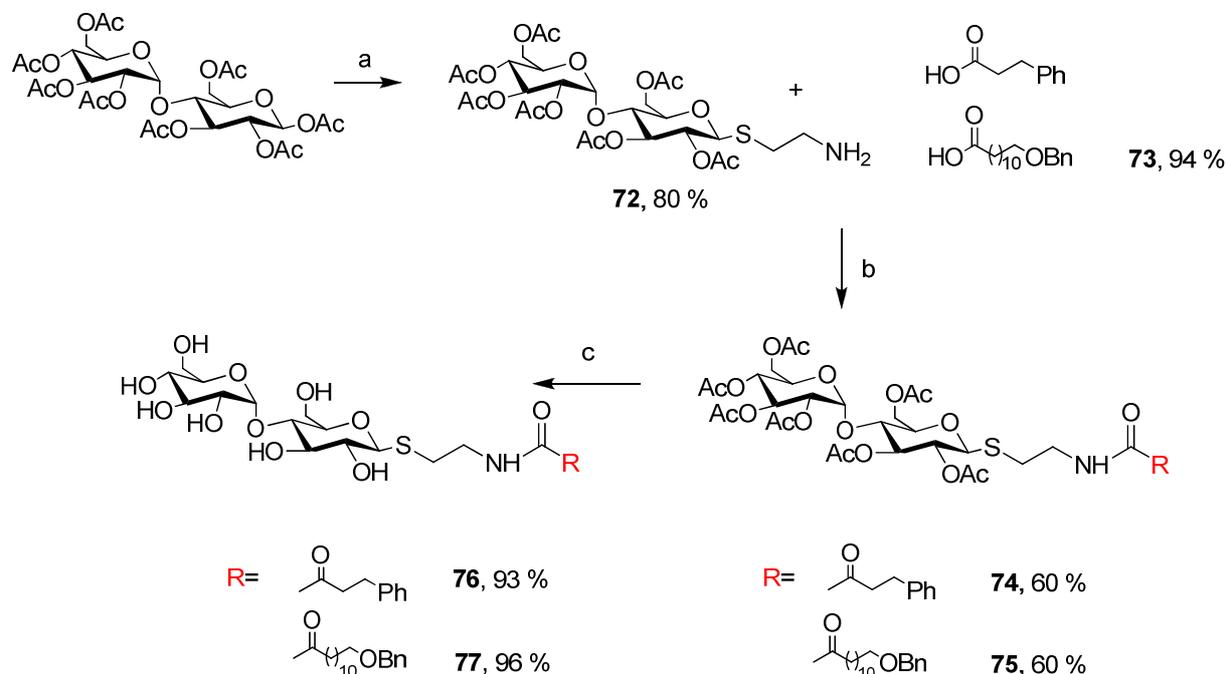
Solubilité pour la préparation d'une solution à 4,4 mM		
composé	dans l'acétonitrile	dans le chloroforme
70	-	-
71	-	-

Les composés **70** et **71** ont pu être obtenus avec un rendement global, de 6 et 5 % respectivement. Ces deux disaccharides sont ni solubles dans l'acétonitrile, ni dans le chloroforme.

L'augmentation du nombre de groupements aromatiques n'a pas permis d'augmenter la solubilité des composés **70** et **71** dans l'acétonitrile ou dans le chloroforme.

Nous avons donc cherché à introduire des chaînes hydrophobes en position anomérique par le biais d'un espaceur¹⁷⁸ (composé **72**) permettant de réaliser des couplages peptidiques dans des conditions classiques (NHS, EDC). Nous avons ainsi obtenu les

composés **76** et **77** après couplage peptidique et déprotection dans les conditions de Zemplén (Schéma 12).



a) tert-Butyl-N-(2-mercaptoethyl) carbamate (1,2 éq), $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (3 éq), DCM, reflux, 12 h; b) NHS (1,3 éq), EDC (1,3 éq), Et_3N (2 éq), DCM, 12 h, TA ; c) NaOMe (cata), MeOH, 30 min, TA.

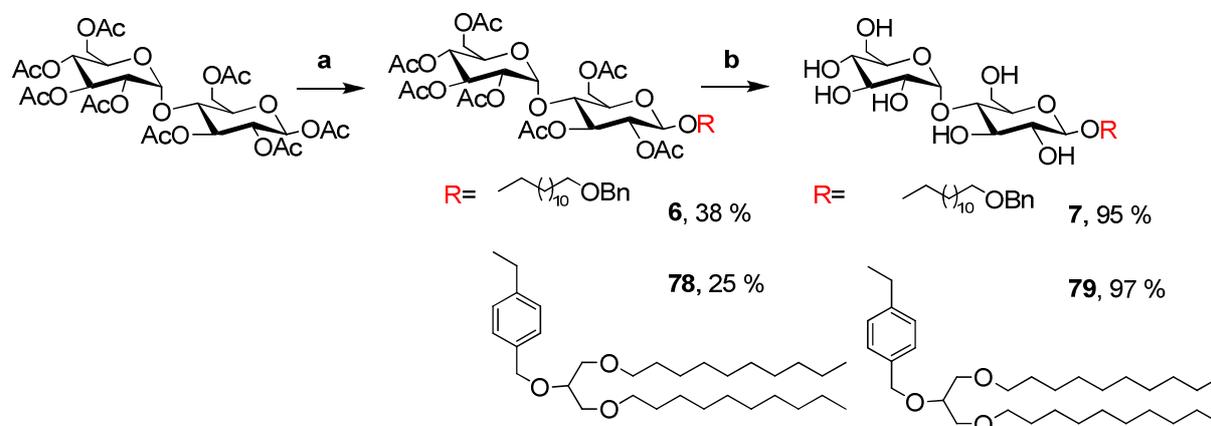
Schéma 12: Synthèse des composés **76** et **77**

Solubilité pour la préparation d'une solution à 4,4 mM		
composé	dans l'acétonitrile	dans le chloroforme
76	-	-
77	-	-

Les composés **76** et **77** ont pu être obtenus avec un rendement global de 44 %. Ces deux disaccharides ne sont pas solubles dans l'acétonitrile, mais le composé **77** présente une faible solubilité dans le chloroforme, contrairement au composé **76**.

La longueur de la chaîne hydrophobe influence donc la solubilité dans le chloroforme.

Nous avons donc poursuivi, par la synthèse de sucres O-glycosylés **7** et **79** afin de comparer l'apport d'un lipide bi-brin sur la solubilité dans la chloroforme (**Schéma 13**).



a) alcool (1,2 éq), $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (3 éq), DCM, reflux, 12 h; b) NaOMe (cata), MeOH, 30 min, TA.

Schéma 13: Synthèse des composés 7 et 79

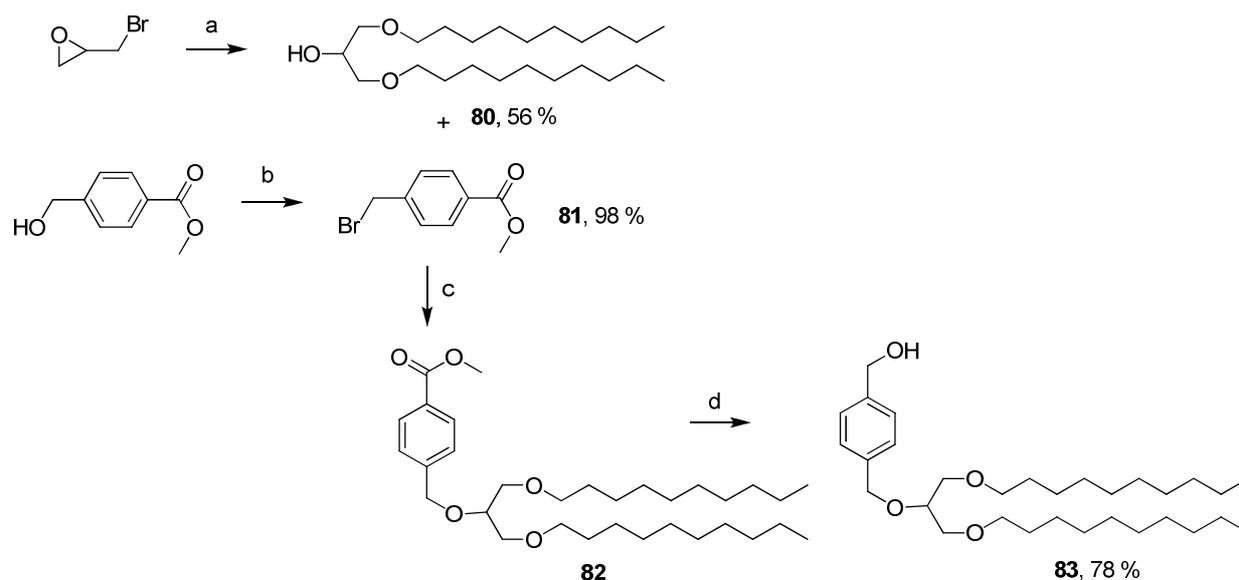
composé	Solubilité pour la préparation d'une solution à 4,4 mM	
	dans l'acétonitrile	dans le chloroforme
7	-	-
79	-	*

Les composés **7** et **79** ont pu être obtenus avec un rendement global, de 36 et 28 % respectivement. Ces deux disaccharides ne sont pas solubles dans l'acétonitrile, mais le composé **79** présente une très bonne solubilité dans le chloroforme.

Nous allons pouvoir envisager des études de binding dans le chloroforme, pour les polymères imprimés, avec des dérivés de disaccharides fonctionnalisés en position anomérique avec le lipide bi-brin **83** (**Schéma 14**).

Synthèse des mono- et disaccharides comportant un lipide bi-brin :

Nous avons donc, dans un premier temps, mis au point la synthèse convergente du lipide bi-brin **83**, avec un rendement global de 43 % (**Schéma 14**).

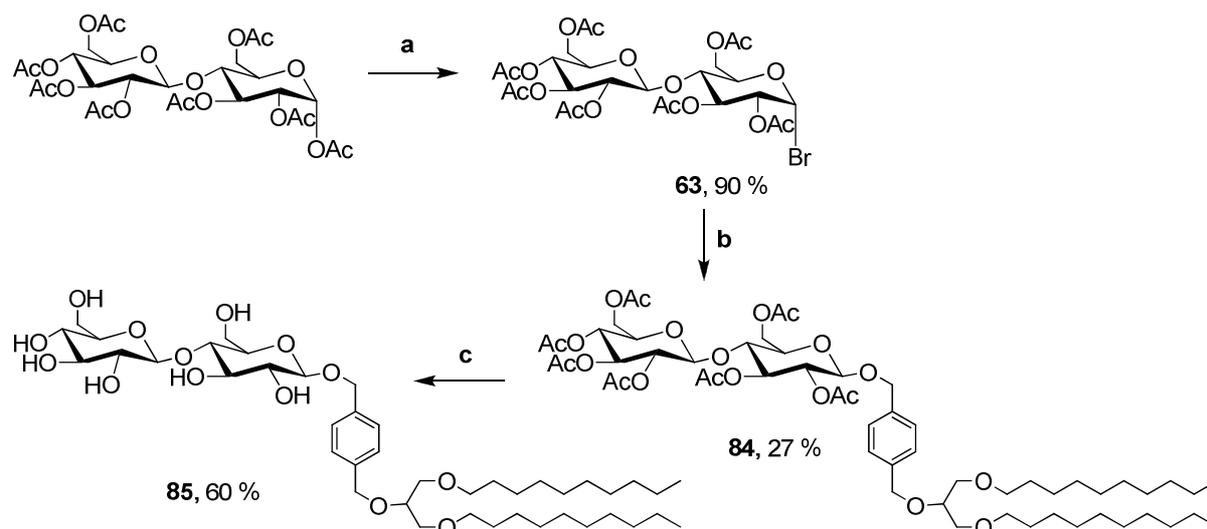


a) dodecanol (8,5 éq), NaH (4 éq), épibromhydrine (1 éq), reflux, 12 h; b) PBr_3 (1,5 éq), DCM, 12 h, TA ; c) AgOTf (1,5 éq), DCM, $-20\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{TA}$; d) LiAlH_4 (4 éq), éther, 1 h, $0\text{ }^\circ\text{C}$.

Schéma 14: Synthèse du lipide **83**

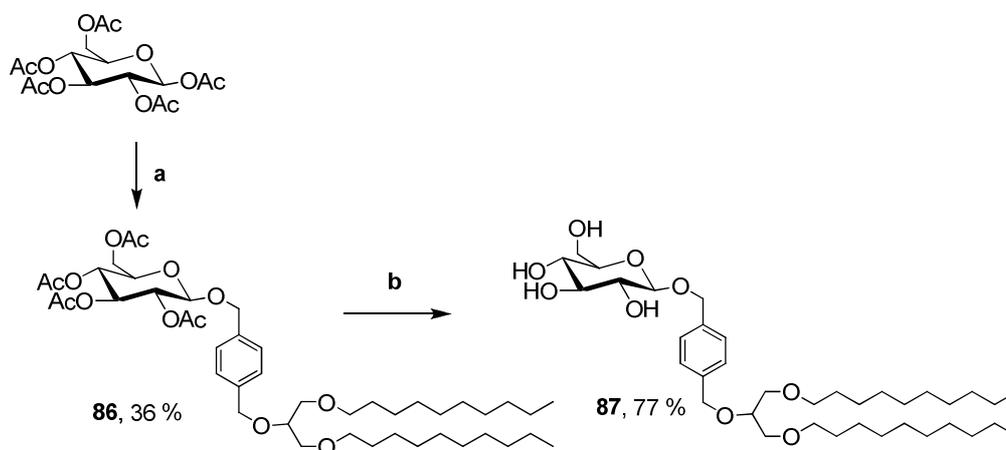
L'obtention du lipide bi-brin **83** est décrite dans la littérature.¹⁷⁹ Le couplage entre les composés **80** et **81** donne le composé **82**. Le brut réactionnel est directement réduit pour conduire au lipide **83** avec un rendement sur les deux étapes de 78 %.

Nous avons donc effectué le couplage de ce lipide **83** avec le maltose peracétylé dans un premier temps, puis avec le dérivé bromé **63** du cellobiose (**Schéma 15**) et le glucose peracétylé (**Schéma 16**) dans un deuxième temps.



a) PBr_3 (1 éq), H_2O (2,2 éq), DCM, TA, 12 h ; b) AgOTf (1,5 éq), DCM, $-20\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{TA}$; c) NaOMe (cata), MeOH, 30 min, TA.

Schéma 15: Synthèses du dérivé 85



a) composé **83** (1,2 éq), $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (3 éq), DCM, TA, 12 h ; b) NaOMe (cata), MeOH, 30 min, TA.

Schéma 16: Synthèse du dérivé 87

Solubilité pour la préparation d'une solution à 4,4 mM		
composé	dans l'acétonitrile	dans le chloroforme
85	-	*
87	*	*

Les dérivés du maltose et du cellobiose **79**, **85** ainsi que le dérivé du glucose **87** sont parfaitement solubles dans le chloroforme. Le dérivé **87** est également soluble dans l'acétonitrile.

L'introduction du lipide bi-brin a donc permis d'améliorer nettement la solubilité des disaccharides, dans le chloroforme. Des études de binding avec les composés **79** et **85** vont donc pouvoir être menées avec les polymères imprimés avec des dérivés de disaccharides.

Aucun disaccharide fonctionnalisé en position anomérique n'est soluble dans l'acétonitrile.

III. CONCLUSION :

Nous avons développé une méthodologie originale pour la préparation de sucres polymérisables perméthacrylés. Cela a permis de synthétiser cinq templates de monosaccharides et deux templates de disaccharides polymérisables en vue de la préparation de polymères imprimés (**Figure 54**).

La synthèse de ces composés a également nécessité une étude de la réactivité en position anomérique et a permis de mettre au point une nouvelle méthode de glycosylation employant TMSNTf₂.

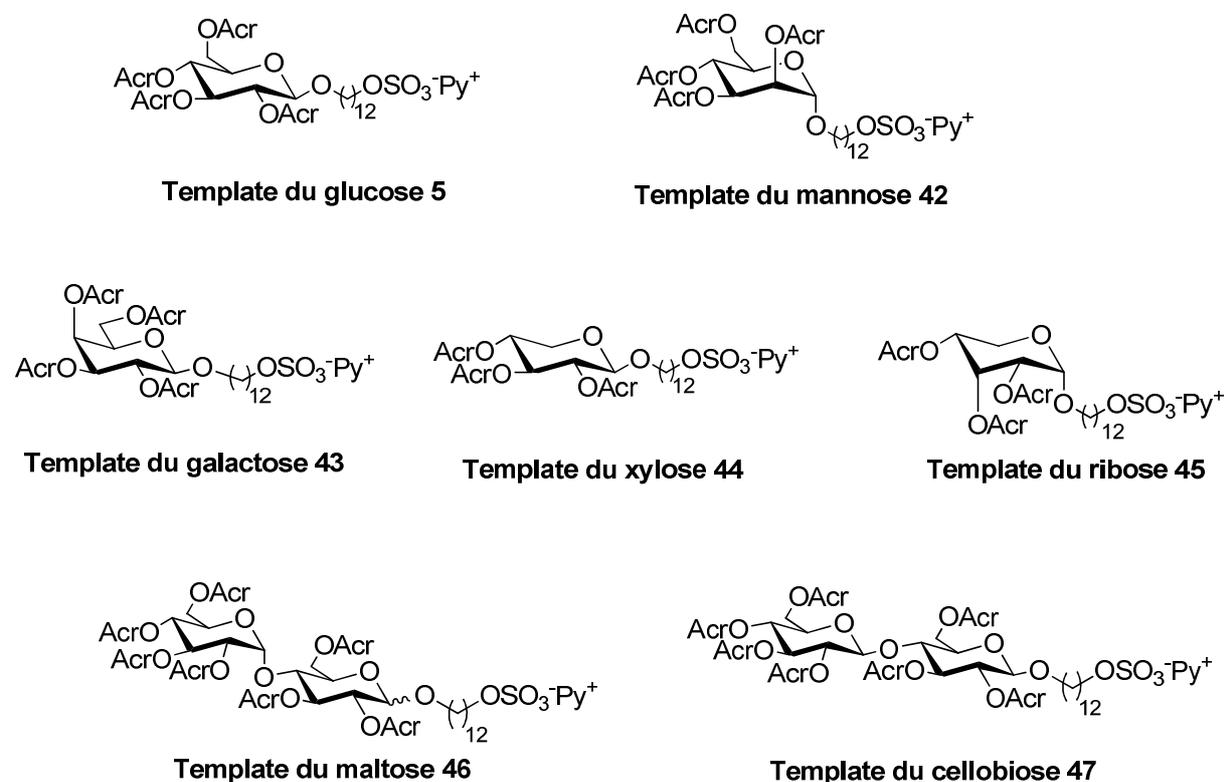


Figure 54: Templates synthétisés

Par ailleurs, la synthèse de différentes molécules cibles a également été réalisée pour des études ultérieures de binding afin de caractériser ces polymères imprimés (**Figure 55**).

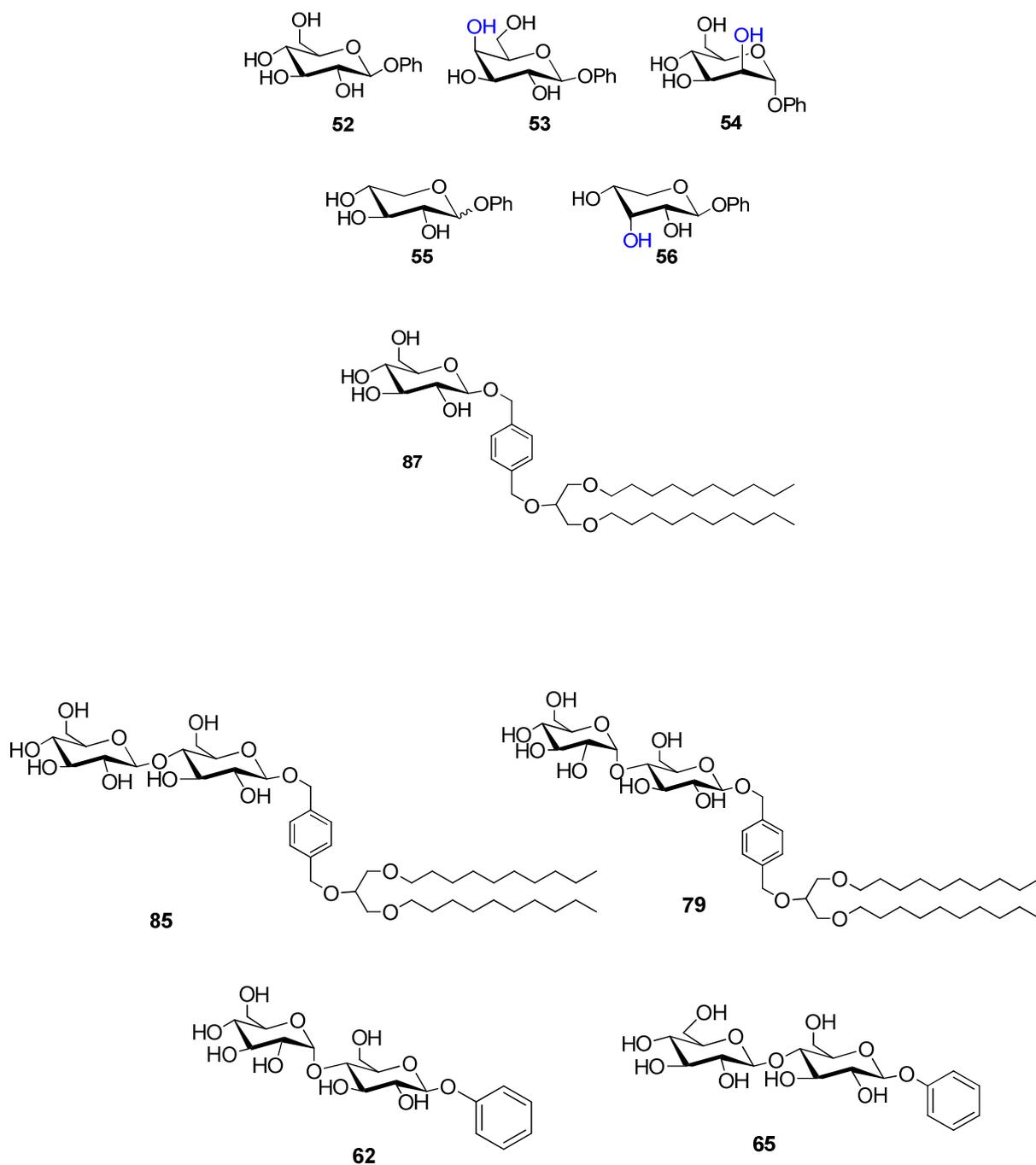


Figure 55: Différentes molécules cibles synthétisées

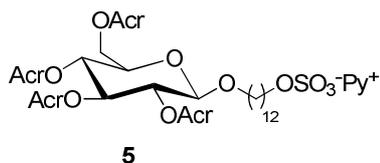
Chapitre 3 : Polymères imprimés avec des dérivés de monosaccharides

Après avoir synthétisé les différents templates, ce chapitre aborde la préparation des polymères imprimés par la technique de mini-émulsion « one pot », décrite en introduction (Chapitre 1, page 85).

Parmi toutes les méthodes décrites dans la littérature (polymérisation en masse, en suspension, par précipitation ou en émulsions), la technique d'impression moléculaire par mini-émulsion permet de préparer des particules nanométriques, homogènes en taille sans broyage et tamisage.

L'approche semi-covalente a été choisie afin de combiner la stabilité du complexe de prépolymérisation et la cinétique rapide du « binding » par des liaisons hydrogènes.

Comme système modèle, nous avons donc choisi de préparer des polymères imprimés avec le dérivé du glucose **5** par l'approche semi-covalente et mini-émulsion « one pot ».



Ce travail a été mené de manière concomitante avec Pasquale Curcio qui a également mené des études cinétiques et déterminé des constantes de dissociation.

Notations :

Tous les polymères imprimés préparés seront notés MIPXi avant clivage et MIPXic après clivage, avec :

- X : représente le template qui a servi à imprimer la matrice polymérique
- i : le n° du lot de polymère imprimé

Les polymères de contrôle seront notés Ci, avec i le n° du lot de polymère contrôle

I. Polymères imprimés avec un dérivé de glucose

I.1 Premiers polymères imprimés synthétisés

Les objectifs de cette première partie sont les suivants :

- Montrer que l'effet d'empreinte est réel en comparant un polymère imprimé avec différents polymères de contrôle
- Montrer l'importance des acides carboxyliques libres pour le binding non covalent
- Montrer l'influence de l'état de surface du polymère imprimé sur le binding non spécifique.

I.1.1 Paramètres du système de polymérisation

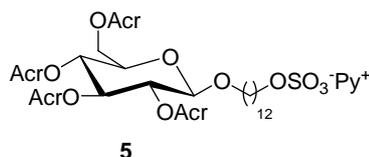
Pour la préparation de nos polymères imprimés, nous avons fixé les conditions expérimentales suivantes, suite aux travaux antérieurs rapportés dans la littérature:

- une matrice styrène/divinylbenzène (DVB), stable en milieu acide comme en milieu basique
- le taux de solide a été fixé à 17 % en masse (taux de solide classique pour un mini-émulsion¹⁸)
- le taux d'agent de réticulation a été fixé à 20 % inspirés des travaux de Whitcombe¹⁸
- la charge en template du polymère fixée arbitrairement à 46 $\mu\text{mol/g}$ de polymère, si la polymérisation du template est totale
- une initiation par voie thermique en utilisant comme initiateur de radicaux le 2,2'-azobis(2-méthylbutyronitrile) (AMBN)
- l'hexadécane (0,7 %) comme agent hydrophobe selon les travaux décrits par Tovar¹⁹

I.1.2 Mode opératoire

Le premier polymère imprimé a donc été préparé, sous atmosphère inerte,¹⁸⁰ comme suit :

- le template **5** est dissous dans le mélange styrène/ DVB (ce template est parfaitement soluble dans le mélange monomère/agent de réticulation)



- l'hexadécane, agent hydrophobe nécessaire à stabiliser la mini-émulsion, est additionné
- la phase organique est soniquée pendant 1min avec un bain à soniquer
- l'initiateur (AMBN), soluble en phase organique, est additionné au mélange
- une solution aqueuse de dodécyle sulfate de sodium (SDS) (32 mM) est ajoutée pour former une macro émulsion qui est agitée fortement pendant 15 minutes
- la macro émulsion est ensuite soniquée avec une sonde à soniquer, pendant 2 minutes sous argon pour former une mini-émulsion stable
- la mini émulsion ainsi obtenue est chauffée, sous argon, pendant 20 heures à 80 °C.

A la fin des 20 heures de chauffage, un latex blanc (particules en suspension dans l'eau) est obtenu.

Après ajout d'acétone, une première décantation dans un mélange 1/1 eau/acétone (en volume) est réalisée. La décantation est souvent difficile et les particules les plus fines restent en suspension (cf. partie expérimentale XVI)

Plusieurs lavages à l'eau/acétone (mélange 1/1) sont réalisés (entre 5 et 6) pour enlever un maximum de SDS en surface du polymère. A la dernière décantation, le surnageant est retiré; le polymère est ensuite laissé à l'air libre pendant une nuit afin d'évaporer l'acétone, puis séché par lyophilisation (**Figure 56**).

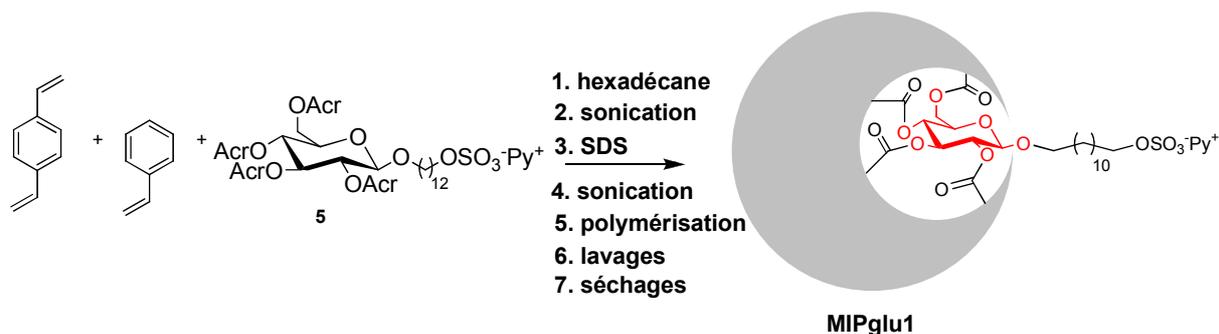


Figure 56: Préparation du polymère imprimé MIPglu1

Un polymère imprimé **MIPglu1** a donc été préparé, dans les conditions décrites ci-dessus.

MIPglu1 est, dans un premier temps, caractérisé par MET, par mise en suspension de 1 mg de polymère dans le chloroforme. Des particules sphériques sont observées, variant entre 50 et 100 nm. Les particules de polymères obtenues pour **MIPglu1** sont visualisées dans la **Figure 57**.

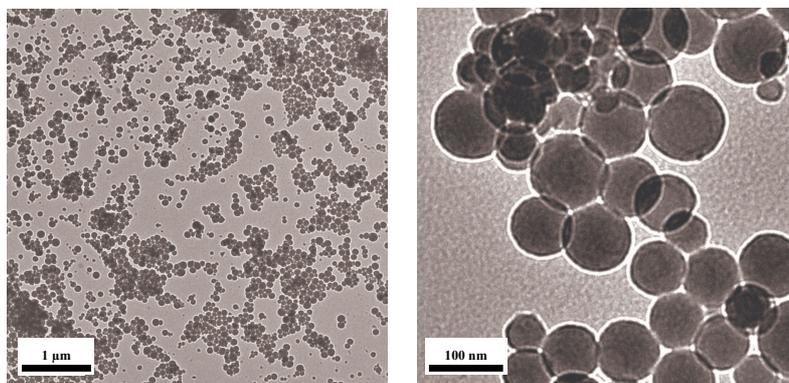


Figure 57 : Caractérisation par MET du polymère MIPglu1, échelle 1 µm et 100 nm

La mesure de la polydispersité par diffusion de la lumière, d'une suspension de polymère dans le chloroforme est de 0,154 avec une population de particules de 144 nm, ce qui semble en accord avec les photographies obtenues par MET.

Un spectre Infra-Rouge (pastille de KBr ; background effectué au KBr) de ces premiers polymères imprimés est, ensuite effectué afin de vérifier l'incorporation, par copolymérisation de manière covalente, du template **5**, dans la matrice styrène/DVB.

A titre de comparaison, les spectres Infra-Rouge du template **5** et du polymère imprimé **MIPglu1** sont rapportés dans les **Figures 58 et 59**.

La bande d'absorption des fonctions alcènes à 1638 cm^{-1} , présente dans le spectre Infra-Rouge du template disparaît après polymérisation (ligne - - - - sur les spectres Infra-Rouge).

La bande d'absorption des fonctions esters à 1734 cm^{-1} est toujours présente après polymérisation mais a diminué d'intensité (ligne - - - - sur les spectres Infra-Rouge).

Le template **5** est donc bien lié de manière covalente à la matrice polymérique dans **MIPglu1**.

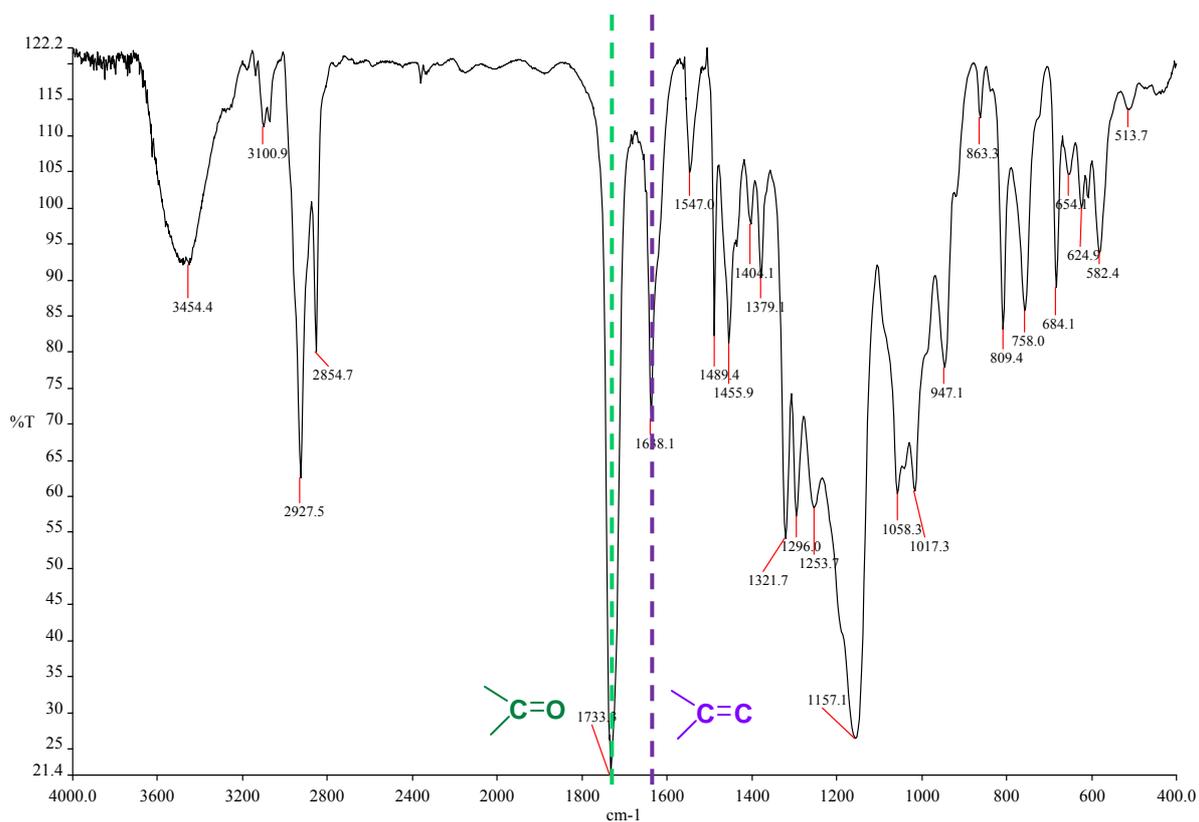


Figure 58: Spectre Infra Rouge du template 5 du glucose

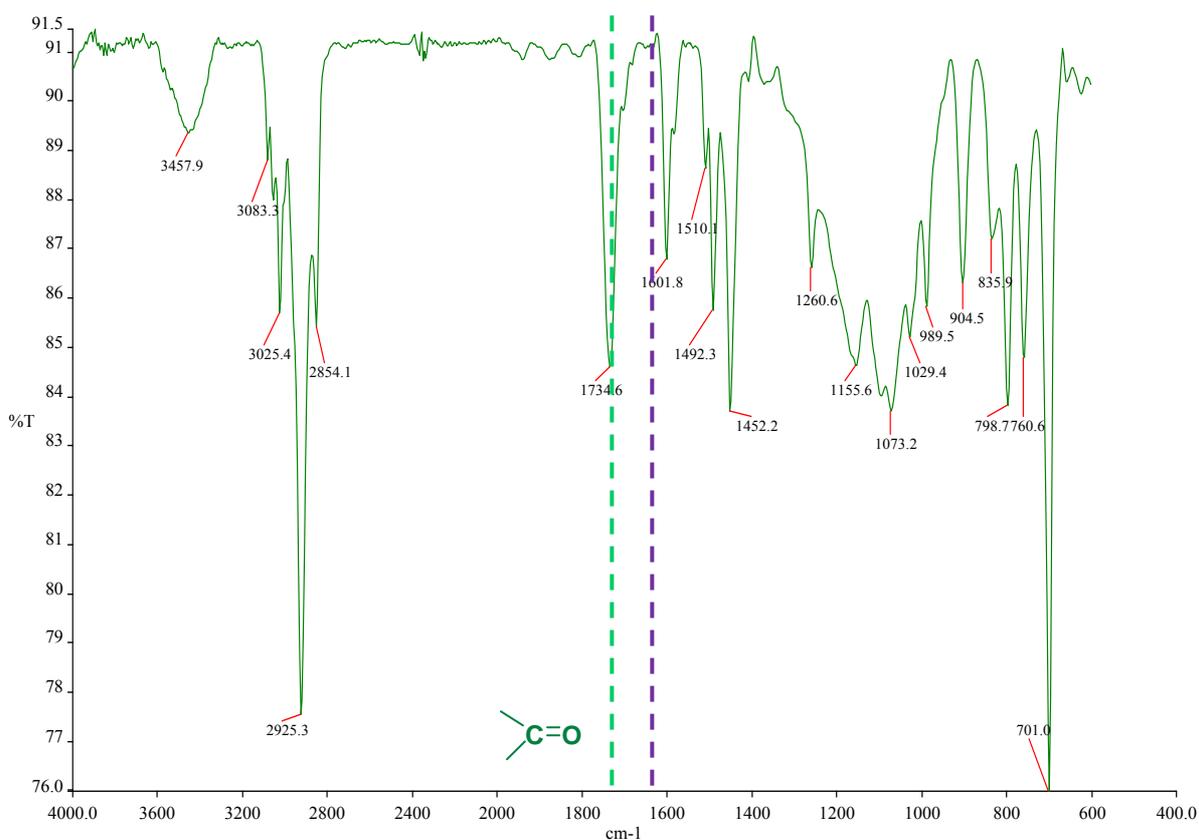


Figure 59: Spectre Infra Rouge du polymère imprimé MIPglu1

1.1.3 Clivage du template 5

L'extraction du template **5** est effectuée dans des conditions basiques (5 M NaOHaq/ MeOH) à reflux pendant 3 jours, dans des ballons en téflon (cf. partie expérimentale XIX) afin de libérer des acides carboxyliques en surface (**Figure 60**).

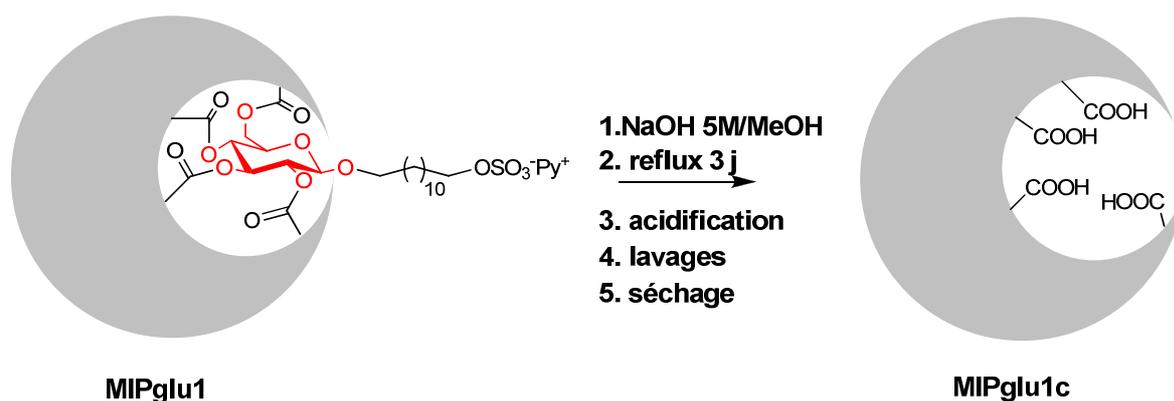


Figure 60: Extraction du template 5

Après retour à température ambiante, de l'acide chlorhydrique 12 N est additionné lentement pour rendre le milieu acide (pH = 1). Une première décantation a lieu. Le surnageant est retiré.

Plusieurs lavages à l'eau du polymère imprimé clivé sont effectués jusqu'à obtenir un pH de 7, par agitations et décantations successives. Le polymère, ainsi obtenu, noté **MIPglu1c**, est ensuite séché au lyophilisateur (cf. partie expérimentale XIX).

Ce polymère, **MIPglu1c**, est mis en suspension dans le chloroforme et caractérisé par MET. Les particules de polymères obtenues pour **MIPglu1c** sont visualisées dans la **Figure 61**.

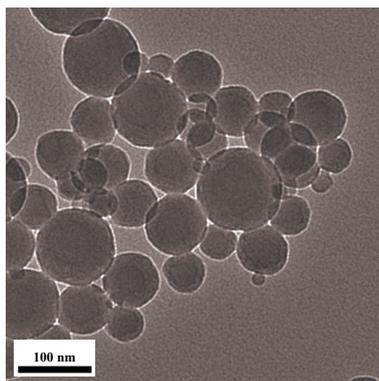


Figure 61: Caractérisation par MET du polymère MIP1gluc, échelle 100nm

L'aspect des particules de polymères après clivage reste inchangé et la taille est toujours comprise entre 50 et 100 nm.

La mesure de la polydispersité par diffusion de la lumière, d'une suspension de polymère dans le chloroforme est de 0,173 avec une population de particules de 154 nm, ce qui est en accord avec les photographies obtenues par MET.

Un spectre Infra-Rouge (pastille de KBr ; background effectué au KBr) de ce premier polymère imprimé clivé est ensuite effectué.

A titre de comparaison, les spectres Infra-Rouge des polymères **MIPglu1** et **MIPglu1c** sont rapportés dans les **Figures 62** et **63**.

Une diminution d'intensité de la bande d'absorption des fonctions esters à 1734 cm^{-1} , en comparaison de la bande d'absorption présente à 1601 cm^{-1} est observée (ligne - - - sur les spectres Infra-Rouge).

Un changement dans la zone comprise entre 1630 et 1700 cm^{-1} est constaté dans le spectre Infra-Rouge du polymère **MIPglu1c** (zone hachurée bleu).

Un épaulement est également noté à $\sim 3200\text{ cm}^{-1}$, caractéristique de la présence de fonctions acides carboxyliques (ligne - - - sur les spectres Infra-Rouge).

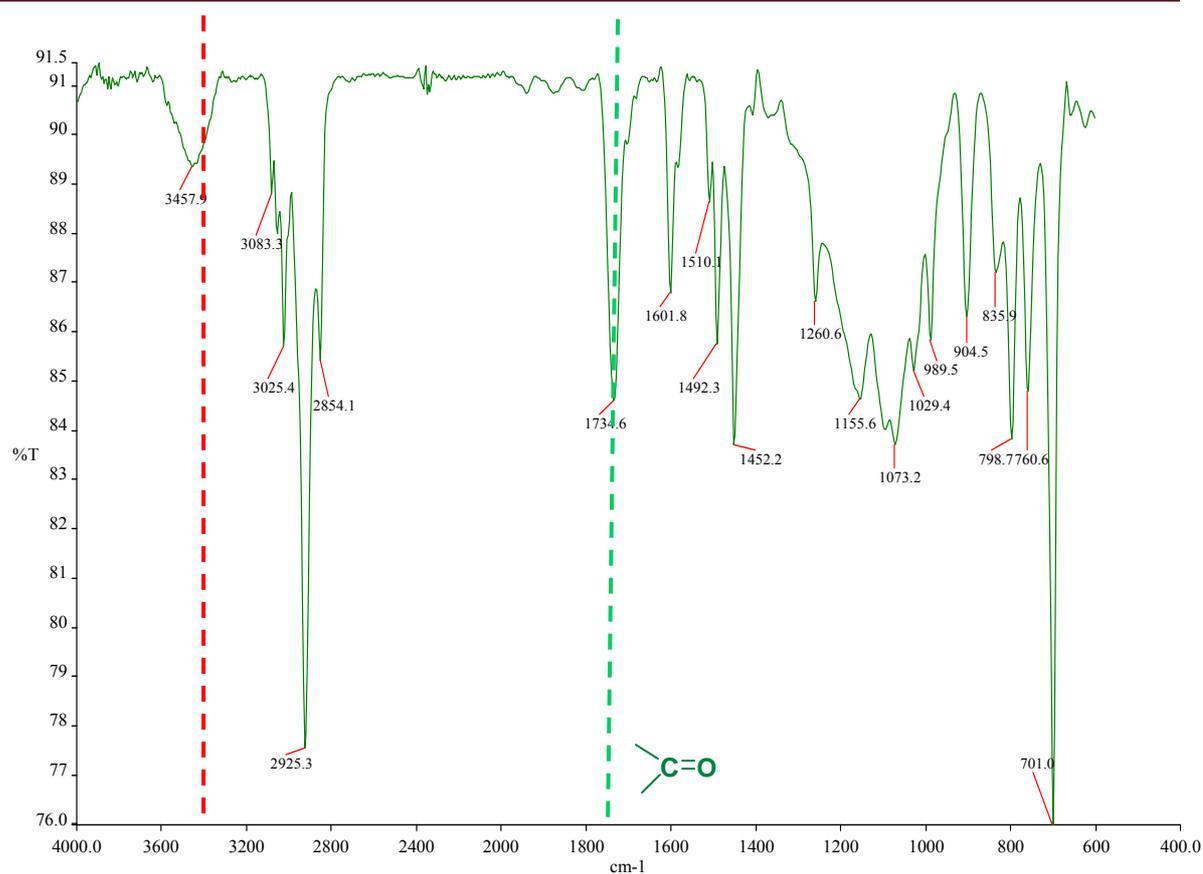


Figure 62: Spectre Infra Rouge du polymère imprimé MIPglu1

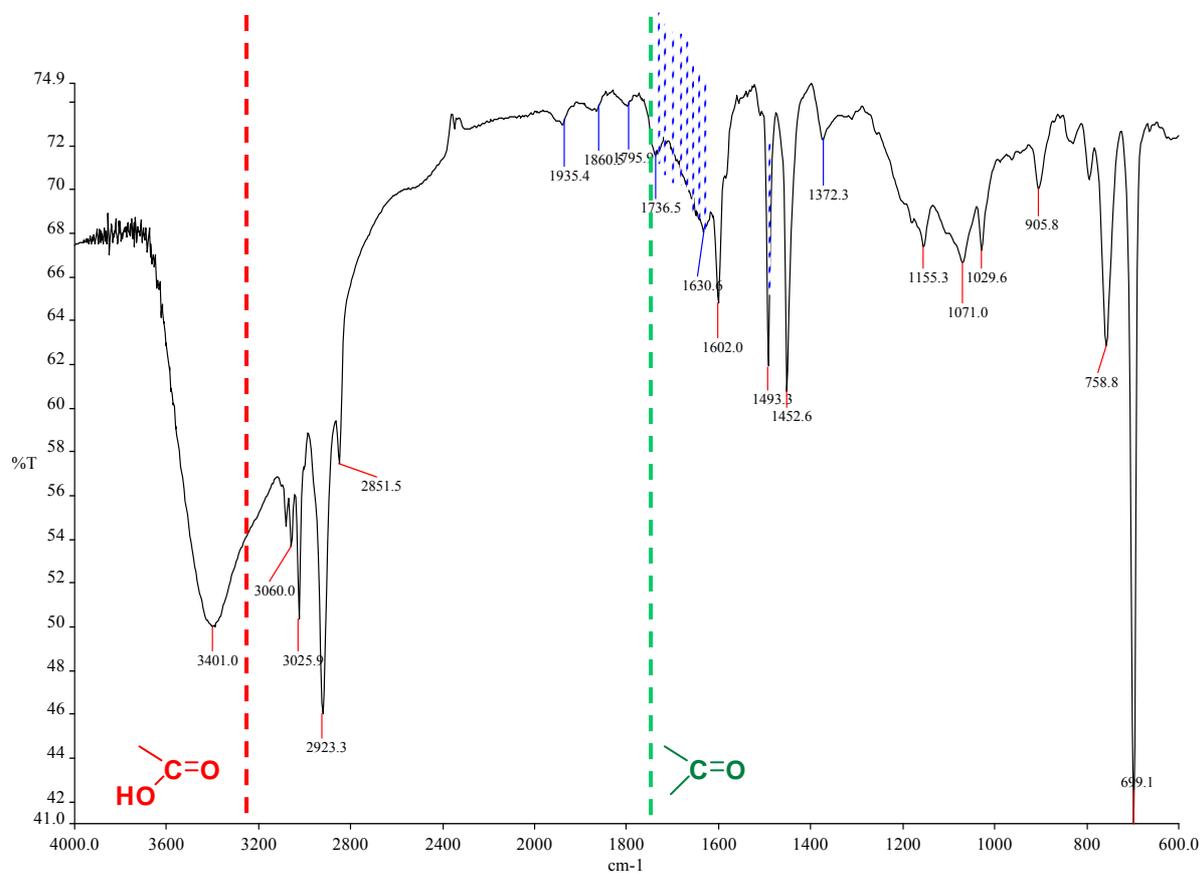


Figure 63: Spectre Infra Rouge du polymère MIPglu1c après extraction du template 5

1.1.4 Préparation des polymères de contrôle

1.1.4.a Influence de la matrice styrène/DVB

Afin d'évaluer et de quantifier le binding non spécifique dû à la matrice polymérique, un premier polymère composé simplement de styrène-DVB (**C1**) a été synthétisé par le même procédé de mini-émulsion « one pot » utilisé pour préparer **MIPglu1** (cf. partie expérimentale XVII)

Ce polymère subi le même work up que le polymère **MIPglu1**, par lavages successifs dans un mélange 1/1 acétone/eau, puis séchage au lyophilisateur.

C1 a été mis en suspension dans le chloroforme, et caractérisé par MET (**Figure 64**).

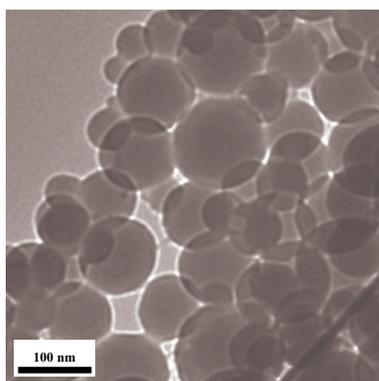


Figure 64: Caractérisation par MET du polymère de contrôle C1, échelle 100 nm

L'aspect général des particules obtenues pour **C1** reste inchangé par rapport à **MIPglu1**. Cependant la distribution en taille semble moins monodisperse que dans le cas de **MIPglu1**.

La mesure de la polydispersité d'une suspension de **C1** dans le chloroforme donne 0,253 avec une population de particule à 154 nm. La valeur de polydispersité est plus élevée que pour **MIPglu1** (polydispersité de 0,154); c'est également ce qui avait été constaté par MET.

Un spectre Infra-Rouge (pastille de KBr ; background effectué au KBr) de ce premier polymère contrôle est, ensuite effectué. A titre de comparaison, les spectres Infra-Rouge des polymères **MIPglu1** et **C1** sont rapportés dans les **Figures 65** et **66**.

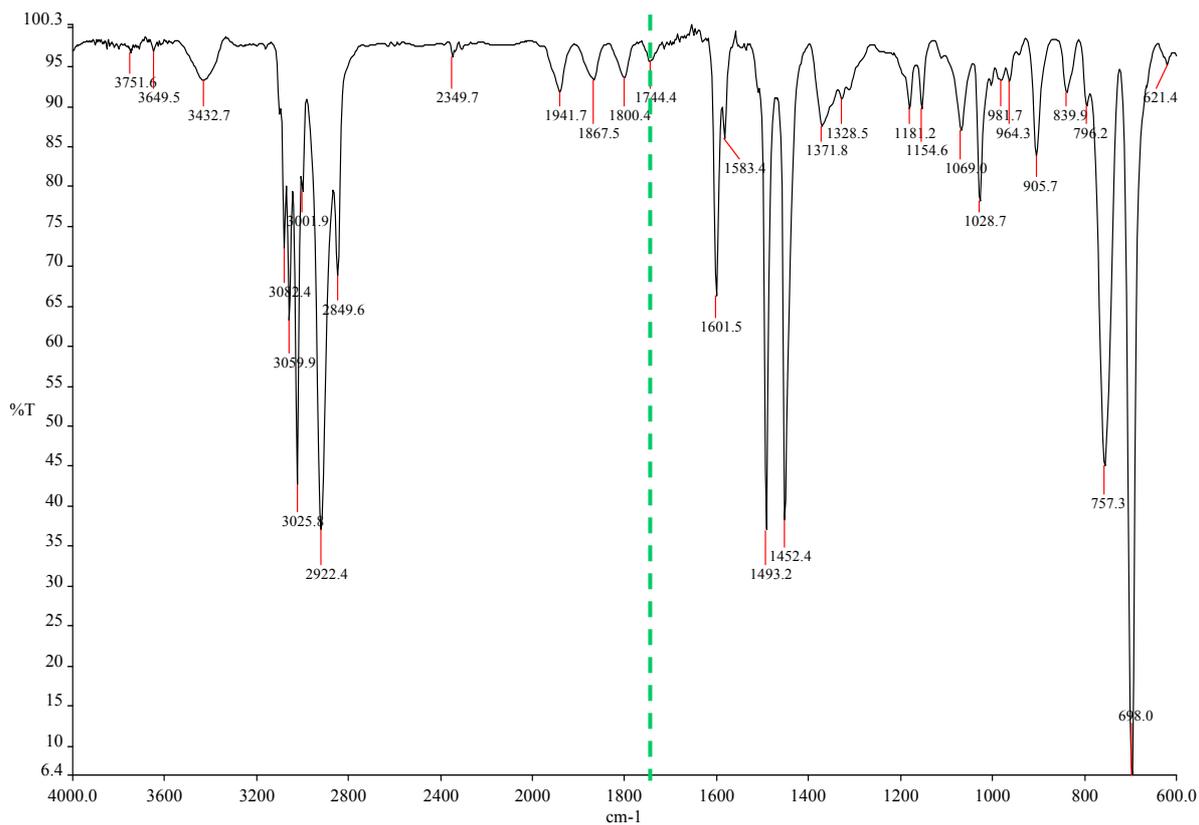


Figure 65: Spectre Infra Rouge du polymère imprimé C1

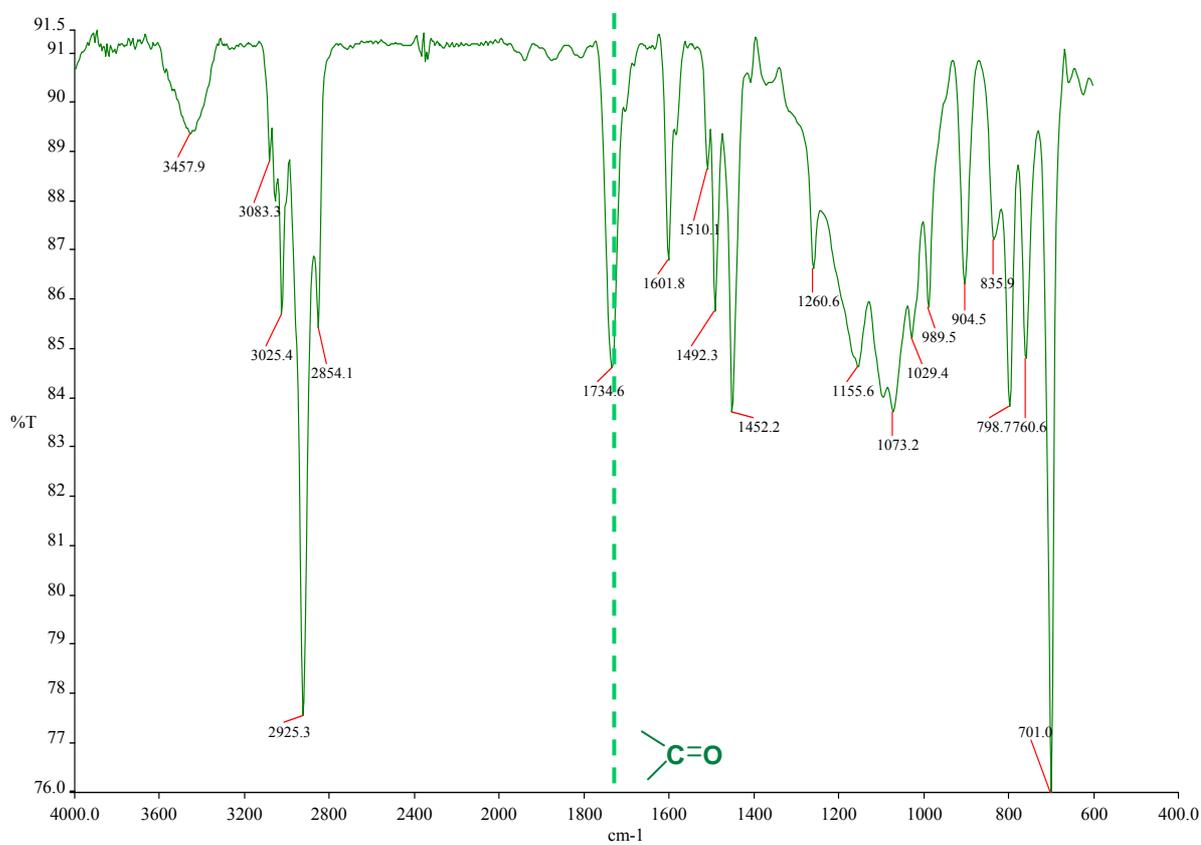


Figure 66: Spectre Infra Rouge du polymère imprimé MIPglu1

La principale différence entre les deux spectres est la présence de la bande d'absorption des fonctions esters à 1734 cm^{-1} dans le spectre Infra-Rouge du polymère imprimé **MIPglu1** (ligne - - - sur les spectres Infra-Rouge).

Ce polymère **C1** a subi le même traitement basique que **MIPglu1**, c'est-à-dire un reflux de 3 jours en présence de 5 M NaOHaq/MeOH.

Un work up similaire à **MIP1gluc**, avec de l'acide chlorhydrique 12 N, lavages successifs avec de l'eau jusqu'à l'obtention d'un pH de 7 a également été mené. Le polymère **C1c** est finalement séché au lyophilisateur (cf. partie expérimentale XIX)

C1c a également été caractérisé par un spectre Infra-Rouge où aucune différence n'est à noter par rapport à **C1**.

I.1.4.b Influence des acides carboxyliques en surface

Afin de quantifier le binding non spécifique dû à la présence des acides carboxyliques en surface, un second polymère (**C2**) a été préparé, de la même manière que **MIPglu1**, par mini-émulsion « one pot » en présence du monomère polymérisable **M1** (**Figure 67**). Afin d'avoir potentiellement le même nombre de fonctions acides carboxyliques à la surface du polymère de contrôle **C2c**, quatre équivalents de monomères **M1** par rapport au template du glucose **5** ont été utilisés et copolymérisés avec le styrène et le DVB. Ce polymère **C2** a subi le même type de work up que **MIPglu1** (cf. partie expérimentale XVII).

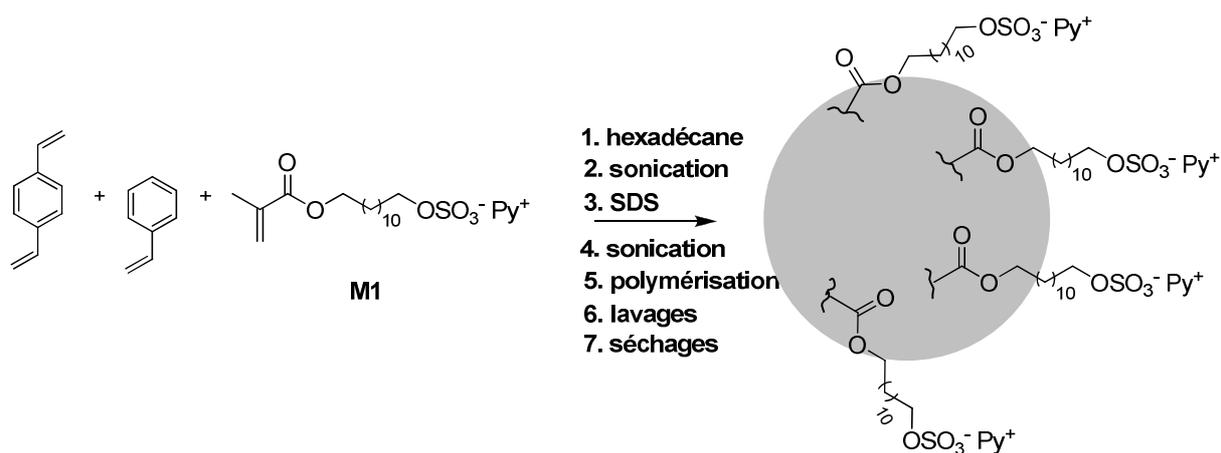


Figure 67: Préparation du polymère de contrôle C2

C2 a été mis en suspension dans le chloroforme, et caractérisé par MET (Figure 68).

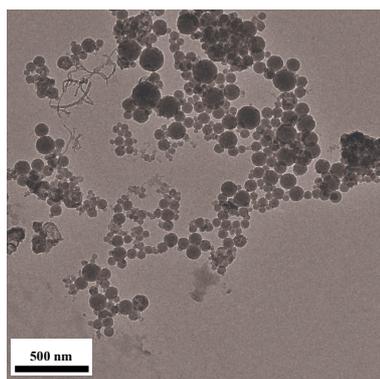


Figure 68: Caractérisation par MET du polymère de contrôle C2, échelle 500 nm

L'aspect des particules de polymère reste inchangé. La distribution en taille des particules varie entre 50 et 200 nm.

La polydispersité a été évaluée par diffusion de la lumière, d'une suspension de C2 dans le chloroforme donne 0,101 avec une population de particule de taille 138 nm, ce qui reste en accord avec les photographies obtenues par MET.

C2 a également été clivé dans les mêmes conditions basiques 5M NaOHaq/MeOH à reflux pendant 3 jours. Le polymère C2c a subi le même work up, par acidification avec de l'acide chlorhydrique 12 N et des lavages successifs pour donner, après lyophilisation, le polymère C2c.

C2c possède une répartition aléatoire de fonctions acides carboxyliques à la surface.

La polydispersité a été évaluée par diffusion de la lumière, d'une suspension de **C2c** dans le chloroforme donne 0,180 avec une population de particule de taille 141 nm.

Un spectre Infra-Rouge (pastille de KBr; background effectué au KBr) de ces polymères **C2** et **C2c** est ensuite effectué.

A titre de comparaison, les spectres Infra-Rouge des polymères **C2** et **C2c** sont rapportés dans les **Figures 69** et **70**.

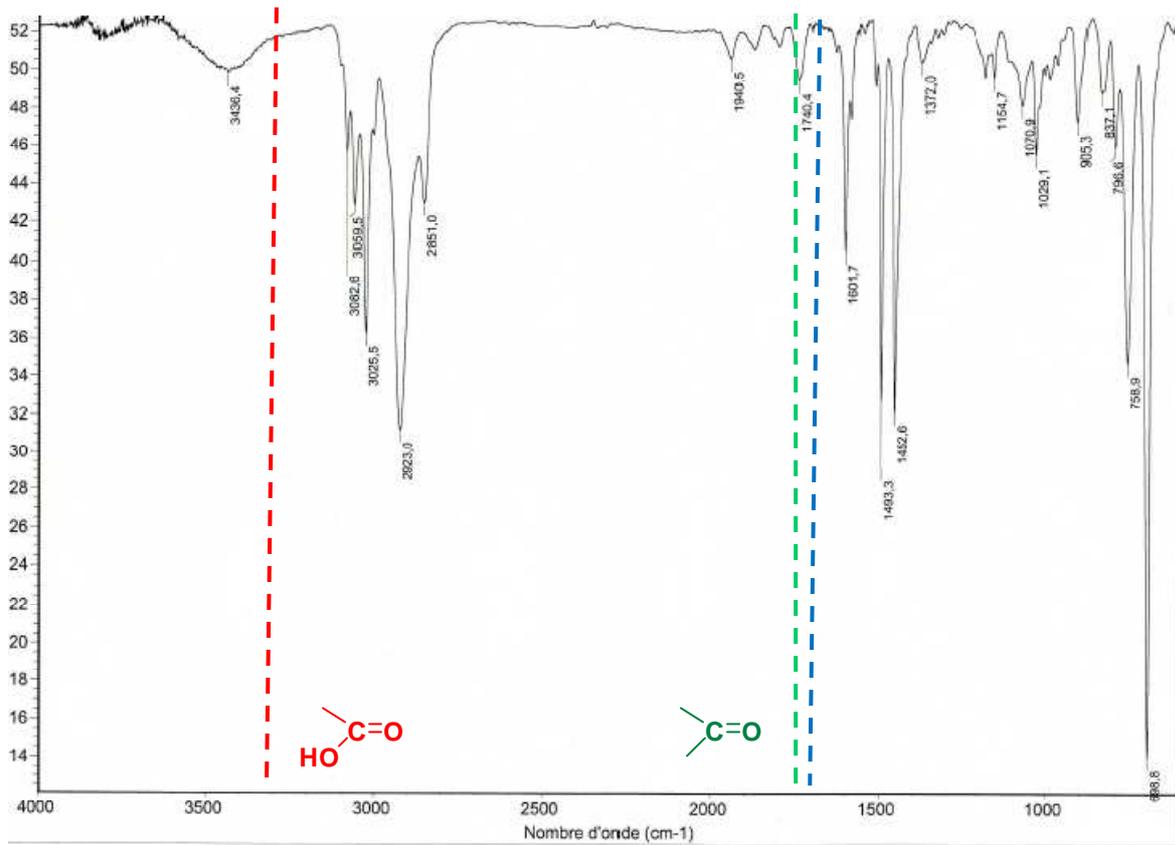


Figure 69: Spectre Infra-Rouge du polymère C2

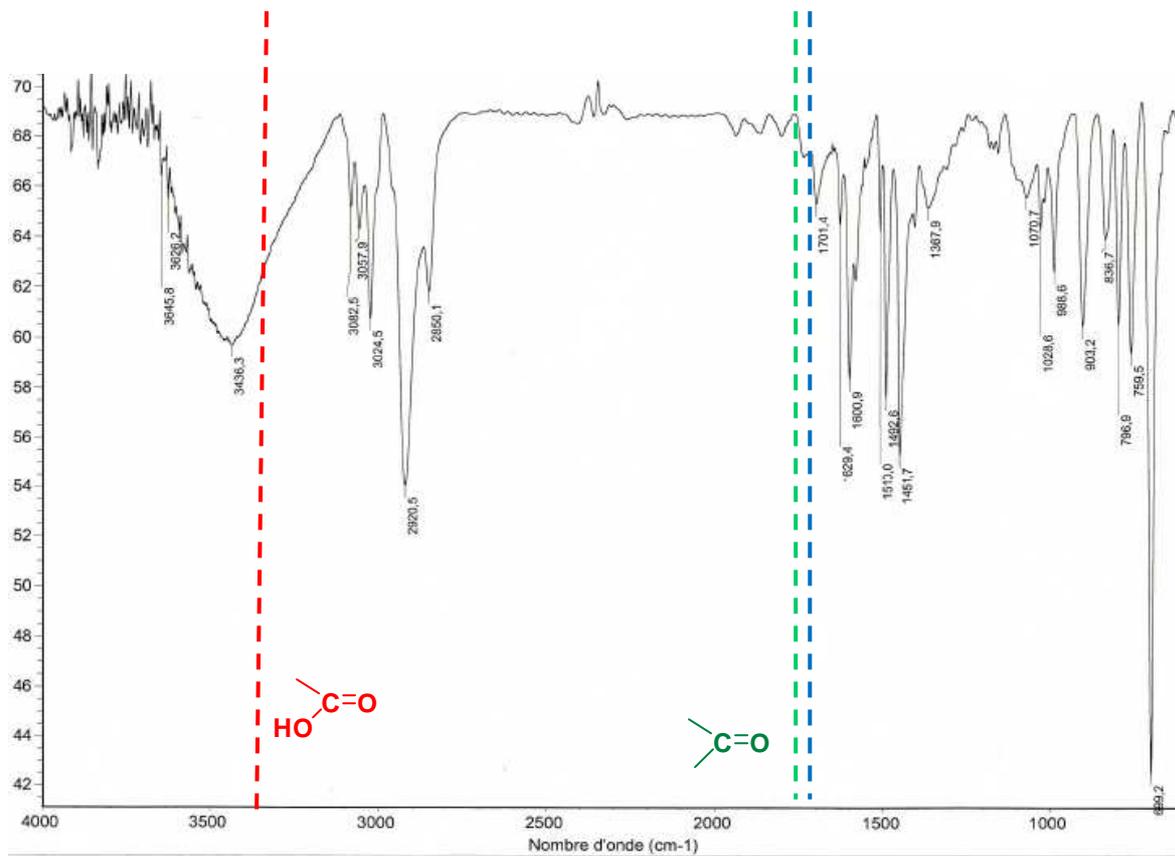


Figure 70: Spectre Infra-Rouge du polymère C2c

L'intensité de la bande d'absorption des fonctions esters à 1740 cm^{-1} , avant clivage, est faible. On constate la disparition de cette bande d'absorption à 1740 cm^{-1} , (ligne - - - sur les spectres Infra-Rouge) après clivage.

L'apparition d'une nouvelle bande d'absorption à 1701 cm^{-1} , attribuée aux fonctions acides carboxyliques, est constatée dans le spectre Infra-Rouge du polymère **C2c** (ligne sur les - - - spectres Infra-Rouge).

De plus, un épaulement est également noté à $\sim 3200\text{ cm}^{-1}$, caractéristique de la présence d'acides carboxyliques (ligne - - - sur les spectres Infra-Rouge).

1.1.5 Etude du binding

La capacité des polymères **MIP1gluc**, **C1c** et **C2c** a été déterminée par la méthode du « batch process ». Différentes concentrations de molécules **52** ont été incubées avec 5 mg de polymère **MIPglu1c**, à $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, dans l'acétonitrile pendant 24 heures (**Figure 71**).

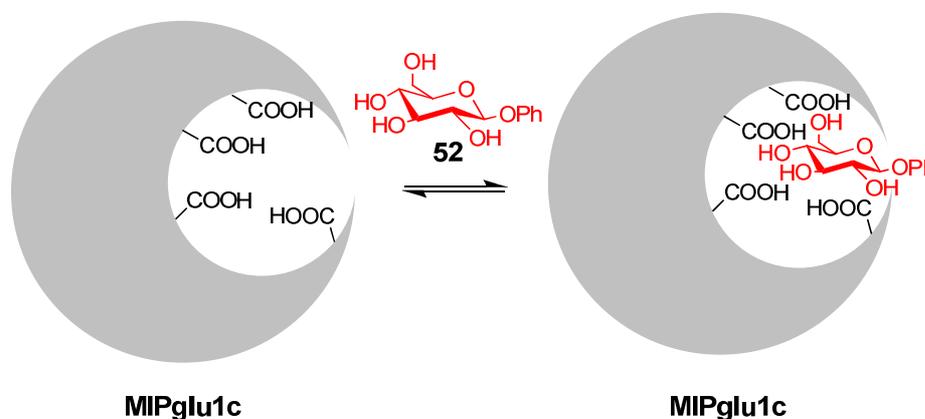
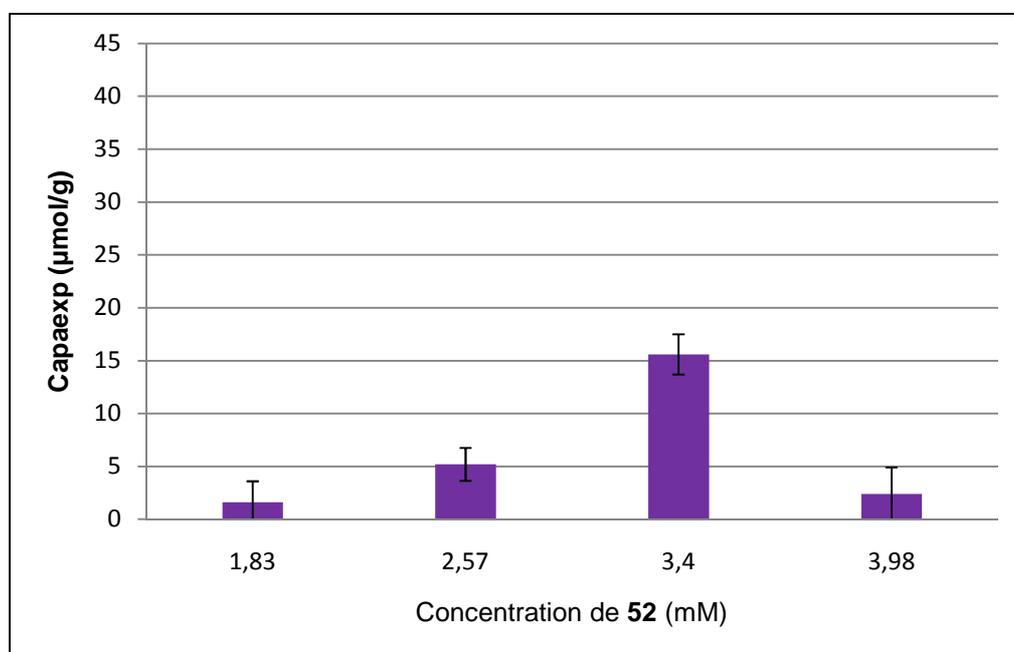
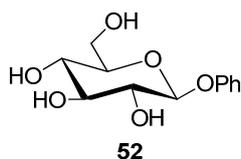


Figure 71: Equilibre de complexation

Avant analyse, le polymère est mis à décanter par centrifugation, pendant 5 min à 14 000 tr/min. Le polymère décanse totalement. Le surnageant est alors prélevé et analysé par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) afin de quantifier le binding.

Une courbe d'étalonnage a été tracée dans une gamme de concentration comprise entre 1,1 mM et 4,4 mM ($r^2 = 0,9999$) La capacité du polymère en $\mu\text{mol/g}$ de polymère, est

déterminée en calculant la différence entre la concentration du composé **52** avant incubation avec le polymère imprimé **MIPglu1c** et celle, dans le surnageant, après 24 heures d'incubation. Les résultats sont représentés sur l'**Histogramme 1**. Chaque point est la moyenne de trois injections successives en CLHP et les barres d'erreurs correspondent aux écart-types sur les trois injections.



Histogramme 1 : Etude de binding du polymère MIP1gluc en présence de l'analyte 52

Le binding atteint un maximum de $15,8 \pm 1,9$ µmol/g de polymère, pour **MIPglu1c**, pour une concentration de 3,40 mM en analyte **52** ($C_{\max}(52)$: concentration pour laquelle le binding maximum est atteint).

La capacité des deux polymères de contrôle **C1c** et **C2c** a été déterminée, dans les mêmes conditions d'incubation que **MIPglu1c**, à une concentration de 3,40 mM en composé **52**, et atteint $0,70 \pm 0,2$ µmol/g pour **C1c** et $1,79 \pm 0,5$ µmol/g pour **C2c**.

De la même façon, la capacité, déterminée à une concentration d'incubation de 3,40 mM en composé **52**, du polymère imprimé **MIPglu1**, avant clivage, est très faible ($< 1 \mu\text{mol/g}$).

Cette première expérience semble indiquer la présence d'un effet d'empreinte. Pourtant, d'après des études menées par Mosbach, la présence de plusieurs fonctions acides carboxyliques dans des cavités entraîne une compression des ces cavités, ce qui empêche la reconnaissance polymère-substrat.⁷⁴ Pour pallier à ce phénomène, Whitcombe a introduit un espaceur dit « sacrifié » pour minimiser cette contraction des cavités.⁶⁵ En l'absence d'espaceur, on pourrait donc s'attendre à une contraction des cavités du polymère imprimé **MIPglu1c** empêchant la reconnaissance de l'analyte **52**.

De plus, l'établissement de liaisons hydrogènes entre les acides carboxyliques et le dérivé **52** nécessite une certaine géométrie dans l'espace qui n'est pas prévue dans la cavité ($\sim 2 \text{ \AA}$ par liaisons hydrogènes) (**Figure 72**).

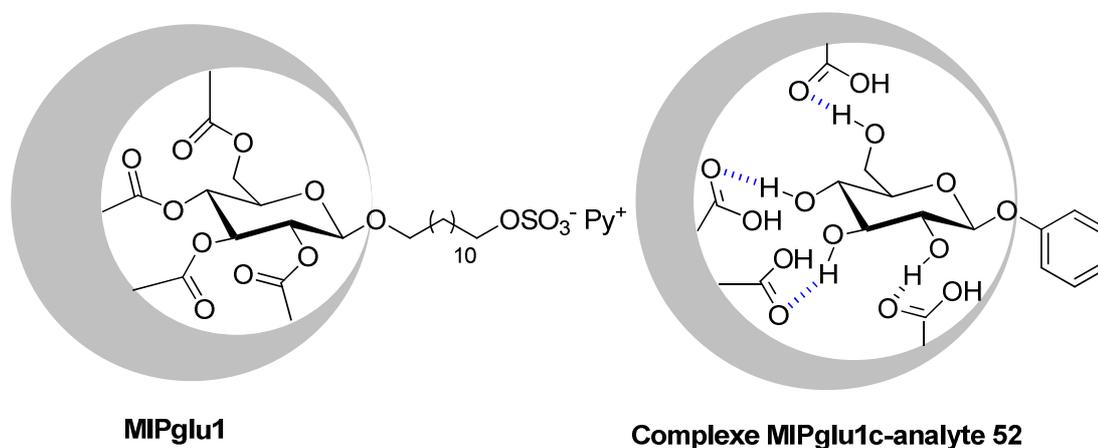


Figure 72: Représentation schématique du polymère imprimé MIPglu1 et du complexe MIPglu1c-analyte 52

Encouragé par ce premier résultat de binding, nous avons poursuivi par des études de sélectivité afin de vérifier si l'effet d'empreinte est réel.

I.1.6 Etude de sélectivité de MIPglu1c

A cette même concentration de 3,40 mM (Cmax (**52**)), les monosaccharides **53**, **54**, **55** et **56** sont incubés pendant 24 heures avec les polymères **MIPglu1c** et **C2c**, dans l'acétonitrile à 10 °C (**Figure 73**). Cette étude va permettre de déterminer la sélectivité du polymère imprimé **MIPglu1c**. Les capacités expérimentales ont été reproduites deux fois, en menant en parallèle deux séries d'incubation sur 5 mg de polymère, à 10 °C, pendant 24 heures d'incubation. Les capacités données sur l'**Histogramme 2** sont la moyenne des deux mesures de capacités expérimentales de chaque série d'incubation. Les barres d'erreurs correspondent donc à un écart-type lié à la reproductibilité.

Une calibration a été effectuée pour chaque analyte **53**, **54**, **55** et **56** pour des gammes de concentrations comprises entre 2,2 et 4,4 mM (*coefficients de corrélation* compris entre 0,9997 et 0,9999).

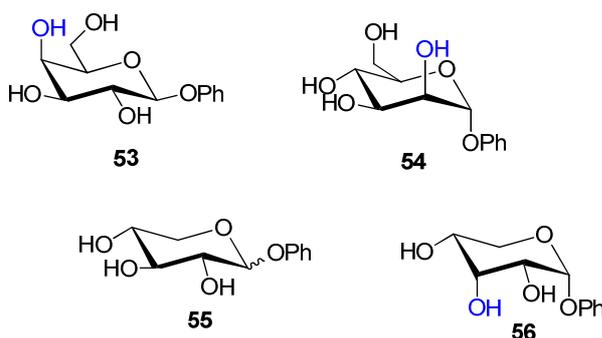
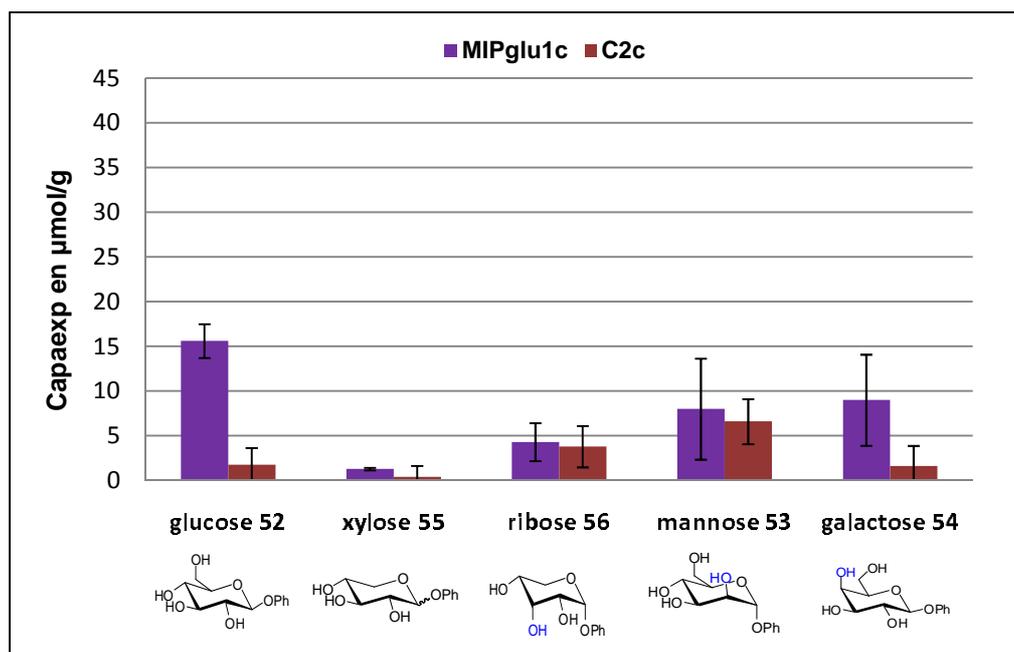


Figure 73: Différents monosaccharides utilisés pour les études de sélectivité avec MIPglu1c



Histogramme 2: Etude de la sélectivité du polymère MIPglu1c

La capacité du polymère imprimé **MIPglu1c** vis-à-vis des dérivés du xylose ($1,5 \pm 1,2 \mu\text{mol/g}$), du ribose ($4,3 \pm 2,4 \mu\text{mol/g}$), du mannose ($8,0 \pm 5,6 \mu\text{mol/g}$) et du galactose ($9,0 \pm 5,1 \mu\text{mol/g}$) est moins élevée que celle observée pour le dérivé **52** du glucose ($15,6 \pm 1,9$). Le polymère imprimé **MIPglu1c** est donc plus sélectif pour le dérivé du glucose **52**, c'est à dire le template ayant servi à synthétiser l'empreinte.

Le polymère de contrôle **C2c** reconnaît plus faiblement le xylose ($0,4 \pm 1,2 \mu\text{mol/g}$) et le galactose ($1,6 \pm 2,3 \mu\text{mol/g}$) que les dérivés du ribose ($3,8 \pm 2,3 \mu\text{mol/g}$) et du mannose ($6,6 \pm 2,5 \mu\text{mol/g}$) qui semblent avoir une plus grande affinité avec **C2c**.

Ces premiers résultats semblent montrer que la présence du groupement hydroxyle primaire en position 6, est nécessaire pour une reconnaissance efficace des analytes par le polymère **MIPglu1c**. En effet, les dérivés du xylose **55** et du ribose **56** se lient nettement moins au polymère **MIPglu1c** par rapport aux dérivés du galactose **53** et du mannose **54**. Il est, par ailleurs, intéressant de noter que le xylose, dont l'orientation des groupements hydroxyles est identique à celui du glucose sans le groupement hydroxyle primaire, est le composé le moins reconnu.

Grâce aux données de l'**Histogramme 2**, nous pouvons calculer des facteurs de sélectivité à Cmax (52) soit 3,40 mM, selon la formule suivante :

$$\alpha_{j,i} = \frac{C_j - C_{nj}}{C_i - C_{ni}}$$

Equation 8

C_j : concentration de glucose liée au polymère imprimé **MIPglu1c**

C_{nj} : concentration du glucose liée au polymère de contrôle **C2c**

C_i : concentration de galactose, mannose, ribose ou xylose liée au polymère imprimé **MIPglu1c**

C_{ni} : concentration du galactose, mannose, ribose ou xylose liée au polymère de contrôle **C2c**

Les facteurs de sélectivité, calculés avec la **Equation 8** sont regroupés dans le **Tableau 30**.

Entrée	Facteurs de sélectivité pour le polymère imprimé MIPglu1c	
1	α glucose-xylose	10,8
2	α glucose-ribose	28,1
3	α glucose-mannose	12,6
4	α glucose-galactose	1,8

Tableau 30 : Facteurs de sélectivité obtenus pour le polymère MIPglu1c à Cmax (52) de 3,40 mM

Nous avons comparé ces facteurs de sélectivité à la littérature. Le groupe de Shimidzu a synthétisé des polymères imprimés avec du glucose, par polymérisation en masse, en mettant en œuvre l'approche non covalente.¹⁴² Les études de binding sont réalisées dans l'acétonitrile pour différents polymères fortement réticulés (74 et 100 % de DVB). Les

facteurs de sélectivité, indiqués dans le **Tableau 31**, sont déterminés par incubations successives des dérivés du glucose, mannose et galactose, en l'absence de réaction de compétition.

Entrée	Facteurs de sélectivité	Polymères imprimés préparés avec	
		100 % DVB	74 % DVB
1	α glucose-galactose	1,2	1
2	α glucose-mannose	1,4	1,2

Tableau 31: Facteurs de sélectivité obtenus par Shimidzu

Le facteur de sélectivité glucose-galactose obtenus dans le cas de **MIPglu1c** est comparable au facteur de sélectivité obtenu par Shimidzu (**Tableau 31**). Par contre, le facteur de sélectivité glucose-mannose est plus élevé pour **MIPglu1c**.

Les polymères synthétisés par Shimidzu (**Tableau 31**) ont été polymérisés en masse dans des matrices fortement réticulées. Pour **MIPglu1c**, obtenu par polymérisation en mini-émulsion, le taux de réticulation est plus faible (20 % DVB). Dans notre cas, la sélectivité pourrait donc probablement encore être améliorée en augmentant le taux de réticulation. Cette étude sera menée dans le paragraphe I.2 du chapitre 3.

Une seconde manière de calculer le facteur de sélectivité fait intervenir le coefficient de partage K_p défini comme étant le rapport de la concentration de ligand lié dans le polymère et la concentration de ligand libre en solution après incubation.¹⁰⁷

$$K_P = \frac{C_j}{F}$$

Equation 6

C_j : concentration de glucose liée au polymère imprimé **MIPglu1c** (μmol/g)

F : concentration de glucose libre après incubation (mM)

Les coefficients de partage, calculés avec l'**Equation 6**, sont donnés dans le **Tableau 32**.

Entrée		Coefficients de partage μmol.mM ⁻¹ /g de polymère
1	Glucose	4,68
2	Xylose	0,40
3	Ribose	1,42
4	Mannose	2,65
5	Galactose	2,78

Tableau 32 : Coefficients de partage obtenus pour le polymère imprimé **MIPglu1c**

Le facteur de sélectivité est alors déterminé comme étant le rapport des deux coefficients de partage K_{p1} et K_{p2}, K_{p1} étant le coefficient de partage du glucose et K_{p2} celui du galactose, mannose, ribose ou xylose. Ils sont reportés dans le **Tableau 33**.

Entrée	Facteurs de sélectivité pour le polymère imprimé MIPglu1c	
1	α glucose-xylose	11,7
2	α glucose-ribose	3,3
3	α glucose-mannose	1,7
4	α glucose-galactose	1,7

Tableau 33: Facteurs de sélectivité obtenus à l'aide des coefficients de partage pour **MIPglu1c**

Les facteurs de sélectivité obtenus, l'Equation 8, d'une part, et en passant pas le calcul des coefficients de partage d'autre part, sont différents. L'Equation 8 tient compte de la reconnaissance du polymère de contrôle **C2c** ; les facteurs de sélectivité déterminés par l'Equation 8 sont donc plus élevés que ceux déterminés par le calcul des coefficients de partage.

Il est également intéressant de calculer le facteur d'empreinte, appelé I est défini comme le rapport du coefficient de partage du dérivé du glucose **52** avec le polymère imprimé **MIPglu1c** et le coefficient de partage du composé **52** avec le polymère de contrôle **C2c**.¹¹²

$$I = \frac{K_{PMIP1c}}{K_{C2c}}$$

Equation 7

Pour le polymère imprimé **MIPglu1c**, le facteur d'empreinte est de 9,2.

Ce facteur n'ayant pas été calculé par les auteurs de publication sur les empreintes moléculaires, il a été difficile de la comparer à d'autres polymères imprimés.

Le groupe de Cheong a utilisé ce facteur d’empreinte pour caractériser des polymères imprimés avec des stéroïdes, synthétisés par une polymérisation en masse par l’approche non covalent.¹⁸¹ Les facteurs d’empreintes déterminés sont compris entre 1,1 et 4,1.

Notre facteur d’empreinte est donc plus élevé. Ceci étant probablement dû à la faible reconnaissance non spécifique observée avec le polymère de contrôle **C2c**. L’approche non covalente est effectivement connue comme induisant une reconnaissance non spécifique élevée ce qui diminue le facteur d’empreinte (cf. chapitre 1, VI.4).

1.1.7 Post fonctionnalisation et inhibition du binding

Afin de montrer l’importance des acides carboxyliques dans l’équilibre de complexation entre l’analyte **52** et le polymère imprimé **MIPglu1c**, une réaction d’estérification des acides carboxyliques des cavités de reconnaissance, a été effectuée en présence de trimethylsilyldiazométhane (2 éq par –COOH théorique) dans un mélange méthanol/toluène. L’ajout du trimethylsilyldiazométhane est effectué à 0 °C puis le milieu réactionnel est agité pendant 2 heures en laissant revenir lentement à température ambiante.

Après une première décantation du polymère, deux lavages dans un mélange acétonitrile/eau sont réalisés. Le polymère est ensuite évaporé à l’étuve et séché au lyophilisateur.

5 mg de ce polymère ainsi traité ont ensuite été mis en contact, selon la méthode du « batch process », avec la molécule **52**, à une concentration de 3,30 mM, à 10 °C, pendant 24 heures.

Avant traitement avec le triméthylsilyldiazométhane, la capacité du polymère **MIPglu1c** était de 15,8 µmol/g de polymère ; après traitement, la capacité du polymère est très faible (< 1-2 µmol/g).

Ce résultat montre que la nature des interactions entre le polymère **MIPglu1c** traité et l’analyte **52** a changé. Les acides carboxyliques ont donc été estérifiés. Cette inhibition du binding de l’analyte **52** avec **MIPglu1c** estérifié montre l’importance des acides carboxyliques dans la reconnaissance polymère-substrat. L’inhibition des liaisons hydrogènes empêche donc la reconnaissance polymère-substrat.

Nous avons ensuite cherché à déterminer l'influence du groupement en position anomérique de l'analyte sur la reconnaissance polymère-substrat.

1.1.8 Influence du groupement présent en position anomérique dans la reconnaissance polymère-substrat

Afin d'évaluer l'influence du groupement de l'analyte en position anomérique sur la reconnaissance polymère-substrat, les composés **90**, **92** et **93** ont également été synthétisés par la même voie de synthèse que le composé **52**, par glycosylation directe en présence de thiophénol et déprotection dans les conditions de Zemplén pour les composés **90** et **92**, sauf pour le composé **93** (Figure 74).

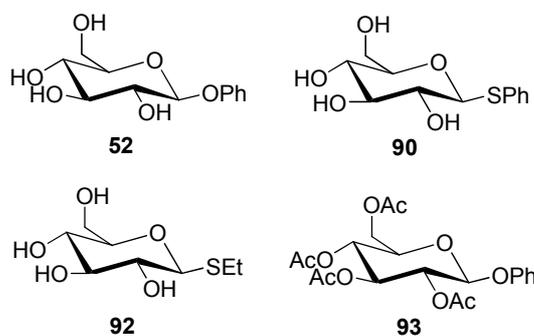


Figure 74: Différents monosaccharides utilisés dans le binding

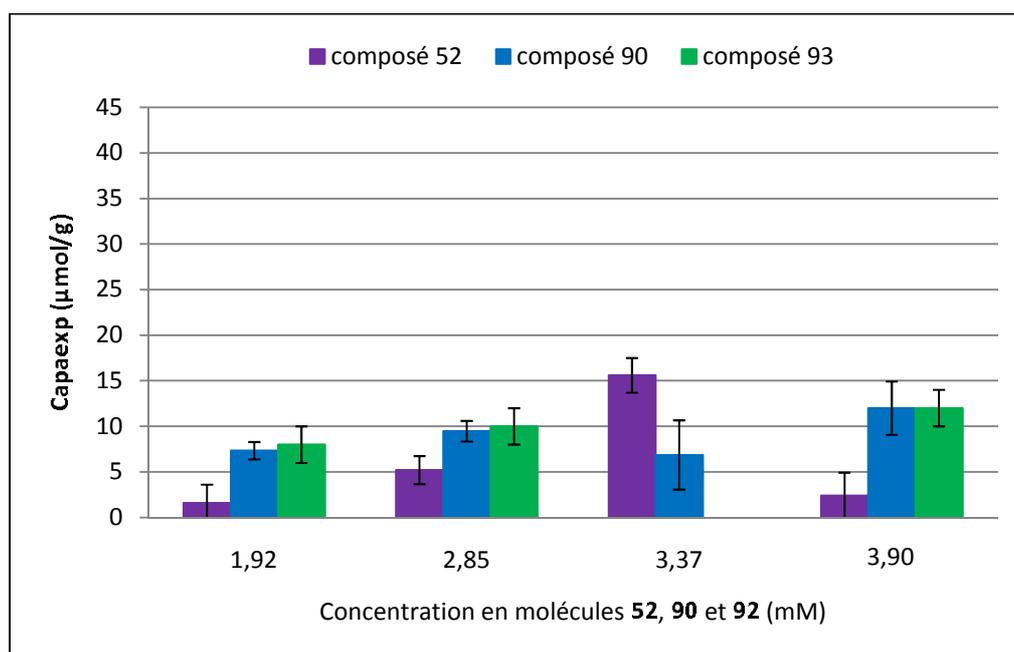
Par le biais de ces quatre monosaccharides, on pourra tester :

- l'influence de l'hétéroatome en position anomérique en comparant le binding des composés **52** et **90**
- l'influence du groupement aromatique en position anomérique en comparant le binding des composés **90** et **92**
- l'influence d'interactions purement hydrophobes en comparant le binding des composés **52** et **93**

Tous les composés **90**, **92** et **93** ont été mis en contact, par la méthode du « batch process » avec le polymère **MIPglu1c**, à 10 °C, pendant 24 heures. Une droite d'étalonnage a été effectuée pour chaque composé, pour des gammes de concentrations comprises entre 1,1

et 4,8 mM ($0,984 < r^2 < 0,998$). Les droites d'étalonnage obtenues ont des coefficients de corrélation plus faibles que précédemment, ce qui est probablement dû à un problème de solubilité pour le composé **92** (solution mère légèrement trouble). Aucun problème de solubilité n'a par contre été constaté pour les composés **92** et **93**. Les erreurs sont liées à la moyenne de trois injections successives en CLHP.

Les résultats sont donnés dans l'**Histogramme 3**.



Histogramme 3 : Etude de binding des différents monosaccharides 52, 90 et 93 avec MIPglu1c

Le binding maximal de l'analyte **90** est d'environ $12,0 \pm 2,9$ µmol/g, et celui du dérivé **52**, de $15,8 \pm 1,9$ µmol/g. L'hétéroatome en position anomérique ne semble avoir que peu d'influence sur la complexation **MIPglu1c**-substrat.

Le binding du composé **92** est très faible quelle que soient les concentrations testées (< 1 µmol/g). En comparaison, le binding de l'analyte **90** est d'environ $12,0 \pm 2,9$ µmol/g. Il semble donc que le groupement aromatique joue un rôle dans la reconnaissance polymère-substrat, probablement par π -stacking.

Le binding du composé **93**, semble confirmer cette hypothèse. En effet, en l'absence de liaisons hydrogènes, la reconnaissance du composé **93** par le polymère imprimé **MIPglu1c**

n'est pas nulle. La courbe de binding du composé **93** avec **MIPglu1c** est, par contre, linéaire. Il semble donc que le composé **93** se lie au polymère imprimé **MIPglu1c** que de manière non spécifique (cf. chapitre 1, VII.1, page 197) en l'absence de liaisons hydrogènes possibles avec les acides carboxyliques présents dans les cavités.

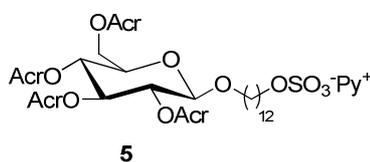
Afin de vérifier les hypothèses avancées sur le binding non spécifique par π -stacking, le polymère de contrôle **C1c** a été mis en présence du composé **93**, par la méthode du « batch process », à 10 °C, pendant 24 heures d'incubation. Sur deux séries d'incubations menées en parallèle, les variations entre la concentration avant incubation et après incubation sont très faibles (< 1-2 $\mu\text{mol/g}$). La reconnaissance par interactions de type π -stacking n'est donc pas confirmée dans le cas du polymère de contrôle **C1c**.

Nous ne sommes donc pas en mesure de conclure sur le type d'interaction qui intervient dans le binding entre **C1c** et le composé **93**.

1.1.9 Tentative de quantification du template dans le processus polymérisation/clivage

Nous avons cherché à suivre, de manière générale, le devenir du template au cours du processus de polymérisation/clivage. Pour cela, nous avons envisagé d'introduire un traceur hétéroatomique afin de quantifier le template après polymérisation et après clivage.

Dans un premier temps, nous avons cherché à quantifier le soufre, présent sur le template **5** de la fonction O-sulfonate.



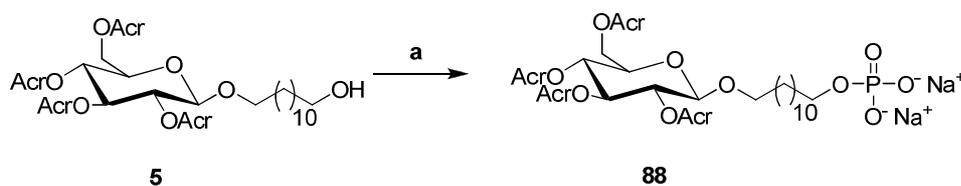
Une analyse élémentaire du soufre, sur le polymère **C1c** (polymère de contrôle basé sur une matrice styrène/DVB), montre la présence d'une quantité importante de soufre, de l'ordre de 1540 - 2000 ppm (par rapport à une quantité théorique de 4630 ppm). Ce soufre provient du SDS, encore présent à la surface malgré les lavages successifs avec de l'eau. Il est

en effet très difficile d'enlever la totalité du SDS en surface de particules préparées par émulsion, sauf par des dialyses très poussées.

Il n'est donc pas possible de distinguer le soufre provenant du SDS d'une part et de la fonction O-sulfonate du template **5** d'autre part.

Nous avons donc décidé de changer de traceur hétéroatomique. La fonction polaire O-sulfonate a été remplacée par une fonction O-phosphate afin de réaliser des analyses élémentaires du phosphore, utilisé comme traceur. Cela nous permettra de savoir le devenir du template au cours du processus de polymérisation et de clivage. Des analyses élémentaires du soufre pourront également être réalisées pour quantifier le SDS présent à la surface du polymère, résultant du SDS.

Pour ce faire, nous avons réalisé la synthèse du template **88** à partir du composé **5** :



a) POCl₃ puis NaOHaq, 85 %

Schéma 17: Synthèse du template 88

Ce template **88** a été polymérisé par mini-émulsion « one pot », dans les mêmes conditions que le polymère **MIPglu1**, soit 20 % de DVB, avec une capath fixée à 46 μmol/g (cf. I.1.2).

Expérimentalement, une prise en masse du milieu de polymérisation a été constatée contrairement à **MIPglu1**. Un volume d'acétone a été additionné et des lavages successifs dans un mélange 1/1 actéone/eau ont été réalisés (5 fois). Le polymère imprimé **P1** est récupéré après séchage au lyophilisateur.

Une suspension de ce polymère **P1**, dans le chloroforme, a été analysée par MET (**Figure 75**). Il a été très difficile d'obtenir des photographies nettes des particules car elles semblent toutes agrégées.

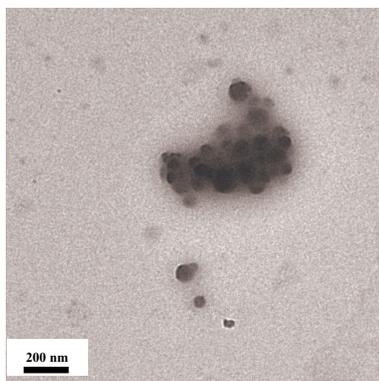


Figure 75 : Caractérisation par MET du polymère P1, échelle 200 nm

La polydispersité d'une suspension de polymère, dans l'éthanol, est de 1,00 ce qui confirme la difficulté de mettre le polymère en suspension et donc de l'analyser par MET.

Le clivage de ce polymère **P1** est réalisé dans les mêmes conditions que précédemment c'est-à-dire 3 jours à reflux dans un mélange 5M NaOHaq/MeOH (cf. I.1.3). Après acidification avec de l'acide chlorhydrique 12 N, des lavages avec de l'eau et un séchage au lyophilisateur, le polymère **P1c** est obtenu.

Un spectre Infra-Rouge (neat) a été effectué sur les polymères **P1** et **P1c** (**Figures 76** et **77**).

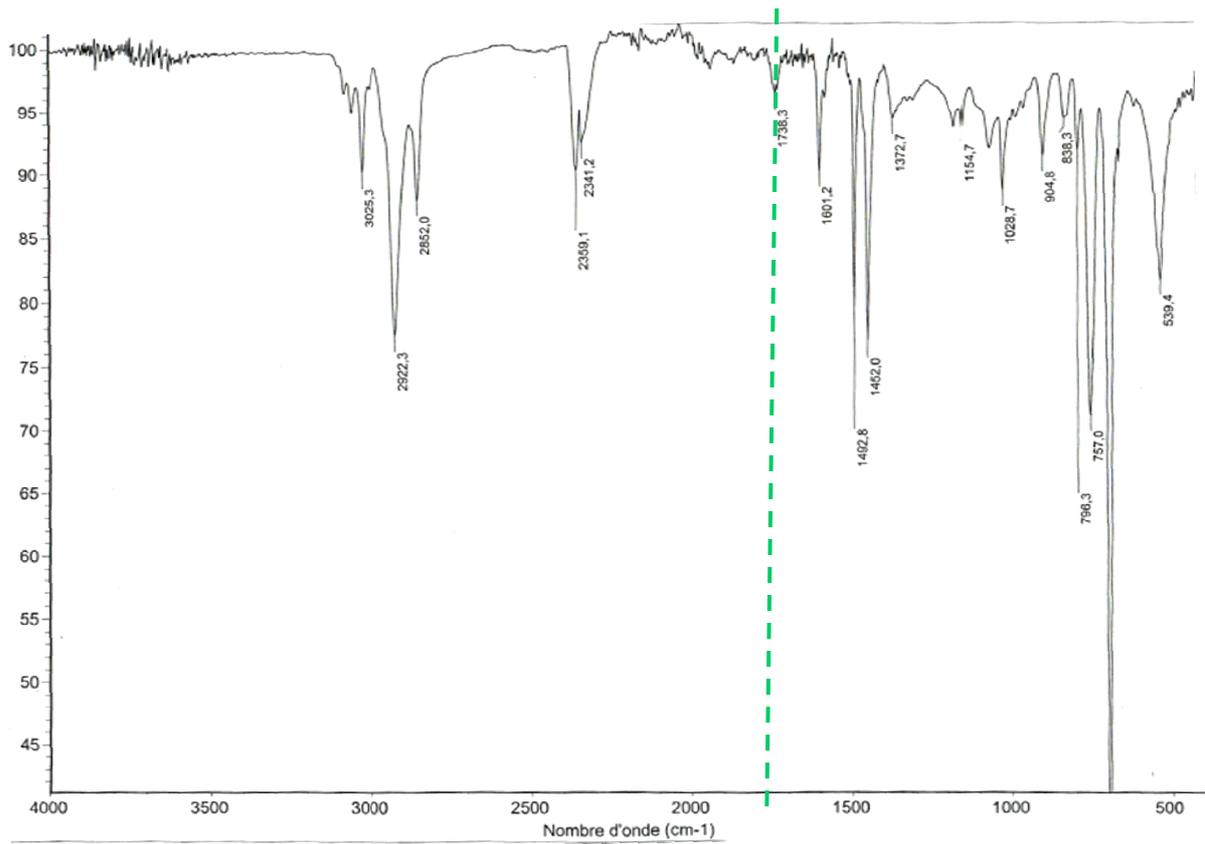


Figure 76: Spectre Infra-Rouge de P1

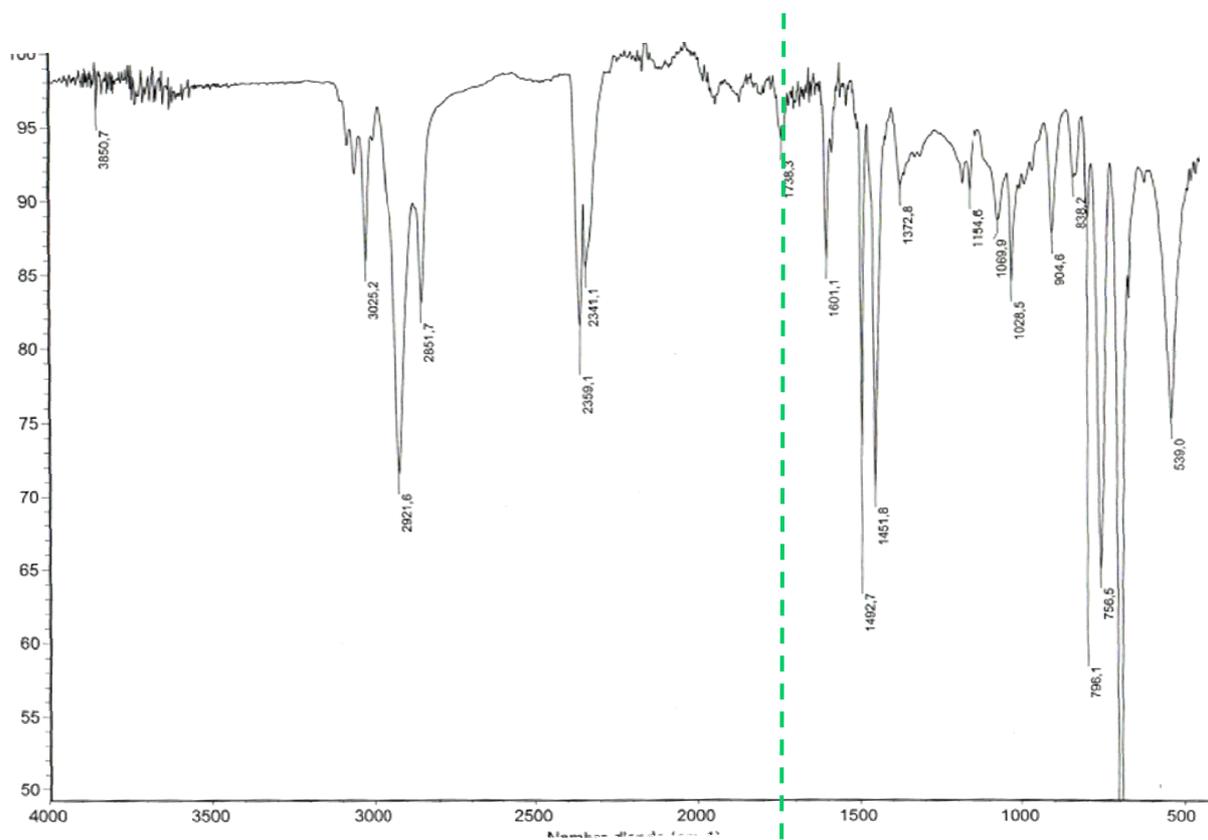


Figure 77: Spectre Infra-Rouge du polymère P1c

Avant clivage, donc pour **P1**, l'apparition de la bande d'absorption des fonctions esters à 1736 cm^{-1} montre l'incorporation de manière covalente du template **88** dans la matrice polymérique.

Par contre, aucune différence n'est à noter entre le spectre Infra-Rouge avant et après clivage. La bande d'absorption des fonctions esters à 1736 cm^{-1} ne semble pas avoir diminué d'intensité par rapport à la bande d'absorption à 1601 cm^{-1} . De plus aucun changement n'est apparu dans la zone entre 1654 et 1700 cm^{-1} , ni dans la zone à 3200 cm^{-1} (bandes d'absorption des acides carboxyliques).

A la vue de ces premiers résultats, il semble que le clivage n'a pas été efficace.

Afin d'évaluer l'efficacité du clivage, des analyses élémentaires du phosphore et à titre indicatif du soufre, sont ensuite réalisées sur **P1** et **P1c** ; les résultats sont regroupés dans le **Tableau 34**.

Entrée	Polymères	Quantité théorique (ppm)		Analyse élémentaire (expérimentale) (ppm)		Capaexp ($\mu\text{mol/g}$) pour 52
		soufre	phosphore	du soufre	du phosphore	
1	P1	4630	1533	1700	1800	13,2
2	P1c	4630	920 ^a	<2000	1700	17,6
3	C1	4630	-	<2000	-	0,7

^a Quantité déterminée d'après les expériences de binding à 24 heures

Tableau 34: Analyses élémentaires du soufre et du phosphores des polymères P1 et P1c, C1

Rappel : **C1** est le polymère de contrôle basé sur une matrice styrène/DVB pure.

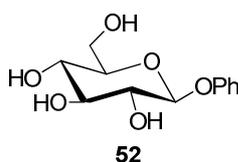
Remarque : les analyses élémentaires n'ont été réalisées qu'une seule fois par échantillon et par élément. La précision de la mesure dépend des appareillages et de la méthode utilisée.

La quantité mesurée de phosphore avant clivage de **P1** est proche de la quantité de phosphore après clivage (**Tableau 34, entrée 2**). Ce résultat confirme donc que l'extraction du template **88** n'a pas été efficace, ce qui est en accord avec les résultats de binding et les spectres Infra-Rouge avant et après clivage.

Par ailleurs, les analyses élémentaires du phosphore indiquent que l'incorporation du template **88** dans la matrice est élevée. La différence entre la quantité théorique et expérimentale de phosphore peut être due aux erreurs de mesure d'une part et à une polymérisation partielle du styrène/DVB d'autre part, augmentant la quantité de phosphore présente par unité de masse. Le spectre Infra-Rouge du polymère **P1** (**Figure 77**) montrait pourtant une bande d'absorption correspondant aux fonctions ester à 1738 cm^{-1} de faible intensité.

De plus, les analyses élémentaires du soufre révèlent un pourcentage de soufre inférieure à 43 %, par rapport à la quantité de soufre initialement introduite.

Des expériences de binding des polymères **P1** et **P1c** sont réalisées, après 24 heures d'incubation, à $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans l'acétonitrile avec le dérivé **52**.



Le binding maximum de **P1c** est $17,6 \pm 2,0\text{ }\mu\text{mol/g}$ pour une concentration de $3,51\text{ mM}$ en composé **52** et celui du polymère **P1** atteint $13,2 \pm 1,9\text{ }\mu\text{mol/g}$ pour la même concentration en analyte **52**.

Ceci est sensiblement en accord avec les résultats des analyses élémentaires. Le clivage n'a donc pas été efficace et le binding de l'analyte **52** n'est probablement dû qu'à de la reconnaissance non spécifique.

La difficulté rencontrée lors du clivage du template **88** n'a pas pour l'instant été expliquée. Nous n'avons donc pas poursuivi dans cette voie.

Cette étude n'a pas permis de conclure quant à la tracabilité du template **88** dans le processus polymérisation/extraction.

Cette étude a, cependant, permis de montrer l'influence de groupements chargés négativement à la surface des polymères imprimés sur la reconnaissance non spécifique. Il semble également que l'incorporation du template **88** dans la matrice polymérique, est quantitative.

1.1.10 Conclusion 1 :

Nous avons donc synthétisé un polymère imprimé du glucose, avec 20 % de DVB et une capacité de 46 $\mu\text{mol/g}$ qui reconnaît sélectivement le dérivé du glucose **52**, avec une capacité de $15,8 \pm 1,9 \mu\text{mol/g}$. Des facteurs élevés de sélectivité glucose-xylose et glucose-ribose ont été obtenus.

La présence des acides carboxyliques est indispensable dans le processus de reconnaissance polymère-substrat. Ceci a été mis en évidence par l'estérification de ces mêmes fonctions acides, qui a entraîné une inhibition du binding. Des études plus approfondies doivent être menées pour conclure réellement sur les interactions polymère-analyte.

Des difficultés de clivage ont été mises en évidence sur les polymères imprimés synthétisés avec le template phosphoré **88**. Une étude plus approfondie du clivage doit être menée.

La présence de la tête O-phosphate a permis de mettre en évidence l'effet de groupements chargés négativement, à la surface des polymères imprimés, sur la reconnaissance non spécifique. De la même façon, il semble que le polymère de contrôle **C2c** basé sur des acides carboxyliques à la surface, est plus d'affinité pour les dérivés du ribose et du mannose.

Il n'a pas été possible de conclure sur la quantité de template incorporé dans la matrice polymérique. Il semble que la polymérisation du template **88** est quantitative. Nous considérerons, dans la suite de nos études, que la polymérisation des templates de mono- et de disaccharides est quantitative.

L'étude cinétique et le tracé de l'isotherme d'absorption, menés par Pasquale Curcio, a montré, par le traitement des données avec le modèle de Bi-Langmuir, que les sites de binding sont hétérogènes. Deux populations de sites, respectivement à haute et basse affinité, ont été caractérisées (cf. Thèse de Pasquale Curcio)

Après avoir vérifié l'effet d'empreinte en comparant la capacité du polymère imprimé **MIPglu1c** et du polymère de contrôle **C2c** et caractérisé ses sites de binding et sa sélectivité, dans la partie I.2 du chapitre 3, nous avons décidé de procéder à une optimisation de la formulation des polymères imprimés avec un dérivé de glucose.

I.2 Optimisation de la formulation des polymères imprimés avec un dérivé de glucose

I.2.1 Paramètres étudiés

D'après la littérature, deux paramètres semblent jouer un rôle majeur dans la préparation de polymères imprimés :

- le pourcentage de template (T) présent dans la matrice qui influence la capacité expérimentale de l'empreinte.
- le taux d'agent de réticulation (en %) qui influence la structure de la matrice polymérique et donc probablement sa sélectivité

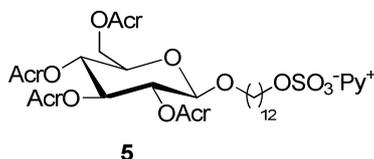
Une optimisation de la formulation des polymères a donc été menée sur le polymère imprimé avec du glucose.

Les pourcentages de DVB et la quantité de SDS sont calculés par rapport à la masse de template introduite dans le milieu de polymérisation.

La capacité et la sélectivité ont été testées pour différentes capacités théoriques (7, 15, 46 et 88) et différents pourcentages de DVB (20, 58 et 80 %) (**Tableau 35**).

Remarque : tous les polymères de la série à 20 % de DVB seront notés en violet, ceux de la série à 58 % de DVB en vert et pour la série à 80 % de DVB en bleu. Un dégradé de couleur sera appliqué en fonction de la capacité théorique des polymères imprimés (**Tableau 35**)

Tous les polymères sont synthétisés par mini-émulsion « one pot » (cf. chapitre 3, I.1.2) avec le template **5** et certains polymères ont été synthétisés deux fois, en parallèle afin de vérifier la reproductibilité des résultats.



Capath ($\mu\text{mol/g}$)	7	15	46	88
%DVB				
20	MIPglu2c MIPglu3c	MIPglu8c MIPglu9c	MIPglu1c	MIPglu14c
58	MIPglu4c MIPglu5c	MIPglu10c	MIPglu12c	MIPglu15c
80	MIPglu6c MIPglu7c	MIPglu11c	MIPglu13c	MIPglu16c

Tableau 35: Différents lots de polymères imprimés avec un dérivé de glucose

Pour une capacité théorique de 88 $\mu\text{mol/g}$, la solubilisation du template **5** dans le mélange styrène/DVB devient difficile. Il est nécessaire de soniquer au moins 5 minutes pour solubiliser l'ensemble du template.

De manière générale, tous les polymères dont la capacité théorique est de 7 $\mu\text{mol/g}$, ont pris en masse au cours de la polymérisation. Le même constat a été fait pour tous les polymères avec 80 % de DVB.

Pour tous les autres polymères imprimés, un latex est récupéré après les 20 heures de polymérisation.

La décantation est souvent difficile et une grande partie du polymère reste en suspension.

Tous ces polymères ont subi un work up identique à **MIPglu1** (chapitre 3, I.1.2), par ajout d'un volume d'acétone, décantation, lavages successifs dans un mélange 1/1 acétone/eau (5 fois) et séchage au lyophilisateur.

Tous les polymères ont été clivés, comme précédemment (chapitre 3, I.1.3) dans un mélange 5 M NaOH/MeOH, à reflux pendant 3 jours. Un work up identique a été mené par acidification avec de l'acide chlorhydrique 12 N, puis lavages à l'eau jusqu'à l'obtention d'un pH de 7.

Afin de faciliter la lecture des résultats, tous les polymères de la série à 20 % de DVB seront en violet dans les histogrammes, ceux de la série à 58 % de DVB en vert et ceux de la série à 80 % de DVB en bleu.

La capacité théorique sera notée $capath$ et celle déterminée expérimentalement par les expériences de binding $capaexp$.

La concentration en dérivé **52** pour laquelle la capacité maximale est atteinte sera notée $C_{max}(52)$.

I.2.2 Etude des capacités en fonction du rapport styrène/DVB et $capath$

La capacité expérimentale ($capaexp$) des polymères imprimés **MIPglu2c** à **MIPglu16c** a été déterminée par la méthode du « batch process » (chapitre 3, I.1.5). Différentes concentrations de molécules **52** ont été incubées avec 5 mg de polymère, à 10 °C, dans l'acétonitrile pendant 24 heures.

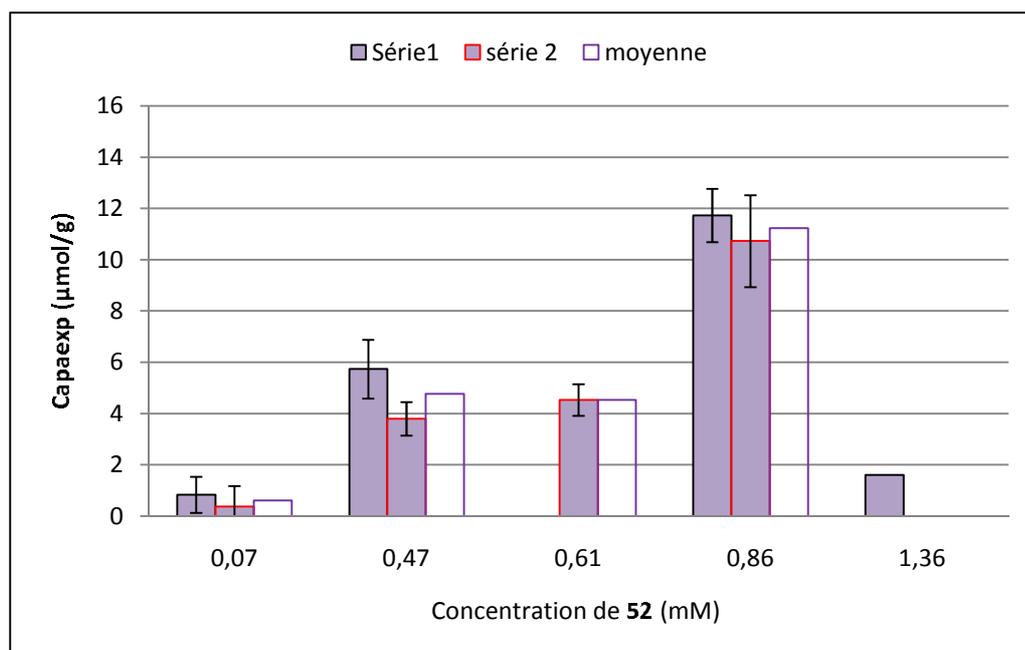
Pour chaque valeur de capacité théorique, une courbe d'étalonnage a été réalisée dans des gammes de concentrations regroupées dans le **Tableau 36**.

Entrée	Capath ($\mu\text{mol/g}$)	Gamme de concentration (mM)
1	7	0,07 – 1,52
2	15	0,07 – 1,52
3	46	0,43 – 4,40
4	88	0,81 – 8,10

Tableau 36: Gamme de concentrations pour les droites d'étalonnage

Toutes les droites d'étalonnage réalisées ont des coefficients de corrélation r^2 supérieur à 0,9995.

Dans l'**Histogramme 4**, sont représentées les capacités expérimentales des polymères de la série à 15 $\mu\text{mol/g}$ et 20 % de DVB, soit **MIPglu8c** et **MIPglu9c** pour des concentrations variant entre 0,07 et 1,36 mM. Toutes ces capacités expérimentales sont la moyenne de deux mesures de capa_{exp} sur deux séries d'incubations menées en parallèle. Les barres d'erreurs sont donc directement liées à la reproductibilité.

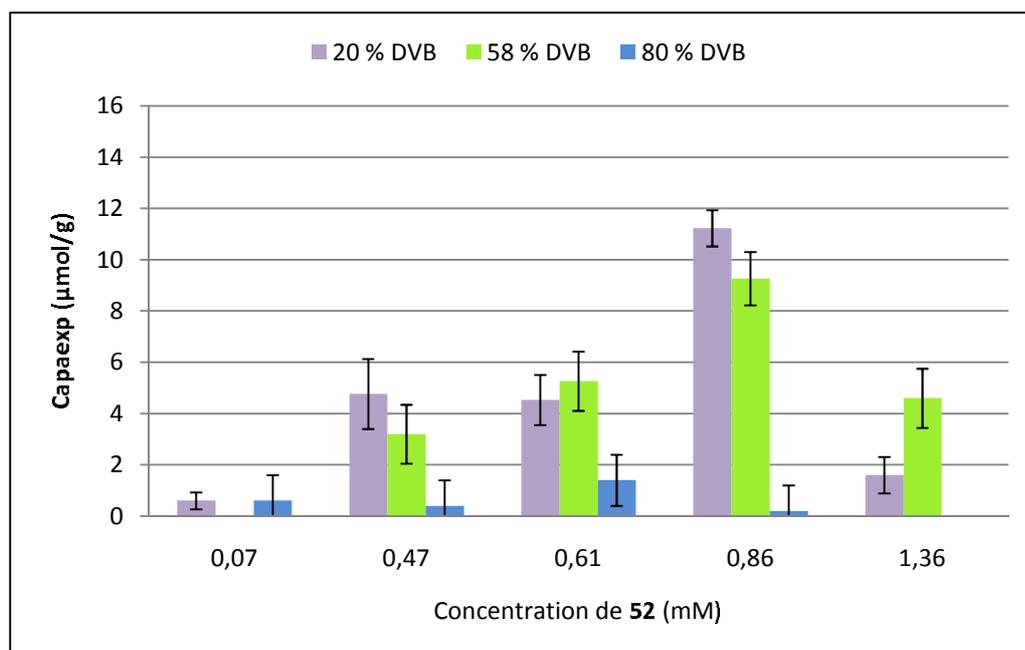


Histogramme 4: Reproductibilité du binding entre lots de polymères préparés avec une capath de 15 µmol/g et 20 % de DVB

Il est intéressant de constater que la mesure de la capaexp sur deux lots différents de polymères traités de manière identique, est reproductible.

Par ailleurs, les deux lots de polymères semblent se comporter de manière identique en passant par un maximum pour une concentration de 0,86 mM.

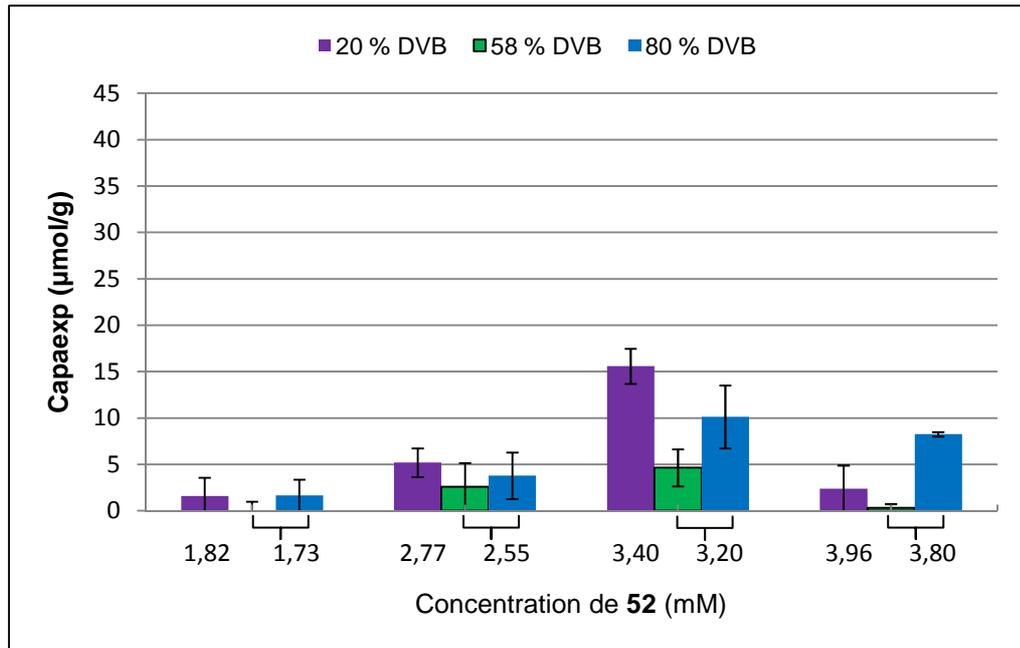
Afin de vérifier cette hypothèse, comparons l'évolution de la courbe de binding pour la série de polymère préparée avec une capath de 15 µmol/g (**Histogramme 5**). Chaque valeur rapportée est la moyenne de deux capaexp mesurée sur deux incubations menées en parallèle. Les erreurs sont donc liées directement à la reproductibilité.



Histogramme 5: Etude de binding des polymères préparés avec une capath de 15 µmol/g et différents pourcentage de DVB

Pour tous les polymères de la série à 15 µmol/g, une tendance générale se dégage : une lente augmentation du binding pour des concentrations inférieures à 0,61 mM ; un maximum atteint pour une concentration de 0,86 mM et une chute du binding pour des concentrations supérieures à 1,36 mM. Les écart-types sur les mesures varient entre 0,9 et 1,6 µmol/g.

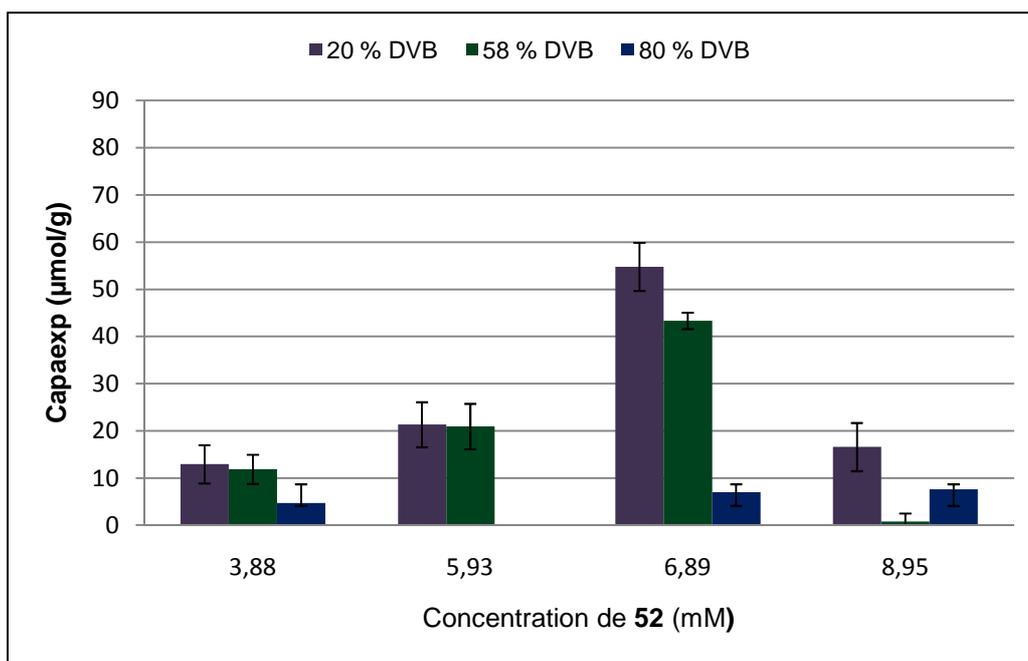
Dans l'**Histogramme 6**, sont représentées les capacités expérimentales des différents polymères de la série à 46 µmol/g, pour des concentrations variant entre 1,73 et 3,80 mM. Toutes ces capacités expérimentales sont la moyenne de deux mesures de capaexp sur deux séries d'incubations menées en parallèle. Les barres d'erreurs sont donc directement liées à la reproductibilité.



Histogramme 6 : Etude de binding des polymères préparés avec une capath de 46 µmol/g et différents pourcentage de DVB

Comme précédemment, une tendance générale se dégage pour cette série de polymère à 46 µmol/g. Un maximum de binding est atteint pour des concentrations comprises entre 3,20 - 3,40 mM. Les écart-types sur les mesures sont compris entre 0,8 et 2,5 µmol/g.

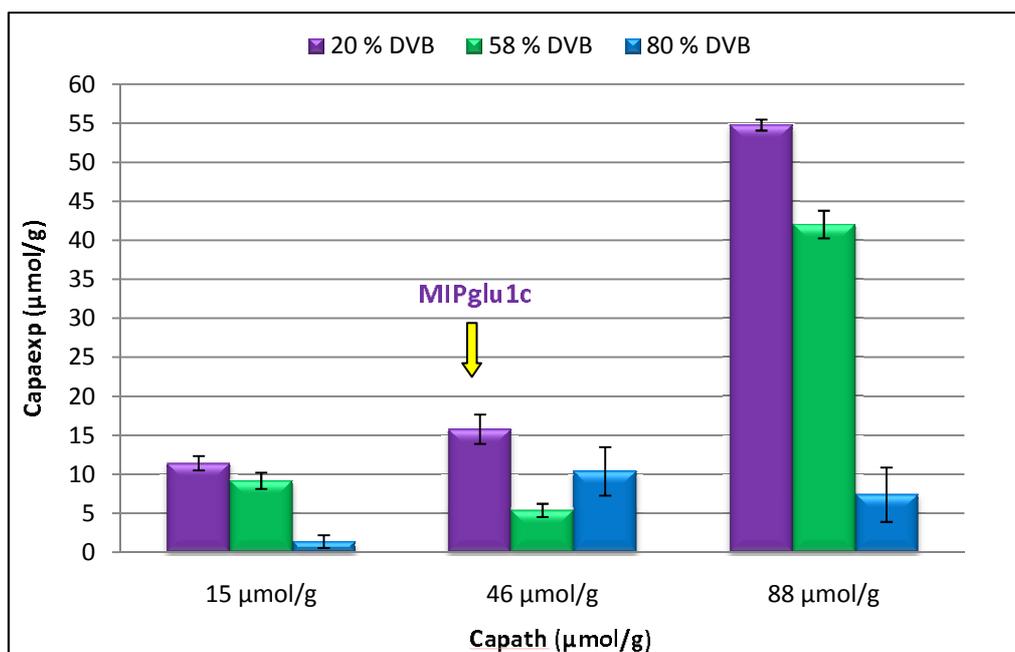
Dans l'**Histogramme 7**, sont représentées les capacités expérimentales des différents polymères de la série à 88 µmol/g, pour des concentrations variant entre 3,88 et 8,95 mM. Toutes ces capacités expérimentales sont la moyenne de deux mesures de capaexp sur deux séries d'incubations. Les barres d'erreurs sont donc directement liées à la reproductibilité.



Histogramme 7: Etude de binding des polymères préparés avec une capath de 88 µmol/g et différents pourcentage de DVB

A nouveau, une tendance générale se dégage pour cette série de polymère à 88 µmol/g. Un maximum de binding est atteint pour à la concentration de 6,89 mM. Les écart-types sur les mesures sont comprises entre 1,6 et 5,0 µmol/g.

Dans l'**Histogramme 8** est indiqué un récapitulatif de la capacité maximale de chaque polymère imprimé en fonction de la capacité théorique (capath) et de la quantité de DVB utilisée. Les barres d'erreurs sont liées à la reproductibilité de chaque mesure sur deux incubations menées en parallèle.



Histogramme 8: Capacité maximale (capaexp) des polymères imprimés en fonction de la capacité théorique (capath) et du rapport styrène/DVB

Lorsque que le template **5** est trop dilué dans la matrice polymérique (capath de 7 µmol/g), le polymère imprimé ne reconnaît pas le dérivé **52** du glucose. Etant donné les faibles concentrations utilisées, on est probablement à la limite de détection de la CLHP.

Plus la capath augmente, plus la capaexp est élevée. Cette tendance est observée quel que soit le pourcentage de DVB dans la matrice styrénique.

Il est également intéressant de noter que plus la quantité de DVB dans la matrice styrénique augmente, plus la capaexp diminue. Cette tendance est vérifiée quel que soit la capath. Ceci peut être dû à une extraction plus difficile du template **5**, liée à une plus forte réticulation de la matrice polymérique.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la série de polymère préparés à 20 % de DVB dont les capacités expérimentales sont les plus élevées.

En effectuant le rapport capaexp/capath de chaque polymère imprimé, on constate une occupation des sites théoriques de reconnaissance supérieure 60 % (**Tableau 37**, entrées 2 et 4) sauf dans le cas du polymère avec un capath de 46 µmol/g (**Tableau 37**, entrée 3).

Entrée	Capath ($\mu\text{mol/g}$)	Capaexp ($\mu\text{mol/g}$)	Rapport capaexp/capath (%)	
1	7	0	/	
2	15	10,8	72	
3	46	15,8	36	← MIPglu1c
4	88	56,6	60	

Tableau 37 : Comparaison entre capacités théoriques et expérimentales

Une autre remarque intéressante concerne la concentration en molécule **52** pour laquelle la capacité maximale est atteinte (C_{max} (**52**)).

Pour une capacité théorique constante, C_{max} (**52**) est identique quel que soit le pourcentage de DVB dans la matrice styrénique.

De plus, il semble exister une relation linéaire entre cette concentration C_{max} (**52**) et la capacité théorique en site pour chaque polymère imprimé (**Tableau 38, Graphique 1**).

	Capath ($\mu\text{mol/g}$)	C_{max} (52) (mM)
MIPglu8c, 9c	15	0,91
MIPglu10c		
MIPglu1c	46	3,40
MIPglu12c		
MIPglu14c	88	6,89
MIPglu15c		

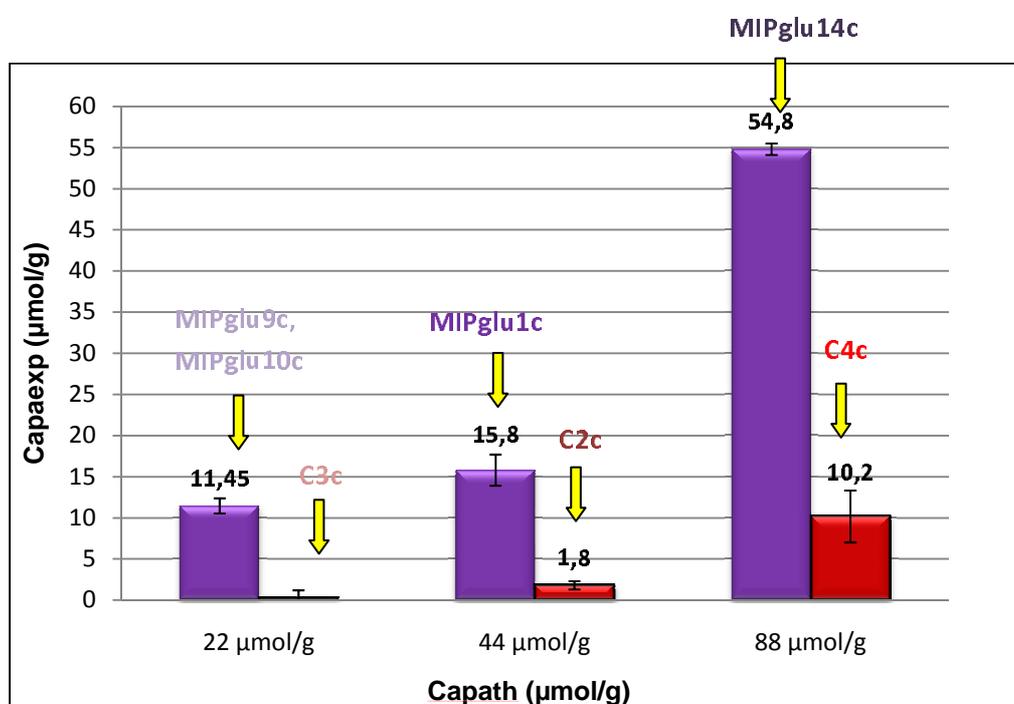
Tableau 38 : C_{max} (52) pour les différentes séries de polymères

La charge théorique en acides carboxyliques est donc de $4 \times 15 \mu\text{mol/g}$ pour **C3** et $4 \times 88 \mu\text{mol/g}$ pour **C4**.

Une fois la polymérisation achevée, un work up identique à **MIPglu1c** a été réalisé par ajout d'un volume d'acétone, décantation, lavages successifs dans un mélange 1/1 acétone/eau et séchage au lyophilisateur.

Ces deux polymères ont été ensuite clivés dans les mêmes conditions que précédemment, dans un mélange 5M NaOHaq/MeOH à reflux pendant 3 jours. Après acidification (HCl 12 N), lavages successifs et lyophilisation, les polymères obtenus sont notés **C3c** et **C4c**.

La capacité des polymères **C3c** et **C4c**, à lier le dérivé du glucose **52** a été déterminée par la méthode du « batch process », à la concentration C_{max} (**52**) ; les résultats sont indiqués dans l'**Histogramme 9**. Les erreurs sont liées à la reproductibilité sur deux incubations menées en parallèle.



Histogramme 9 : Binding non spécifique à C_{max} (52**) pour chaque polymère de la série à 20 % de DVB**

Le polymère **C3c** ne semble pas lier le dérivé **52** du glucose. La méthode de dosage choisie ne permet pas de donner une valeur précise de la capaexp.

Le polymère de contrôle **C4c**, dont la capacité théorique en fonction acides carboxyliques est de $4 \times 88 \mu\text{mol/g}$, reconnaît le composé **52** à $10,2 \pm 3,1 \mu\text{mol/g}$.

Le calcul du facteur d’empreinte, donné dans le **Tableau 39**, pour chaque polymère imprimé est effectué par la formule suivante :

$$I = \frac{K_{PMIPgluic}}{K_{PCjc}}$$

Equation 7

$K_{PMIPgluic}$: coefficient de partage des polymères imprimés **MIPglu9c**, **MIPglu1c** et **MIPglu14c**

K_{PCjc} : coefficient de partage des polymères de contrôle **C3c**, **C2c** et **C4c**

	Capath ($\mu\text{mol/g}$)	Coefficient de partage $\mu\text{mol.mM}^{-1}/\text{g}$		Facteur d’empreinte
		$K_{PMIPgluic}$	K_{PCjc}	
MIPglu9c	15	-	nd	nd
MIPglu1c	46	4,68	0,51	9,2
MIPglu14c	88	7,93	1,49	5,3

Tableau 39: Facteurs d’empreinte pour la série de polymère imprimés avec 20 % de DVB

Le facteur d’impression n’est pas calculable pour le polymère imprimé **MIPglu9c**, étant donné les faibles variations de concentration et les dilutions élevées.

Le facteur d’impression du polymère imprimé **MIPglu1c** (capath: $46 \mu\text{mol/g}$) est plus élevé que celui calculé pour **MIPglu14c** (capath: $88 \mu\text{mol/g}$). Une augmentation de la

capacité théorique du polymère semble donc être synonyme d'une diminution du facteur d'empreinte. Intuitivement, il semble probant de penser que plus la capacité expérimentale des polymères imprimés augmente, moins les sites sont isolés et donc bien définis.

Une fois les études de capacité terminées, nous avons cherché à déterminer les sélectivités des différents polymères imprimés synthétisés.

1.2.3 Etude de la sélectivité en fonction du rapport styrène/DVB et capath

Nous avons choisi de ne pas étudier la sélectivité des polymères imprimés avec 80 % de DVB car la capacité expérimentale, à une concentration C_{max} , de ces polymères est faible.

Pour déterminer la sélectivité de chaque polymère imprimé, dans la série à 20 % et 58 % de DVB, les monosaccharides **53**, **54**, **55** et **56** (**Figure 79**) sont incubés, 24 heures, dans l'acétonitrile à 10 °C pour une concentration C_{max} (**Tableau 40**).

Pour chaque analyte **53**, **54**, **55** et **56**, et pour chaque capath, une droite d'étalonnage a été réalisée pour des gammes de concentrations identiques à celle du **Tableau 36** (cf. page 180).

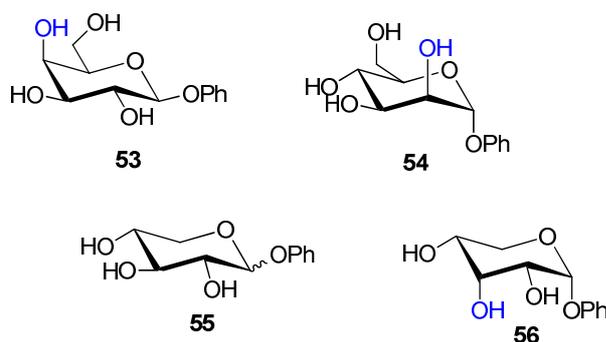
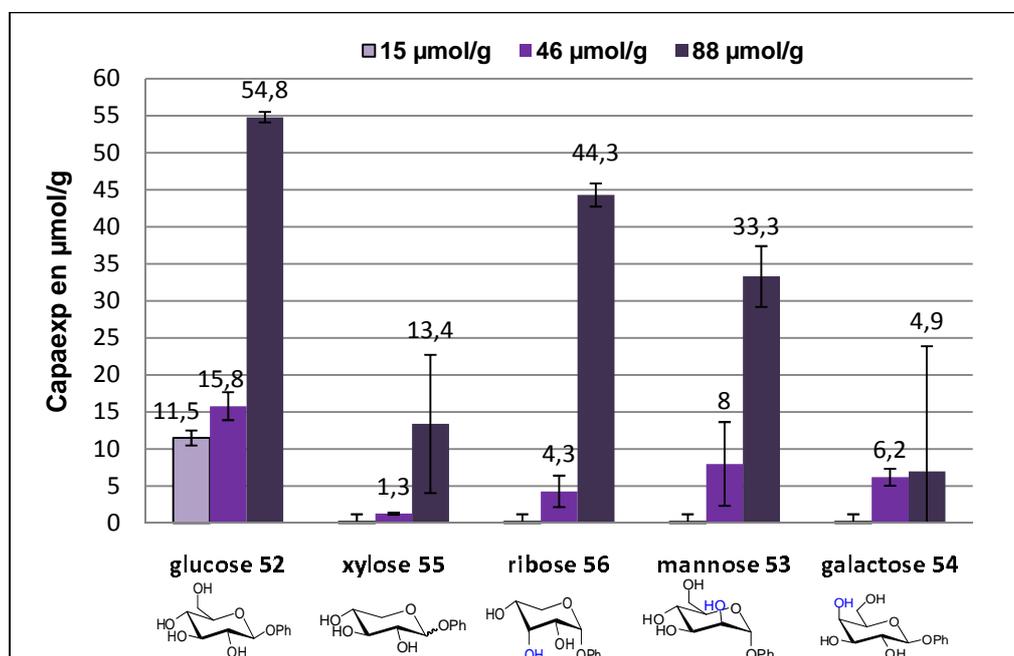


Figure 79: Monosaccharides utilisés pour les études de sélectivité avec différents polymères imprimés avec un dérivé de glucose

	Capath ($\mu\text{mol/g}$)	Cmax (52) (mM)
MIPglu8c, 9c	15	0,91
MIPglu10c		
MIPglu1c	46	3,40
MIPglu12c		
MIPglu14c	88	6,89
MIPglu15c		

Tableau 40 : Rappel des concentrations pour lesquelles la capacité théorique des polymères imprimés avec un dérivé de glucose est maximale

Les résultats pour la série à 20 % de DVB sont regroupés dans l'**Histogramme 10**. Chaque valeur de capacité est la moyenne de deux mesures de capaexp sur deux séries d'incubations menées en parallèle sur 5 mg de polymère. Les erreurs sont donc directement liées à la reproductibilité.



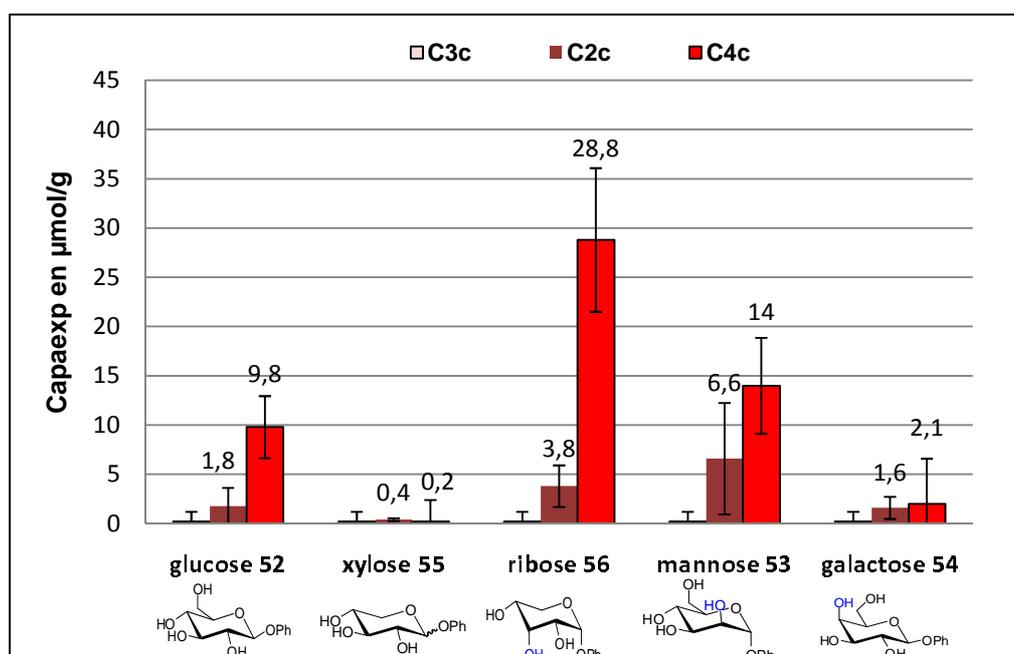
Histogramme 10: Capaexp des polymères imprimés avec un dérivé de glucose, avec 20 % de DVB en présence des dérivés 52, 53, 54, 55 et 56

Plus la capath des polymères imprimés augmente, plus la capaexp pour les dérivés du xylose **55**, du ribose **56** et du mannose **53** augmente. C'est la même tendance que l'on avait observé pour le dérivé **52** du glucose. L'extraction du template semble donc rester tout aussi efficace en augmentant la capath dans la matrice polymérique.

Il n'y a que le dérivé du galactose **54** qui semble se comporter légèrement différemment mais la barre d'erreur est supérieure à la moyenne des capaexp. Il est donc difficile de conclure.

Pour une capacité théorique de 15 $\mu\text{mol/g}$, les polymères imprimés **MIPglu8c**, **MIPglu9c** ne reconnaissent que le template d'origine, c'est-à-dire le dérivé du glucose **52**. Ils semblent donc très sélectifs.

En parallèle, les polymères de contrôle **C3c** et **C4c** ont également été testés par la méthode du « batch process » en présence des dérivés **53**, **54**, **55** et **56** (**Histogramme 11**). Deux incubations ont également été menées en parallèle et les erreurs sont liées à la reproductibilité.



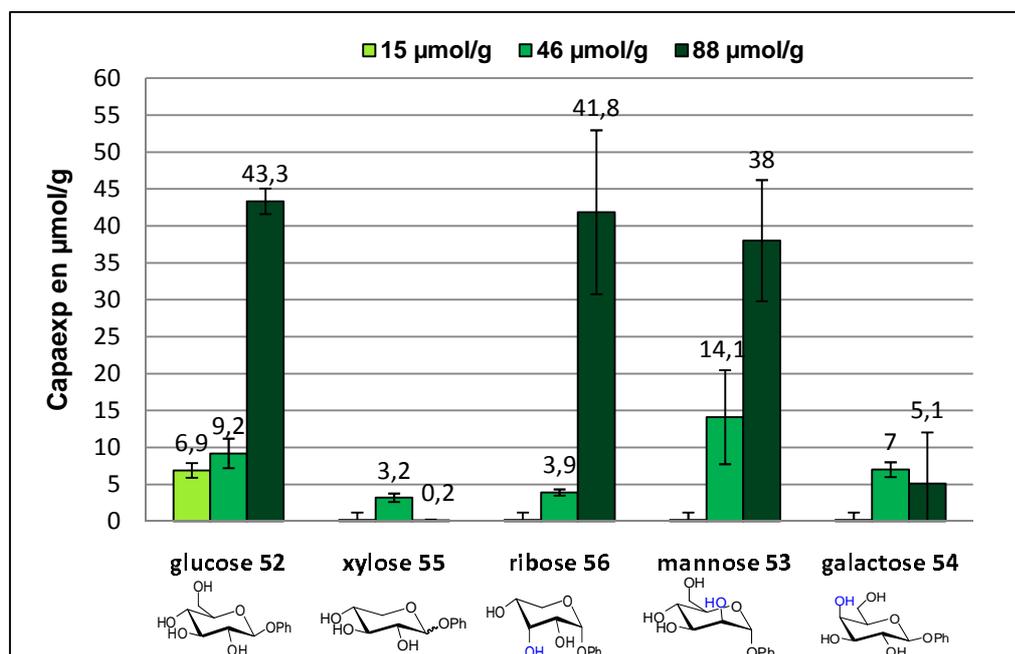
Histogramme 11: Capaexp des polymères de contrôle avec un dérivé de glucose, avec 20 % de DVB en présence des dérivés 52, 53, 54, 55 et 56

Les capaexp déterminées pour les dérivés **53**, **54**, **55** et **56** sont très faibles. La précision de la mesure ne nous permet de donner une valeur exacte.

Pour le polymère de contrôle **C4c**, une tendance générale se dégage. Les dérivés du ribose **56** et du mannose **53** se lient davantage à la matrice polymérique. Ce constat avait déjà été fait pour le polymère de contrôle **C2c**.

La sélectivité des polymères de la série préparée avec une capath de 15 $\mu\text{mol/g}$ semble à nouveau se confirmer étant la très faible reconnaissance du polymère de contrôle **C3c** pour les dérivés **53**, **54**, **55** et **56**.

Analysons maintenant les résultats de capaexp obtenus pour les polymères imprimés de la série à 58 % de DVB (**Histogramme 12**). Chaque valeur est la moyenne de deux mesures de capaexp sur deux incubations menées en parallèle.



Histogramme 12: Capaexp des polymères imprimés avec un dérivé de glucose, avec 58 % de DVB en présence des dérivés 52, 53, 54, 55 et 56

Les mêmes tendances se dégagent comparativement à la série de polymères imprimés avec 20 % de DVB. Plus la capath augmente, plus la capexp augmente pour les dérivés **53** et **56** testés.

Les dérivés **54** et **55** semblent se comporter différemment en passant par un maximum pour la capacité théorique de 46 $\mu\text{mol/g}$.

Pour cette série de polymère, faute de temps, les polymères de contrôle non pas pu être préparés.

Il semble également que la série de polymères préparés avec une capath de 15 $\mu\text{mol/g}$ soit très sélective du glucose. Pour confirmer cette tendance, il faudrait tester la capaexp du polymère de contrôle correspondant.

Afin de mieux exploiter les résultats des **Histogrammes 11** et **12**, nous avons procédé au calcul des facteurs de sélectivité à l'aide des coefficients de partage, selon la définition suivante :

$$K_P = \frac{C_j}{F}$$

Equation 6

C_j : concentration d'analyte liée au polymère imprimé **MIPgluic**

F : concentration d'analyte libre après incubation

L'utilisation de cette définition du facteur de sélectivité est indépendante de la reconnaissance des polymères de contrôle et va donc permettre de comparer les facteurs de sélectivité pour la série de polymères imprimés avec 20 % et 58 % de DVB. Les résultats sont regroupés dans les **Tableau 41** et **42**.

Coefficients de partage $\mu\text{mol.mM}^{-1}/\text{g}$					
	Glucose	Xylose	Ribose	Mannose	Galactose
MIPglu 8c, 9c	-	nd	nd	nd	nd
MIPglu 1c	4,68	0,40	1,42	2,65	2,78
MIPglu 14c	7,93	4,17	6,98	4,57	0,75

Tableau 41 : Coefficients partage pour la série de polymères imprimés avec un dérivé de glucose à 20 % de DVB

Coefficients de partage $\mu\text{mol.mM}^{-1}/\text{g}$					
	Glucose	Xylose	Ribose	Mannose	Galactose
MIPglu 10c	-	nd	nd	nd	nd
MIPglu 12c	1,49	0,96	1,24	4,17	2,23
MIPglu 15c	6,47	nd	5,00	3,95	0,74

Tableau 42 : Coefficients partage pour la série de polymères imprimés avec un dérivé de glucose à 58 % de DVB

Dans la série de polymères imprimés dont la capacité théorique est de 15 $\mu\text{mol/g}$, les trop faibles variations de concentrations ne nous ont pas permis de déterminer leur capacité à lier les dérivés du xylose, du ribose, du mannose et du galactose. Les coefficients de partage sont donc non déterminés (nd).

D'après les **Tableaux 41** et **42**, les facteurs de sélectivité peuvent être calculés comme le rapport de deux coefficients de partage (**Tableaux 43** et **44**).

Facteurs de sélectivité				
	Glucose-Xylose	Glucose-Ribose	Glucose-Mannose	Glucose-Galactose
MIPglu 8c, 9c	nd	nd	nd	nd
MIPglu 1c	11,7	3,3	1,7	1,7
MIPglu 14c	1,9	1,1	1,7	10,5

Tableau 43 : Facteurs de sélectivité pour la série de polymères imprimés avec un dérivé de glucose à 20 % de DVB

Facteurs de sélectivité				
	Glucose-Xylose	Glucose-Ribose	Glucose-Mannose	Glucose-Galactose
MIPglu 10c	nd	nd	nd	nd
MIPglu 12c	1,5	1,2	0,3	0,7
MIPglu 15c	nd	1,3	1,6	8,7

Tableau 44 : Facteurs de sélectivité pour la série de polymères imprimés avec un dérivé de glucose à 58 % de DVB

On constate que plus la capath augmente, moins les polymères imprimés sont sélectifs. Ce résultat était attendu. En effet, le calcul du facteur d’empreinte pour les polymères imprimés de la série à 20 % de DVB (cf. page 188) avait déjà montré qu’une augmentation de la capath entraînait une diminution du facteur d’empreinte.

Pour une capacité théorique de 46 $\mu\text{mol/g}$, les polymères imprimés avec 20 % de DVB sont plus sélectifs que ceux imprimés avec 58 % de DVB. On observe notamment une sélectivité inversée pour le mannose et le galactose dans les cas des polymères imprimés avec un dérivé de glucose, préparés avec 58 % de DVB. Cette sélectivité inverse n’a pas, pour le moment, été expliquée.

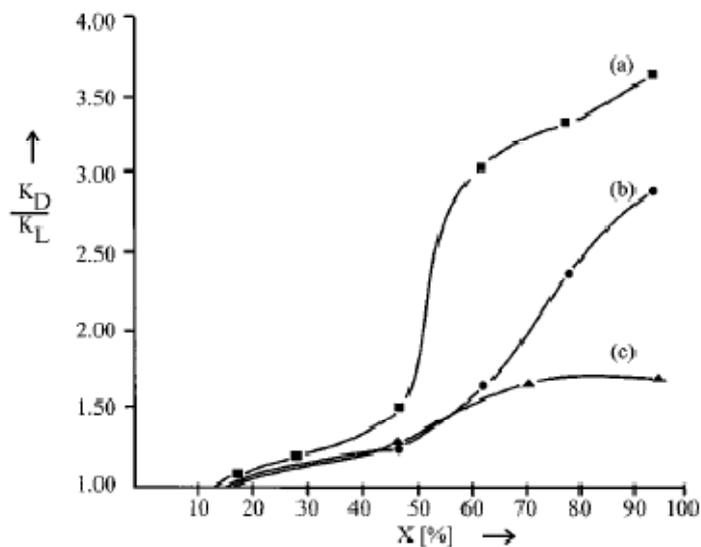
A simple titre indicatif, Wulff a mené le même type d'étude de sélectivité avec des polymères imprimés avec un dérivé de mannose en fonction du pourcentage de différents agents de réticulation (EGDMA, tétraméthylène diméthacrylate et DVB). Cette étude a été réalisée pour des polymères imprimés préparés par l'approche covalente et une polymérisation en masse. La sélectivité, déterminée par CLHP, est exprimée comme étant le rapport des coefficients de distribution des formes L et D.

X : agent de réticulation

(a).éthylènediméthacrylate

(b). tétraméthylène diméthacrylate ;

(c). divinylbenzène



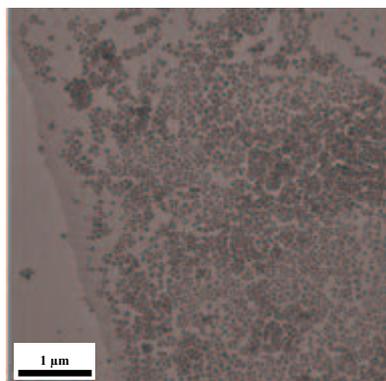
Plus le pourcentage de DVB est élevé dans la matrice polymérique, plus la sélectivité augmente pour atteindre un maximum de 1,7 pour un pourcentage de 70 % en DVB.

Cette étude n'est pas directement comparable à la notre, puisque nous avons réalisé les études de sélectivité par la méthode du « batch process ». Dans notre cas, les polymères imprimés, préparés par mini-émulsion, avec 20 % de DVB, présentent la capacité la plus élevée et le plus de sélectivité.

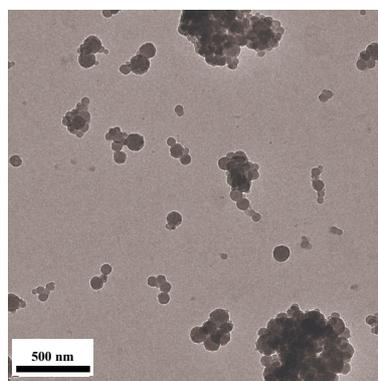
Pour finir notre étude, nous avons caractérisé tous ces polymères imprimés par MET, par la mesure de la polydispersité, par la mesure de la taille des particules et la mesure de la surface spécifique par BET.

1.2.4 Caractérisation des polymères imprimés par MET

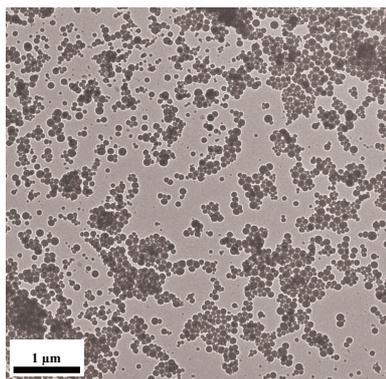
Nous avons caractérisé, par MET, une suspension de différents polymères imprimés (de la série préparée avec 20 et 58 % de DVB) dans le chloroforme, soniquée pendant 1 à 2 minutes, uniquement avant extraction du template **5** du glucose.



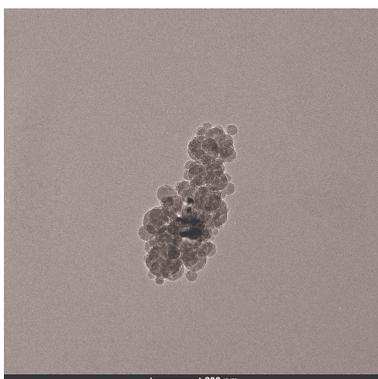
MIPglu9 (capath: 15 μmol/g)
échelle : 1 μm



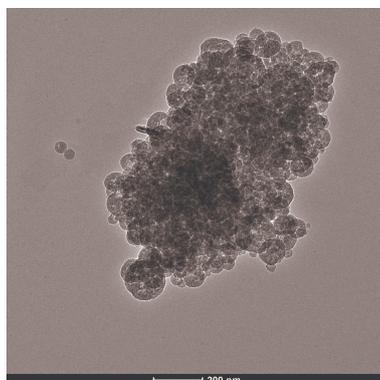
MIPglu10 (capath: 15 μmol/g)
échelle : 500 nm



MIPglu1 (capath: 46 μmol/g)
échelle : 1 μm



MIPglu13 (capath: 46 μmol/g)
échelle : 200 nm



MIPglu15 (capath: 88 μmol/g)
échelle: 200 nm

Plus la capacité théorique des polymères imprimés augmente, plus les particules de polymères semblent agrégées. Il a d'ailleurs été impossible de disperser le polymère **MIPglu14** (capacité théorique de 88 $\mu\text{mol/g}$) dans le chloroforme pour le caractériser par MET.

On constate également que plus le pourcentage de DVB augmente, plus les particules semblent agrégées.

1.2.5 Mesure de la polydispersité et de la taille des particules

La polydispersité ainsi que la taille des particules ont été déterminées par diffusion de la lumière sur un échantillon de 1mg de polymère, mis en suspension dans de l'éthanol par sonication pendant 1 minute. Les résultats sont regroupés dans les **Tableaux 45** et **46**.

La polydispersité est obtenue par des formules mathématiques très compliquées et représente la variance de la distribution des tailles de particules.

Lorsque l'échantillon de polymère est trop polydisperse, la distribution de la taille des particules ne peut pas être mesurée.

L'erreur sur la mesure de la taille moyenne est calculée comme étant la moitié de la largeur à mi-hauteur de la Gaussienne correspondante.

	Avant clivage		Après clivage	
	Polydispersité	Taille (nm)	Polydispersité	Taille (nm)
MIPglu8	0,31 0,21 ^a	85 ± 11 68 ± 16	0,91	nd
MIPglu9	0,56 0,10 ^a	nd 77 ± 11	0,36	793 ± 55
MIPglu1	0,15	144 ± 15	0,17	154 ± 11
MIPglu14	0,70	353 ± 26	0,66	nd

^a polydispersité mesurée directement sur le latex obtenu à la fin de la polymérisation

Tableau 45: Série de polymères imprimés avec un dérivé de glucose, avec 20 % de DVB

	Avant clivage		Après clivage	
	Polydispersité	Taille (nm)	Polydispersité	Taille (nm)
MIPglu10	0,39 0,31 ^a	83 ± 20 126 ± 18	0,95	nd
MIPglu12	0,34	734 ± 20	0,86	nd
MIPglu15	0,24	84 ± 15	0,92	nd

^a polydispersité mesurée directement sur le latex obtenu à la fin de la polymérisation

Tableau 46: Série de polymères imprimés avec un dérivé de glucose, avec 58 % de DVB

De manière générale, avant clivage, les polydispersités sont plus faibles qu'après clivage. Ceci est peut être dû à une dégradation des amas de particules.

La polydispersité des polymères **MIPglu9c** et **MIPglu1c**, après clivage, reste plus faible que dans le cas des autres polymères imprimés.

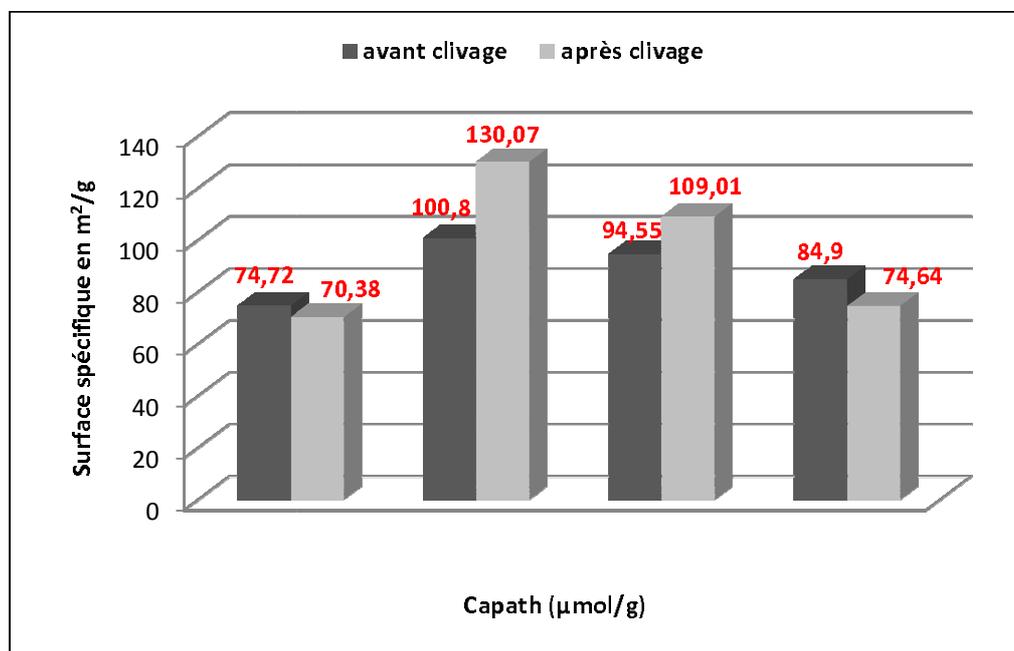
Pour **MIPglu14**, la polydispersité avant clivage est très élevée, ceci explique probablement pourquoi il n'a pas été possible de disperser suffisamment le polymère dans le chloroforme pour l'analyser en MET.

Il est également intéressant de noter que la polydispersité mesurée directement sur le latex obtenu après polymérisation est plus faible que celle mesurée sur le même polymère, lyophilisé puis remis en suspension dans l'éthanol. (MIPglu8, MIPglu9, MIPglu10).

Comme dernière caractéristique, nous avons cherché à calculer la surface spécifique par la méthode BET.

1.2.6 Evolution de la surface spécifique des polymères imprimés

La série de polymère à 58 % de DVB a été analysée par BET avant et après clivage. Les résultats sont regroupés dans l'**Histogramme 13**. La mesure de cette surface spécifique nécessite au moins 30 mg de polymère, 100 mg étant la quantité idéale. Pour cette série de mesure, nous avons également tenu compte du polymère dont la capacité théorique est de 7 $\mu\text{mol/g}$.



Histogramme 13: Evolution de la surface spécifique pour des polymères préparés avec 58 % de DVB

La surface spécifique semble passer par un maximum pour le polymère imprimé avec une capacité théorique de 15 $\mu\text{mol/g}$.

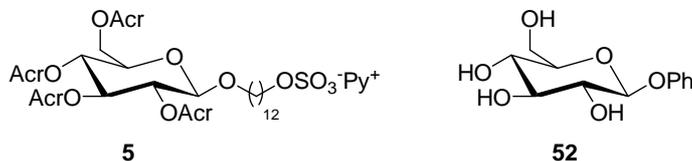
Pour le polymère imprimé dont la capacité est de 7 $\mu\text{mol/g}$ (**MIPglu10c**), la surface spécifique varie peu avant et après clivage, ce qui semble corrélérer avec l'absence de binding avec l'analyte **52**.

Pour les polymères dont la capacité théorique est de 15 et 46 $\mu\text{mol/g}$ (**MIPglu10c** et **MIPglu12c**), la surface spécifique augmente après clivage, ce qui indique une modification de la surface des polymères après clivage.

Dans le cas du polymère imprimé avec une capacité théorique de 88 $\mu\text{mol/g}$ (**MIPglu15c**), la surface spécifique est plus faible après qu'avant clivage, ce qui paraît surprenant étant donné qu'il s'agit du polymère ayant la capacité la plus élevée de la série de polymères préparés avec 58 % de DVB.

1.2.7 Conclusion 2 :

L'optimisation de la formulation des polymères imprimés avec le template **5** du glucose a conduit aux résultats suivants :



- plus la capacité théorique augmente :
 - plus le binding des polymères avec le dérivé **52** du glucose augmente
 - plus la sélectivité des polymères imprimés diminue

- quelle que soit la quantité de DVB dans la matrice styrénique:
 - pour une capacité théorique de 7 $\mu\text{mol/g}$, la capacité des polymères imprimés est très faible et non quantifiable avec notre méthode de dosage
 - pour une capacité théorique de 15 $\mu\text{mol/g}$, les polymères imprimés ne reconnaissent que le dérivé **52** du glucose ; la reconnaissance du polymère de contrôle **C3c** est très faible. Les polymères imprimés de la série à 15 $\mu\text{mol/g}$ de capath sont donc des matrices extrêmement sélectives.

- plus la quantité de DVB augmente dans la matrice styrénique :
 - plus le binding diminue quelle que soit la capacité théorique des polymères imprimés.
 - moins les polymères imprimés sont sélectifs (les polymères de la série à 20 % de DVB sont plus sélectifs que ceux de la série à 58 % de DVB)

D'après l'étude d'optimisation menée dans I.2, les polymères imprimés avec 20 % de DVB et une capacité théorique de 46 $\mu\text{mol/g}$ semble être un bon compromis entre capacité et sélectivité. C'est donc cette formulation, nommée « idéale » que nous conserverons pour la suite de nos études.

Dans la littérature, la grande majorité des polymères imprimés avec des sucres, préparés par polymérisation en masse, sont fortement réticulés (taux de réticulation de l'ordre

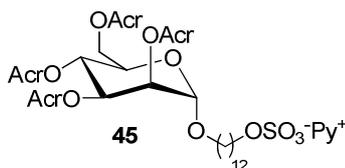
de 80 %). La technique de polymérisation par mini-émulsion « one pot » permet donc de préparer des polymères imprimés sélectifs avec un faible taux de réticulation.

Après avoir optimisé la formulation des polymères imprimés avec un dérivé de glucose, nous avons procédé à la préparation de polymères imprimés avec des dérivés de mannose et de xylose, dans les conditions optimales retenues précédemment (*Conclusion 2*), c'est-à-dire 20 % de DVB et une capacité théorique de 46 $\mu\text{mol/g}$.

II. Polymères imprimés avec différents monosaccharides

II.1 Polymère imprimé avec un dérivé de mannose

Nous avons procédé à la préparation d'un polymère imprimé avec le template du mannose **45** par mini-émulsion « one pot », avec une capacité théorique de 46 $\mu\text{mol/g}$ et 20 % de DVB (**MIPMan1**) selon la procédure décrite précédemment pour **MIPglu1c**. (cf. chapitre 3, I.1.2).



Un latex est obtenu en fin de polymérisation. Un volume d'acétone est additionné au milieu de polymérisation. Après décantation, lavages successifs avec un mélange 1/1 acétone/eau (5 fois) et séchage au lyophilisateur, le polymère **MIPman1** est récupéré.

Une suspension de ce polymère imprimé **MIPman1** dans le chloroforme a été caractérisée par MET (**Figure 80**).

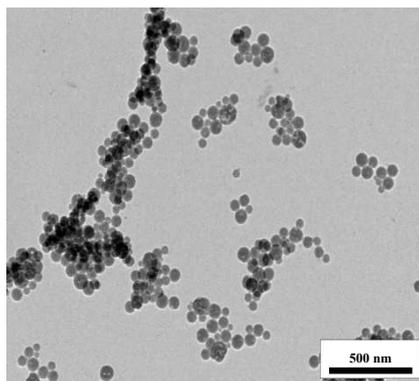


Figure 80 : Caractérisation par MET du polymère imprimé MIPMan1, échelle 500 nm

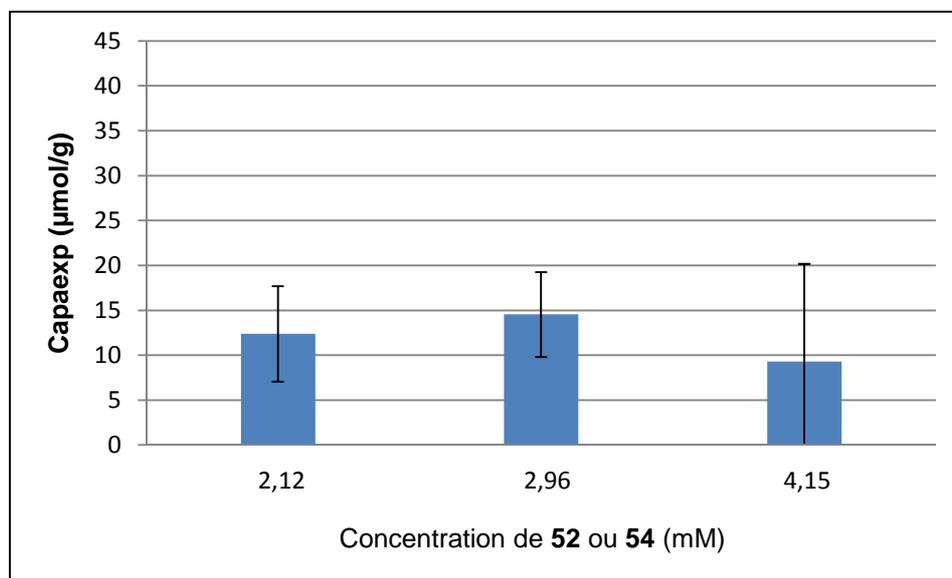
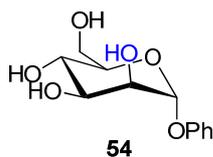
Des particules de polymères, relativement monodisperses sont observées. Cet échantillon de polymère semble très similaire à **MIPglu1c**.

Une suspension de ce polymère **MIPman1**, dans l'éthanol, a également été analysée par diffusion de la lumière. La polydispersité mesurée est de 0,567 ce qui relativement élevée. Cela ne semblait pas être le cas en MET.

Un spectre Infra-Rouge (neat) du polymère imprimé **MIPman1** a confirmé l'incorporation du template **45** dans la matrice styrène/DVB.

Le polymère imprimé **MIPman1** a été clivé dans les mêmes conditions que les polymères imprimés avec un dérivé de glucose, c'est-à-dire 3 jours à reflux en présence d'un mélange équimolaire 5 M NaOHaq/MeOH (cf.chapitre 3, I.1.4). Après acidification avec de l'acide chlorhydrique 12 N, des lavages successifs à l'eau jusqu'à l'obtention d'un pH de 7 et séchage au lyophilisateur, le polymère **MIPman1c** est récupéré.

Le polymère imprimé **MIPman1c** a été testé par la méthode du « batch process » en présence de différentes concentrations du composé **54**, à 10 °C, après 24 heures d'incubation dans l'acétonitrile (chapitre 3, I.1.5). Une droite d'étalonnage a été tracée pour des gammes de concentrations variant de 0,44 et 4,4 mM. Les capaexp sont reportées l'**Histogramme 14**. Les erreurs sont liées à trois injections successives en CLHP.



Histogramme 14 : Etude de binding du polymère MIPman1c en présence du dérivé du mannose **54**

La capacité du polymère imprimé **MIPman1c** atteint un maximum à $14,1 \pm 4,7$ mol/g pour une concentration en molécule **54** de 2,96 mM (C_{max} (**54**)). Cette capacité est du même ordre de grandeur que celle obtenue pour **MIPglu1c**.

Afin de caractériser le binding non spécifique, la capacité du polymère de contrôle **C2c** (cf. chapitre 3, I.1.3) a été mesurée à C_{max} (**54**). La capacité obtenue est de $6,6 \pm 2,5$ μmol/g.

Evaluons le facteur d'impression. Le calcul des coefficients de partage est effectué avec l'**Equation 6**.

$$K_P = \frac{C_j}{F}$$

Equation 6

C_j : concentration de mannose liée au polymère imprimé **MIPman1c**

F : concentration de mannose libre après incubation

Le rapport des coefficients de partage relatifs au polymère imprimé **MIPman1c**, d'une part et au polymère de contrôle **C2c** d'autre part, donne accès au facteur d'empreinte I (**Tableau 47**).

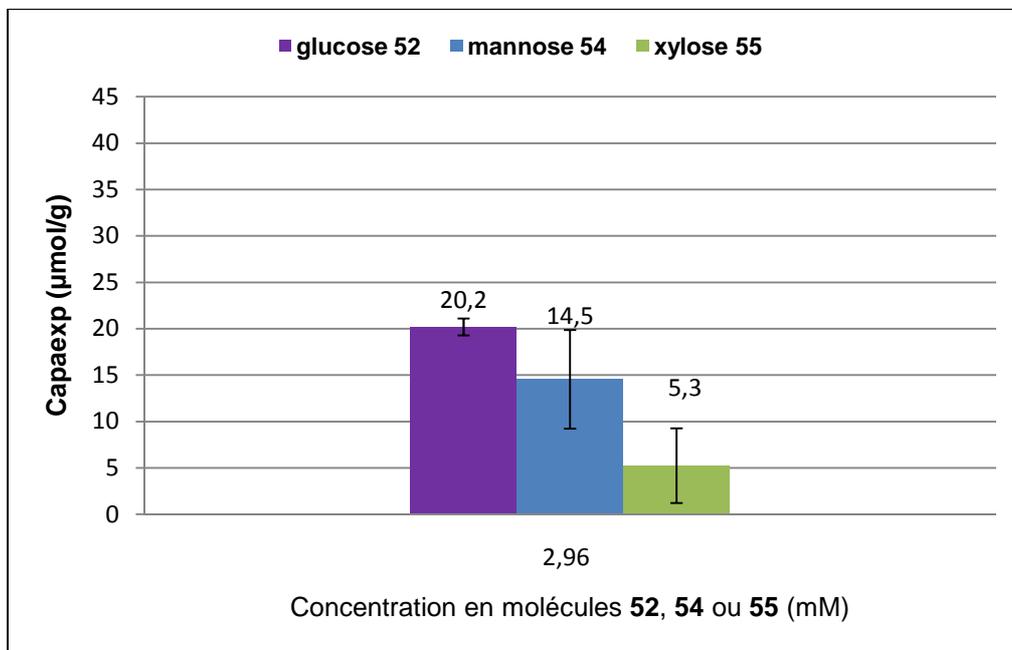
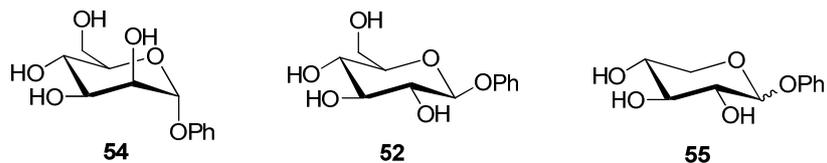
Coefficient de partage ($\mu\text{mol.mM}^{-1}/\text{g}$)		Facteur d'empreinte I
$K_{PMIPMan1c}$	K_{PC2c}	
4,88	2,25	2,2

Tableau 47 : Coefficients de partage et facteur d'empreinte pour le polymère imprimé **MIPman1c**

Ce facteur d'empreinte est plus faible que celui calculé dans le cas du polymère imprimé avec un template dérivé du glucose **MIPglu1c** (facteur d'empreinte de 9,2).

Voyons maintenant comment se comporte ce polymère **MIPman1c**, d'un point de vue de la sélectivité.

Pour déterminer la sélectivité mannose-glucose et mannose-xylose, le polymère imprimé **MIPman1c** a été incubé avec les dérivés **52** et **55** (mélange $\beta/\alpha = 1/1$) dans les mêmes conditions que le composé **54**, à la concentration C_{max} (**54**) soit 2,96 mM. Les résultats sont regroupés dans l'**Histogramme 15**. Les erreurs sont directement liées à la reproductibilité sur deux mesures de capa_{exp} réalisées sur deux incubations menées en parallèle.



Histogramme 15 : Capaexp du dérivé du glucose 52, du xylose 55 et du mannose 54 à Cmax (54)

La capacité du dérivé du glucose 52 est plus élevée que la capacité du dérivé 54 à Cmax (54) ; on observe donc une sélectivité inverse.

Afin de calculer les facteurs de sélectivité mannose-glucose et mannose-xylose, le calcul des coefficients de partage a été effectué. Le rapport de deux coefficients de partage donne le facteur de sélectivité correspondant (Tableau 49).

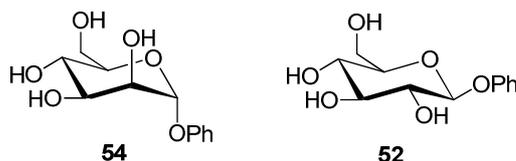
Coefficient de partage ($\mu\text{mol}/\text{mM}^{-1}/\text{g}$)		Facteurs de sélectivité	
Glucose	Xylose	Mannose-glucose	Mannose-xylose
7,45	1,44	0,5	2,8

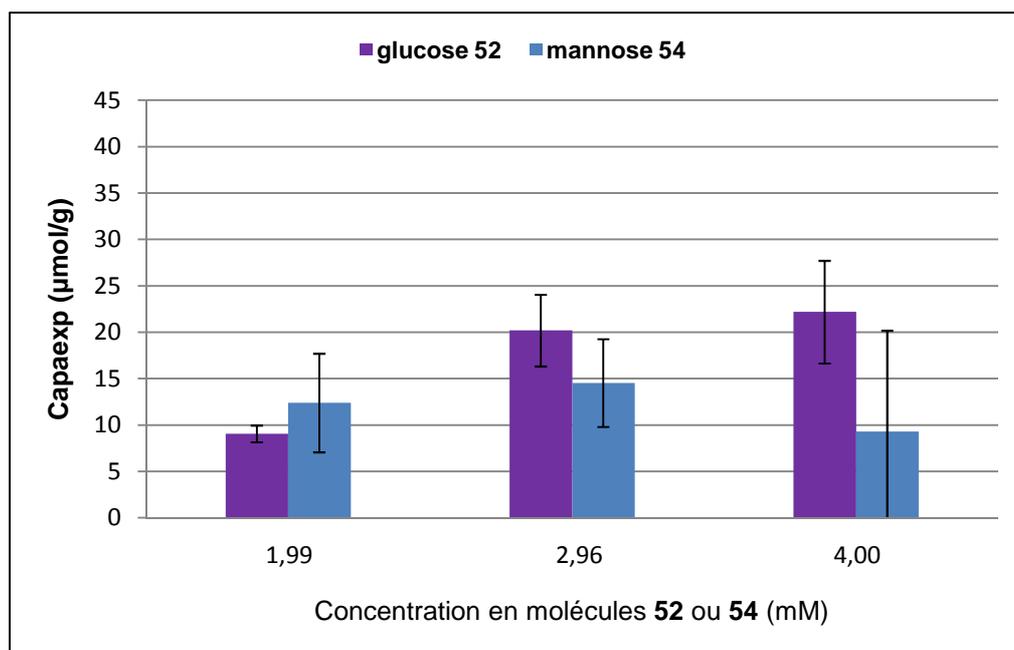
Tableau 49: Coefficients de partage et facteurs de sélectivité

Comparativement, pour **MIPglu1c**, le facteur de sélectivité glucose-mannose est de 1,7 et glucose-xylose, de 11,7.

Les facteurs de sélectivités pour **MIPman1c**, comme le facteur d’empreinte, sont donc moins élevés que pour **MIPglu1c**.

Afin de vérifier la tendance de sélectivité inverse mannose-glucose, le polymère imprimé **MIPman1c** a été incubé par la méthode du « batch process » avec différentes concentrations en dérivé **52** du glucose, à 10 °C, pendant 24 heures. Les résultats sont reportés dans l’**Histogramme 16**. Les erreurs sont liées à trois injections successives en CLHP.





Histogramme 16 : Etude de binding du polymère MIPman1c en présence des dérivés du glucose 52 et du mannose 54

A la concentration de 1,99 mM, la capacité du polymère **MIPman1c** à lier le dérivé du glucose **52** et du mannose **54** est identique.

Aux concentrations plus élevées (2,96 mM et 4,00 mM), le dérivé du glucose **52** est plus reconnu que le dérivé **54** du mannose. La sélectivité inversée est donc confirmée.

Cette sélectivité inversée obtenue dans le cas du polymère imprimé **MIPman1c** n'est pas aberrante.

Le manque de sélectivité du polymère imprimé **MIPman1c** pourrait s'expliquer par une structure géométrique différente des cavités dans l'espace. Les phénomènes de contraction des polymères imprimés pourraient probablement être aussi à l'origine de cette sélectivité inverse. La représentation schématique de la **Figure 72**, page 160, n'est probablement pas non plus très représentative de la cavité qui peut se situer à la surface de la particule sans être en profondeur dans la matrice.

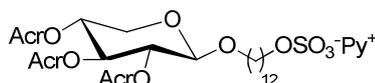
A titre d'exemple, ce type de phénomène a déjà été observé dans la littérature. En effet, Sellergren a synthétisé des polymères imprimés d'acides aminés par l'approche semi-covalente par la technique de polymérisation en masse.⁶³ Le polymère imprimé avec un dérivé

L d'amino-acides a un facteur de sélectivité D/L de 1,26, donc une sélectivité inversée par rapport au substrat de départ.

Afin de poursuivre nos études d'impression de différents templates, nous avons préparé un polymère imprimé avec un dérivé du xylose qui ne comporte aucun carbone en position C6.

II.2 Polymère imprimé avec un dérivé de xylose

Nous avons donc préparé un polymère imprimé avec le template du xylose **47** par mini-émulsion « one pot », avec une capacité théorique de 46 $\mu\text{mol/g}$ et 20 % de DVB (**MIPxyl1**) selon la procédure décrite au I.1.2.



47

Un latex est obtenu en fin de polymérisation. Après ajout d'un volume d'acétone, décantation, lavages successifs avec un mélange 1/1 acétone/eau et lyophilisation, le polymère **MIPxyl1** est récupéré.

Une suspension de ce polymère imprimé **MIPXyl1** dans le chloroforme a été caractérisée par MET (**Figure 81**).

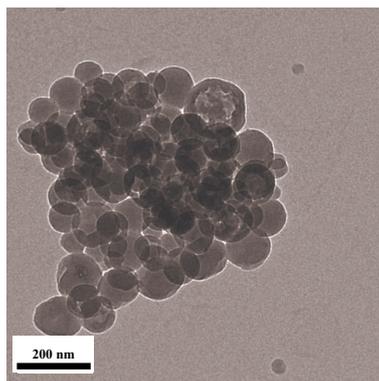


Figure 81: MET du polymère imprimé MIPxy11, échelle 200nm

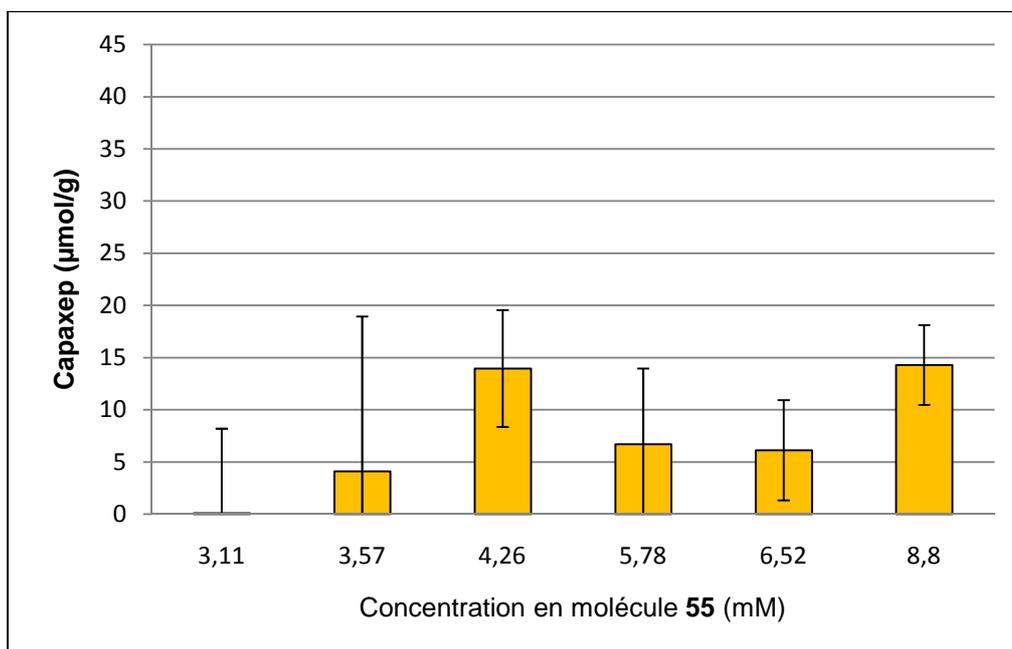
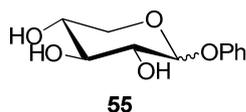
Des particules légèrement déformées sont observées comparativement à **MIPglu1**. Elles semblent également plus agrégées que dans le cas de **MIPglu1** et **MIPman1**.

L'analyse de ce polymère **MIPxy11**, en suspension dans l'éthanol, par diffusion de la lumière conduit à une polydispersité de 0,607 ce qui semble confirmer l'analyse par MET.

Un spectre Infra-Rouge (neat) du polymère imprimé **MIPxy11** a confirmé l'incorporation du template **47** dans la matrice styrène/DVB.

Le polymère imprimé **MIPxy11** a été clivé dans les mêmes conditions que les polymères imprimés avec du glucose, c'est-à-dire 3 jours à reflux en présence d'un mélange équimolaire 5 M NaOH/MeOH. Après acidification avec de l'acide chlorhydrique 12 N, lavages successifs avec de l'eau jusqu'à l'obtention d'un pH de 7 et lyophilisation, le polymère **MIPxy11c** est obtenu.

Le binding du polymère imprimé **MIPxy11c** a été testé par la méthode du « batch process », à 10 °C, après 24 heures d'incubation, dans l'acétonitrile en présence de différentes concentrations en dérivé **55** (**Histogramme 17**). Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type sur trois injections en CLHP.



Histogramme 17: Etude du binding du polymère MIPxyl1c avec le dérivé 55

La courbe de binding atteint une saturation pour une concentration en xylose de 4,26 mM (C_{max} (**55**)). La capacité moyenne est d'environ $14,0 \pm 5,6$ µmol/g.

Cette capacité reste du même ordre de grandeur que celle obtenue pour **MIPglu1c** avec le dérivée **52** du glucose. C_{max} (**55**) est un peu plus élevée que C_{max} (**52**) (3,40 mM). Etant donné l'absence d'une fonction hydroxyle sur le dérivé du xylose **55**, cette différence entre C_{max} (**55**) et C_{max} (**52**) n'est pas aberrante.

Pour déterminer la sélectivité xylose-glucose, le polymère imprimé **MIPxyl1c** a été mis en contact, avec le dérivé **52** dans les mêmes conditions que le composé **55**, à la concentration $C_{max}(\mathbf{52})$ soit 3,40 mM et $C_{max}(\mathbf{55})$ soit 4,26 mM. Les résultats sont regroupés dans le **Tableau 48**.

Capacité expérimentale en $\mu\text{mol/g}$	
Glucose à C_{max} (52): 3,40 mM	Glucose à C_{max} (55): 4,27 mM
$6,0 \pm 3,5$	$14,1 \pm 3,5$

Tableau 48: Capacité du dérivé du glucose 52 à C_{max} (52) et C_{max} (55)

Comme dans le cas de **MIPman1c**, le polymère imprimé **MIPxyl1c** n'est pas sélectif vis-à-vis du template d'origine. Les capacités des dérivés du glucose **52** et du xylose **55** déterminées avec le polymère imprimé **MIPxyl1c** sont similaires.

Pour le polymère imprimé **MIPglu1c**, une différence très nette de capacité avait été observée entre le dérivé **52** du glucose ($15,8 \pm 1,9 \mu\text{mol/g}$) et le dérivé **55** du xylose ($1,5 \pm 1,2 \mu\text{mol/g}$).

Conclusion 3

Les premiers polymères imprimés avec un dérivé de mannose **MIPman1c** et de xylose **MIPxyl1c**, préparés avec la formulation idéale déterminée après optimisation des polymères imprimés avec du glucose (20 % de DVB, capath de $46 \mu\text{mol/g}$) ne sont pas sélectifs vis à vis de leur template d'origine respectif.

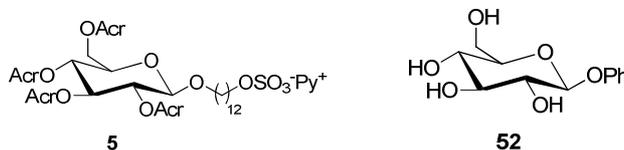
La géométrie dans l'espace des templates du mannose et du xylose entraîne probablement une structuration différente des cavités à la surface des polymères imprimés qui peut être à l'origine des sélectivités inverses observées. Aucune explication de ce phénomène n'est connue à ce jour.

Conclusion générale du chapitre 3 :

Le premier polymère imprimé avec un dérivé de glucose, préparé par mini-émulsion « one pot », a montré un facteur d’empreinte élevé (9,2) et des facteurs de sélectivité compris entre 1,7 (glucose-galactose) et 11,7 (glucose-xylose).

La présence des acides carboxyliques est indispensable dans le processus de reconnaissance et de complexation polymère-substrat. Ceci a été mis en évidence par l’estérification de ces mêmes fonctions acides, qui a entraîné une inhibition du binding. Il semble également que des interactions hydrophobes interviennent dans le processus de reconnaissance polymère-substrat. Une étude plus détaillée doit être menée pour conclure quant aux types d’interactions qui interviennent réellement dans les phénomènes de complexation polymère-analyte.

Par ailleurs, l’optimisation de la formulation des polymères imprimés avec le template **5** du glucose a conduit aux résultats suivants :



- plus la capacité théorique augmente :
 - plus le binding des polymères avec le dérivé **52** du glucose augmente
 - plus la sélectivité des polymères imprimés diminue

- quelle que soit la quantité de DVB dans la matrice styrénique:
 - pour une capacité théorique de 7 $\mu\text{mol/g}$, la capacité des polymères imprimés est nulle.
 - pour une capacité théorique de 15 $\mu\text{mol/g}$, les polymères imprimés ne reconnaissent que le dérivé **52** du glucose ; ceux sont donc des matrices extrêmement sélectives.

- plus la quantité de DVB augmente dans la matrice styrénique :
 - plus le binding diminue quelle que soit la capacité théorique des polymères imprimés (ceci étant probablement dû à une extraction plus difficile du template **5**)
 - moins les polymères imprimés sont sélectifs (les polymères de la série à 20 % de DVB sont plus sélectifs que ceux de la série à 58 % de DVB)

Au cours de cette optimisation, les polymères imprimés préparés avec 20 % de DVB et avec une capacité théorique de 46 $\mu\text{mol/g}$, semblaient être un bon compromis entre capacité et sélectivité. C'est donc cette formulation que nous conserverons pour la suite de nos études.

Comparativement, dans la littérature, tous les polymères imprimés de sucres sont fortement réticulés. Les sélectivités rapportées sont du même ordre de grandeur que celles obtenues avec nos polymères imprimés préparés par mini-émulsion « one pot » avec 20 % de DVB (cf. chapitre 1, paragraphe IX).

Les premiers polymères imprimés (**MIPman1c** et **MIPxyl1c**) préparés avec des templates, non basés sur une structure de type glucose, ne semblent pas sélectifs par rapport à leur template d'origine respectif. Une organisation structurale de la cavité dans l'espace pourrait être à l'origine de ce manque de sélectivité.

Perspectives :

Toutes ses études ont été débutées mais faute de temps elles n'ont pas pu être poursuivies.

- *Application 1 : Utilisation des polymères imprimés comme groupement protecteur temporaire de fonctions hydroxyles*

Les synthèses d'oligosaccharides sont souvent complexes. Elles nécessitent des étapes de protections et déprotections successives. Etant donné la structure même de nos polymères imprimés en surface, il devrait être possible de les utiliser comme groupement protecteur temporaire des fonctions hydroxyles et de réaliser des couplages glycosydiques sélectifs en position anomérique (**Figure 82**).

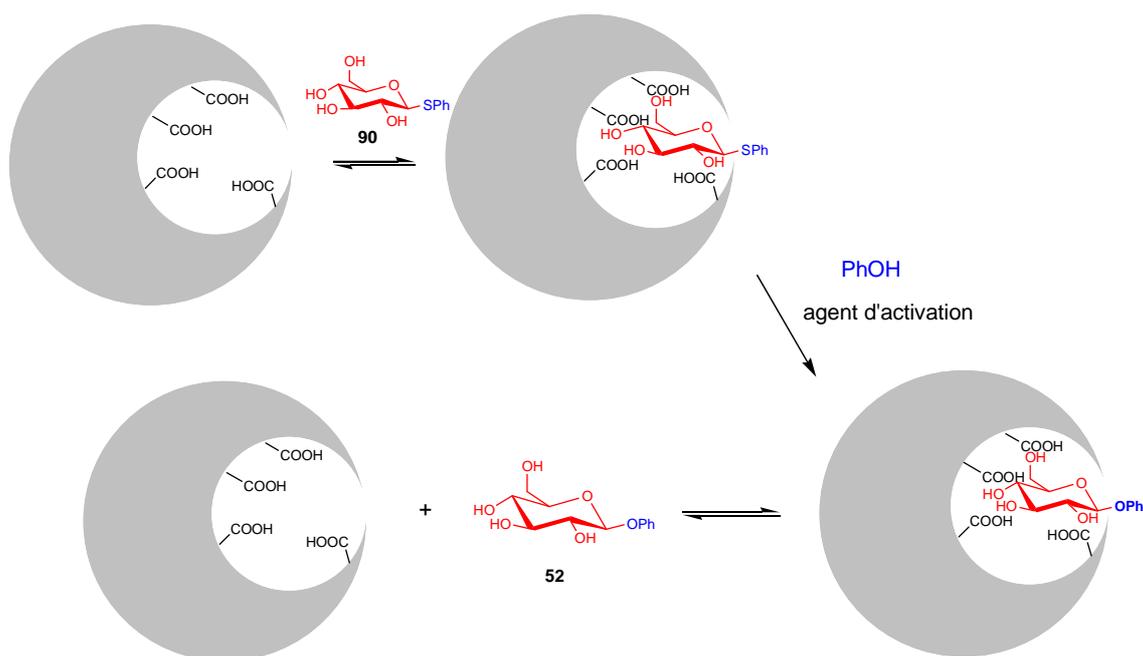


Figure 82: Glycosylation d'un glucose activé en position anomérique et piégé dans un polymère imprimé

Des applications de ce type ont déjà été rapportées dans la littérature. Ainsi, dans le chapitre 1, page 68, des polymères imprimés avec des dérivés de stéroïdes, par polymérisation en masse, par l'approche covalente en utilisant des esters boroniques ont pu être utilisés

comme groupements protecteurs temporaire et permettre des acétylations sélectives de différents stéroïdes.⁶⁵

A ce jour, des polymères imprimés préparés par l'approche semi-covalente n'ont jamais été utilisés comme groupement protecteurs temporaires.

La première étape du processus de la **Figure 82** consiste à piéger le monosaccharide activé **90** en position anomérique dans un polymère imprimé avec un dérivé de glucose. Ceci a déjà été réalisé lors de l'étude de l'influence du groupement anomérique sur le binding (cf. paragraphe I.1.8). Des tests d'activation de la position anomérique sont actuellement en cours.

Une expérience de contrôle sera également menée en l'absence du polymère imprimé.

- ***Application 2 : Marquage par un fluorophore de polymères imprimés avec un dérivé de glucose***

Les particules nanométriques imprimées avec des dérivés de monosaccharides pourraient être utilisés comme récepteurs multivalents artificiels. Ils pourraient être employés pour la détection de cellules ou de bactéries possédant des sucres à la surface.

Pour cette application, il faut, dans un premier temps, vérifier que nos particules de polymères sont capables de lier des sucres de manière multivalente dans un milieu aqueux.

De plus, il faudrait être capable de rendre ces particules de polymères fluorescentes pour la détection tout en conservant les propriétés de binding.

- ***Application 3 : Etude du clivage***

Très peu d'études systématiques des conditions de clivage et d'extraction de template ont été effectuées dans la littérature. En introduisant un traceur hétéroatomique (**Figure 83**), il devrait être possible d'étudier rapidement un grand nombre de conditions de clivage et de détecter l'efficacité de ces extractions par des analyses élémentaires de l'azote.

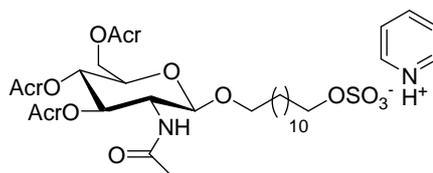


Figure 83: Exemple de template à synthétiser pour les études de clivage

La présence d'un traceur hétéroatomique pourrait également permettre de montrer le devenir du template au cours du processus polymérisation/clivage.

- **Application 4 : Etude de l'influence de l'état de surface sur la sélectivité**

L'étude menée dans la partie I.1.8, sur l'influence d'un groupement phosphate sur le binding non spécifique demande à être approfondie. Le binding du dérivé **52** du glucose est de $13,2 \pm 1,9 \mu\text{mol/g}$ tandis que pour le dérivé **55** du xylose est de $28,0 \pm 2,3 \mu\text{mol/g}$ pour la même concentration.

La présence des groupements phosphates induits peut être une sélectivité en fonction du nombre ou de la position dans l'espace des fonctions hydroxyyles des analytes.

Chapitre 4 : Polymères imprimés avec des dérivés de disaccharides

Dans ce chapitre, nous avons étudié la synthèse de polymères imprimés avec un dérivé de maltose et de cellobiose, par l'approche semi-covalente et mini-émulsion « one pot » décrite dans le chapitre 3, **I.1.1**.

Rappel des notations :

Un polymère imprimé avec du maltose sera noté **MIPmulti** et un polymère imprimé avec du cellobiose **MIPcelloi**, avant clivage.

Après clivage, ces mêmes polymères seront notés **MIPmalticj** et **MIPcelloicj** ; j signifiant que plusieurs clivages ont été réalisés sur un même lot de polymère imprimé.

I. Polymères imprimés avec un dérivé du maltose

Rappel : Nous avons montré, dans le chapitre 3, que la formulation idéale pour les polymères imprimés avec un dérivé du glucose est 20 % de DVB pour une capacité théorique de 44 $\mu\text{mol/g}$.

Le premier polymère imprimé avec un dérivé du maltose a donc été préparé avec cette formulation, par mini émulsion « one pot » selon le mode opératoire décrit pour **MIPglu1** (cf.chapitre 3, I.1.2).

Les pourcentages d'AMBN, de SDS et d'eau sont identiques à ceux utilisés pour les polymères imprimés avec des monosaccharides.

Différents pourcentages d'hexadécane ont été dans un premier temps testé (1, 3, 5, 10, 15 et 20 %). Quel que soit le pourcentage d'hexadécane utilisé, une prise en masse du milieu de polymérisation a systématiquement été constatée.

La quantité d'hexadécane a donc été fixée à 3 % en masse pour tous les polymères imprimés avec des dérivés de disaccharides. (0,7 % en masse d'hexadécane était utilisé pour les polymères imprimés avec des monosaccharides).

Un premier polymère imprimé avec le template **49** du maltose a donc été préparé. En parallèle, un polymère de contrôle (**C5**) a également été synthétisé, par mini-émulsion « one pot », en présence de sept équivalents de monomère tensioactif **M1** (**Figure 84**).

Le template **49** est parfaitement soluble dans le mélange styrène/DVB.

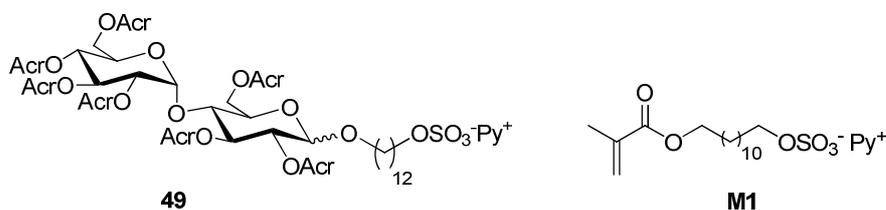


Figure 84: Template du maltose et monomère M1

Contrairement aux polymères imprimés avec des dérivés de monosaccharides, pour la même formulation, on constate une prise en masse du milieu de polymérisation dans le cas du polymère **MIPmalt1**. Cette prise en masse n'a pas été constatée pour le polymère de contrôle **C5**.

Un work up identique au polymère imprimé **MIPglu1c** a été effectué. De l'acétone est additionné au milieu de polymérisation; après une première centrifugation dans un mélange 1/1 acétone/eau, décantation, le surnageant est retiré. La décantation s'effectue plus facilement que pour les monosaccharides. Plusieurs lavages acétone/eau et décantations (5 fois) successives sont ensuite réalisés. Les deux polymères sont ensuite séchés au lyophilisateur.

Ce premier polymère imprimé **MIPmalt1**, mis en suspension dans le chloroforme, a été caractérisé par MET (**Figure 85**).

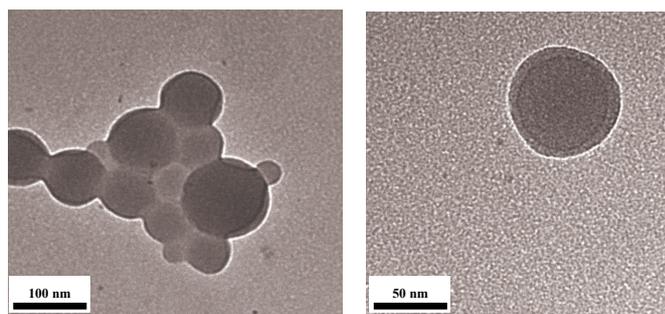


Figure 85: Caractérisation par MET du polymère imprimé du maltose MIPmalt1 (échelle : 100 nm et 50 nm)

La morphologie des particules obtenues, dont la taille varie entre 50 et 150 nm, restent identiques à celles des polymères imprimés avec le template du glucose. Cependant, ces particules de polymères semblent plus agrégées. Ceci étant une caractéristique des polymères imprimés avec des disaccharides comme nous le verrons plus loin.

Un spectre Infra-Rouge (pastille de KBr ; background au KBr) a été effectué afin de vérifier l'incorporation du template **49** dans la matrice polymérique (**Figure 87**).

1.1 Etude du lot MIPmalt1c

Un premier clivage de **MIPmalt1** a été effectué sur une échelle de 150 mg environ de polymère à reflux pendant 4 jours en présence d'un mélange de 10 M NaOHaq/méthanol. Etant donné la présence de trois fonctions esters supplémentaires à cliver, la concentration de soude utilisée est plus élevée (10 M contre 5 M) et le temps de clivage plus long (4 jours au lieu de 3) par rapport aux clivages de polymères imprimés avec des dérivés de monosaccharides.

Le work up reste identique à celui mené sur **MIPglu1c** ; après acidification avec de l'acide chlorhydrique 12 N, des lavages successifs à l'eau jusqu'à l'obtention d'un pH 7 et séchage au lyophilisateur, le polymère **MIPmalt1c1** est récupéré.

La morphologie de ce polymère imprimé clivé a également été vérifiée par MET (**Figure 86**).

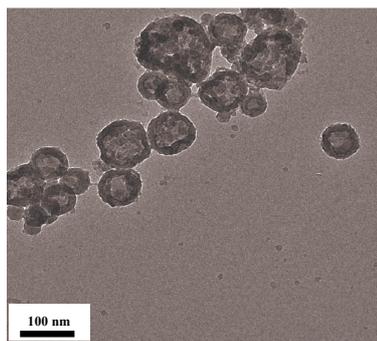


Figure 86: Caractérisation par MET du polymère imprimé clivé MIPmalt1c1, échelle 200 nm

L'aspect des particules de polymères est différent, après clivage. Les particules semblent déformées. Ce n'était pas le cas pour le polymère **MIPglu1c**. C'est la seconde différence constatée entre les polymères imprimés avec des dérivés de mono- et des disaccharides.

Un spectre Infra Rouge (pastille de KBr, background au KBr) du polymère imprimé après clivage a été réalisé (**Figure 87**).

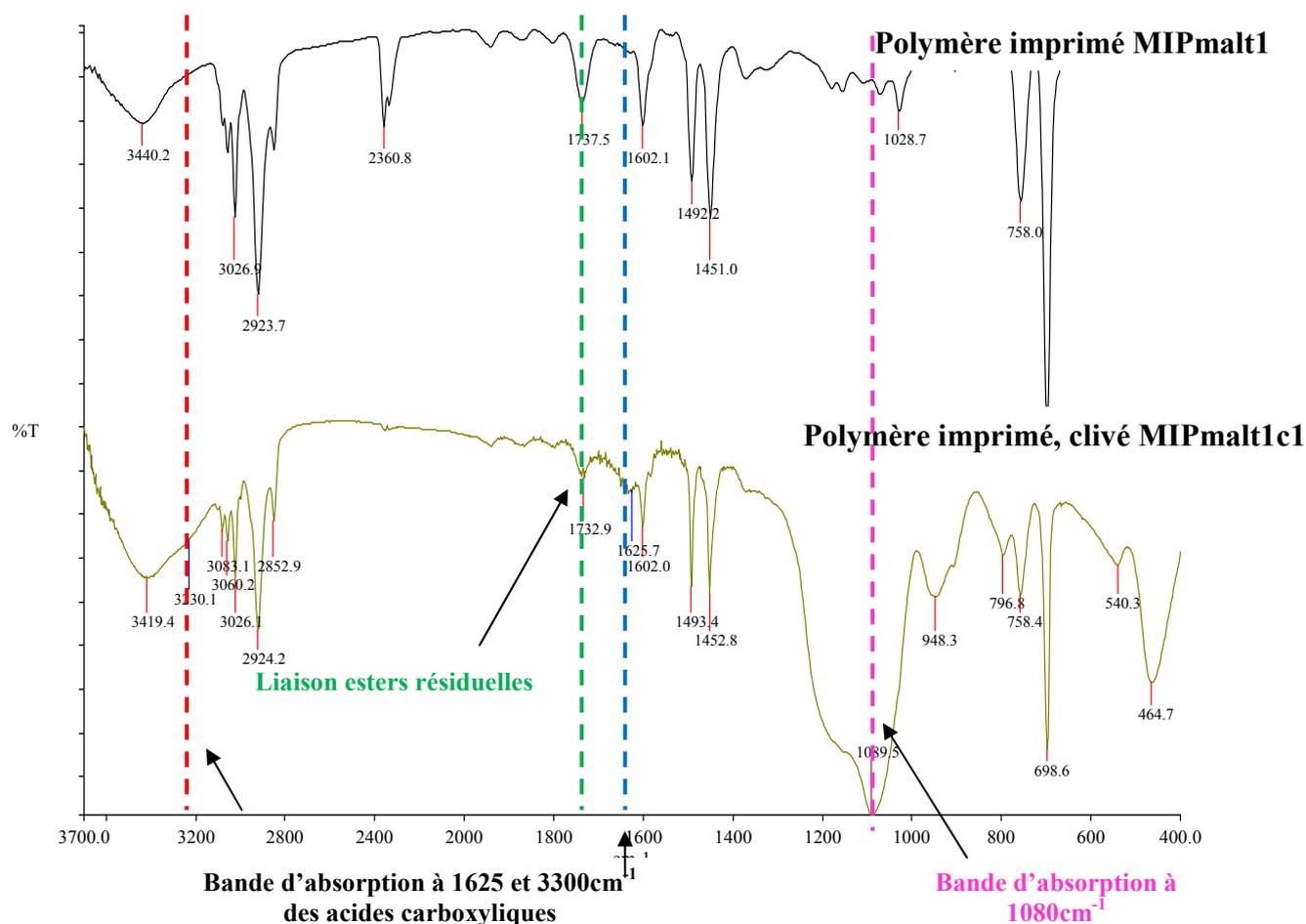


Figure 87: Spectre Infra Rouge du polymère imprimé MIPmalt1 et du polymère clivé MIPmalt1c1

Sur le spectre Infra Rouge du polymère imprimé après clivage **MIPmalt1c1**, la bande d'absorption des fonctions esters à 1737 cm^{-1} a diminué d'intensité et deux nouvelles bandes d'absorption caractéristiques des fonctions acides carboxyliques sont apparues à 1625 cm^{-1} et 3230 cm^{-1} . Les mêmes constatations avaient été faites sur le spectre Infra-Rouge de **MIPglu1c**.

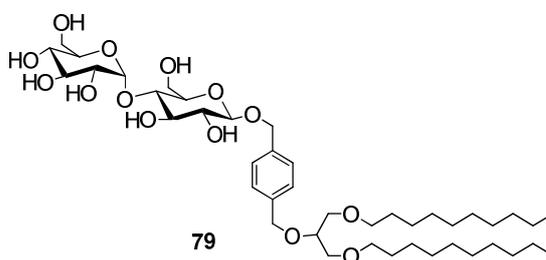
Par contre, une autre bande d'absorption, non caractérisée, est également apparue à 1080 cm^{-1} . La présence de cette bande n'avait jamais été constatée sur les spectres Infra Rouge des polymères imprimés de monosaccharides.

Le polymère de contrôle **C5** a également été clivé dans les mêmes conditions que **MIPmalt1**, c'est-à-dire 4 jours à reflux dans un mélange méthanol/NaOHaq (10 M). Ce

polymère a subi le même work up acide, soit acidification avec de l'acide chlorhydrique 12 N, lavages successifs avec de l'eau jusqu'à l'obtention d'un pH de 7 et lyophilisation.

Des études de binding vont à présent pouvoir être menées sur ce premier lot **MIPmalt1c1**.

Rappel : D'après l'étude menée au chapitre 2, II.2, aucun des disaccharides synthétisés n'était soluble dans l'acétonitrile. La molécule **79** est soluble dans le chloroforme. Ce solvant induit un gonflement des matrices polymériques et n'est donc pas idéal pour réaliser des études de binding.



Nous avons, tout de même, tenté d'effectuer des expériences de reconnaissance polymère-analyte dans le chloroforme afin d'évaluer l'efficacité de l'impression moléculaire selon l'équilibre de complexation de la **Figure 88**.

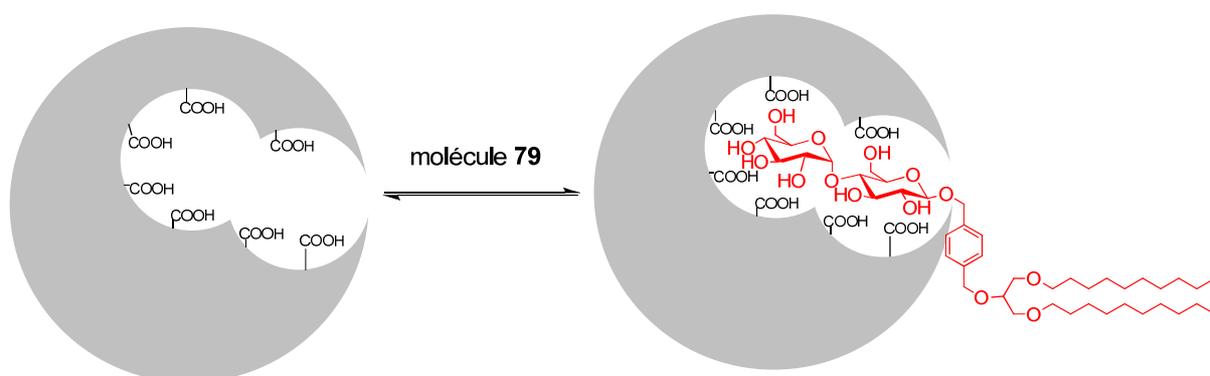


Figure 88: Equilibre de complexation MIPmalt1c1-analyte 79

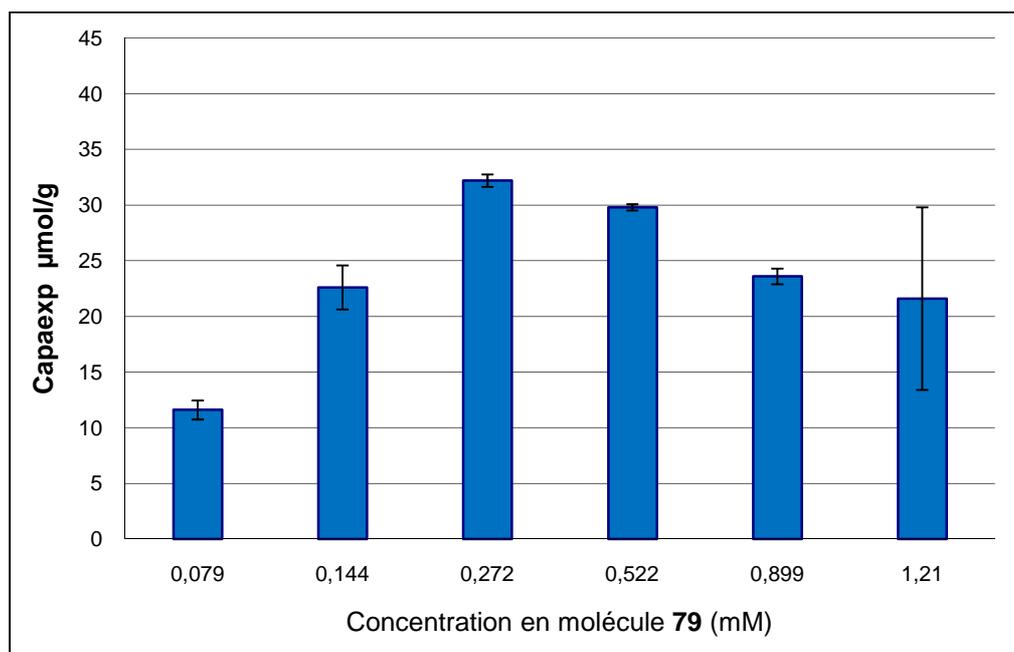
Des tests d'incubation entre le polymère imprimé **MIPmalt1c1** et la molécule **79** ont été réalisés dans le chloroforme, après 24 heures d'incubation à 10 °C, par la méthode du « batch process », déjà utilisée pour les études de binding des polymères imprimés avec des monosaccharides. Une droite de calibration a été tracée dans une gamme de concentration variant de 0,22 à 2,2 mM ($r^2 = 0,9998$).

Comme précédemment, pour les études de binding des polymères imprimés avec des monosaccharides, les concentrations avant et après 24 heures d'incubation sont déterminées par CLHP et la différence entre ces deux concentrations est attribuée à la capacité du polymère imprimé **MIPmalt1c1**.

Des problèmes liés à la décantation du polymère dans le chloroforme ont été constatés. Les très fines particules restent en suspension tandis que le reste du polymère flotte à la surface du chloroforme.

Etant donné qu'il s'agit de très fines particules (20 et 200 nm), il est très difficile d'envisager de filtrer le polymère. Des filtres possédant des pores de 50 nm ont été utilisés pour filtrer les incubations sur seringues mais les plus fines particules restent toujours en suspension. L'utilisation d'une précolonne a été nécessaire afin de ne pas injecter des particules sur la colonne CLHP.

Les résultats de la première série d'étude en « batch process » sont donnés dans l'**Histogramme 18**.



Histogramme 18 : Etude de binding du composé 79, après 24 h d'incubation à 10 °C avec MIPmalt1c1

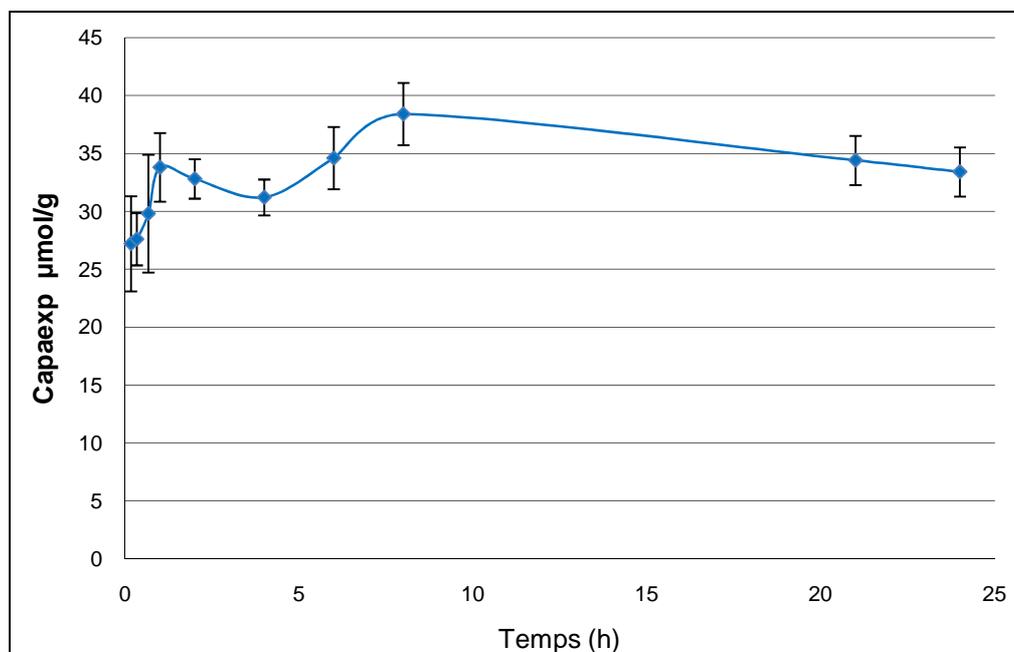
Ces premiers résultats sont encourageants, la capacité maximale expérimentale mesurée, de $32,2 \pm 0,6$ µmol/g de polymère, pour une concentration en molécule 79 de 0,27 mM, est élevée par rapport à la capacité théorique du polymère MIPmalt1c1 (capath: 44 µmol/g). Le rapport entre la capacité expérimentale et la capacité théorique est de 73 %. La reconnaissance du polymère de contrôle C5c, à la concentration de 0,27 mM, est faible, de l'ordre de $4 \pm 0,7$ µmol/g de polymère.

Ces résultats ne sont pas directement comparables avec les résultats de binding de MIPglu1c dont la capacité maximale, déterminée dans l'acétonitrile, en l'absence de chaînes lipidiques en position anomérique est de $15,8 \pm 1,9$ µmol/g.

De plus, si le chloroforme gonfle effectivement le polymère, les phénomènes de contraction dus à la présence des sept acides carboxyliques dans les cavités devraient être minimisés par rapport à des incubations dans l'acétonitrile.

Nous avons ensuite cherché à déterminer une constante de dissociation, comme réalisé sur le polymère MIPglu1'c par Pasquale Curcio (polymère synthétisé en parallèle de MIPglu1c, de même formulation).

La première étape consiste en une étude cinétique, dans le chloroforme, pour une concentration fixe en molécule **79** de 0,27 mM (C_{\max} (**79**)). Afin de vérifier si l'état d'équilibre est atteint après 24 heures d'incubation, la capacité du polymère **MIPmalt1c1** a été mesurée après différents temps d'incubation à 10 °C, dans le chloroforme (**Graphique 2**).

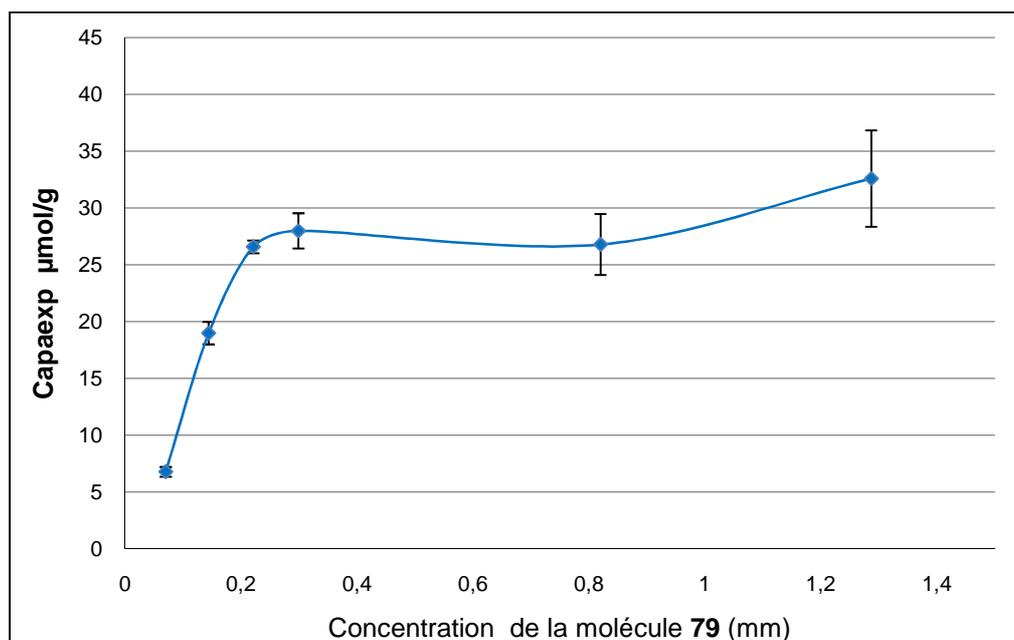


Graphique 2: Cinétique d'absorption du polymère imprimé MIPmalt1c avec le composé 79

La cinétique de binding est rapide; au bout d'une heure l'équilibre est atteint. La capacité à l'équilibre est d'environ $38,2 \pm 2,7$ µmol/g. La valeur de capaexp à 24 heures d'incubation est de $33,4 \pm 2,1$ µmol/g donc très similaire à celle obtenue sur l'**Histogramme 18** avec les expériences de binding à 24 heures, de $32,2 \pm 0,6$ µmol/g.

La valeur moyenne de capaexp au bout de 24 heures d'incubation est donc de $32,8 \pm 0,8$ µmol/g.

Nous avons, ensuite, incubé le polymère **MIPmalt1c1** avec différentes concentrations en molécule **79**, pour un temps d'incubation fixe de 1 heure (**Graphique 3**). Cette étude devrait nous permettre, à l'aide de modèles mathématiques, de caractériser les sites (homogènes ou hétérogènes) et de calculer éventuellement une constante de dissociation K_D .



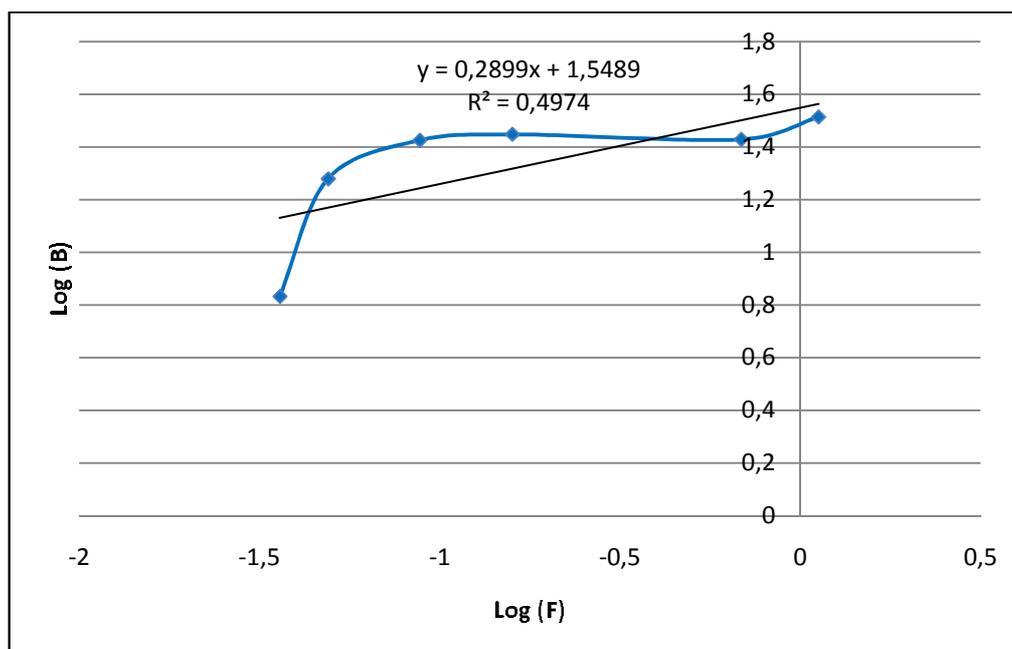
Graphique 3: Etude de Binding à 1 h, avec différentes concentrations en molécule 79

Il semble qu'une saturation à environ $27,0 \mu\text{mol/g}$ soit atteinte pour une concentration en molécule 79 supérieure à $0,22 \text{ mM}$.

Nous avons tenté de traiter les données expérimentales du **Graphique 3** par les modèles de Langmuir ou Freundlich, décrits en introduction (Chapitre 1, VII).

Le tracé de B/F en fonction de B et le tracé de $\text{Log } B$ en fonction de $\text{Log } F$ ne sont pas linéaires. A titre d'exemple, voici la courbe obtenue pour le tracé de $\text{Log } B$ en fonction de $\text{Log } F$ (**Graphique 4**). La non linéarité du tracé de $\text{Log } B$ en fonction de $\text{Log } F$ montre que les sites de binding sont hétérogènes.

Dans le cas du polymère **MIPglu1c**, les modèles de Bi-Langmuir et Freundlich étaient applicables. Deux populations de sites à haute et basse affinité avaient pu être caractérisées. Pour ce premier polymère imprimé avec un dérivé de maltose **MIPmalt1c**, les sites de binding semblent donc beaucoup plus hétérogènes que dans le cas de polymères imprimés avec un dérivé de glucose.



Graphique 4: Tracé de Log B en fonction de Log F pour le polymère MIPmalt1c1

Le traitement des données expérimentales du **Graphique 3** à l'aide du logiciel Prism (généralement utilisé pour le traitement des données pour les interactions protéine-substrat), avec l'approximation «one binding site», donne une constante de dissociation $K_D = 79,4 \pm 1,0 \mu\text{M}$ et une capacité maximale de $35,6 \mu\text{mol/g}$ de polymère, ce qui est en accord avec les expériences de binding à 24 heures où la capacité maximale était de $32,2 \mu\text{mol/g}$ de polymère. Etant donné que nous sommes en présence d'un système très hétérogène, il est difficile de conclure sur la valeur de la constante de dissociation obtenue par le logiciel Prism, qui est un logiciel utilisé pour des récepteurs biologiques et non pas synthétiques.

Nous avons ensuite cherché à étudier le binding de la molécule **85** avec une structure cellobiose (**Figure 89**).

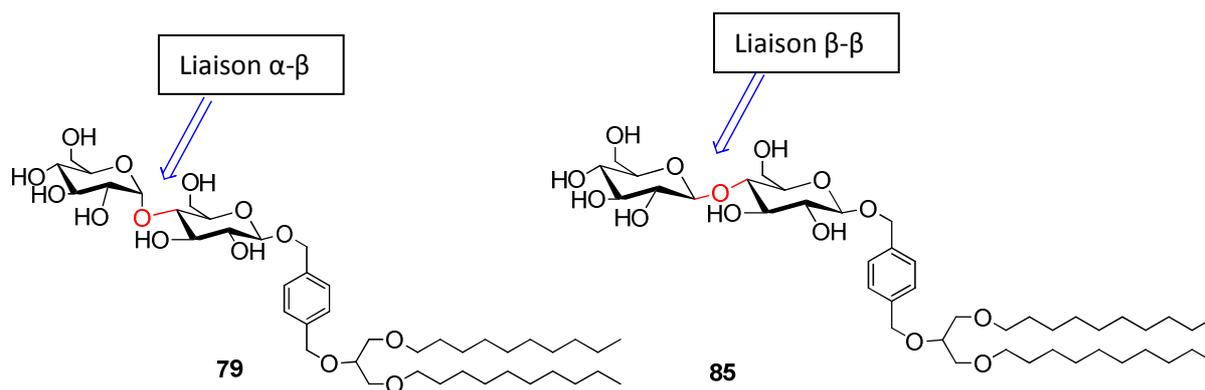
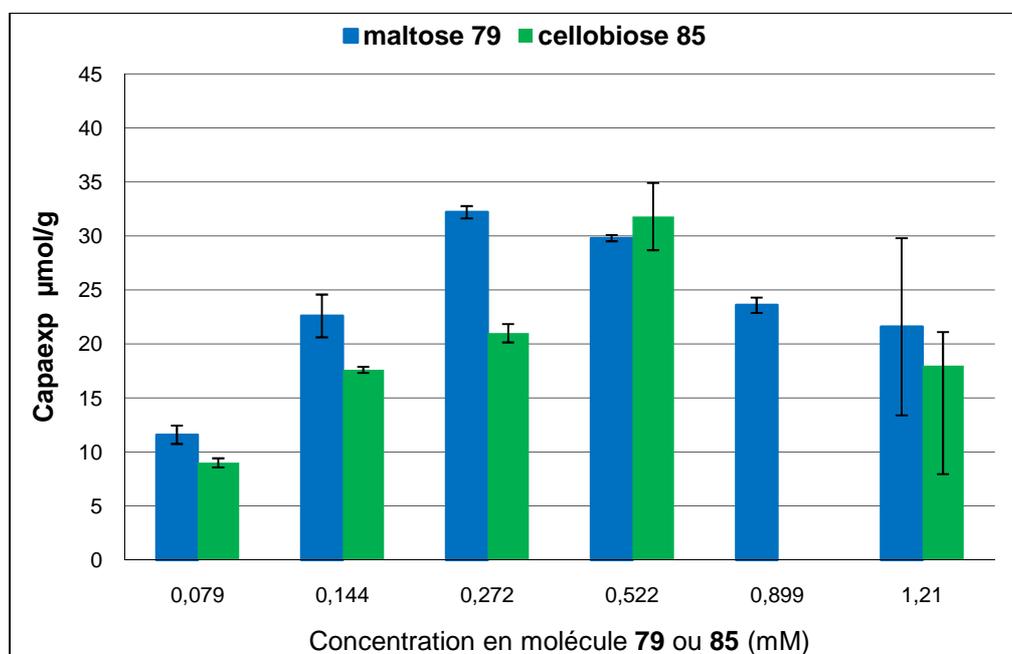


Figure 89 : Structure des dérivés du maltose et du cellobiose

Le but de cette étude est de déterminer la sélectivité de l’empreinte **MIPmalt1c1**. Si l’empreinte est sélective, le binding, dans les conditions du « batch process », après 24 heures d’incubation, dans le chloroforme à 10 °C, de cette molécule **85** devrait être moins important. Une droite de calibration a été tracée pour la composé **85**, dans une gamme de concentration comprise entre 0,055 et 1,3 mM ($r^2 = 0,9994$). Les résultats sont donnés dans l’**Histogramme 19**.

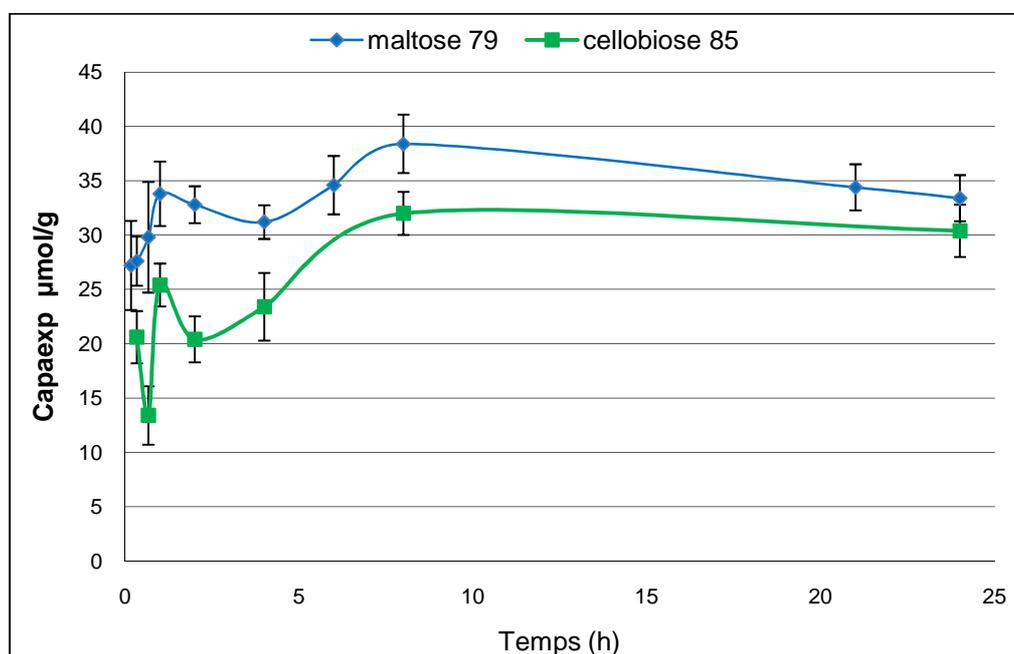


Histogramme 19 : Etude de binding à 24 h des molécules 79 et 85 avec MIPmalt1c1

Aux faibles concentrations, entre 0,055 et 0,079 mM, et aux concentrations plus élevées (supérieures à 0,6 mM), les deux composés **79** et **85** sont reconnus de manière quasi identique. Par contre, à 0,27 mM, soit C_{max} (**79**), le composé **85** (dérivé du cellobiose) n'est reconnu qu'à $21,1 \pm 0,8 \mu\text{mol/g}$ contrairement au composé **79** (dérivé du maltose) dont la reconnaissance est de $32,2 \pm 0,6 \mu\text{mol/g}$.

Etant donné l'allure de l'histogramme de binding du composé **85** avec **MIPmalt1c1**, ce point est probablement un artéfact de mesure. Une seconde incubation à cette concentration de 0,27 mM aurait été nécessaire afin de vérifier la valeur de la capacité. Le polymère **MIPmalt1c1** ne semble donc pas, a priori, sélectif pour le dérivé **79** du maltose.

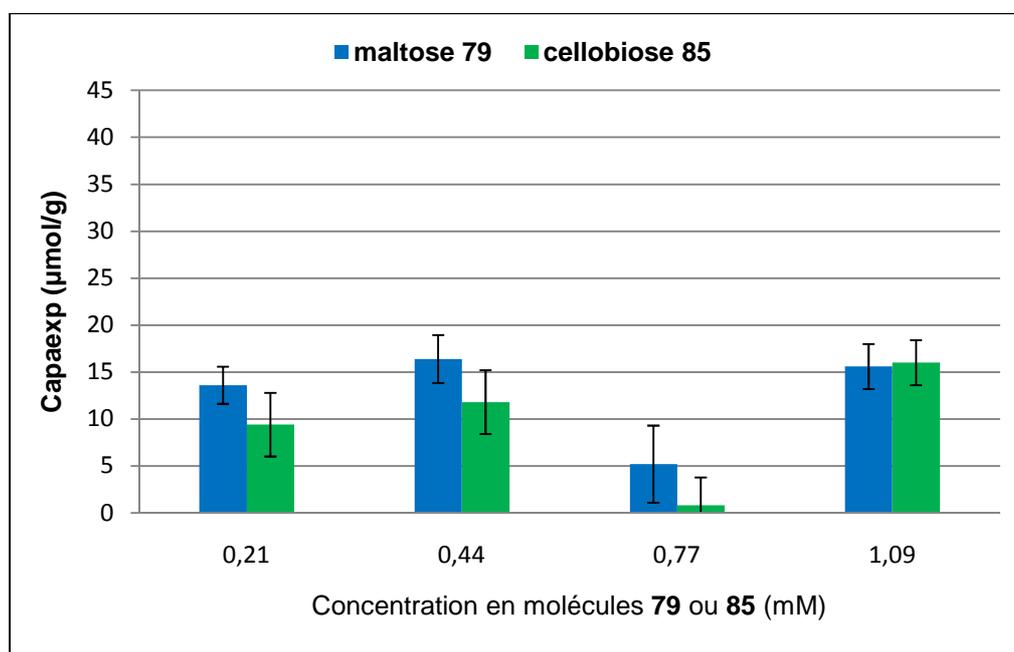
Nous avons ensuite procédé à une étude cinétique, dans nos conditions expérimentales du binding, de la molécule **85**, pour une concentration fixe de 0,41 mM en molécule **85**, avec le polymère imprimé **MIPmalt1c1** (Graphique 5).



Graphique 5: Cinétiques de binding du dérivés du maltose 79 et du cellobiose 85 avec le polymère MIPmalt1c1

A l'équilibre, la reconnaissance du dérivé du cellobiose **85** est plus faible que celle du dérivé du maltose **79**, ce qui semble montrer que le polymère imprimé **MIPmalt1c1** est sélectif pour le maltose, c'est-à-dire le template qui a servi à imprimer le polymère.

Afin d'affiner ce résultat, des tests de compétition ont été réalisés, c'est-à-dire que le polymère **MIPmalt1c1** a été mis en présence de mélanges équimolaires des dérivés maltose **79**/cellobiose **85**. Après optimisation des conditions de séparation de ces deux composés sur la CLHP, la capacité est évaluée au bout de 8 heures (**Histogramme 20**).



Histogramme 20 : Tests de compétition sur MIPmalt1c1 à 8 h

Lors des expériences de compétition, la capacité du polymère **MIPmalt1c** augmente quand la concentration en molécules **79** et **85** augmente, sauf pour une concentration de 0,77 mM où il semblerait y avoir un artéfact de mesure.

Pour une concentration de 1,09 mM, le polymère **MIPmalt1c1** reconnaît le dérivé **79** du maltose et **85** du cellobiose, sans discrimination.

Pour une concentration de 0,22 et 0,44 mM, le dérivé **79** du maltose semble être mieux reconnu que le dérivé du cellobiose **85** mais il reste difficile de conclure quant à la sélectivité avérée ou non du polymère imprimé du maltose **MIPmalt1c1**.

1.2 Etude des lots MIPmalt1c2 et MIPmalt1c2'

Un second clivage a été mené dans les mêmes conditions que précédemment sur le polymère **MIPmalt1**. Ce second clivage est noté **MIPmalt1c2**. La capacité de ce polymère a été testée après 24 heures d'incubation à 10 °C, dans le chloroforme, en présence de la molécule **79**. Elle atteint un maximum de $9,7 \pm 6,4$ $\mu\text{mol/g}$ de polymère pour une concentration en molécule **79** de 0,44 mM. Cette capacité est donc plus faible que celle déterminée sur le polymère **MIPmalt1c1**, de $32,2 \pm 0,6$ $\mu\text{mol/g}$.

Nous avons à nouveau mis en réaction, ce lot **MIPmalt1c2** pendant 2 jours en présence d'un mélange 10 M NaOHaq/méthanol pour obtenir **MIPmalt1c2'**, après acidification, lavages et séchage au lyophilisateur.

La capacité de ce polymère a été à nouveau testée après 24 heures d'incubation à 10 °C, dans le chloroforme, en présence de la molécule **79**. La capacité maximale de $24,2 \pm 2,5$ $\mu\text{mol/g}$ pour une concentration de 0,44 mM, reste plus faible que dans le cas du **MIPmalt1c1**.

A la vue des premiers résultats obtenus sur les lots **MIPmalt1c1** et **MIPmalt1c2**, les conditions d'extraction ne sont pas reproductibles pour un même lot de polymère, variant de 9,7 à 32,2 $\mu\text{mol/g}$ de polymère. Cependant, il est semble possible d'augmenter la capacité du polymère par deux clivages successifs. Compte tenu de ces résultats, nous avons cherché à optimiser et standardiser, dans un premier temps, le processus de polymérisation/clivage.

1.3 Optimisation du process de polymérisation/clivage

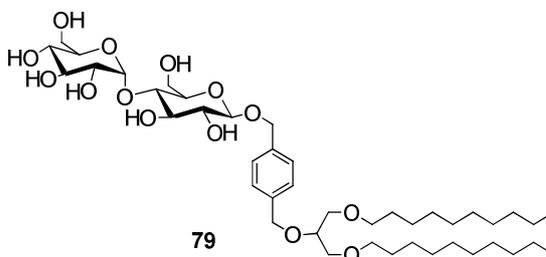
Afin de valider la reproductibilité du process de polymérisation/clivage, six différents lots de polymères ont été synthétisés, par mini-émulsion « one pot » selon le mode opératoire utilisé pour préparer **MIPmalt1** (cf. chapitre 4, page 192). Tous ces polymères ont une capacité théorique de 46 $\mu\text{mol/g}$ de polymère et contiennent 20 % de DVB dans la matrice styrénique.

De manière générale, tous les polymères imprimés ont pris en masse au cours de la polymérisation.

Des spectres Infra-Rouges ont été effectués sur chaque lot avant et après clivage. L'évolution de plusieurs bandes d'absorption est suivie :

- la disparition de la bande d'absorption des fonctions esters à 1730 cm^{-1}
- l'apparition de la bande d'absorption à 1080 cm^{-1} dont l'intensité est plus ou moins importante selon les lots et les clivages
- l'apparition de deux bandes d'absorption des fonctions acides carboxyliques à 1630 cm^{-1} et 3300 cm^{-1} .

Seules des études de binding, après incubation pendant 24 heures à 10 °C , dans le chloroforme, avec la molécule **79**, sont fiables pour évaluer l'efficacité du clivage.



Les différents lots de polymère et conditions utilisés pour le clivage et le work up sont réunis dans le **Tableau 49**.

Tous les résultats ont été reproduits deux fois sur deux incubations de polymères menées en parallèle.

Entrée	lots	clivage	Work up	Bandes d'absorption à		Capaexp (μmol/g)
				1730cm ⁻¹	1080cm ⁻¹	
1	MIPmalt2c1	130 mg	Lavages HCl	non	oui	70,4 ± 2,8
	MIPmalt2c1'	-	Lavages bis HCl	oui	oui	61,6 ± 2,4
2	MIPmalt3c1	125 mg	Lavages HCl	non	oui	non testé
	MIPmalt3c2	123 mg	Lavages HCl	oui	oui	27,7 ± 1,8
3	MIPmalt4c1	120 mg sous pression	Lavages HCl	non	non	< 1
	MIPmalt4c2	120 mg sous pression	Lavages HCl	non	non	9,7 ± 1,9
4	MIPmalt5c1	600 mg	Lavages HCl	oui	non	29,1 ± 0,1
	MIPmalt5c2	200 mg LiAlH ₄	Lavages HCl	oui	non	106,6 ± 2,1
5	MIPmalt6c1	600 mg	Lavages HCl	oui	non	15,4 ± 2,7
	MIPmalt6c1'	Second clivage MIPmalt6c1	Lavages HCl	oui	non	19,8 ± 2,0
5	MIPmalte2	600 mg	Lavages HCl	oui	non	13,2 ± 3,9
	MIPmalte2'	-	Lavages bis HCl	oui	non	22,0 ± 1,7
6	MIPmalt6c3	300 mg sonication 20min avant clivage	Lavages HCl	oui	non	20,7 ± 1,0
	MIPmalt6c3'	-	Lavages bis HCl	oui	non	22,0 ± 1,5
6	MIPmalt7c1	630 mg	Lavages HCl	oui	non	15,8 ± 3,4
	MIPmalt7c2	300 mg	Sans lavages HCl	oui	non	18,6 ± 3,2
	MIPmalte3	794 mg	Lavages HCl	oui	non	18,5 ±

Tableau 49: Capacité de différents lots de polymères imprimés en fonction du clivage

De manière générale, tous les polymères sont clivés à reflux pendant 4 jours dans un mélange 1/1 méthanol/NaOHaq (10 M), sauf pour le polymère **MIPmalt5c2**, clivé avec LiAlH₄ dans le THF (**Tableau 49**, entrée 4).

Tous les polymères ont subi un work up acide et des lavages successifs avec de l'eau jusqu'à l'obtention d'un pH de 7, sauf pour le polymère **MIPmalt7c2** (**Tableau 49**, entrée 6).

Certains lots de polymères ont subi un deuxième work up acide (**Tableau 49**, entrées 1 et 5) afin de voir l'influence du work up sur la capacité des polymères imprimés.

Clivage sur 100-150 mg :

Pour les premiers lots de polymères (**MIPmalt2**, **MIPmalt3** et **MIPmalt4**), des clivages sur des faibles quantités de polymère ont été réalisés. Nous pensions ainsi pouvoir améliorer l'efficacité du clivage. Pour ces polymères imprimés, la capacité de l'empreinte varie entre 0 et 70,4 $\mu\text{mol/g}$ de polymère. Le clivage dans le mélange 10 M NaOHaq/méthanol n'est donc pas très reproductible.

La capacité théorique des polymères est de 46 $\mu\text{mol/g}$, **MIPmalt2c1** et **MIPmalt2c2** présentent donc une capacité expérimentale supérieure à la capacité théorique.

Pour **MIPmalt3**, un excès de masse a été constaté lors du premier clivage.

De manière générale, les spectres Infra-Rouge des polymères **MIPmalt2cj** et **MIPmalt3cj** présentent tous la bande d'absorption à 1080 cm^{-1} .

Le clivage sous pression du lot **MIPmalt4** n'a pas permis d'améliorer les conditions de clivage.

Clivage sur 400-600 mg :

Dans les lots suivants (**MIPmalt5**, **MIPmalt6** et **MIPmalt7**), nous avons réalisé des clivages sur de plus grande quantité de polymère, de l'ordre 600 mg afin de déterminer si l'efficacité du clivage pouvait dépendre de l'échelle à laquelle le clivage est effectué.

Aucun spectre Infra-Rouge de ces polymères ne montre la présence de la bande d'absorption à 1080 cm^{-1} .

Identification de la bande d'absorption à 1080 cm^{-1} :

Afin d'analyser la surface de nos particules de polymère, une analyse XPS du polymère imprimé **MIPmalt7** et du polymère imprimé clivé **MIPmalt7c1** a également été menée. Cette analyse consiste à déterminer les propriétés chimiques en surface d'un matériau par diffraction des rayons X. Avant clivage, la surface du polymère **MIPmalt7** est composée de 90 % de carbone et 10 % d'oxygène.

Après clivage, l'analyse de la surface du polymère **MIPmalt7c1** montre la présence de silice. Ceci provient de l'attaque de la silice du verre par la soude 10 M. La présence de silice peut entraîner une perturbation au niveau de la reconnaissance des substrats lors des essais de binding.

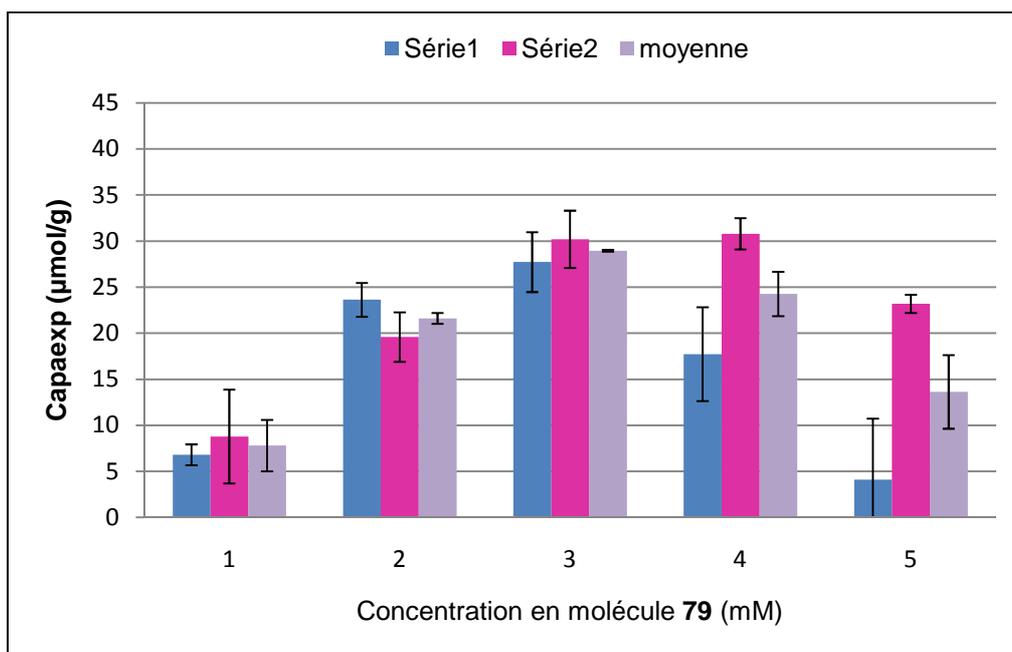
Après une analyse plus détaillée des spectres Infra-Rouge, la bande d'absorption présente à 1080 cm^{-1} , plus ou moins intense selon les clivages, est une caractéristique des liaisons Si-O. La présence de cette bande d'absorption sur les spectres Infra-Rouge après clivage est donc un point négatif, montrant la présence de silice à la surface du polymère.

Conséquence :

Tous les polymères seront désormais clivés dans des ballons en téflon afin d'éviter la pollution de la surface des polymères par de la silice.

Reproductibilité sur un même lot de polymère:

Avec **MIPmalt5c1** (**Tableau 49**, entrée 5), deux séries d'incubation ont été réalisées par la méthode du « batch process » (**Histogramme 21**). Les barres d'erreurs de chaque série correspondent à l'erreur de trois injections en CLHP (écart type sur trois injections d'une même solution). Les barres d'erreurs de la moyenne correspondante à l'erreur liée à la reproductibilité des résultats.



Histogramme 21 : Reproductibilité du binding sur le batch MIPmalt5c1 à 24 h

Les deux séries d'incubation donnent des résultats reproductibles avec une capacité moyenne de $29,0 \pm 0,1$ $\mu\text{mol/g}$ de polymère.

Influence d'un second clivage sur la capacité expérimentale :

Sur **MIPmalt6** (Tableau 49, entrée 5), un premier clivage sur 600 mg a été réalisé (**MIPmalt6c1**). La capacité a été évaluée à $15,4 \pm 2,7$ $\mu\text{mol/g}$. Cette valeur est plus faible que celle obtenue pour **MIPmalt5c1**. Afin de vérifier si nous pouvions améliorer cette valeur, un second clivage de **MIPmalt6c1** a été réalisé et donne, après acidification, lavages et séchage au lyophilisateur le polymère **MIPmalt6c1'**. La capacité a été légèrement améliorée pour atteindre $19,8 \pm 2,0$ $\mu\text{mol/g}$. De façon intéressante, le second clivage n'a pas permis d'augmenter la capacité contrairement au second clivage réalisé sur **MIPmalt1c2** (cf. chapitre, I.2).

Influence de la sonication sur la capacité expérimentale:

Un troisième clivage a été réalisé sur **MIPmalt6**, afin de tester l'influence de la sonication avant clivage. La sonication devrait permettre de dissocier les agrégats afin de rendre le clivage plus efficace. La capacité de ce lot clivé **MIPmalt6c3** est de $20,7 \pm 1,0$ $\mu\text{mol/g}$, du même ordre de grandeur que celles obtenues précédemment. La sonication n'améliore donc pas de manière significative le clivage.

Influence du work up sur la capacité expérimentale:

Le work up après clivage ne semble avoir que peu d'influence sur la capacité expérimentale des polymères imprimés (**Tableau 49**, entrées 5 et 6).

En conclusion de ces différents essais de clivages, une tendance générale peut être dégagée :

- le clivage peut être effectué sur une échelle de 300 à 700 mg sans aucun problème de reproductibilité sur un même lot de polymère imprimé (cf. lot **MIPmalt7**)
- la reproductibilité entre différents lots de polymère imprimé a également été prouvée (cf. lots **MIPmalt6c2** et **MIPmalt7c1**)
- la sonication avant clivage n'améliore que sensiblement le clivage (cf. lot **MIPmalt6c3**)
- l'état de protonation des acides carboxyliques présents dans les cavités ne semble avoir que peu d'influence sur la capacité expérimentale
- l'efficacité d'un second clivage sur un même lot de polymère imprimé clivé n'est pas a priori démontrée.

Protocole de clivage optimisé:

Le protocole de clivage a donc été optimisé comme suit : tous les lots de polymères imprimés sont désormais clivés sur une échelle supérieure ou égale à 300 mg dans des ballons en téflon afin d'éviter l'attaque de la silice par la soude. Après acidification avec de l'acide chlorhydrique 12 N jusqu'à pH 1, le polymère est agité pendant 15 minutes avant d'être

centrifugé. Puis plusieurs lavages à l'eau sont réalisés avec agitation 5 minutes avant centrifugation jusqu'à ce que les eaux de lavage soient à pH 6-7. Le polymère est ensuite séché au lyophilisateur.

En utilisant ce protocole de clivage, un troisième clivage a été réalisé sur 790 mg de polymère (**MIPmalt7c3**).

Nous allons procéder comme suit, par :

- une caractérisation physique (MET, polydispersité, surface spécifique)
- des études de binding
- la détermination d'une constante de dissociation
- des études de l'influence des chaînes lipidiques de l'analyte en position anomérique et du solvant d'incubation
- des études de sélectivité

1.4 Caractérisation du polymère MIPmalt7c3

1.4.1 MET, polydispersité et BET

Ce lot de polymère a tout d'abord été caractérisé par plusieurs techniques : MET, polydispersité, BET.

En MET, la morphologie du polymère reste identique à celle observée précédemment pour **MIPmalt1 (Figure 90)**.

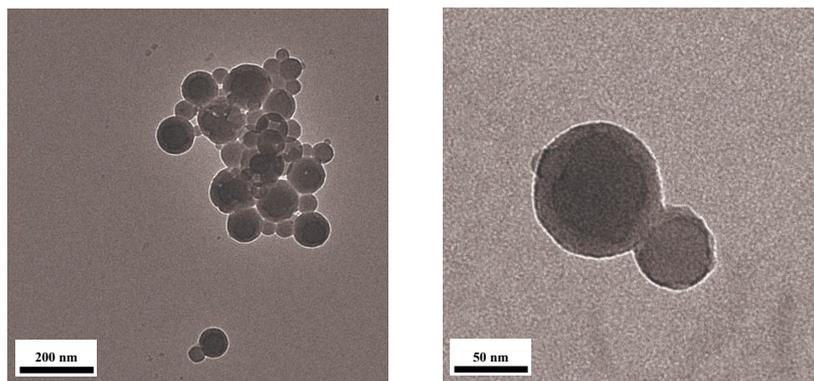


Figure 90 : Caractérisation par MET du polymère MIPmalt7c3, échelle 200 nm, 50 nm

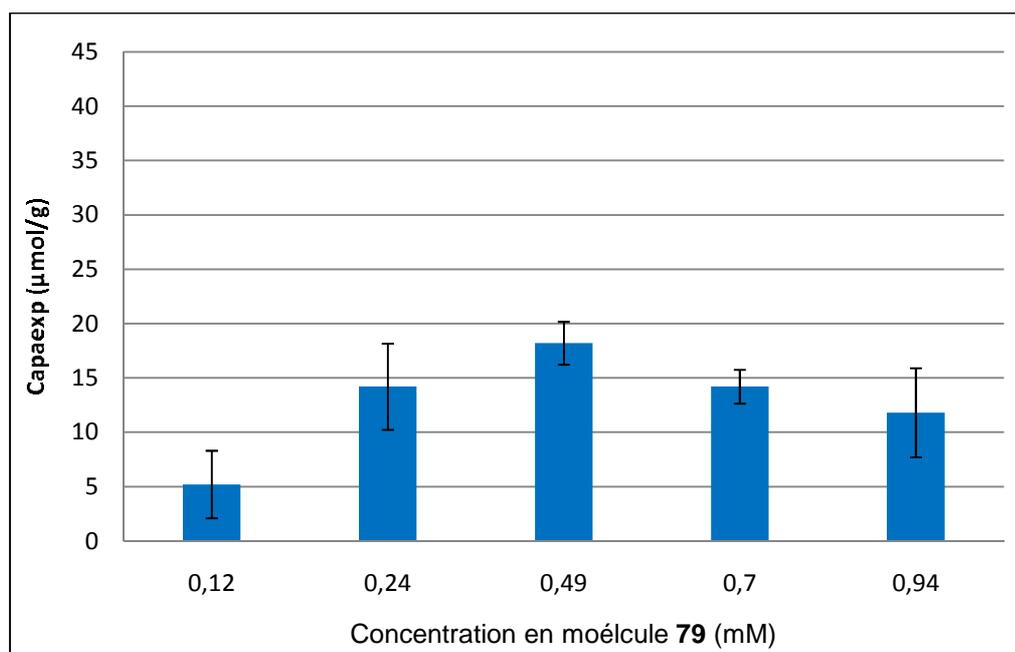
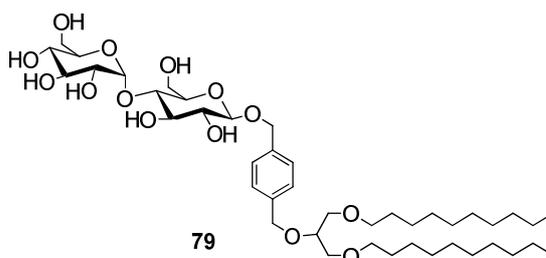
La polydispersité, d'une suspension de polymères dans l'éthanol, déterminée par diffusion de la lumière, est de 0,63. Les particules de polymères sont donc fortement agrégées.

L'analyse de la surface spécifique avant et après clivage a été déterminée par la méthode BET. Avant clivage, la surface spécifique du polymère imprimé **MIPmalt7** est de 64,9 m²/g. Après clivage, une augmentation nette de la surface spécifique à 191,1 m²/g a été mesurée, ce qui est un indice de l'extraction du template et surtout de la dégradation des amas de particules.

1.4.2 Etude du binding, de la cinétique et calcul de la constante de dissociation

1.4.2.a Etudes de binding

Pour vérifier l'efficacité du clivage, nous avons procédé, en premier lieu, à une étude de binding après 24 heures d'incubation à 10 °C, dans le chloroforme, en présence de la molécule **79 (Histogramme 22)**.



Histogramme 22 : Etude du binding du composé 79, après 24 h d'incubation, à 10 °C, avec MIPmalt7c3

La capacité maximale de l’empreinte **MIPmalt7c3** est de $18,2 \pm 1,9 \mu\text{mol/g}$, du même ordre de grandeur que celle observée lors de clivages précédents, pour C_{max} (**79**) de 0,49 mM.

Pour cette concentration de 0,49 mM, la capacité du polymère de contrôle **C5c** est de $4,6 \pm 1,5 \mu\text{mol/g}$. Le calcul des coefficients de partage, par l’**Equation 6**, donne accès au facteur d’empreinte I (**Tableau 50**).

$$K_P = \frac{C_j}{F}$$

Equation 6

C_j : concentration de maltose liée au polymère imprimé **MIPmalt1c1**

F : concentration de maltose libre après incubation

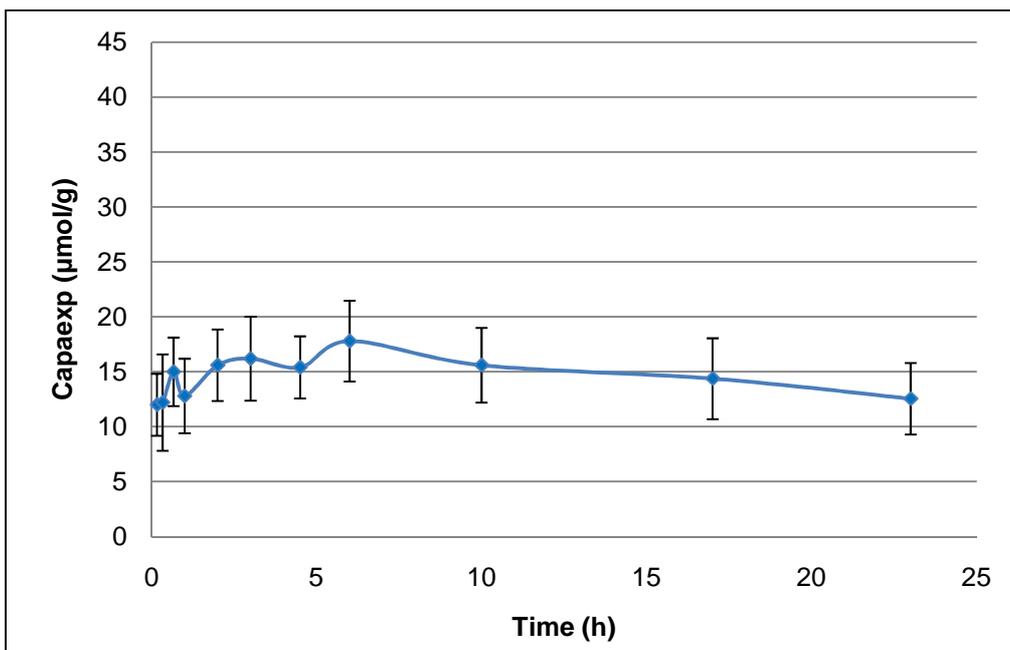
Coefficients de partage $\mu\text{mol.mM}^{-1}/\text{g}$		Facteur d'empreinte
MIPmalt7c3	C5c	
56,1	11,5	4,5

Tableau 50 : Calcul des coefficients de partage et du facteur d'empreinte pour MIPmalt7c3

Ce facteur d'empreinte n'est pas directement comparable à celui calculé pour **MIPglu1c** de 9,2 étant donné la différence de solvant d'incubation et de la nature du groupement en position anomérique de l'analyte.

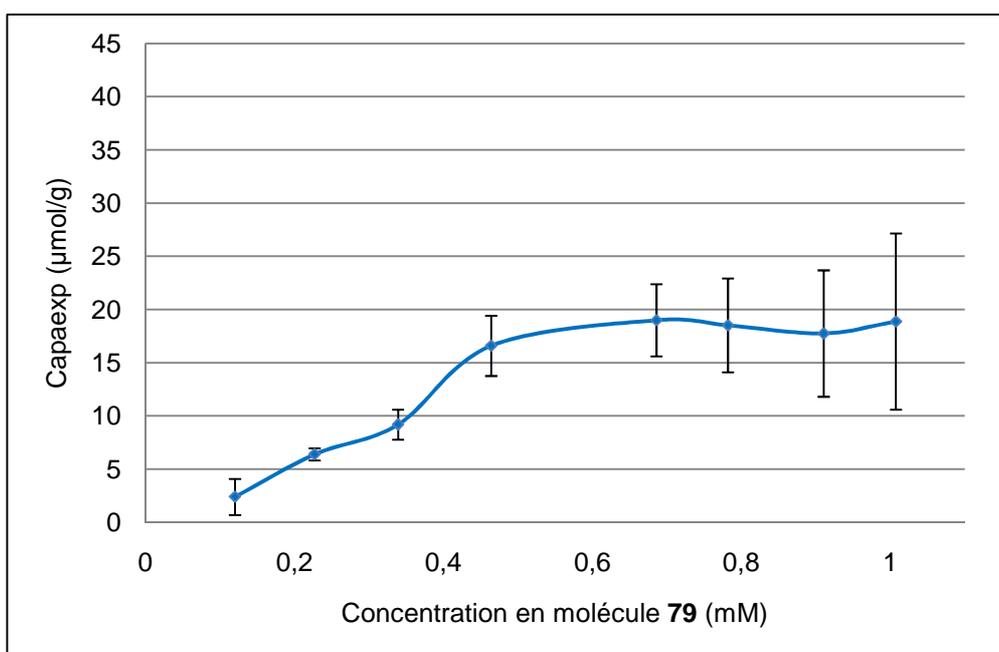
I.4.2.b Détermination de la constante de dissociation

Nous avons ensuite procédé à une étude cinétique, sur le polymère **MIPmalt7c3**, à concentration fixe en molécule **79**, de 0,44 mM (**Graphique 6**). Comme précédemment, l'équilibre est rapidement atteint, au bout de 30 minutes à 1 heure.



Graphique 6 : Etude cinétique pour le batch MIPmalt7c3 avec le composé 79

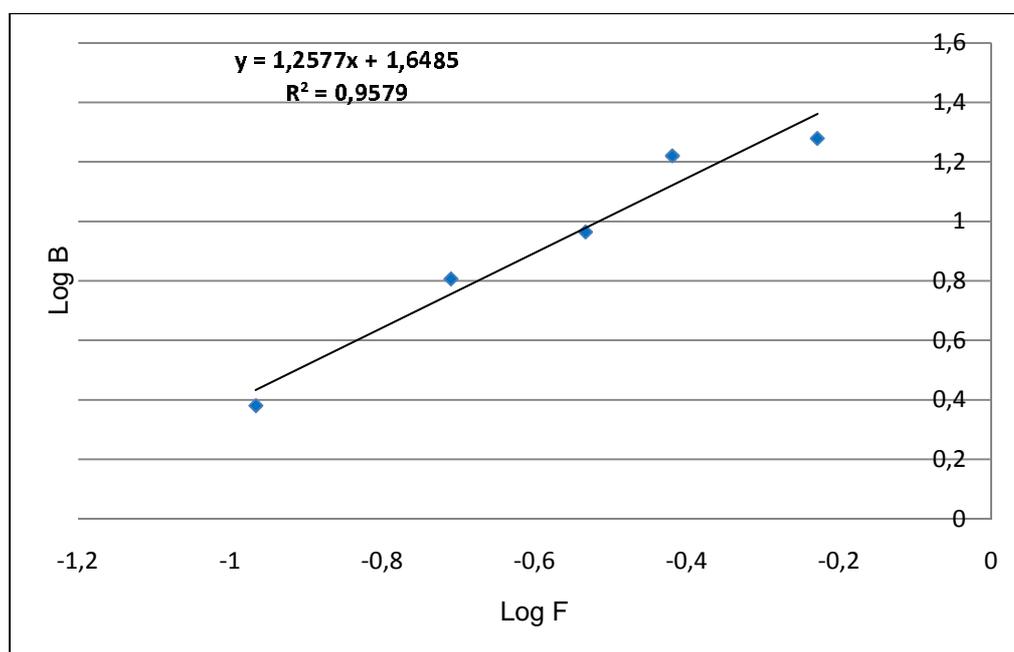
Par la suite, afin de tracer une isotherme d'absorption, nous avons fixé le temps d'incubation à 3 heures et incubé le polymère avec différentes concentrations en molécule 79 (Graphique 7).



Graphique 7: Isotherme du binding pour le polymère MIPmalt7c3 avec le composé 79

Un premier traitement des données du **Graphique 7**, par le tracé de B/F en fonction de F (modèle de Langmuir, cf. chapitre 1), ne donne pas une droite. Le modèle n'est donc pas applicable, ce qui rend compte de l'hétérogénéité du polymère **MIPmalt7c3**.

Le tracé de Log B en fonctions de Log F (modèle de Freundlich, cf. chapitre 1) donne, après régression linéaire, une droite dont le coefficient de corrélation est de 0,88 (**Graphique 8**). Ce modèle de Freundlich est généralement applicable à des systèmes hétérogènes.



Graphique 8: Traitement des données du Graphique 7 avec le modèle de Freundlich

Le traitement des données par le modèle de Freundlich donne une droite de coefficient de corrélation de 0,9579. La pente de 1,2577, représente l'index d'hétérogénéité. Cette pente est supérieure à 1, alors que dans le modèle de Freundlich, cette pente est normalement comprise entre 0 et 1. Il est donc difficile de conclure sur cet indice d'hétérogénéité.

L'intersection avec l'origine donne accès à la capacité théorique du polymère, qui est ici de 26,3 $\mu\text{mol/g}$ de polymère. Etant donné que la capacité expérimentale du polymère a été mesurée à 18,2 $\mu\text{mol/g}$ de polymère, le résultat obtenu par ce modèle de Freundlich semble être cohérent. Il existe cependant une différence non négligeable entre la capacité théorique

déterminée par le modèle de Freundlich et la capacité expérimentale déterminée par la méthode du « batch process ».

Un second traitement des données expérimentales du **Graphique 8** à l'aide du logiciel Prism avec l'approximation « one binding site », donne une constante de dissociation $K_D = 840,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$.

La capacité maximale théorique, déterminée par le logiciel Prism, est de $36 \mu\text{mol/g}$, ce qui n'est pas en adéquation avec la valeur expérimentale de $19 \mu\text{mol/g}$. Ceci provient du fait que le traitement des données par le logiciel Prims n'est pas adapté pour des récepteurs synthétiques.

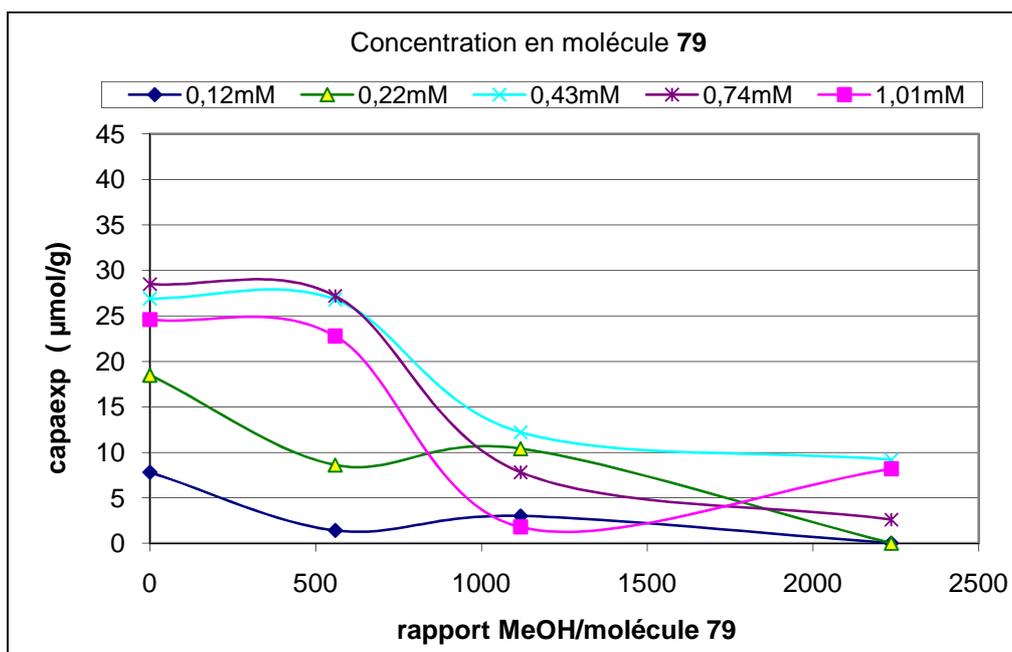
Nous avons donc pu réaliser une étude de binding et de cinétique complète qui nous a permis, pour la première fois, de montrer l'hétérogénéité des sites de binding sur un polymère imprimé avec un dérivé de maltose.

Nous avons, ensuite, cherché à montrer l'influence du solvant d'incubation et de la chaîne lipidique présent en position anomérique de l'analyte sur la capacité et la cinétique.

I.4.2.c Etudes de l'influence des chaînes lipidique en position anomérique de l'analyte et du solvant d'incubation

Influence du solvant d'incubation :

Avec le lot de polymère **MIPmalt5c1**, nous avons cherché à étudier l'influence du méthanol sur la capacité maximale atteinte, en conservant la chaîne lipidique en position anomérique. Le méthanol étant un solvant protique, il peut établir des liaisons hydrogènes avec les acides carboxyliques présents dans les sites de reconnaissance. Nous avons donc procédé à des incubations avec différentes concentrations en molécule **79** et différents rapports méthanol/molécule **79**, dans le chloroforme (**Graphique 9**).



Graphique 9: Influence du méthanol sur la capacité maximale du polymère MIPmalt5c1

Pour un rapport méthanol/composé **79** = 560 et des concentrations en composé **79** de 0,43, 0,74 et 1,01 mM, la capacité maximale de l’empreinte reste inchangée. En rapportant la quantité de méthanol au nombre d’acides carboxyliques théoriques, présents dans les sites, le rapport MeOH/-COOH est de 80. Les propriétés de reconnaissance ne sont donc pas inhibées malgré le large excès de méthanol.

Plus la quantité de méthanol augmente, pour une concentration fixe en molécule **79**, plus la capacité du polymère diminue. Ce résultat n’est pas surprenant, le méthanol crée une sphère de solvation autour du composé **79** ce qui empêche la reconnaissance.

Influence de la chaîne lipidique en position anomérique :

La molécule **79** possède une chaîne hydrophobe bi-brin qui peut, d’une manière ou d’une autre, influencer l’équilibre entre le polymère **MIPmalt7c3** et la molécule **79** en solution.

De plus, le chloroforme est connu pour déformer les polymères imprimés.

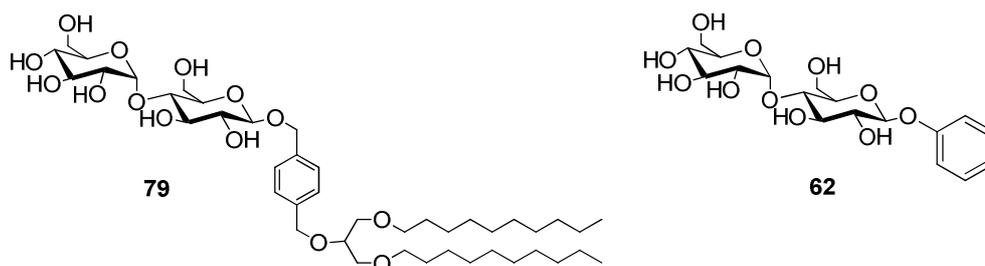
Enfin, de manière pratique, les polymères imprimés décantent très mal dans le chloroforme. Cette mauvaise décantation entraîne l'injection de fines particules de polymères sur la colonne CLHP, qu'il n'est pas possible de filtrer.

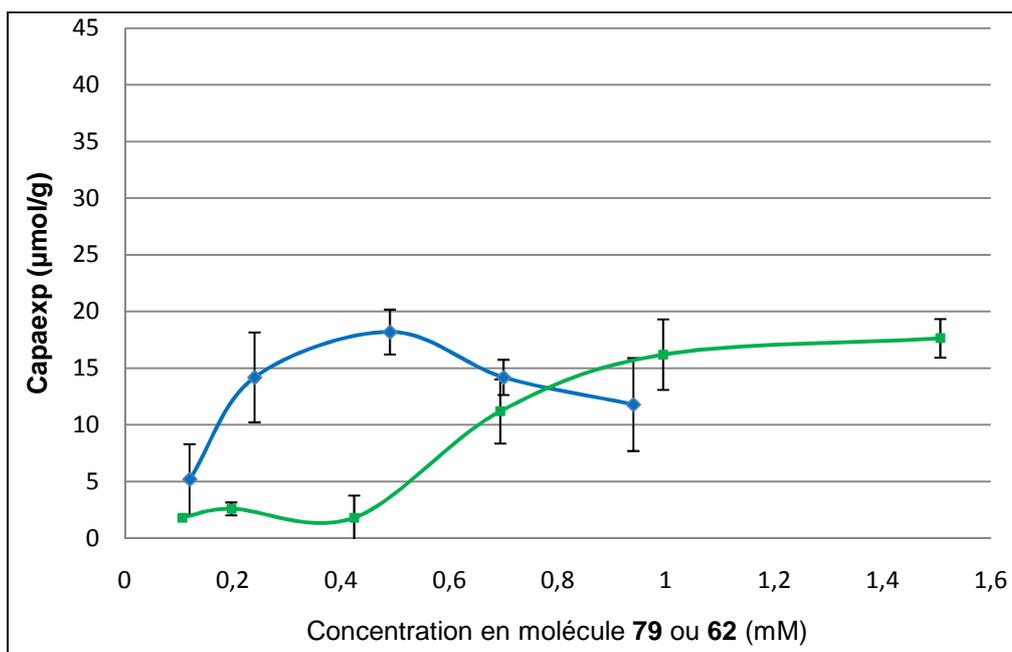
Ces trois problèmes nous ont mené à changer le solvant d'incubation pour l'acétonitrile qui n'est pas connu pour déformer les matrices polymériques par les phénomènes de « swelling ».

Nous avons également décidé de simplifier au maximum la molécule utilisée pour les études de binding. Par similarité avec les monosaccharides, nous avons donc synthétisé la molécule **62** qui n'est pas soluble dans l'acétonitrile pure, mais dans un mélange acétonitrile/méthanol.

D'après l'étude précédente, nous avons mis en évidence qu'un faible pourcentage de méthanol dans le chloroforme n'avait que peu d'influence sur la capacité maximale de l'empreinte, déterminée en présence de la molécule **79**.

Nous avons donc procédé à des études de binding dans un mélange méthanol/composé **62** = 280 (mélange α/β = 1/4) (**Graphique 10**). Une droite de calibration pour chaque anomère a été tracée dans une gamme de concentration compris entre 0,36 et 1,80 mM pour l'anomère β et 0,08 et 0,41 mM ($r^2 = 0,9992$ et $0,9959$).





Graphique 10: Etudes de binding en fonction des solvants d'incubation sur MIPmalt7c3

Une saturation du binding est également obtenue pour des incubations dans un mélange acétonitrile/méthanol.

La capacité maximale du polymère **MIPmalt7c3** reste inchangée, atteignant $18,8 \pm 1,9$ $\mu\text{mol/g}$ pour les incubations dans le chloroforme avec la molécule **79** et $17,6 \pm 1,7$ $\mu\text{mol/g}$ pour les incubations dans acétonitrile/méthanol avec la molécule **62**. La seule différence notée est que C_{max} (**79**) est de 0,53 mM et C_{max} (**62**) de 1,59 mM.

La capacité du polymère de contrôle **C5c** a été déterminée pour une concentration C_{max} (**62**) ; elle atteint $1,2 \pm 0,7$ $\mu\text{mol/g}$.

Le calcul des coefficients de partage, par l'Equation 6, donne accès au facteur d'empreinte (**Tableau 51**).

$$K_P = \frac{C_j}{F}$$

Equation 6

C_j : concentration de maltose liée au polymère imprimé **MIPmalt1c1**

F : concentration de maltose libre après incubation

Coefficients de partage $\mu\text{mol.mM}^{-1}/\text{g}$		Facteur d'empreinte
MIPmalt7c3	C5c	
11,6	0,76	15,2

Tableau 51: Calcul des coefficients de partage et du facteur d'empreinte pour MIPmalt7c3 dans un mélange acétonitrile/méthanol

La capacité du polymère de contrôle **C5c** est plus faible dans un mélange acétonitrile/méthanol. Le facteur d'empreinte de **MIPmalt7c3** est donc plus élevé dans un mélange acétonitrile/méthanol, que dans le chloroforme pur.

Comme la capacité maximale des polymères imprimés reste inchangée, qu'elle soit déterminée dans du chloroforme ou dans un mélange acétonitrile/méthanol, on peut conclure que la chaîne lipidique en position anomérique semble impliquer une reconnaissance non spécifique plus élevée qu'un simple groupement phényle.

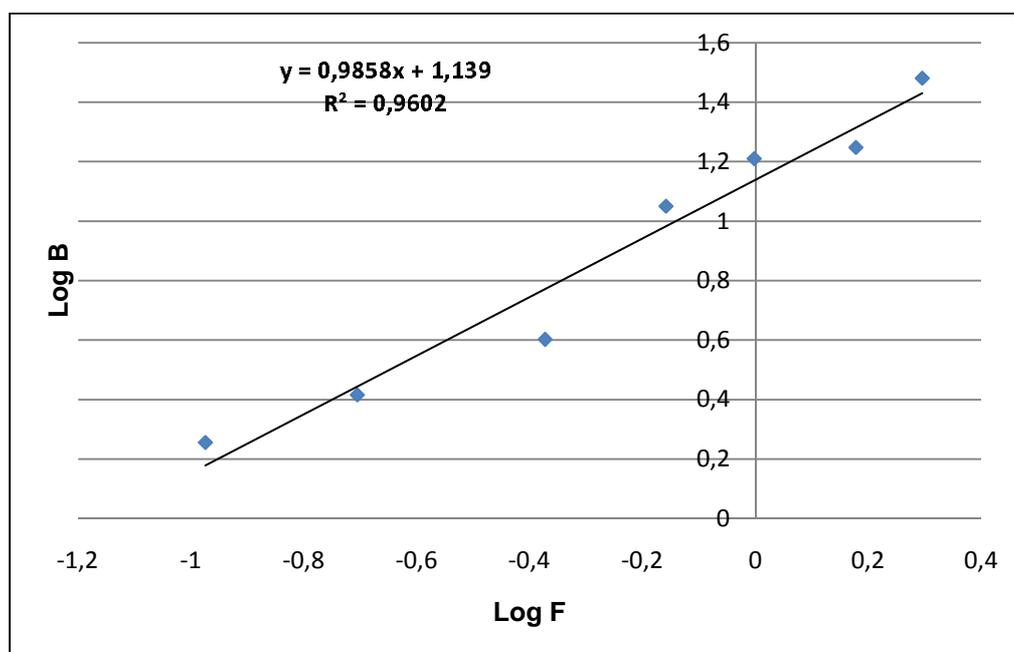
Les études de binding peuvent être effectuées, dans un mélange acétonitrile/méthanol, avec la molécule **62** comportant uniquement un groupement phényle en position anomérique sans changer la capacité maximale de l'empreinte et en diminuant la reconnaissance non spécifique.

La synthèse des molécules cibles est donc plus simple et la décantation des polymères est plus aisée que dans le chloroforme.

Poursuivant nos études sur l'influence du solvant d'incubation, nous avons décidé de tester, cette fois, l'influence de l'eau sur le binding. Des incubations menées avec **MIPmalt5c1** ont donc été réalisées avec un mélange eau/composé **62** = 280. Dans ce cas, le binding est totalement inhibé. Quelle que soit la concentration en molécule **62**, la capacité de l'empreinte est nulle. L'effet de solvation de l'eau sur les acides carboxyliques et la molécule **62** est plus important que dans le méthanol. Ceci implique aussi un encombrement des sites de reconnaissance. La sphère de solvation créée autour du sucre empêche la molécule **62** d'accéder aux sites de reconnaissance d'où une reconnaissance nulle du polymère **MIPmalt5c1** en présence d'eau.

Nous avons ensuite cherché à déterminer l'influence du solvant d'incubation sur la constante de dissociation.

Les données du binding dans acétonitrile/méthanol, du **Graphique 10**, ont, par conséquent, été traitées avec le modèle de Freundlich. Le tracé de Log B en fonction de Log F a donc été effectué (**Graphique 11**). C'est une droite dont le coefficient de corrélation est de 0,9602.



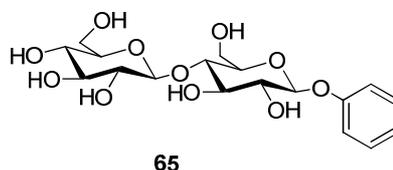
Graphique 11: Traitement des données du Graphique 10 selon le modèle de Freundlich

L'index d'hétérogénéité donné par la pente de la droite est de 0,9858. Il est donc quasi identique à celui déterminé pour des incubations dans le chloroforme avec la molécule **79**. Le calcul de $K_{D_{moy}}$ (page 62), avec les limites fixées entre $K_0 = 0,85mM^{-1}$ et $K_1 = 8,33 mM^{-1}$, est de $415 \mu M$.

Le modèle de Freundlich donne donc accès à une constante de dissociation moyenne de $415 \mu M$ dans le mélange acétonitrile/méthanol mais n'est pas applicable aux données obtenues dans le chloroforme.

I.4.2.d Etude de la sélectivité

Pour finir notre étude, des tests de sélectivité ont été effectués dans le chloroforme et dans l'acétonitrile/méthanol avec un rapport méthanol/composé **65** = 280. Le dérivé du cellobiose **65** a donc été synthétisé.



Il n'a pas été possible de séparer les composés **62** et **65** en mélange équimolaire, par CLHP. Le facteur de sélectivité, dans un mélange acétonitrile/méthanol, est déterminé après 24 heures d'incubation à $10\text{ }^{\circ}C$ en incubant séparément les molécules **62** et **65**. La même procédure a été utilisée pour calculer le facteur de sélectivité dans le chloroforme en présence des molécules **79** et **85**. Les facteurs de sélectivité ont été déterminés à partir l'**Equation 8** (**Tableau 52**).

$$\alpha_{j,k} = \frac{C_j - C_{nj}}{C_k - C_{nk}}$$

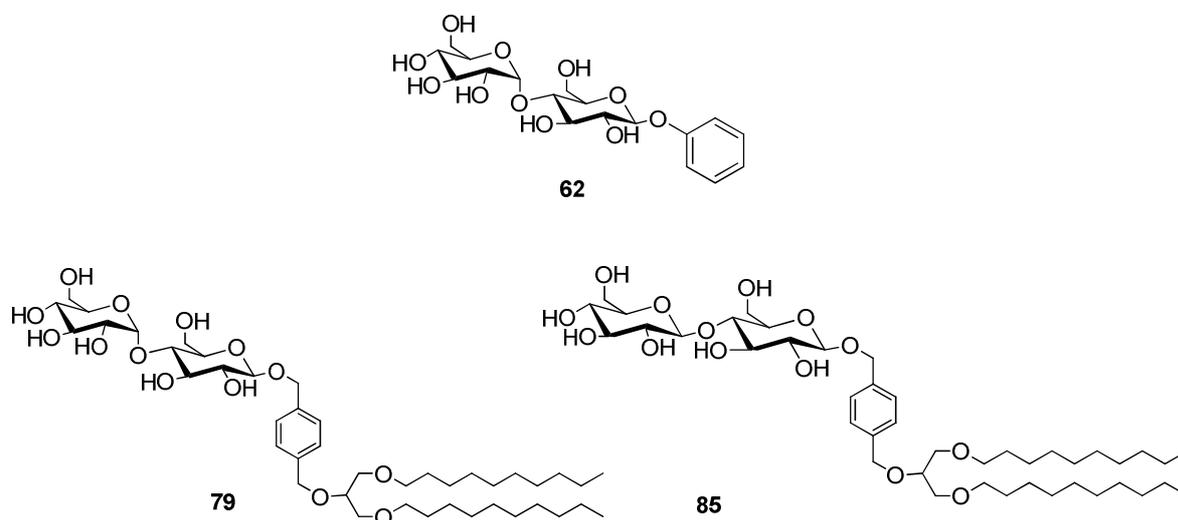
Equation 8

C_j : concentration de maltose liée au polymère imprimé MIPXic

C_{nj} : concentration de maltose liée au polymère de contrôle C_{ic}

C_k : concentration du cellobiose liée au polymère imprimé MIPXic

C_{nk} : concentration du cellobiose liée au polymère de contrôle C_{ic}



	chloroforme	acétonitrile/méthanol
Capaexp ($\mu\text{mol/g}$)	79 : $18,2 \pm 1,9$ (0,44 mM)	62 : $11,5 \pm 1,7$ (1,1 mM)
Capaexp ($\mu\text{mol/g}$)	85 : $14,8 \pm 1,5$ (0,44 mM)	65 : $1,8 \pm 1,6$ (1,1 mM)
Facteur de sélectivité	$\alpha_{\text{malto/cello}} = 1,2$ (0,44 mM) ^a	$\alpha_{\text{malto/cello}} = 5,5$ (1,1 mM)

^a Concentrations en molécules **62/65** ou **79/85** pour lesquelles la capacité et le facteur de sélectivité a été calculés

Tableau 52: Facteur de sélectivité maltose/ cellobiose en fonction du solvant d'incubation

Le facteur de sélectivité est donc nettement amélioré dans le mélange acétonitrile/méthanol. Ceci confirme l'hypothèse avancée concernant l'influence du chloroforme sur les polymères et les phénomènes de « swelling ».

Ces facteurs de sélectivité ne sont pas directement comparables avec ceux obtenus dans le cas des polymères imprimés avec un dérivé de glucose. Les facteurs de sélectivité maltose-cellobiose obtenus pour **MIPmalt1c1** ne sont pas très élevés ; le gonflement des matrices polymériques en présence de chloroforme peut entraîner des déformations des polymères et donc également diminuer la sélectivité des polymères imprimés.

A titre indicatif, nous avons comparé la sélectivité de notre polymère avec des données de la littérature. Très peu de polymères imprimés de disaccharides sont rapportés. Seule S. Striegler a synthétisé des polymères imprimés de maltose, cellobiose, par polymérisation en masse, avec une impression par liaisons de coordination autour d'un métal.¹⁴⁰ Ses études de binding sont effectuées en milieux aqueux, donc pas comparables avec nos études dans le chloroforme. Les facteurs de sélectivité obtenus sont regroupés dans le **Tableau 53**.

	Polymère du maltose	Polymère du cellobiose
Capaexp ($\mu\text{mol/g}$)	10	10
Facteur de sélectivité dans l'eau	$\alpha_{\text{malto/cello}} = 1,2$	$\alpha_{\text{cello/malto}} = 1,7$

Tableau 53: Résultats de sélectivité obtenus par S. Striegler (réf. 140)

Nos facteurs de sélectivité, obtenus dans le chloroforme, sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus par S. Striegler dans des milieux aqueux.

1.5 Conclusion 1:

L'optimisation du process de polymérisation et de clivage a permis d'aboutir à un protocole de clivage optimisé.

L'identification de la bande d'absorption à 1080 cm^{-1} ainsi que des études complémentaires d'analyse XPS nous a montré la présence néfaste de silice à la surface des polymères imprimés.

Protocole de clivage optimisé :

Tous les lots de polymères imprimés sont clivés sur une échelle supérieure ou égale à 300 mg dans des ballons en téflon afin d'éviter l'attaque de la silice par la soude. Après acidification avec de l'acide chlorhydrique 12 N jusqu'à pH 1, le polymère est agité pendant 15 minutes avant d'être centrifugé. Puis plusieurs lavages à l'eau sont réalisés sous agitation pendant 5 minutes avant centrifugation jusqu'à ce que les eaux de lavage soient à pH 6-7. Le polymère est ensuite séché au lyophilisateur.

L'étude des lots de polymères **MIPmalt5c1** et **MIPmalt7c3** nous a conduit aux résultats suivants :

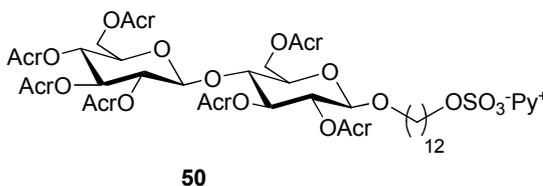
- la cinétique de binding de l'analyte **79** est rapide ce qui semble montrer une bonne accessibilité des sites de reconnaissance
- la chaîne lipidique présent en position anomérique sur l'analyte, n'a pas d'influence néfaste sur le binding des polymères imprimés mais augmente la reconnaissance non spécifique
- le solvant d'incubation n'a pas d'influence sur la capacité des polymères imprimés
- le polymère imprimé **MIPmalt7c3** est sélectif vis-à-vis du template d'origine
- la sélectivité des polymères imprimés est nettement améliorée dans un mélange acétonitrile/méthanol probablement à cause de l'absence de phénomène de « swelling »

En parallèle des études menées sur les polymères imprimés avec du maltose, nous avons synthétisé des polymères imprimés avec un dérivé du cellobiose. Le but de cette étude est de comparer les capacités et les sélectivités avec des polymères imprimés avec un dérivé de maltose.

II. Polymères imprimés avec un dérivé de cellobiose

Nous avons décidé de synthétiser quatre polymères imprimés afin de tester l'influence du taux de réticulation, sur la capacité et la sélectivité des polymères imprimés.

La capacité des polymères imprimés a été fixée à 44 $\mu\text{mol/g}$, seul taux de DVB varie. Tous les polymères imprimés (**Tableau 54**) sont synthétisés par mini-émulsion « one pot » comme décrite dans le chapitre 3. La quantité d'hexadécane a été fixée à 3 % comme dans le cas des polymères imprimés avec du maltose (cf. partie expérimentale XIX).



Polymères	% de DVB
MIPcello1	20
MIPcello2	38
MIPcello3	58
MIPcello4	80

Tableau 54: Différents polymères imprimés avec un dérivé de cellobiose

Tous ces polymères ont pris en masse après 20 heures de polymérisation.

Après ajout d'un volume d'acétone, une première décantation est réalisée après centrifugation. Aucun problème de décantation n'a été noté. Le précipité est donc lavé plusieurs fois avec un mélange 1/1 acétone/eau (5 fois), puis centrifugé et finalement séché au lyophilisateur.

Ces polymères imprimés avant clivage ont été caractérisés par la mesure de la polydispersité par diffusion de la lumière et par la mesure de la surface spécifique par la méthode BET (**Tableau 55**).

En utilisant le protocole optimisé de clivage, tous les lots de polymères imprimés sont clivés sur une échelle supérieure ou égale à 300 mg dans des ballons en téflon afin d'éviter l'attaque de la silice par la soude. Après acidification avec de l'acide chlorhydrique 12 N jusqu'à pH 1, le polymère est agité pendant 15 minutes avant d'être centrifugé. Puis plusieurs lavages à l'eau sont réalisés avec agitation 5 minutes avant centrifugation jusqu'à ce que les eaux de lavage soient à pH 6-7. Les polymères sont ensuite séchés au lyophilisateur et sont notés **MIPcello1c1**, **MIPcello2c1**, **MIPcello3c1** et **MIPcello4c1**.

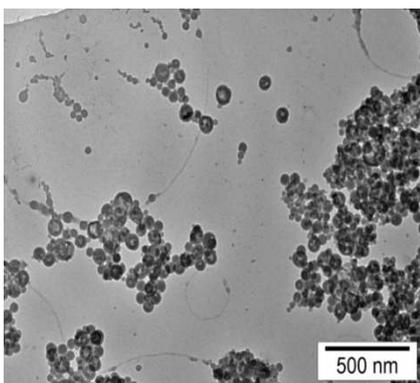
A titre indicatif, un clivage sur 200mg de **MIPcello4** a été effectué dans un ballon en verre, à reflux pendant 4 jours en présence d'un mélange 10 M NaOHaq/méthanol. Après acidification avec de l'acide chlorhydrique 12 N, des lavages successifs avec de l'eau jusqu'à l'obtention d'un pH de 7, le polymère **MIPcello4c2** a été séché au lyophilisateur. Une analyse élémentaire du silicium a montré la présence de plus 31 % de silicium sur un échantillon de 40 mg de polymère **MIPcello4c2**.

Une analyse élémentaire du silicium a été également réalisée sur le polymère **MIPcello4c1** clivé avec le protocole optimisé. 0,3 % de silicium a été détecté, par analyse élémentaire, sur un échantillon de 40 mg de **MIPcello4c1**. Ceci provient probablement d'une dégradation des ballons en verre lors de la polymérisation.

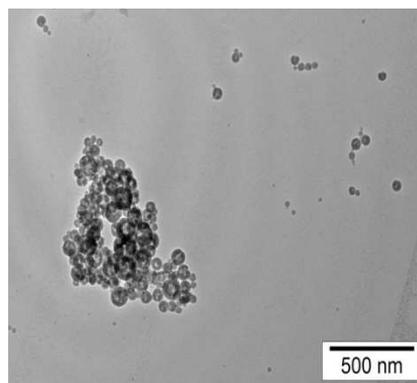
Le polymère imprimé clivé avec le protocole optimisé (**MIPcello4c1**), dans un ballon en téflon, ne possède que 0,3 % de silice à la surface, soit environ dix fois de silice que le polymère imprimé clivé dans un ballon en verre (**MIPcello4c2**).

II.1 Caractérisation des polymères

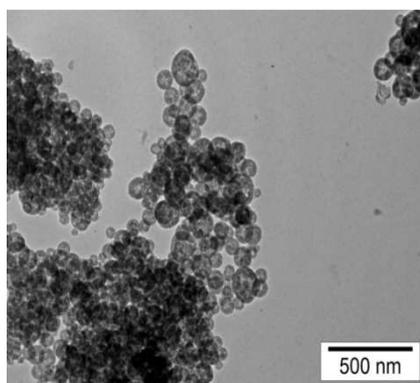
Afin de vérifier l'aspect des particules obtenues après polymérisation et clivage en milieu basique, une suspension, dans le chloroforme, des différents polymères **MIPcello1c1**, **MIPcello2c1**, **MIPcello3c1** et **MIPcello4c1** a été observé par MET.



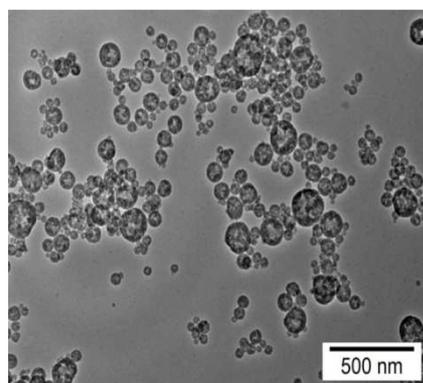
MIPcello1c1



MIPcello2c1



MIPcello3c1



MIPcello4c1

L'aspect des particules restent identique quel que soit le pourcentage de DVB dans la matrice. Des particules de tailles comprises entre 50 et 200 nm sont obtenues dans chacun des cas, avec des degrés d'agrégation élevés.

La polydispersité des polymères synthétisés a été mesurée par diffusion de la lumière, sur une suspension des différents polymères imprimés dans l'éthanol. Les polydispersités et la taille moyenne des particules sont indiquées dans le **Tableau 55**.

Polymère imprimé	Polydispersité	Taille (nm)	Polymère clivé	Polydispersité	Taille (nm)
MIPcello1	1,00	/	MIPcello1c1	0,70	/
MIPcello2	0,54	246 ± 27	MIPcello2c1	0,43	262 ± 22
MIPcello3	0,20	>1000	MIPcello3c1	0,27	567 ± 54
MIPcello4	0,54	192 ± 16	MIPcello4c1	0,36	128 ± 22

Tableau 55: Polydispersité et taille des particules obtenues avant et après clivage pour les différents polymères imprimés avec un dérivé de cellobiose

Globalement les polydispersités mesurées avant clivage, sont plus élevées que celles mesurées pour les polymères imprimés avec le template du glucose. Ce résultat est corroboré par la prise en masse du milieu de polymérisation.

La surface spécifique de ces polymères imprimés a été déterminée avant et après clivage, par la méthode BET. Les résultats sont regroupés dans le **Tableau 56**.

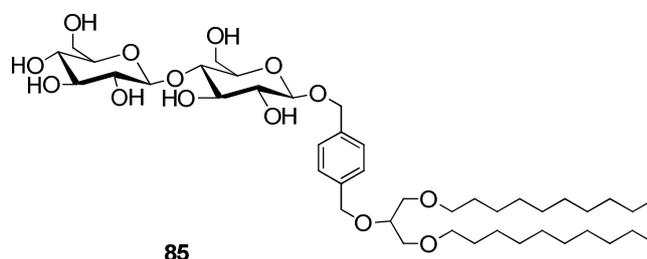
Polymère imprimé	Surface spécifique m ² /g	Polymère clivé	Surface spécifique m ² /g
MIPcello1	70,5	MIPcello1c1	82,3
MIPcello2	non calculée	MIPcello2c1	83,8
MIPcello3	124,9	MIPcello3c1	138,0
MIPcello4	115,3	MIPcello4c1	162,3

Tableau 56 : Surfaces spécifiques déterminées par BET

La surface spécifique augmente après clivage, ce qui indique une modification de la surface des polymères et probablement un désagrégation des amas de particules.

II.2 Etudes de binding

La capacité des polymères **MIPcello1c1**, **MIPcello2c1**, **MIPcello3c1** et **MIPcello4c1** a été déterminée après 24 heures d'incubation à 10 °C, dans le chloroforme avec la molécule **85**. Les capacités maximales sont regroupées dans le **Tableau 57**.

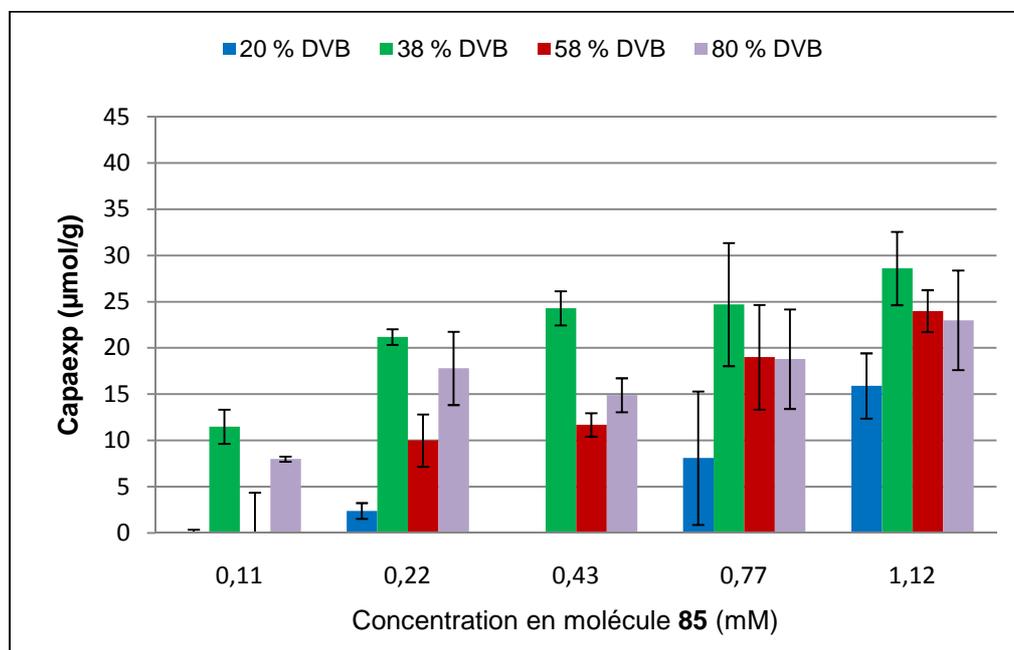


% de DVB	Lots	Capaexp ($\mu\text{mol/g}$) à 1,12 mM
20	MIPcello1c1	13,2 \pm 3,5
38	MIPcello2c1	28,6 \pm 4,0
58	MIPcello3c1	24,2 \pm 2,6
80	MIPcello4c1	22,0 \pm 5,3

Tableau 57: Capacité maximale des polymères imprimés MIPcello1c1, MIPcello2c1, MIPcello3c1 et MIPcello4c1

D'après ces résultats, on peut conclure que la capacité des polymères imprimés est indépendante du pourcentage de DVB présent dans la matrice. Seul le polymère **MIPcello1c1** présente une plus faible capacité. Il est intéressant de noter également que la concentration pour laquelle la capacité maximale est atteinte C_{max} (**85**) est identique pour chaque

polymère. De plus les courbes de binding montrent une saturation, un équilibre est donc atteint (**Histogramme 23**).



Histogramme 23 : Etudes de binding à 24 h des polymères imprimés MIPcello1c1, MIPcello2c1, MIPcello3c1 et MIPcello4c1

Nous nous sommes ensuite plus particulièrement intéressés au lot de polymère **MIPcello2c1**.

Les études suivantes ont été réalisées :

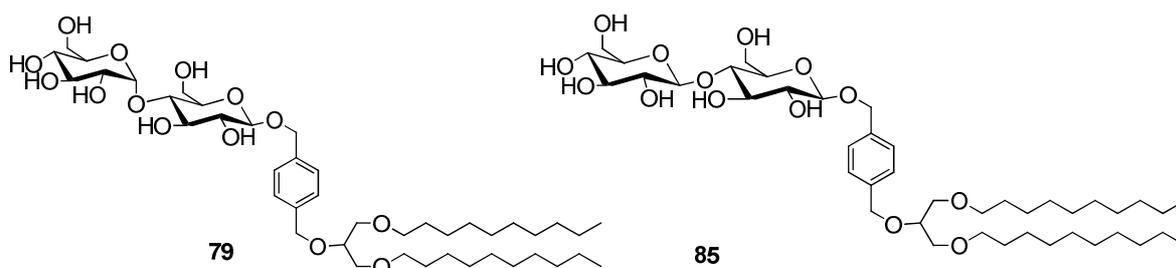
- détermination de la constante de dissociation dans le chloroforme
- étude de l'influence du solvant d'incubation et de la chaîne lipidique de l'analyte **85** en position anomérique sur le binding
- étude de la sélectivité

II.3 Etudes du batch MIPcello2c1 :

II.3.1 Détermination du facteur d'impression :

Pour une concentration de 1,1 mM (C_{max} (**85**)), la capacité du polymère de contrôle **C5c** a été déterminée par la méthode du « batch process ». Cette capacité s'est avérée être très faible (< 1 μmol/g). La reconnaissance non spécifique est donc plus faible que la limite de détection de la CLHP.

Afin de comparer la reconnaissance non spécifique induite par le dérivé du maltose **79**, calculée à une concentration de 0,44 mM, et du dérivé du cellobiose **85**, la capacité du polymère de contrôle **C5c** a été déterminée pour une concentration d'incubation de 0,44 mM en composé **85**. La capacité mesurée est de 3,6 ± 1,2 μmol/g.



Pour cette concentration de 0,44 mM, le calcul des coefficients de partage, par l'Equation 6, donne accès au facteur d'empreinte I (Tableau 58).

$$K_P = \frac{C_j}{F}$$

Equation 6

C_j : concentration de cellobiose liée au polymère imprimé MIPcello2c1

F : concentration de cellobiose libre après incubation

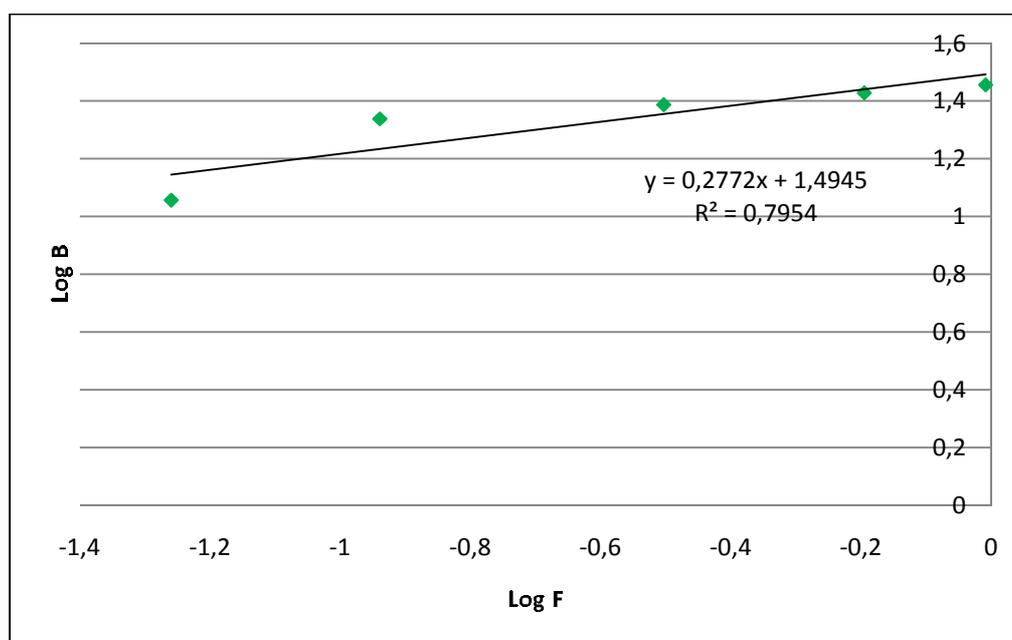
Coefficients de partage $\mu\text{mol.mM}^{-1}/\text{g}$		Facteur d’empreinte
MIPcello2c1	C5c	
77,7	8,6	9,0

Tableau 58: Calcul des coefficients de partage et du facteur d’empreinte pour MIPcello3c1

Le facteur d’empreinte calculé pour MIPmalt7c3, à une concentration de 0,44 mM en composé 79, est de 4,5. Le facteur d’empreinte est donc plus élevé pour le polymère imprimé MIPcello2c1.

II.3.2 Détermination de la constante de dissociation dans le chloroforme :

Afin de comparer MIPcello2c1 et MIPmalt7c3, les données de l’Histogramme 23, concernant le polymère MIPcello2c1, ont dans un premier temps étaient traitées selon le modèle de Freundlich. Le tracé de Log B en fonction de Log F donne une droite, avec un coefficient de corrélation de 0,79 (Graphique 12).



Graphique 12: Traitement des données de l’isotherme de binding du polymère MIPcello3c1 par le modèle de Freundlich

Le coefficient de corrélation du traitement de données avec le modèle de Freundlich, pour **MIPcello2c1** est légèrement inférieur à celui obtenu pour **MIPmalt7c3** ($r^2 = 0,7954$).

L'indice d'hétérogénéité (de 0,28) est proche de 0 ; les sites de reconnaissance de **MIPcello2c1** semblent donc très hétérogènes.

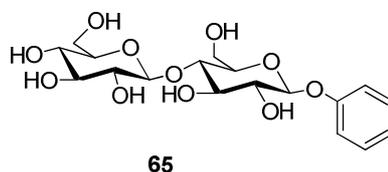
L'intersection avec l'origine donne une capacité théorique de 30,9 $\mu\text{mol/g}$. Ceci est en accord avec la capacité maximale mesurée par les expériences de binding de 28,6 $\mu\text{mol/g}$.

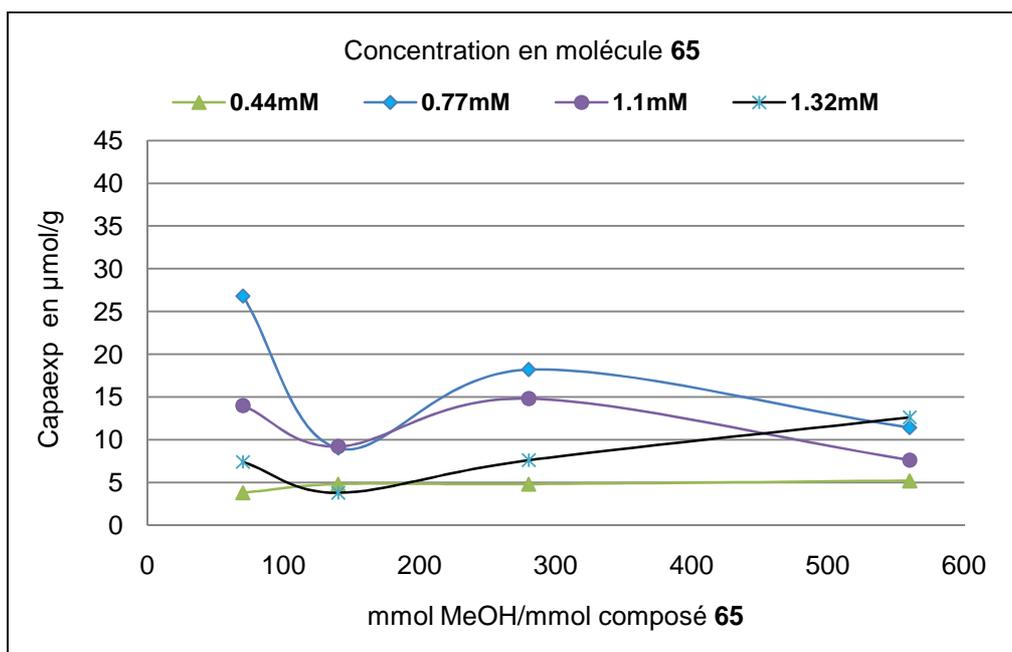
Nous avons ensuite cherché à calculer, une constante d'association moyenne, K_{Amoy} , par la **Formule 4**, page 62. Les limites, $K_0 = 0,85\text{mM}^{-1}$ et $K_1 = 8,33\text{ mM}^{-1}$, sont fixées aux deux valeurs extrêmes des concentrations utilisées pour le calcul de K_{Amoy} dans le cas du polymère **MIPmalt7c3**.

K_{Amoy} , pour **MIPcello2c1**, est de 3,12 mM^{-1} soit une constante de dissociation K_{Dmoy} de 320,5 μM . Cette constante de dissociation est du même ordre de grandeur que celle calculée pour **MIPmalt7c3** ($K_{\text{Dmoy}} = 420,5\mu\text{M}$).

II.3.3 Influence du solvant d'incubation :

Nous avons également procédé à des études de binding dans différents mélanges acétonitrile/méthanol, avec un rapport méthanol/composé **65** variable, après 24 heures d'incubation à 10 °C (**Graphique 13**).



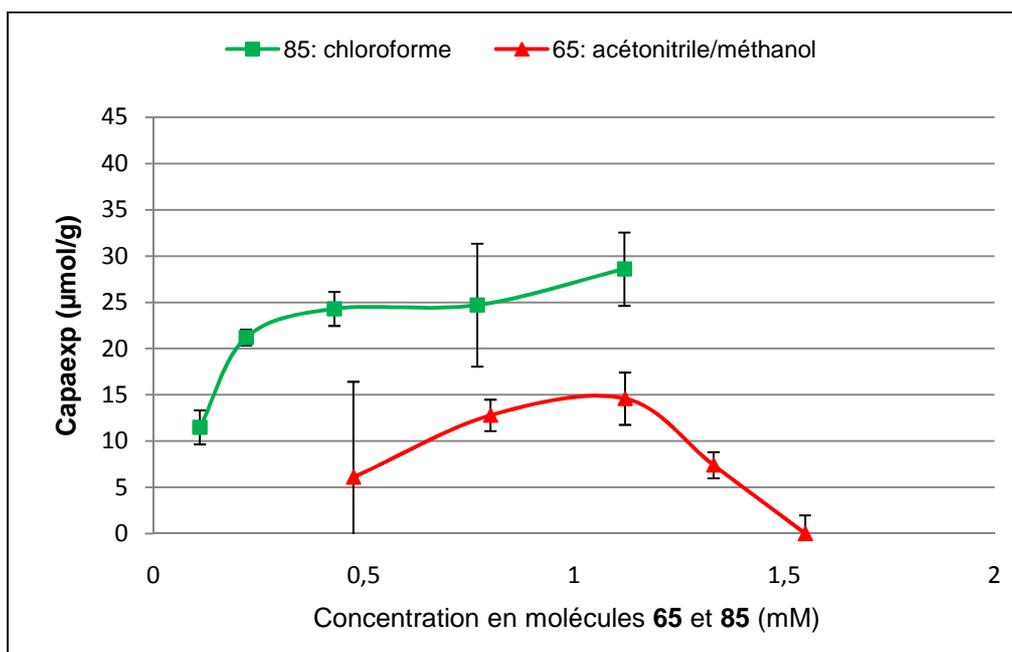


Graphique 13: Etude de l'influence du méthanol pour des incubations dans l'acétonitrile du polymère MIPcello2c1

On constate que plus la quantité de méthanol augmente, plus la capacité diminue. La même constatation avait été faite pour les études de l'influence du méthanol pour des incubations menées dans le chloroforme avec le composé **79** sur **MIPmalt5c1**.

Une chute de la capacité (inférieure à 10 µmol/g quelles que soient les concentrations en molécule **85**) a été constatée pour un rapport méthanol/composé **65** de 140.

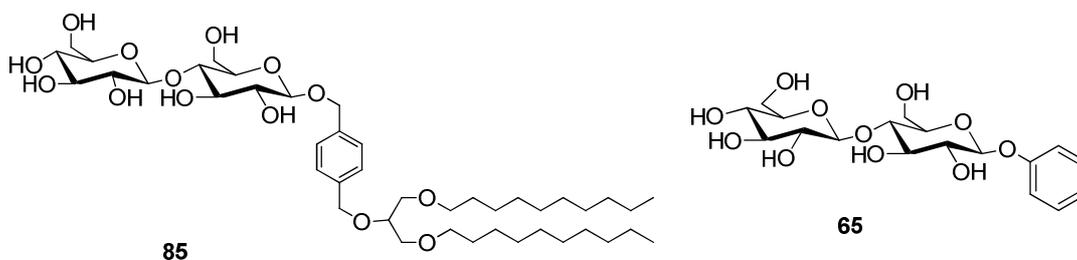
Les capacités maximales, quelles soient les concentrations en molécule **65**, sont obtenues pour un mélange méthanol/composé **65** de 280. C'est ce rapport méthanol/composé **62** qui avait également été testé avec **MIPmalt7c3**. La comparaison des deux courbes de binding, dans le chloroforme et dans le mélange acétonitrile/méthanol est reportée dans le **Graphique 14**.



Graphique 14: Comparaison des courbes de binding du polymère MIPcello2c1 dans le chloroforme et dans le mélange acétonitrile/méthanol

Une saturation et un équilibre semble être atteint dans le cas du binding du polymère imprimé dans le chloroforme avec la molécule **85**. Par contre, une courbe en « cloche » est obtenue pour le binding de **MIPcello2c1** avec le composé **65** indiquant une dissociation du complexe **MIPcello2c1**-analyte **62** aux concentrations élevées (supérieures à 1,1 mM).

Pour **MIPcello2c1**, comparons maintenant la capacité expérimentale maximale déterminée dans l'acétonitrile avec un mélange méthanol/composé **65** = 280 et celle évaluée dans le chloroforme avec le composé **85** (**Tableau 59**).



Conc. en composés	capaexp $\mu\text{mol/g}$	
	85 dans le chloroforme	65 dans le mélange acétonitrile/méthanol
0,77 mM	$24,7 \pm 2,6$	$12,8 \pm 1,7$
1,10 mM	$28,6 \pm 4,0$	$14,6 \pm 2,8$

Tableau 59 : Capaexp maximales déterminées dans le chloroforme et dans le mélange acétonitrile/méthanol pour MIPcello2c1

Contrairement au polymère imprimé du maltose **MIPmalt7c3**, la capacité maximale du polymère imprimé **MIPcello3c1** dans le mélange acétonitrile/méthanol est légèrement inférieure à celle observée expérimentalement dans le chloroforme. La capacité maximale, de $14,6 \pm 2,8 \mu\text{mol/g}$, est obtenue pour une concentration en molécule **65** de 0,77 mM (C_{max} (**65**)). C'est la concentration de référence pour toutes les études suivantes.

Comparativement à la capacité théorique des polymères imprimés qui est de $44 \mu\text{mol/g}$ de polymère, la capacité expérimentale calculée dans un mélange acétonitrile/méthanol reste élevée ($\text{capaexp}/\text{capath} = 41 \%$).

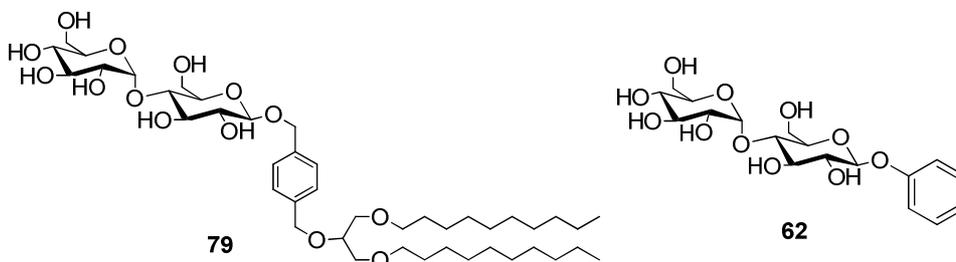
Pour finir, nous avons procédé à une étude de sélectivité cellobiose-maltose dans le chloroforme et dans un mélange acétonitrile/méthanol.

II.3.4 Etude de la sélectivité :

Des études de sélectivités ont été réalisées dans le mélange acétonitrile/méthanol en incubant séparément les dérivés du cellobiose **62** et **65** et dans le chloroforme en incubant les dérivés du maltose **79** et **85** (**Tableau 62**).

Dans l'acétonitrile/méthanol, la concentration en composés **62** et **65** est fixée à 0,77 mM.

Dans le chloroforme, les concentrations en composés **79** et **85** ont été fixées à 0,44mM, concentration à laquelle a été déterminé le facteur de sélectivité maltose-cellobiose pour **MIPmalt7c3**.



Le calcul des facteurs de sélectivité s'effectue, par l'Equation 8. (Tableau 60). Les erreurs proviennent d'un écart type entre deux incubations menées en parallèle.

$$\alpha_{j,k} = \frac{C_j - C_{nj}}{C_k - C_{nk}}$$

Equation 8

C_j : concentration de cellobiose liée au polymère imprimé MIPXic

C_{nj} : concentration de cellobiose liée au polymère de contrôle Cic

C_k : concentration du maltose liée au polymère imprimé MIPXic

C_{nk} : concentration du maltose liée au polymère de contrôle Cic

	chloroforme	acétonitrile/méthanol
Capaexp ($\mu\text{mol/g}$)	85 : $21,2 \pm 0,8$ (1,1 mM)	65 : $14,6 \pm 2,8$ (0,77 mM)
Capaexp ($\mu\text{mol/g}$)	79 : $11,3 \pm 3,0$ (0,44 mM)	62 : $15,7 \pm 0,6$ (0,77 mM)
Facteur de sélectivité	$\alpha_{\text{cello/malto}} = 2,6$ (0,44 mM) ^a	$\alpha_{\text{cello/malto}} = 1,0$ (0,77 mM)

^a Concentrations en molécules **62/65** ou **79/85** pour lesquelles la capacité et le facteur de sélectivité a été calculés

Tableau 60: Facteurs de sélectivité cellobiose/maltose en fonction du solvant d'incubation

Dans le cas du polymère **MIPcello2c1** imprimé avec un dérivé du cellobiose, la sélectivité cellobiose/maltose calculée dans le mélange acétonitrile/méthanol est moins élevée que dans le chloroforme.

Un facteur de sélectivité maltose-cellobiose plus élevé dans un mélange acétonitrile/méthanol avait été pour le polymère **MIPmalt7c3**, imprimé avec un dérivé du maltose.

II.3.5 Conclusion 2:

La capacité du polymère imprimé **MIPcello2c1** est de $28,6 \mu\text{mol/g}$ dans le chloroforme et de $14,6 \mu\text{mol/g}$ dans un mélange acétonitrile/méthanol.

Pour des incubations dans l'acétonitrile/méthanol, le rapport idéal méthanol/composé **67** est de 280.

Le polymère imprimé **MIPcello2c1** est sélectif pour son template d'origine. Les facteurs de sélectivité cellobiose/maltose pour **MIPcello2c1** restent inférieurs aux facteurs de sélectivité maltose/cellobiose déterminés pour **MIPmalt7c3**.

Pour finir l'étude des polymères imprimés avec un dérivé de cellobiose, une étude de la capacité maximale et de la sélectivité a été menée en fonction du taux de réticulation dans un mélange acétonitrile/méthanol.

II.4 Etudes de la capacité maximale en fonction du taux de réticulation:

La capacité des polymères **MIPcello1c1**, **MIPcello2c1**, **MIPcello3c1** et **MIPcello4c1** a été déterminée à une concentration de 0,77 mM en molécule **65**, après 24 heures d'incubation à 10° C, dans un mélange acétonitrile/méthanol avec un rapport méthanol/composé **65** = 280, sur 5 mg de polymère.

Les capacités maximales de chaque polymère sont regroupées dans le **Tableau 61**.

	% de DVB	Capaexp (µmol/g)	
		chloroforme C _{max} (85): 1,1 mM	acétonitrile/methanol C _{max} (65): 0,77 mM
MIPcello1c1	20	13,2 ± 3,5	9,5 ± 3,5
MIPcello2c1	38	28,6 ± 4,0	14,6 ± 2,8
MIPcello3c1	58	24,2 ± 2,6	8,4 ± 0,6
MIPcello4c1	80	22,0 ± 5,3	< 1

Tableau 61 : Comparaison capaexp en fonction du taux de réticulation et du solvant d'incubation

Pour une concentration fixe d'incubation de 0,77 mM, plus le pourcentage de DVB augmente, plus la reconnaissance de l'analyte **65** est faible.

La capacité du polymère imprimé **MIPcello2c1** est de 18,2 µmol/g dans un mélange acétonitrile/méthanol alors que la capacité du polymère imprimé **MIPcello4c1** est nulle dans

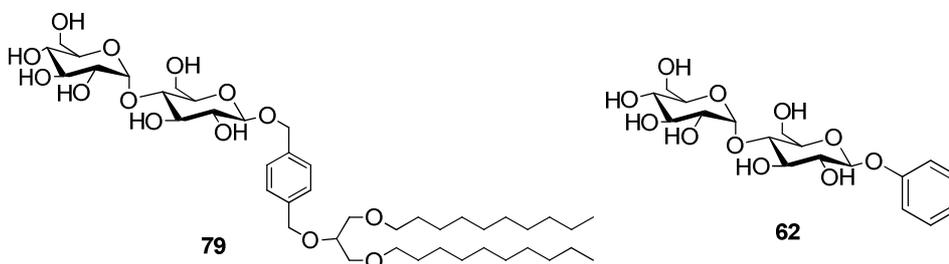
le même mélange de solvant. La présence de méthanol, sur une matrice plus réticulée semble donc inhiber les propriétés de reconnaissance polymère-substrat.

Nous avons ensuite procédé à une étude de sélectivité en fonction du taux de réticulation et du solvant d'incubation.

II.5 Etude de la sélectivité en fonction du taux de réticulation et du solvant d'incubation :

Pour cette étude, le dérivé du maltose **62**, à une concentration de 0,77 mM, a été incubé en présence de 5 mg de polymère, à 10 °C, dans un mélange acétonitrile/méthanol avec un rapport méthanol/composé **62** = 280.

De même, le dérivé **79** du maltose, à une concentration de 0,44 mM, a été incubé en présence de 5 mg de polymère, à 10 °C, dans le chloroforme.



Les capacités mesurées sont regroupées dans le **Tableau 64**. Etant donné que la capacité de **MIPcello4c1** est très faible (1-2 $\mu\text{mol/g}$) dans un mélange acétonitrile/méthanol, le polymère imprimé **MIPcello4c1** a été éliminé de cette étude. Les écarts types sont liés à la reproductibilité de deux mesures de capa_{exp} sur deux incubations menées en parallèle.

	Capaexp des dérivés 62 et 79		
	% de DVB	chloroforme C _{max} (79): 0,44 mM	acétonitrile/methanol C _{max} (65): 0,77 mM
MIPcello1c1	20	-	6,0 ± 0,1
MIPcello2c1	38	11,3 ± 3,0	15,7 ± 0,6
MIPcello3c1	58	26,2 ± 6,1	6,3 ± 0,4

Tableau 62: Capaexp pour les dérivés **62** et **79** avec les différents polymères imprimés avec un dérivé de cellobiose

Le calcul des sélectivités s'effectue par l'Equation 8 (Tableau 63).

$$\alpha_{j,k} = \frac{C_j - C_{nj}}{C_k - C_{nk}}$$

Equation 8

C_j : concentration de cellobiose liée au polymère imprimé MIPXic

C_{nj} : concentration de cellobiose liée au polymère de contrôle Cic

C_k : concentration du maltose liée au polymère imprimé MIPXic

C_{nk} : concentration du maltose liée au polymère de contrôle Cic

	Facteurs de sélectivité		
	% de DVB	chloroforme 0,44mM	acétonitrile/methanol 0,77mM
MIPcello1c1	20	-	2,1
MIPcello2c1	38	2,6	1,0
MIPcello3c1	58	0,7	1,7

Tableau 63 : Facteurs de sélectivité cellobiose-maltose en fonction du pourcentage de DVB

Le facteur de sélectivité cellobiose-maltose déterminé dans un mélange acétonitrile/méthanol reste inchangé en fonction du pourcentage de DVB dans la matrice polymérique.

Une chute du facteur de sélectivité cellobiose-maltose a été constatée entre **MIPcello2c1** et **MIPcello3c1**.

II.6 Conclusion 3 :

Les polymères imprimés avec un dérivé de cellobiose sont donc sélectifs par rapport au template d'origine. La sélectivité cellobiose/maltose reste inchangée quelque soit le pourcentage de DVB dans un mélange acétonitrile/méthanol.

Les capacités des polymères imprimés avec un dérivé de cellobiose déterminées dans le chloroforme sont comprises entre 13,2 et 28,6 $\mu\text{mol/g}$

La constante de dissociation déterminée pour **MIPcello2c1** de 320,4 μM est du même ordre de grandeur que celle calculée pour **MIPmalt7c3**.

Dans un mélange acétonitrile/méthanol, la capacité des polymères imprimés diminue quand le pourcentage de DVB augmente dans la matrice polymérique. L'absence de phénomène de « swelling », la contraction des polymères due à la présence de sept acides carboxyliques dans les cavités et la présence de méthanol est probablement à l'origine de cette chute de capacité. Afin de quantifier le binding non spécifique, des polymères de contrôle avec 38, 58 et 80 % de DVB doivent être également préparés.

Conclusion générale du chapitre 4 :

L'optimisation du process de polymérisation et de clivage a permis d'aboutir à un protocole de clivage optimisé.

Le protocole optimisé est donc le suivant : tous les lots de polymères imprimés sont clivés sur une échelle supérieure ou égale à 300 mg dans des ballons en téflon afin d'éviter l'attaque de la silice par la soude. Après acidification avec de l'acide chlorhydrique 12 N jusqu'à pH 1, le polymère est agité pendant 15 minutes avant d'être centrifugé. Puis plusieurs lavages à l'eau sont réalisés avec agitation 5 minutes avant centrifugation jusqu'à ce que les eaux de lavage soient à pH 6-7. Le polymère est ensuite séché au lyophilisateur.

Les polymères imprimés avec un dérivé de maltose ou de cellobiose sont sélectifs par rapport à leur template d'origine.

Les capacités et sélectivités sont regroupées dans le tableau suivant :

% DVB	Capacité maximale en $\mu\text{mol/g}$				Sélectivité			
	chloroforme		acétonitrile/méthanol		chloroforme		acétonitrile/méthanol	
	MIPmalt	MIPcelo	MIPmalt	MIPcelo	MIPmalt	MIPcelo	MIPmalt	MIPcelo
20	18,2 (0,53 mM)	13,2 (1,1 mM)	17,6 (1,59 mM)	9,5 (0,77 mM)	1,2 (0,44 mM)	/	5,5 (1,1 mM)	2,1 (0,79 mM)
38	/	28,6 (1,1 mM)	/	14,6 (0,77 mM)	/	2,6 (0,53 mM)	/	1,8 (0,79 mM)
58	/	24,2 (1,1 mM)	/	8,4 (0,77 mM)	/	0,7 (0,53 mM)	/	1,7 (0,79 mM)
80	/	22,0 (1,1 mM)	/	0 (0,77 mM)	/	/	/	/

() Concentrations pour lesquelles la capacité ou le facteur de sélectivité a été calculé

Comme dans le cas des polymères imprimés avec un dérivé du glucose, c'est le polymère **MIPcello2c1**, préparé avec 38 % de DVB, qui présente le meilleur compromis entre capacité et sélectivité.

L'étude des lots de polymère **MIPmalt5c1** et **MIPmalt7c3** nous a conduit aux résultats suivants :

- la cinétique de binding est rapide ce qui semble montrer une bonne accessibilité des sites de reconnaissance
- la chaîne lipidique entraîne une reconnaissance non spécifique plus élevée qu'un simple groupement phényle
- le solvant d'incubation n'a pas d'influence sur la capacité des polymères imprimés

La constante de dissociation déterminée pour **MIPcello2c1** de 320,4 μM est du même ordre de grandeur que celle calculée pour **MIPmalt7c3**.

Perspective:

Le but ultime de ces polymères imprimés avec des disaccharides serait de les utiliser comme nanoréacteur pour la synthèse sélective de dérivés de maltose ou de cellobiose régio- et stéréosélective (**Figure 91**). Pour cela, il faudrait étudier le binding de monosaccharides dans un polymère imprimé avec des dérivés de disaccharides. Cependant, faute de temps, cette étude n'a pas pu être menée au laboratoire.

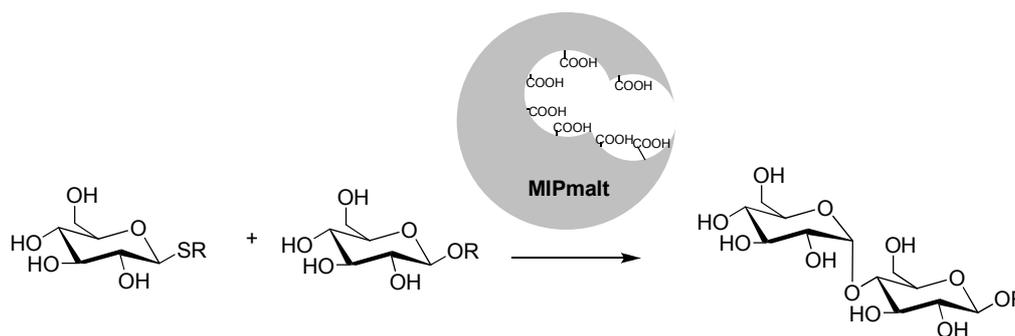


Figure 91: Utilisation de polymères imprimés comme nanoréacteur pour la glycosylation régio- et stéréosélective

Conclusion générale

Le développement d'une nouvelle technique de polymérisation par mini-émulsion « one pot » en utilisant l'approche semi-covalente en surface a permis la préparation de polymères imprimés de différents mono- et disaccharides. Des particules de taille nanométrique plus ou moins homogènes sont obtenues sans broyage et tamisage.

L'optimisation du procédé de polymérisation des polymères imprimés avec un dérivé de glucose a abouti à une formulation notée « idéale », à savoir 20 % de DVB et une capacité théorique de 46 $\mu\text{mol/g}$. C'est pour cette formulation que nous avons observé le meilleur compromis entre la capacité et sélectivité des polymères imprimés.

Une optimisation du procédé de polymérisation et de clivage des polymères imprimés avec un dérivé de maltose a permis la mise au point d'un protocole optimisé d'extraction du template, dans un mélange méthanol/NaOH (5 ou 10 M).

La présence des acides carboxyliques dans les cavités de reconnaissance est indispensable dans le processus de reconnaissance polymère-substrat.

L'augmentation du nombre de points d'ancrages (acides carboxyliques) pour les polymères préparés avec des dérivés de disaccharides n'a pas permis d'améliorer la sélectivité comparativement aux polymères imprimés avec un dérivé de glucose.

Les cinétiques de binding, observées pour les polymères imprimés avec des mono- et disaccharides sont rapides, entre 1 et 5 heures. La présence de sites de reconnaissance en surface permet effectivement d'éviter les problèmes de diffusion. Les constantes de dissociation évaluées par deux techniques différentes sont comprises entre 300 et 900 μM . Ces constantes de dissociation sont plus faibles que celles évaluées pour des récepteurs artificiels non basés sur des polymères imprimés ou des lectines.

Cette technique de polymérisation par mini-émulsion « one pot » en utilisant l'approche semi-covalente en surface présente un inconvénient majeur : la synthèse de template polymérisable.

Dans l'ensemble du procédé de polymérisation, du clivage et du binding, des questions restent encore en suspens. Il serait intéressant d'étudier différents systèmes de polymérisation afin de rendre les matrices polymériques plus hydrophiles. Une étude des conditions de clivage des templates pourrait également être menée afin de diminuer le temps de clivage et

peut être d'améliorer l'extraction des templates. Dans un dernier temps, une étude des phénomènes d'interactions entre les polymères imprimés et les substrats pourrait conduire à une meilleure compréhension des sélectivités observées. La structure même des cavités présentes à la surface des polymères n'est pas connue à ce jour.

Bien que de nombreux problèmes persistent, l'utilisation de polymères imprimés avec des dérivés de monosaccharides comme groupements protecteurs est en cours au laboratoire

L'emploi de polymères imprimés avec des dérivés de disaccharides comme nanoréacteurs sera également étudié.

Partie expérimentale

Conditions:

^1H -NMR, ^{13}C -NMR spectra used for the characterization of the products were recorded on Bruker DPX200, DPX300 and DPX400. Chemical shifts (δ) are quoted in parts per million (ppm) and are calibrated relative to solvent residual peaks (CHCl_3 : ^1H NMR 7.27ppm, ^{13}C NMR 77.16ppm; MeOD: ^1H NMR 3.30ppm, ^{13}C NMR 49.0ppm). Multiplicity is reported as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet, br = broad.

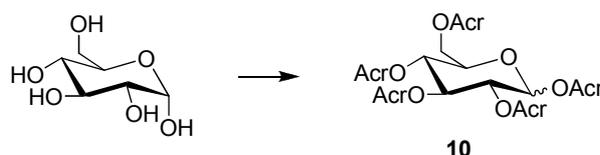
Mass spectra were recorded on a MS/MS high resolution Micromass ZABSpecTOF spectrometry.

Infrared spectra of samples were taken using a Perkin-Elmer 2000 FT-IR spectrometer or a Thermo Electron Corporation Nicolet 380 FT-IR.

All reactions were carried out under an argon atmosphere. Organic solvents were distilled under an argon atmosphere using standard drying agents or stored over molecular sieves (4Å). All starting material were purchased commercially and used without further purification.

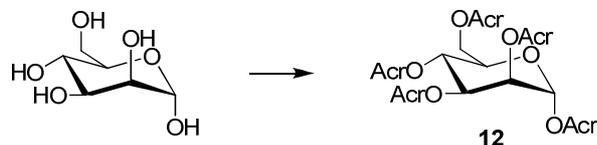
I. General procedure for permethacrylation of totally deprotected sugars

General procedure for Method 1:

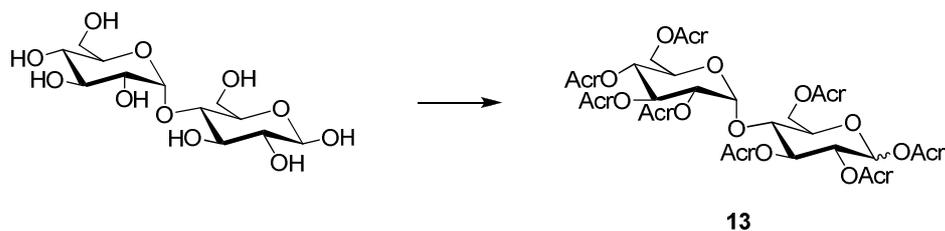


Glucose (5.0 g, 27.70 mmol, 1 equiv.) was suspended in dichloromethane (100 mL); methacrylic anhydride (40 mL, 266.4 mmol, 9.6 equiv.), triethylamine (40 mL, 284.6 mmol, 10.3 equiv.) and catalytic amount of DMAP were added. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight, then washed with water (3*50 mL), dried over Na_2SO_4 and evaporated. The crude was purified by column chromatography (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.63) to give a white solid (8.5 g, yield: 59 %, β/α = 1/1). ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz): δ (ppm) 6.46 (d, J = 4.0Hz, 0.5H), 6.28-6.04 (m, 5H), 5.87 (d, J = 8.0Hz, 0.4H), 5.78-5.49 (m, 6H), 5.41-5.22 (m, 2H), 4.40-4.03 (m, 3H), 2.01-1.85 (6s, 15H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50MHz) δ (ppm) 167.0-165.8, 135.8-135.0,

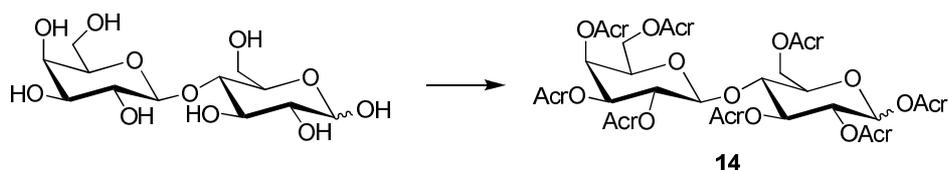
128.3-126.5, 92.5, 89.8, 73.1, 72.7, 70.6, 70.4, 70.2, 70.0, 68.6, 68.3, 62.4, 62.2, 18.3; MM-ES: 543.3 [M+Na]⁺, 561.3 [M+K]⁺.



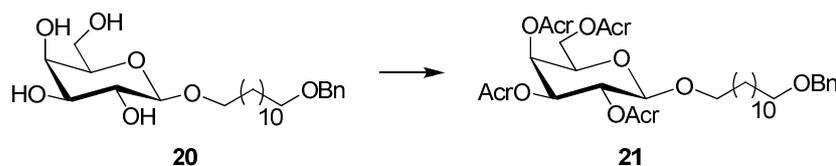
From 4.0 g of mannose, 2.6 g of compound **12** as a colorless oil (yield: 23 %, $\beta/\alpha = 0/1$) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, $R_f = 0.56$). ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 6.24-5.98 (5s, 6H), 5.73-5.42 (m, 8H), 4.30-4.21 (m, 3H), 1.98-1.96-1.93-1.93-1.86-1.81 (5s, 15H) ¹³C-Jmod NMR (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) 166.9, 166.1, 165.9, 165.8, 164.3, 135.9-135.2, 127.8-126.1, 91.1, 70.9, 69.6, 69.0, 65.7, 62.1, 18.2; IR: ν (cm⁻¹) 2980, 1728, 1637, 1458, 1319, 1294, 1147; MM-ES: 543.1 [M+Na]⁺, 559.2 [M+K]⁺.



From 5.0 g of maltose, 10.4 g of compound **13** as a white solid (yield: 42 %, $\beta/\alpha = 5/1$) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, $R_f = 0.53$). ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 6.33 (d, $J = 3.7$ Hz, 0.20H), 6.26-5.85 (m, 8.8H), 5.73 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, Hano β), 5.68-5.42 (m, 12.8H), 5.30-5.13 (m, 2H), 5.10-4.90 (m, 1.2H), 4.55 (m, 1.1H), 4.40 (m, 1.1H), 4.26-4.01 (m, 5.5H), 1.98-1.80 (8s, 31H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75Hz) δ (ppm) 167.1-165.4, 128.3-126.7, 136.0-135.3, 96.5, 92.2, 75.2, 73.6, 72.4, 71.2, 70.7, 69.9, 69.3, 68.6, 63.2, 62.3, 27.2, 18.4; IR: ν (cm⁻¹) 2978, 1731, 1638, 1454, 1319, 1295, 1154, 1082; API-ES. Pos: 909.4 [M+Na]⁺.



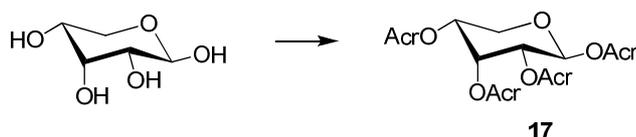
From 2.0 g of compound lactose, 1.7 g of compound **14** as a colorless oil (yield: 34 %, $\beta/\alpha = 3/1$) was recovered (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 7/3, $R_f = 0.60$). ^1H NMR (CDCl_3 , 200MHz) δ (ppm) 6.35 (d, $J = 3.2\text{Hz}$, 1H), 6.25-5.93 (m, 15H), 5.81 (m, 0.5H); 5.77 (d, $J = 8.7\text{Hz}$, 0.5H), 5.72-5.48 (m, 18H), 5.30-5.25 (m, 2H), 5.16-5.08 (m, 2H), 4.64-4.41 (m, 3H), 4.24-3.90 (m, 8.5H), 2.10-1.76 (m, 24H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50MHz) δ (ppm) 172.9, 166.6-165.2, 135.1-134.9, 129.0-126.3, 100.9, 100.6, 92.5, 89.6, 75.4, 75.2, 73.7, 72.6, 71.6, 71.4, 71.1, 70.6, 70.2, 69.9, 69.7, 69.6, 67.3, 62.0, 61.8, 61.4, 61.2, 18.3-17.9; IR: ν (cm^{-1}) 2961, 1731, 1637, 1456, 1319, 1294, 1150, 1076; HRMS: m/z : calc for $\text{C}_{44}\text{H}_{54}\text{O}_{19}\text{Li}$: 896.34 $[\text{M}+\text{Li}]^+$; found : 893.3412.



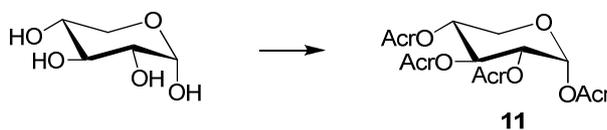
From 446.7 mg of compound **20**, 248.7 mg of compound **21** as a colorless oil (yield: 35 %, $\beta/\alpha = 1/0$) was recovered (SiO_2 , cyclo/ EtOAc = 8/2, $R_f = 0.70$). ^1H NMR (CDCl_3 , 200MHz) δ 7.27 (m, 5H), 6.18 (s, 1H), 6.05 (s, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.60-5.44 (m, 5H), 5.29-5.17 (m, 2H), 4.53 (d, $J = 7.9\text{Hz}$, 1H), 4.49 (s, 2H), 4.33-4.28 (m, 1H), 4.12-3.98 (m, 2H), 3.80 (m, 1H), 3.40 (m, 3H), 1.91-1.86-1.83-1.75 (4s, 13H), 1.53 (m, 4H), 1.17 (m, 17H) ; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50MHz) δ 166.9-166.0, 128.5-126.2, 101.5, 73.0, 71.5, 71.0, 70.7, 70.4, 69.6, 67.8, 61.7, 29.9-29.5, 26.3, 25.9, 18.4; IR: ν (cm^{-1}) 2927, 2854, 1730, 1457, 1320, 1154; HRMS: m/z : calc for $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{Li}$: 733.41 $[\text{M}+\text{Li}]^+$; found 733.4130.

General procedure for Method 2:

Same procedure as in Method 1, but à - 10 °C.

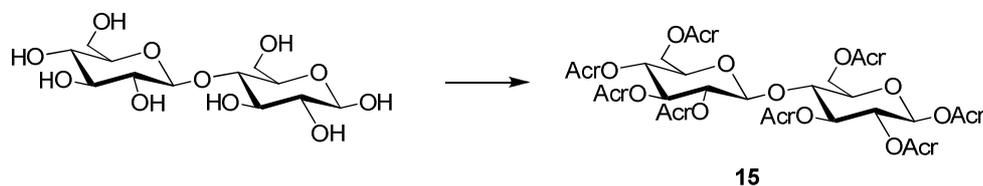


From 500.0 mg of ribose, 1.14 g of compound **17** as a white solid (yield: 70 %, $\beta/\alpha = 5/1$) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, $R_f = 0.67$). ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 6.26 (d, $J = 4.3$ Hz, 0.2H), 6.19 (m, 1H), 6.16 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.12-6.05 (m, 3H), 5.70-5.58 (m, 5H), 5.31-5.25 (m, 2H), 4.17-4.00 (m, 2H), 1.97-1.92 (m, 12H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) 166.0-164.6, 135.6-135.0, 127.2-125.6, 91.4(β), 88.7(α), 67.3(β), 67.1, 67.1(β), 66.5(β), 65.7, 62.5(β), 17.9-17.6; IR: ν (cm⁻¹) 2960, 1724, 1637, 1434, 1318, 1292, 1115, 1079; HRMS: m/z : calc for C₂₁H₂₆O₉Li₁: 429.17 [M+Li]⁺; found 429.1732.

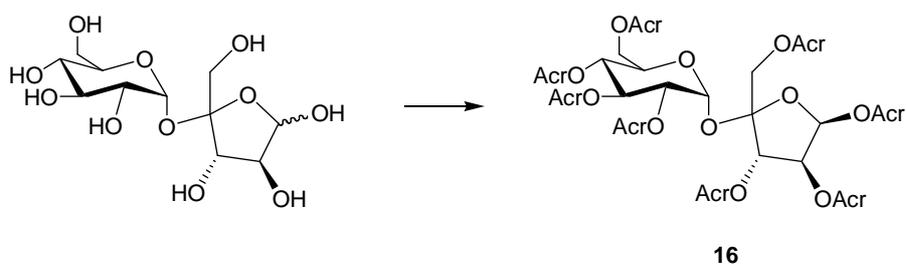


From 500.0 mg of xylose, 1.12 g of compound **11** as a colorless oil (yield: 70 %, $\beta/\alpha = 0/1$) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, $R_f = 0.68$). ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 6.40 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 6.36-6.04 (m, 5H), 5.75-5.56 (m, 6H), 5.25-5.16 (m, 2H), 4.11-4.06 (m, 1H), 3.78 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H), ¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) 165.6-164.5, 135.5-135.3; 126.7-126.3, 89.4, 69.5, 69.3, 68.5, 60.6, 17.6-17.3; IR: ν (cm⁻¹) 2926, 1726, 1637, 1454, 1319, 1290, 1146, 1120; HRMS: m/z : calc for C₂₁H₂₆O₉Li₁: 429.17 [M+Li]⁺; found 429.1732.

General procedure for Method 3:

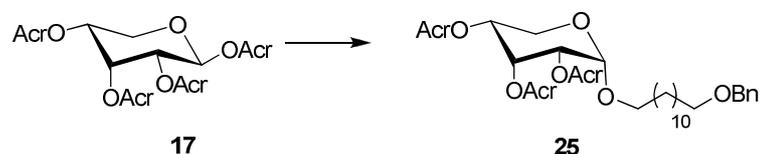


Cellobiose (2.0 g, 5.55 mmol, 1 equiv.) was put in suspension in methacrylic anhydride (10 mL, 66.6 mmol, 12 equiv.), and sodium acetate (600.0 mg, 7.31 mmol, 1.3 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at 180 °C for 5 min in the presence of microwaves. The crude was purified by column chromatography (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.48) to give a white solid (1.7 g, yield: 35 %, β/α = 1/0). ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 6.17-6.00 (m, 7H), 5.77 (d, *J* = 7.8Hz, 1H), 5.25 (m, 8H), 5.35 (t, *J* = 9.2Hz, 1H), 5.18 (m, 2H), 4.64 (m, 1H), 4.52 (m, 1H), 4.20 (m, 2H), 4.13 (m, 2H), 3.85 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 2.00-1.80 (7s, 21H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75Hz) δ (ppm) 18.4, 62.3, 62.9, 68.8, 70.7, 71.6, 72.4, 73.6, 75.5, 92.3, 100.6, 126.7-129.1, 135.1; IR: ν (cm⁻¹) 2978, 1735, 1638, 1454, 1319, 1294, 1153, 1080; API-ES. Pos: 909.3 [M+Na]⁺.

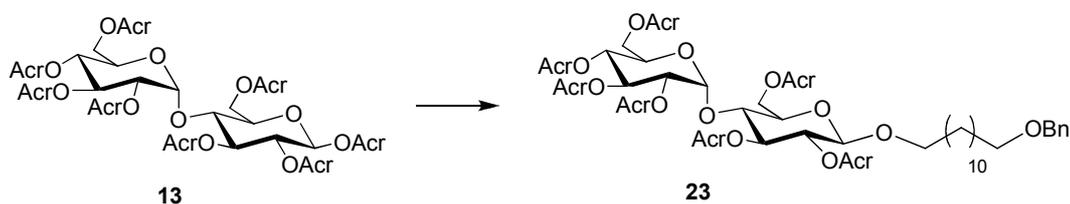


From 100.0 mg of saccharose, 87.0 mg of compound **16** as a colorless oil (yield: 34 %, β/α = 0/1) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.51). ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 6.25-5.97 (m, 8H), 5.76 (d, *J* = 5.8Hz, 1H), 5.71-5.49 (m, 11H), 5.32 (t, *J* = 8.0Hz, 1H), 5.07-5.03 (m, 1H), 4.44-4.23 (m, 8H), 2.03-1.81 (7s, 26H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) 167.7-166.3, 135.8-135.4, 127.7-126.2, 104.2, 90.3, 79.1, 76.7, 75.9, 70.7, 70.0, 68.9, 68.5, 64.5, 64.0, 62.1, 18.4-18.2; IR: ν (cm⁻¹) 2961, 1727, 1637, 1453, 1319, 1296, 1151, 1016.

II. General procedure for glycosidation with $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ on permethacrylated carbohydrates

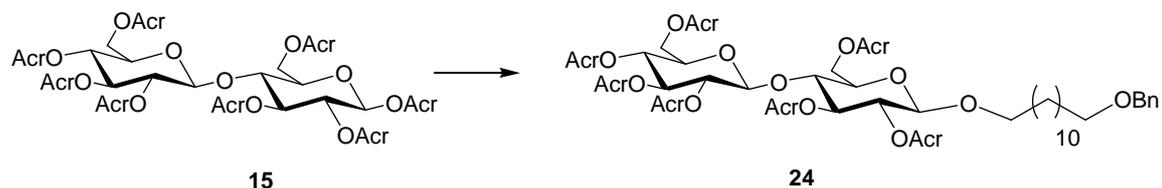


The compound **17** (1.14 g, 2.69 mmol) was dissolved in dichloromethane (40 mL) and 12-(benzyloxy)dodecan-1-ol¹⁸² (946.0 mg, 3.23 mmol, 1.2 equiv.) was added. The reaction mixture was cooled down to 0 °C then $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (1 mL 8.07 mmol, 3 equiv.) was slowly added. The reaction mixture was stirred 5 min at 0 °C then allowed to warm up to room temperature and stirred overnight. The reaction mixture was, then cooled down to 0 °C and quenched with a saturated NaHCO_3 solution (1*10 mL), the two layers were separated and the aqueous phase extracted with dichloromethane (1*10 mL). The organic layers put together were dried over Na_2SO_4 and evaporated. The crude was purified by column chromatography (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 8/2, $R_f = 0.57$) to give a colorless oil (778.4 mg, yield: 46 %, $\beta/\alpha = 0/1$). ^1H NMR (CDCl_3 , 200MHz) δ (ppm) 7.27 (m, 5H), 6.09 (m, 3H), 5.53-5.46 (m, 4H), 5.20 (m, 1H), 5.08 (m, 1H), 4.81 (d, $J = 3.6\text{Hz}$, 1H), 3.81 (m, 1H), 3.83-3.66 (m, 2H), 3.40 (m, 3H), 1.87-1.82 (m, 9H), 1.53 (m, 4H), 1.21 (m, 16H); ^{13}C (CDCl_3 , 50Hz) δ (ppm) 166.8, 166.6, 165.8, 138.8, 136.1, 136.0, 135.9, 128.4, 127.7, 127.5, 126.4, 126.2, 126.1, 98.5, 72.9, 68.9, 68.7, 67.3, 66.3, 61.1; IR: ν (cm^{-1}) 2926, 1737, 1637, 1456, 1320, 1294, 1152, 1078; HRMS: m/z : calc for $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{O}_9\text{Li}$: 635.38 $[\text{M}+\text{Li}]^+$; found 635.3755



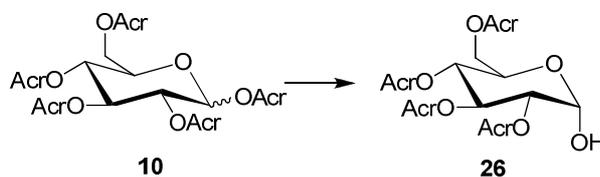
From 617.8 mg of compound **13**, 332.7 mg of compound **23** as a yellow oil (yield: 54 %, $\beta/\alpha = 3/1$) was recovered (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 8/2, $R_f = 0.62$). ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) 7.27 (m, 5H), 6.06 (m, 7H), 5.52 (m, 10H), 5.32 (t, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 5.20 (m, 1H), 4.95 (m, 1H), 4.52 (m, 1H), 4.44 (s, 2H), 4.32 (m, 1H), 4.10 (m, 4H), 4.70 (m, 2H), 3.40 (m, 3H), 1.93-1.74 (7s, 21H), 1.52 (m, 4H), 1.20-1.16 (m, 16H); ^{13}C (CDCl_3 , 75Hz) δ (ppm) 166.9-165.7, 135.8-135.2, 128.5, 127.7, 127.5-126.5, 100.6, 96.1, 95.5, 75.1, 73.0, 72.4, 71.0, 70.7, 70.2, 69.6, 69.0,

68.5, 67.9, 63.3, 62.1, 29.9-29.4, 26.3, 21.1, 20.9, 18.4-18.1; IR: ν (cm^{-1}) 2928, 2855, 1732, 1638, 1454, 1319, 1295, 1159, 1043, 1019; MM-ES: 1089 [M-27].

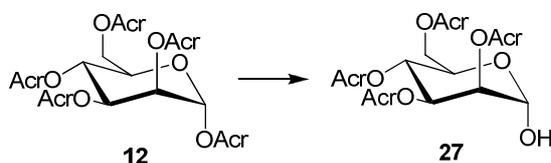


From 510.0 mg of compound **15**, 255.0 mg of compound **24** as a yellow oil (yield: 40 %, $\beta/\alpha = 1/0$) was recovered (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 7/3, $R_f = 0.63$). ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) 7.32 (m, 5H), 6.08 (m, 7H), 5.58 (m, 7H), 5.36 (m, 2H), 5.15 (m, 2H), 5.02 (m, 1H), 4.63 (m, 1H), 4.53(m, 3H), 4.13(m, 4H), 3.91(m, 1H), 3.76 (m, 3H), 3.44 (m, 3H), 1.99-1.80 (7s, 21H), 1.52 (m, 4H), 1.26-1.22 (m, 16H); ^{13}C (CDCl_3 , 75Hz) δ (ppm) 136.1-135.2, 128.5, 127.7, 127.2-126.2, 100.9, 100.6, 76.1, 73.0, 72.9, 72.6, 72.4, 71.9, 71.8, 70.7, 70.3, 68.9, 62.9, 62.4, 29.9-29.5, 25.9, 18.4; IR: ν (cm^{-1}) 2927, 2854, 1730, 1637, 1456, 1320, 1295, 1151, 1068.

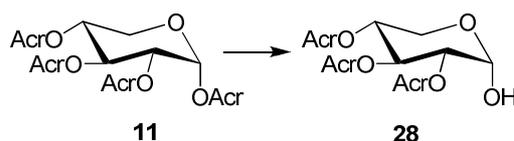
III. General procedure for selective hydrolysis in anomeric position



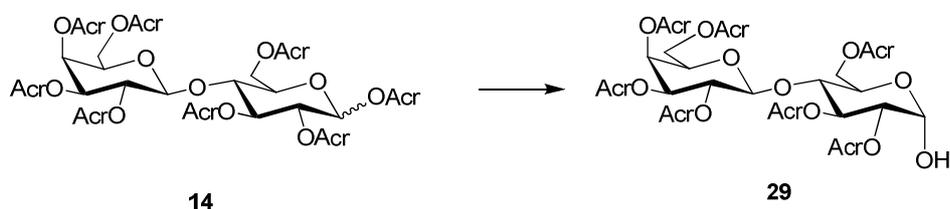
The compound **10** (1.0 g, 1.90 mmol, 1 equiv.) was dissolved in tetrahydrofuran (20 mL) and benzylamine (250 μ L, 2.30 mmol, 1.2 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight, then evaporated. The crude was purified by column chromatography (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 8/2, R_f = 0.51) to give a yellow solid (365.0 mg, yield: 42 %, β/α = 0/1). ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) 6.18-6.01 (4s, 12H), 5.78 (t, J = 10.3Hz, 1H), 5.55 (m, 5H), 5.29 (t, J = 10.3Hz, 1H), 4.96 (m, 1H), 4.37 (m, 2H), 4.19 (m, 1H), 1.96-1.84 (4s, 12H), ^{13}C -DEPT NMR (CDCl_3 , 50MHz) δ (ppm) 127.4-126.5, 90.4, 71.9, 70.0, 69.0, 67.7, 62.6, 18.3; IR: ν (cm^{-1}) 3450, 2960, 1730, 1636, 1456, 1320, 1294, 1155; MM-ES: 435.1 $[\text{M-OH}]^+$.



From 2.6 g of compound **12**, 813.7 mg of compound **27** as a yellow solid (yield: 36 %, β/α = 0/1) was recovered (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 8/2, R_f = 0.55). ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) 6.23-6.01 (m, 4H), 5.68-5.34 (m, 8H), 4.43-4.22 (m, 3H), 3.34 (m, 1H), 1.98-1.82 (3s, 12H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm) 167.4, 166.4-166.2, 136.0-135.4, 126.9-126.3, 92.3, 70.8, 69.6, 68.5, 66.5, 62.6, 18.3-18.1; IR: ν (cm^{-1}) 3470, 2980, 1732, 1637, 1456, 1295, 1152; MM-ES: 435.1 $[\text{M-OH}]^+$.

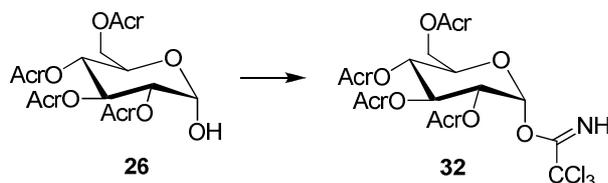


From 361.8 mg of compound **11**, 115.5 mg of compound **28** as a white solid (yield: 36%, $\beta/\alpha=0/1$) was recovered (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 7/3, $R_f = 0.46$). ^1H NMR (CDCl_3 , 200MHz) δ (ppm) 6.09-6.04-6.02 (3s, 3H), 5.73 (t, $J = 8.0\text{Hz}$, 1H), 5.56-5.44 (m, 4H), 5.06-4.87 (m, 2H), 1.84 (s, 9H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50MHz) δ (ppm) 166.7-166.3, 135.5-135.3, 127.2-126.4, 96.0 (α furanose), 90.4 (α pyranose), 73.4 (furanose), 71.8, 69.7, 69.5, 62.8 (furanose), 58.4, 18.2; IR: ν (cm^{-1}) 3467, 2960, 1724, 1637, 1455, 1322, 1293, 1151, 1054; HRMS: m/z : calc for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_8\text{Li}$: 361.15 $[\text{M}+\text{Li}]^+$; found 361.1459.

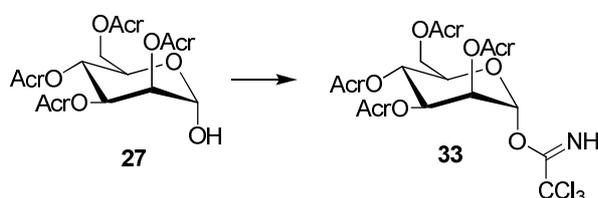


From 1.5 g of compound **14**, 790.0 mg of compound **29** as a white solid (yield: 54 %, $\beta/\alpha = 3/1$) was recovered (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 6/4, $R_f = 0.40$). ^1H NMR (CDCl_3 , 200MHz) δ (ppm) 6.22-5.96 (m, 5H), 5.72-5.47 (m, 7H), 5.29-5.22 (m, 0.5H), 5.12-5.08 (m, 0.5H), 4.82-4.92 (m, 0.5H), 4.65-4.60 (m, 0.5H), 4.53-4.45 (m, 1H), 4.26-4.15 (m, 2H), 4.06-3.89 (m, 2H), 2.02-1.79 (m, 21H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50MHz) δ (ppm) 166.8-165.5, 136.0-135.1, 128.4-125.9, 100.7, 95.7 (α furanose), 90.3 (α pyranose), 75.8, 71.9, 71.6, 71.1, 69.9, 69.7, 68.5, 67.3, 62.2, 61.4, 18.4; IR: ν (cm^{-1}) 3435, 2960, 1727, 1637, 1455, 1321, 1294, 1155, 1076; HRMS: m/z : calc for $\text{C}_{40}\text{H}_{50}\text{O}_{18}\text{Li}$: 825.32 $[\text{M}+\text{Li}]^+$; found 825.3131.

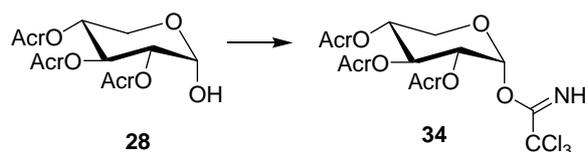
IV. General procedure for trichloroacetimidate synthesis



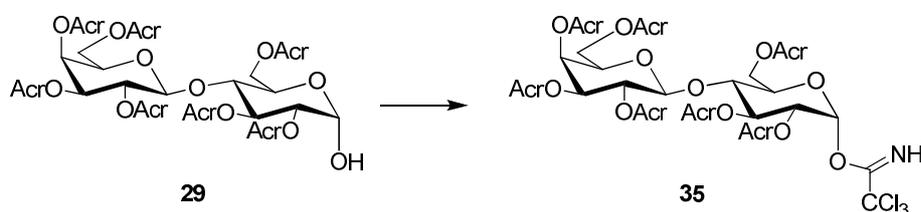
The compound **26** (440.0 mg, 0.97 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dichloromethane (20 mL) and trichloroacetonitrile (290 μ L, 2.92 mmol, 3 equiv.), followed by DBU (15 μ L, 0.10 mmol, 0.1 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h, then evaporated. The crude was purified by column chromatography (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 6/4, R_f = 0.72) to give a white solid (426.0 mg, yield: 73 %, β/α = 0/1). ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) 8.68 (s, 1H), 6.63 (d, J = 4.0Hz, 1H), 6.15-6.04 (m, 12H), 5.81 (t, J = 10.8Hz, 1H), 5.55 (m, 5H), 5.34 (t, J = 10.3Hz, 1H), 5.27 (m, 1H), 4.35 (m, 2H), 4.24 (m, 1H), 1.95-1.86 (4s, 12H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm) 166.9-165.8, 160.7, 135.2-135.0, 127.5-126.4, 93.1, 90.8, 70.6, 70.2, 70.1, 68.2, 62.2, 18.3; IR: ν (cm^{-1}) 3318, 2959, 1724, 1637, 1453, 1317, 1292, 1137, 1020; MM-ES: 622.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 435.1 $[\text{M}-\text{CNHCCl}_3]$.



From 1.4 g of compound **27**, 1.2 g of compound **33** as a yellow solid (yield: 66 %, β/α = 0/1) was recovered (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.67). ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) 8.81 (s, 1H), 6.38-6.24-6.16-6.09-6.01 (5s, 5H), 5.73-5.54 (m, 7H), 4.40-4.25 (m, 3H), 1.99-1.95-1.89-1.83 (4s, 12H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm) 166.9, 166.1-165.9, 160.0, 136.0-135.3, 127.4-126.2, 94.7, 90.7, 71.5, 69.5, 68.6, 65.7, 62.3, 18.3; IR: ν (cm^{-1}) 3315, 2960, 1729, 1638, 1459, 1322, 1295, 1114, 1044.

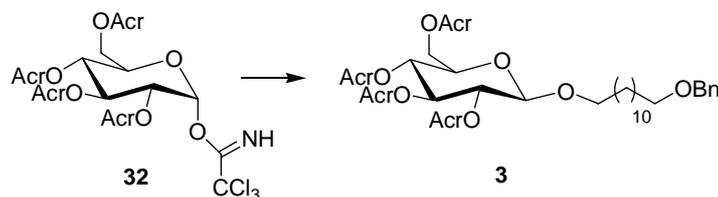


From 306.2 mg of compound **28**, 334.4 mg of compound **34** as a yellow oil (yield: 87 %, $\beta/\alpha = 0/1$) was recovered (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 7/3, $R_f = 0.59$). ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) 8.66 (s, 1H), 6.57 (d, $J = 4.0\text{Hz}$, 1H), 6.07 (2s, 3H), 5.82 (t, $J = 4.0\text{Hz}$, 1H), 5.63-5.55 (m, 4H), 5.28-5.17 (m, 2H), 4.17-4.09 (m, 1H), 3.89 (m, 1H), 1.89 (m, 11H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm) 166.1-165.9, 160.7, 135.3-135.0, 127.3-126.5, 93.3, 90.7, 70.1, 69.5, 68.9, 61.1, 18.1; HRMS: m/z : calc for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{Cl}_3\text{O}_8\text{NLi}$: 506.05 $[\text{M}+\text{Li}]^+$; found 506.0529.

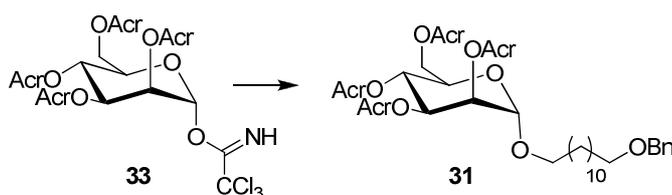


From 461.8 mg of compound **29**, 299.6 mg of compound **35** as a yellow oil (yield: 55 %, $\beta/\alpha = 0/1$) was recovered (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 7/3, $R_f = 0.55$). ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) 6.38-5.97 (m, 8H), 5.77-5.48 (m, 9H), 5.35-5.29 (m, 1H), 5.17-5.11 (m, 1H), 4.65-4.59 (m, 1H), 4.47-4.27 (m, 1H), 4.28-4.13 (m, 2H), 4.09-3.89 (m, 4H), 1.99-1.80 (7s, 22H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50MHz) δ (ppm) 166.6-165.2, 135.9-135.1, 128.0-126.1, 101.0, 89.6, 75.5, 71.6, 71.1, 70.2, 69.9, 69.7, 67.2, 61.7, 61.3.

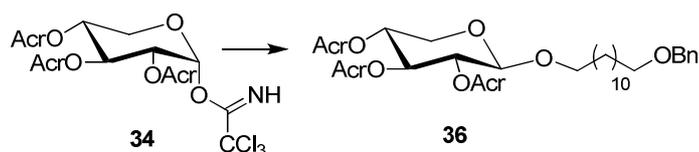
V. General procedure for glycosidation with TMSNTf₂ on activated permethacrylated carbohydrates:



The compound **32** (600.0 mg, 1.00 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dichloromethane (20 mL) and 12-(benzyloxy)dodecan-1-ol (352.0 mg, 1.19 mmol, 1.2 equiv.) was added. The reaction mixture was cooled down to 0 °C and TMSNTf₂ (0.5 mmol, 0.5 equiv.), freshly prepared, was slowly added. The mixture became brown after 30 min. The reaction mixture was then evaporated and the crude purified by column chromatography (SiO₂, cyclo/EtOAc = 8/2, R_f = 0.46) to give the compound **3** as a colourless oil (411.4 mg, yield: 41 %, β/α = 1/0). ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 7.34-7.26 (m, 5H), 6.15-6.02 (4s, 4H), 5.60-5.52 (m, 4H), 5.43 (m, 1H), 5.27 (m, 1H), 5.14 (m, 1H), 4.6 (d, *J* = 8.0Hz, 1H), 4.50 (s, 2H), 4.36 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 3.87-3.83 (m, 2H), 3.52 (m, 1H), 3.46 (t, *J* = 6.6Hz, 2H), 1.95-1.82 (4s, 12H), 1.65-1.47 (m, 4H), 1.38-1.23 (m, 16H); ¹³C NMR (CDCl₃, 50MHz) δ (ppm) 167.1, 166.6, 165.9, 138.9, 135.9, 135.7, 135.3, 135.2, 128.5, 127.8, 127.6, 127.1, 126.4, 101.2, 73.0, 72.1, 71.7, 70.7, 70.3, 69.3, 62.9, 32.9, 29.9, 29.7, 29.5, 29.47, 26.4, 25.9, 18.4, 18.35, 18.3.

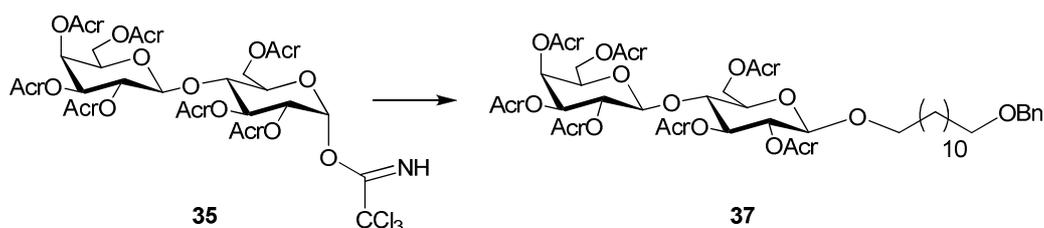


From 1.4 g of compound **33**, 1.1 g of compound **31** as a colourless oil (yield: 40 %, β/α = 0/1) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.69). ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 7.27 (m, 5H), 6.15-6.11-6.00-5.93 (4s, 4H), 5.58-5.29 (m, 8H), 4.83 (s, 1H), 4.44 (s, 2H), 4.30-4.19 (m, 3H), 3.64 (m, 1H), 3.40 (m, 3H), 1.90-1.76 (3s, 12H), 1.57 (m, 4H), 1.21 (m, 16H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) 167.0, 166.3, 166.2, 166.1, 136.2, 135.8, 135.6, 135.5, 128.4, 127.6, 126.8, 126.7, 126.6, 126.0, 97.7, 73.0, 70.7, 70.5, 69.9, 68.8, 66.8, 62.9, 29.9-29.4, 26.3, 18.3-18.1; HRMS: 733,4139 [M+Li]⁺.



From 334.4 mg of compound **34**, 296.0 mg of compound **36** as a colourless oil (yield: 35 %, $\beta/\alpha = 2/1$) was recovered (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 7/3, $R_f = 0.50$).

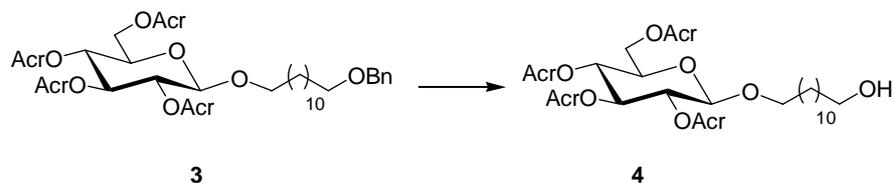
^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) 7.27 (m, 5H), 6.12-6.03 (m, 3H), 5.73 (t, $J = 9.0\text{Hz}$, 0.3H), 5.59-5.52 (m, 3H), 5.38 (t, $J = 7.8\text{Hz}$, 0.3H), 5.09-4.99 (m, 2H), 4.92 (m, 0.3H), 4.58 (d, 1H, $J = 6.7\text{Hz}$); 4.51 (s, 2H), 4.23 (m, 0.7H), 3.92-3.65 (m, 1.7H), 3.51-3.38 (m, 3.8H), 1.91-1.88 (m, 9.8H), 1.69-1.51 (m, 5H), 1.26 (m, 17H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm) 166.4, 165.9, 162.3, 138.9, 135.7, 135.5, 128.5, 127.7, 127.6, 126.9, 126.5, 100.8, 96.0, 73.0, 71.7, 71.3, 70.9, 70.7, 70.0, 69.8, 69.4, 68.7, 62.0, 58.6, 30.1-29.5, 27.0-26.0, 18.4; HRMS: 635.6770 $[\text{M}+\text{Li}]^+$.



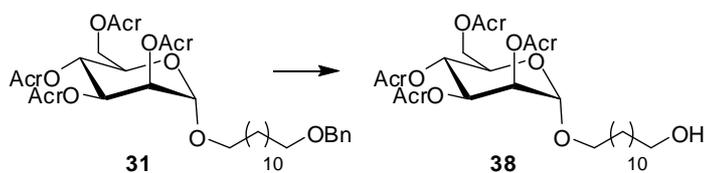
From 380.0 mg of compound **35**, 100.0 mg of compound **37** as a colourless oil (yield: 23 %, $\beta/\alpha = 1/0$) was recovered (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 7/3, $R_f = 0.53$).

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) 7.27 (m, 5H), 6.12-5.89 (6s, 7H), 5.58-5.42 (m, 7H), 5.31 (t, $J = 8.5\text{Hz}$, 1H), 5.21 (m, 1H), 5.05-4.95 (m, 2H), 4.54 (d, $J = 8.5\text{Hz}$, 1H), 4.47-4.42 (m, 3H), 4.17-3.95 (m, 3H), 3.95 (m, 2H), 3.75 (m, 1H), 3.63 (m, 1H), 3.39 (m, 3H), 1.98-1.72 (4s, 21H), 1.55 (m, 4H), 1.15 (m, 16H); ^{13}C Jmod NMR (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm) 166.6-165.7, 136.0-135.1, 128.4, 127.6, 127.5, 127.2, 127.1, 126.9, 126.7, 126.2, 100.9, 100.6, 75.8, 72.8, 71.7, 71.4, 71.1, 70.6, 70.2, 69.6, 67.3, 62.3, 61.4, 29.8-29.4, 26.2, 25.8, 18.3; HRMS: 1099.5407 $[\text{M}+\text{Li}]^+$.

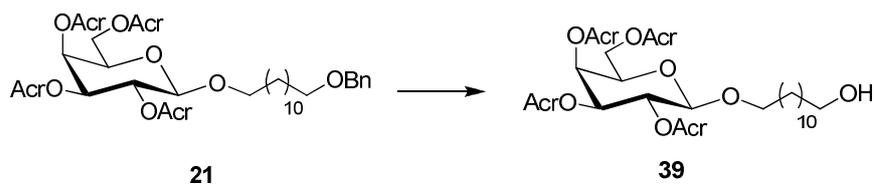
VI. General procedure for debenzylation



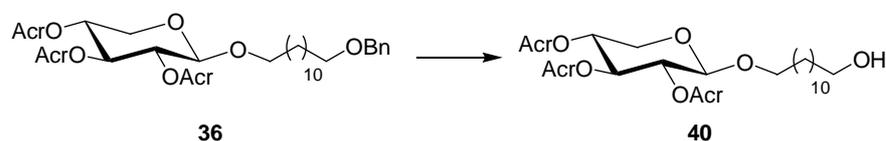
The compound **3** (400.0 mg, 0.55 mmol) was dissolved in a mixture of DCM/water (10/1 mL), then DDQ (625.3 mg, 2.75 mmol, 5 equiv.) was slowly added. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight, then quenched with a saturated NaHCO₃ solution (10 mL), extracted, washed with a saturated NaHSO₄ solution (2*10 mL), dried over Na₂SO₄ then evaporated. The crude yellow oil obtained was purified by column chromatographic (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.22) to give the compound **4** as a colourless oil (200.4 mg, yield: 57 %). ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 6.15-6.01 (4s, 4H), 5.59-5.51 (4s, 4H), 5.42 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H), 5.23 (t, *J* = 9.8Hz, 1H), 5.13 (m, 1H), 4.6 (d, *J* = 7.9Hz, 1H), 4.35 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 3.88-3.81 (m, 2H), 3.63 (t, *J* = 6.7Hz, 2H), 3.52 (m, 1H), 1.94-1.81 (4s, 12H), 1.60-1.51 (m, 4H), 1.30-1.22 (m, 16H); ¹³C NMR (CDCl₃, 50MHz) δ (ppm) 167.1, 166.6, 165.9, 135.9, 135.7, 135.3, 135.2, 127.1, 126.4, 101.2, 72.9, 72.1, 71.7, 70.3, 69.3, 63.2, 62.9, 32.9, 29.7, 29.6, 29.4, 25.9, 18.4, 18.3, 18.2; HRMS 659.3402 [M+Na]⁺.



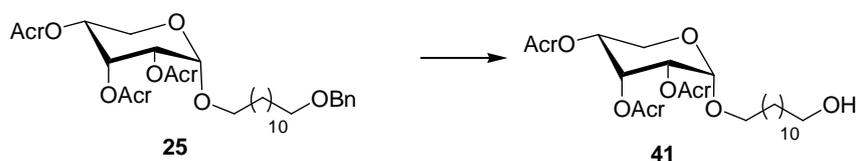
From 230.0 mg of compound **31**, 132.1 mg of compound **38** as a colourless oil (yield: 65 %) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.29). ¹H NMR (CDCl₃, 200MHz) δ (ppm) 6.22-5.99 (m, 4H), 5.65-5.51 (m, 7H), 5.35 (m, 1H), 4.90 (d, *J* = 4.0Hz, 1H), 4.33-4.17 (m, 4H), 3.75-3.61 (m, 3H), 3.47 (m, 1H), 1.98-1.83 (3s, 12H), 1.64-1.59 (m, 4H), 1.29 (m, 16H); ¹³C NMR (CDCl₃, 50MHz) δ (ppm) 167.0-166.1, 135.6-135.3, 126.9-126.1, 97.5, 70.4, 69.8, 68.6, 66.6, 63.1, 62.8, 32.9, 29.6-29.4, 27.0, 26.1, 25.8, 18.3-18.1, HRMS: 643.3656 [M+Li]⁺.



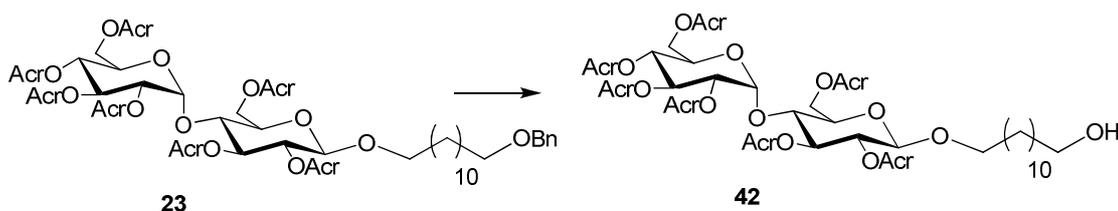
From 220.0 mg of compound **21**, 132.4 mg of compound **39** as a colourless oil (yield: 69 %) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.21). ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 6.22-5.95 (m, 4H), 5.63-5.49 (m, 5H), 5.32 (m, 1H), 5.18 (m, 1H), 4.57 (d, *J* = 7.9Hz, 1H), 4.38-4.33 (m, 1H), 4.16-4.04 (m, 2H), 3.87 (m, 1H), 3.58 (t, *J* = 6.8Hz, 2H) 3.47 (m, 1H), 1.94-1.79 (4s, 12H), 1.53 (m, 4H), 1.23 (m, 16H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) 166.8-165.9, 135.7-135.2, 127.1-126.1, 101.4, 71.4, 71.0, 70.3, 69.5, 67.7, 63.0, 61.7; MM-ES: 654.3 [M+NH₃].



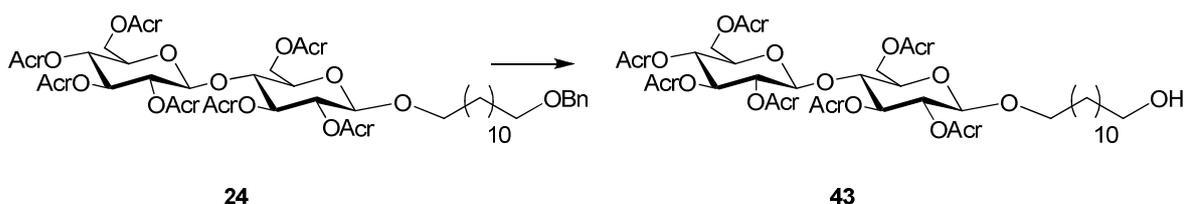
From 320.0 mg of compound **36**, 113.3 mg of compound **40** as a colourless oil (yield: 43%, β/α = 2/1) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.14). ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 6.16-5.99 (m, 4.2H), 5.71-5.49 (m, 5H), 5.34 (t, *J* = 9.0Hz, 1H), 5.05-4.86 (m, 3.3H), 4.55 (d, *J* = 7.9Hz, 1H), 4.20 (m, 1H), 3.84-3.66 (m, 2.3H), 3.59 (m, 3H), 3.47-3.38 (m, 2H), 1.91-1.84 (m, 15H), 1.60-1.51 (m, 6H), 1.23 (m, 25H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) 166.4-165.9, 135.6-135.4, 126.8-126.3, 100.7, 95.9, 71.6, 71.2, 70.8, 70.0, 69.7, 69.3, 68.6, 63.0, 61.9, 59.7, 32.8, 29.5, 25.9, 18.3; MM-ES: 556.3 [M+4H]⁺.



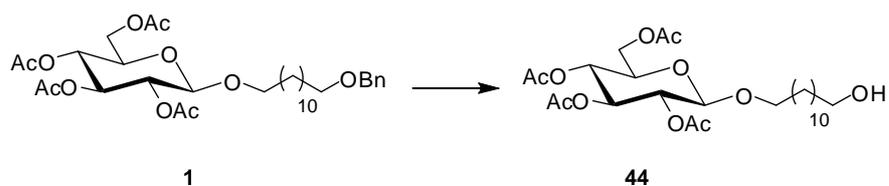
From 320.0 mg of compound **25**, 113.3 mg of compound **41** as a colourless oil (yield: 39 %) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.23). ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ (ppm) 6.16 (s, 1H), 6.14 (s, 1H), 6.05 (s, 1H), 5.59-5.52 (m, 4H), 5.25 (m, 1H), 5.14 (t, *J* = 3.5Hz, 1H), 4.87 (d, *J* = 3.5Hz, 1H), 4.10-4.06 (m, 1H), 3.88-3.83 (m, 1H), 3.78-3.72 (m, 1H), 3.63 (t, *J* = 7.3Hz, 2H), 3.51-3.43 (m, 1H), 1.93-1.92-1.89 (3s, 9H), 1.59 (m, 4H), 1.28 (m, 16H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz) δ (ppm) 166.9, 166.8, 165.9, 136.1-135.9, 126.4-126.2, 98.5, 68.9, 68.7, 67.3, 66.3, 63.2, 61.1, 29.7-29.5, 25.9, 18.4.



From 178.6 mg of compound **23**, 127.6 mg of compound **42** as a colourless oil (yield: 78 %) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.25). ¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 6.08 (m, 7H), 5.52 (m, 10H), 5.25 (m, 1H), 4.97 (m, 2H), 4.66 (m, 2H), 4.38 (m, 1H), 4.23 (m, 1H), 4.10 (m, 3H), 3.82 (m, 1H), 3.62 (m, 2H), 2.03-1.79 (7s, 21H), 1.54 (m, 4H), 1.27-1.21 (m, 16H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75Hz) δ (ppm) 166.9-165.7, 135.8-135.1, 127.5-126.5, 100.5, 96.2, 95.6, 75.3, 75.1, 72.8, 72.7, 72.5, 72.3, 72.1, 71.0, 70.4, 70.1, 69.8, 69.5, 69.0, 68.4, 67.9, 63.3, 63.1, 62.1, 32.9, 29.7-29.4, 27.0, 25.8, 18.4-18.1; IR ν (cm⁻¹) 3557, 2927, 2853, 1731, 1637, 1455, 1405, 1379, 1319, 1295, 1158, 1043, 946, 810; API-ES: 999 [M-27].

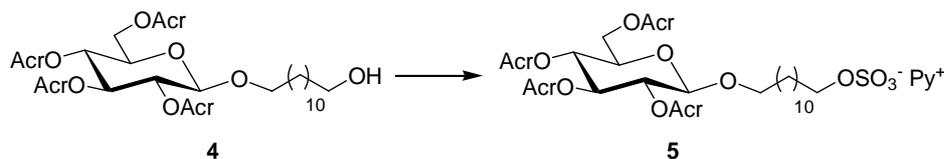


From 430.0 mg of compound **24**, 216.5 mg of compound **43** as a yellow oil (yield: 55 %) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.22). ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 6.08 (m, 7H), 5.57 (m, 7H), 5.35 (m, 2H), 5.16 (m, 2H), 5.03 (m, 1H), 4.63 (d, *J* = 8.0Hz, 1H), 4.52 (m, 2H), 4.18 (m, 4H), 3.91 (m, 1H), 3.78 (m, 5H), 3.43 (m, 1H), 2.05-1.80 (7s, 21H), 1.50 (m, 4H), 1.27-1.22 (m, 16H); ¹³C NMR (CDCl₃, 50Hz) δ 166.9-165.4, 136.1-135.1, 127.3-126.3, 100.9, 100.6, 73.0, 72.9, 72.7, 72.4, 71.9, 71.8, 70.3, 68.9, 63.2, 62.3, 32.6, 29.7, 25.9, 18.4; MM-ES+APCI: 1002.2 [M-H]⁻.

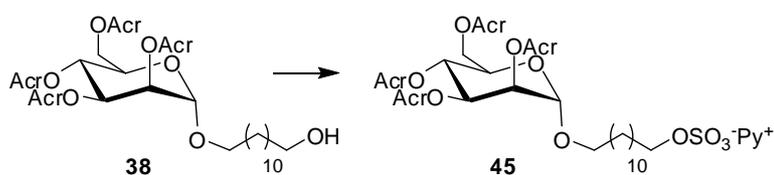


From 720.0 mg of compound **1**, 440.0 mg of compound **44** as a colourless oil (yield: 53 %) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.12). ¹H NMR (CDCl₃, 200MHz) δ (ppm) 5.22-4.99 (m, 3H), 4.51 (d, *J* = 7.8Hz, 1H), 4.26-4.16 (m, 2H), 3.90-3.85 (m, 1H), 3.74-3.62 (m, 3H), 3.50-3.45 (m, 1H), 2.08-2.01 (4s, 12H), 1.62-1.41 (m, 4H), 1.29 (bs, 16H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75Hz) δ (ppm) 167.1, 166.6, 165.9, 101.3, 72.9, 72.1, 71.7, 70.3, 69.3, 63.2, 62.9, 32.9, 29.7, 29.6, 29.4, 25.7, 20.6; MM-ES: 429.2 [M+Na]⁺.

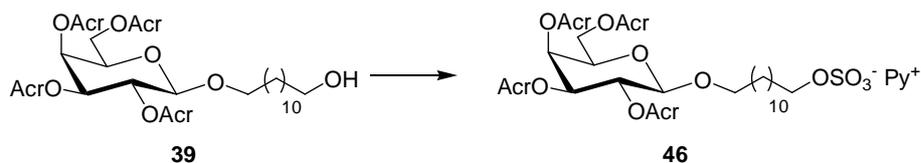
VII. General procedure for surfactant synthesis



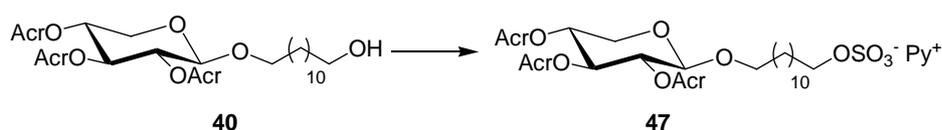
The compound **4** (200.0 mg, 0.31 mmol) was dissolved in dichloromethane (6 mL) and sulphur trioxide pyridine complex (100.0 mg, 0.63 mmol, 2 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at 59 °C for 1 h then cooled down to 0 °C, filtered and the filtrate evaporated. It was then recrystallised in a mixture of diethylether and pentane to give the compound **5** as a white wax (200.0 mg, yield: 68 %). ¹H-NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 8.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 8.52 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.0 (m, 2H), 6.15-6.06 (4s, 4H), 5.59-5.51 (3s, 4H), 5.43 (m, 1H), 5.23 (t, *J* = 9.8 Hz, 1H), 5.13 (m, 1H), 4.6 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.35 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 4.12 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.89-3.82 (m, 2H), 3.52 (m, 1H), 1.94-1.81 (4s, 12H), 1.74-1.64 (m, 2H), 1.58-1.52 (m, 2H), 1.42-1.21 (m, 16H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 50MHz) δ (ppm) 167.0, 166.5, 165.8, 146.1, 142.3, 135.9, 135.6, 135.2, 135.1, 127.4, 127.0, 126.9, 126.4, 126.0, 101.1, 72.9, 72.0, 71.6, 70.3, 69.3, 68.6, 62.9, 29.6, 29.4, 29.3, 25.9, 18.4, 18.3, 18.2, 18.19; IR: ν (cm⁻¹) 2927, 2854, 1734, 1638, 1455, 1323, 1157; HRMS 443.1957 [M-272.1054]⁻.



From 123.0 mg of compound **38**, 108.0 mg of compound **45** as a colourless oil (yield: 70 %) was recovered. ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 9.00 (d, *J* = 6.5Hz, 2H), 8.49 (t, *J* = 8.1Hz, 1H), 8.02 (m, 2H), 6.21-5.99 (m, 4H), 5.64-5.49 (m, 6H), 5.34 (s, 1H), 4.90 (s, 1H), 4.36-4.09 (m, 5H), 3.72 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 1.96-1.82 (3s, 12H), 1.72-1.60 (m, 4H), 1.26 (m, 16H); ¹³C NMR (CDCl₃, 50MHz) δ (ppm) 166.9-166.0, 145.8, 142.2, 135.9-135.2, 127.2-126.0, 97.4, 70.2, 69.7, 68.6, 68.5, 68.4, 62.7, 29.5-29.2, 25.9, 18.2-18.0; IR: ν (cm⁻¹) 2928, 2855, 1733, 1638, 1456, 1323, 1153; HRMS: 715.3000 [M-py]⁻.



From 133.3 mg of compound **39**, 119.0 mg of compound **46** as a colourless oil (yield 87 %) was recovered. ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm) 8.98 (d, $J = 5.1\text{Hz}$, 2H), 8.49 (t, $J = 7.9\text{Hz}$, 1H), 8.00 (m, 2H), 6.24-6.11-6.05-5.98 (4s, 4H), 5.66-5.50 (m, 5H), 5.38-5.31 (m, 1H), 5.23-5.20 (m, 1H), 4.61 (d, $J = 7.3\text{Hz}$, 1H), 4.40-4.35 (m, 1H), 4.19-4.12 (m, 3H), 4.08-4.06 (m, 1H), 3.90-3.88 (m, 1H), 3.51-3.52 (m, 1H), 1.97-1.93-1.90-1.82 (4s, 12H), 1.72-1.67 (m, 2H), 1.58-1.52 (m, 2H), 1.23 (m, 16H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100MHz) δ (ppm) 166.9-166.3, 145.9, 142.4, 135.8-135.3, 127.3-126.2, 101.5, 71.5, 71.1, 70.4, 69.6, 68.8, 67.8, 61.8, 29.7-29.4, 25.9, 18.4-18.1; IR: ν (cm^{-1}) 2930, 2853, 1735, 1638, 1454, 1322, 1157; HRMS: 715.3000 $[\text{M-py}]^-$.

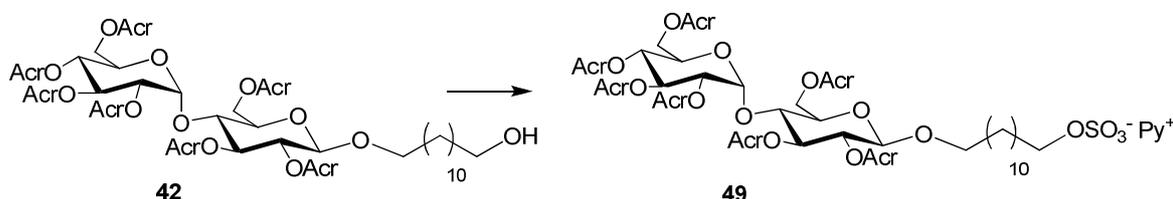


From 113.6 mg of compound **40**, 146.7 mg of compound **47** as a colourless oil (yield: 80 %, $\beta/\alpha = 2/1$) was recovered. ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm) 8.97 (d, $J = 5.2\text{Hz}$, 2H), 8.49 (t, $J = 8.0\text{Hz}$, 1H), 8.00 (m, 2H), 6.10-6.02 (m, 3H), 5.71 (t, $J = 8.0\text{Hz}$, 0.3H), 5.58-5.52 (m, 3H), 5.37 (t, $J = 8.0\text{Hz}$, 0.7H), 5.08-4.99 (m, 3H), 4.92-4.89 (m, 0.3H), 5.57 (d, $J = 7.0\text{Hz}$, 0.7H), 4.24-4.20 (m, 0.7H), 4.12 (t, $J = 7.4\text{Hz}$, 2H), 3.87-3.79 (m, 1.1H), 3.72-3.69 (m, 0.8H), 3.49-3.44 (m, 1H), 1.92-1.86 (m, 9H), 1.72-1.68 (m, 2H), 1.56-1.53 (m, 2H), 1.38-1.23 (m, 16H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100MHz) δ (ppm) 166.3-166.1, 145.9, 142.3, 135.8-135.5, 127.3-126.4, 100.8, 96.1, 71.7, 71.3, 70.9, 70.0, 69.8, 69.4, 68.6, 62.0, 58.6, 29.7-29.4, 25.9, 18.3; IR: ν (cm^{-1}) MM-ES: 617.2 $[\text{M-Opy}]^-$.

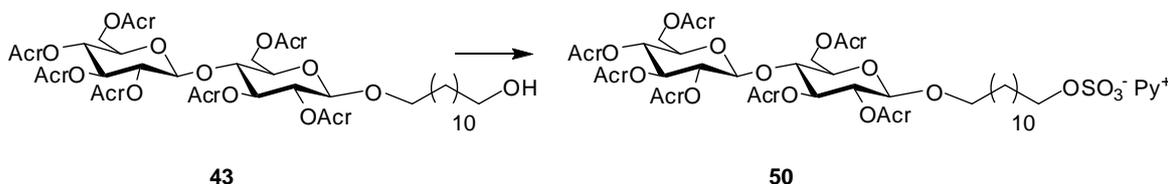


From 254.0 mg of compound **41**, 319.3 mg of compound **48** as a colourless oil (yield: 98 %) was recovered. ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm) 9.00 (d, $J = 5.2\text{Hz}$, 2H), 8.49 (t, $J = 8.2\text{Hz}$, 1H), 8.02 (m, 2H), 6.16-6.15-6.13 (3s, 3H), 5.59-5.52 (m, 4H), 5.23 (m, 1H), 5.13 (m, 1H), 4.86 (d, $J = 4.0\text{Hz}$, 1H), 4.14-4.05 (m, 3H), 3.87-3.73 (m, 2H), 3.49-3.45 (m, 1H), 1.97-1.93-1.88 (3s, 9H),

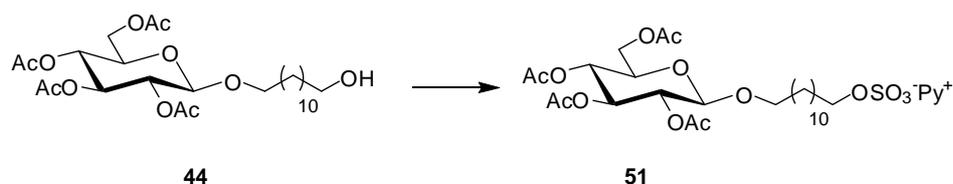
1.38-1.34 (m, 2H), 1.34-1.30 (m, 2H), 1.28-1.21 (bs, 16H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100MHz) δ (ppm) 166.9, 166.6, 165.9, 145.9, 142.4, 136.1-135.9, 127.3, 126.4-126.2, 98.6, 69.0, 68.8, 68.7, 67.3, 66.4, 61.1-29.7-29.4, 25.9, 18.4-18.2; IR: ν (cm^{-1}) MM-ES: 617.2 $[\text{M-Opy}]^-$.



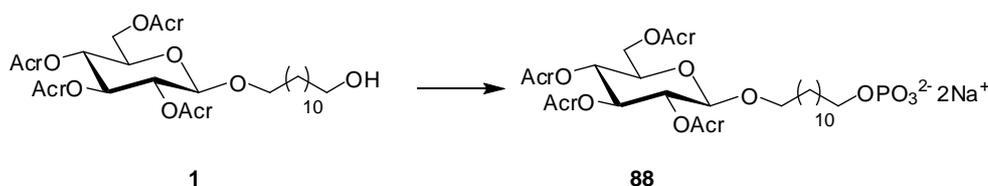
From 127.0 mg of compound **42**, 111.0 mg of compound **49** as a white solid (yield: 75 %) was recovered. ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) 8.96 (d, $J = 5.8\text{Hz}$, 2H), 8.49 (t, $J = 8.1\text{Hz}$, 1H), 7.99 (m, 2H), 6.08 (m, 7H), 5.52 (m, 10H), 5.27 (m, 1H), 4.67 (m, 2H), 4.36 (m, 1H), 4.16 (m, 6H), 4.23 (m, 1H), 3.83 (m, 1H), 3.45 (m, 1H), 1.99-1.80 (7s, 21H), 1.54 (m, 4H), 1.25-1.21 (m, 16H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75Hz) δ (ppm) 166.7-165.7, 146.1, 142.4, 135.5-135.1, 127.5-126.5, 100.5, 96.2, 95.6, 75.2, 75.1, 72.8, 72.1, 71.0, 70.4, 70.2, 69.7, 69.5, 69.0, 68.6, 68.4, 67.9, 63.3, 62.1, 29.7-29.4, 25.9, 18.4-18.2; IR: ν (cm^{-1}) 3431, 2926, 1727, 1633, 1444, 1320, 1159, 1045.; API-ES: 1055 $[\text{M-(Py}^++27)]$, 1081 $[\text{M-py}]^-$.



From 193.0 mg of compound **43**, 232.8 mg of compound **50** as a white solid (yield: 100 %) was recovered. ^1H NMR (CDCl_3 , 200MHz) δ (ppm) 8.95 (d, 2H, $J = 7.8\text{Hz}$), 8.52 (m, 1H), 8.00 (m, 2H), 6.07 (m, 7H), 5.56 (m, 7H), 5.34 (m, 2H), 5.08 (m, 3H), 4.55 (m, 3H), 4.15 (m, 4H), 3.80 (m, 4H), 3.46 (m, 2H), 1.99-1.80 (7s, 21H), 1.54 (m, 4H), 1.27-1.20 (m, 16H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75Hz) δ (ppm) 166.9-165.4, 146.0, 142.3, 135.0, 127.3-126.3, 100.9, 100.6, 76.1, 73.0, 72.9, 72.6, 72.3, 71.8, 71.7, 70.3, 68.7, 62.9, 62.3, 29.6-29.4, 25.9, 18.3; MM-ES+APCI: 1081.2 $[\text{M-py}]^-$.

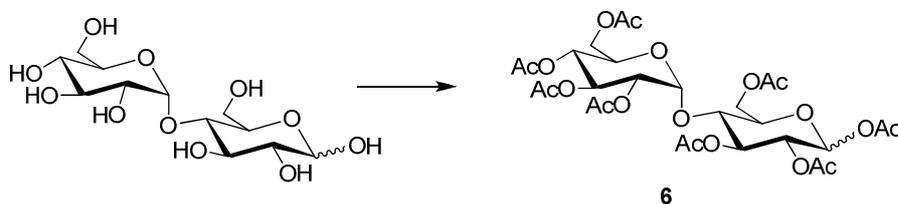


From 440.0 mg of compound **44**, 330.1 mg of compound **51** as a colourless oil (yield: 97 %) was recovered. ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) 8.96 (d, $J = 5.7\text{Hz}$, 2H), 8.51 (t, $J = 7.8\text{Hz}$, 1H), 8.03 (m, 2H), 5.13 (t, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 4.99 (t, $J = 9.6\text{Hz}$, 1H), 4.90 (t, $J = 9.0\text{Hz}$, 1H), 4.43 (d, $J = 7.8\text{Hz}$, 1H), 4.26-4.17 (m, 1H), 4.07-3.98 (m, 3H), 3.83-3.75 (m, 1H), 3.66-3.62 (m, 1H), 3.44-3.37 (m, 1H), 2.02-1.98-1.96-1.93 (4s, 12H), 1.61-1.48 (m, 4H), 1.16 (bs, 16H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75Hz) δ (ppm) 170.6, 170.1, 169.3, 169.2, 146.3, 142.1, 127.4, 100.7, 72.8, 71.6, 71.3, 70.2, 68.4, 68.3, 62.0, 29.4-29.2, 25.7, 20.6.

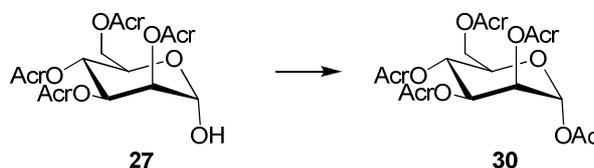


Compound **1** (103.0 mg, 0.16 mmol, 1 equiv.), dissolved in diethylether (2 mL) was slowly added to a solution (2 mL) of POCl_3 (15 μL , 0.16 mmol, 1 equiv.) at 0 °C. The reaction mixture was then stirred 2 h at RT and evaporated. A solution at pH 3 (10 mL) was added to the residue. After removing water, a second solution (10 mL) at pH 3 was added to the residue and again removed. The final crude was evaporated and dried under vacuum to recover compound **88** as an uncolourless (100.0 mg, yield: 81 %). ^1H NMR (CDCl_3 , 200MHz) δ (ppm) 6.18-6.04 (3s, 4H), 5.63-5.55 (m, 4H), 5.46-5.42 (m, 1H), 5.31-5.17 (m, 2H), 4.64 (d, $J = 7.8\text{Hz}$, 1H), 4.37-4.21 (m, 2H), 4.13-4.07 (m, 2H), 3.94-3.87 (m, 2H), 3.54-3.49 (m, 1H), 1.98-1.92-1.89-1.85 (4s, 12H), 1.73-1.59 (m, 4H), 1.26 (bs, 16H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75Hz) δ (ppm) 167.2, 166.7, 165.9, 135.9-135.2, 127.1, 126.5, 101.2, 73.0, 72.1, 71.7, 70.3, 69.3, 63.0, 29.7-29.2, 25.9, 25.5, 18.3; ^{31}P (CDCl_3 , 81Hz) 2.59. MM-ES+APCI: 762.7 $[\text{M}+2\text{H}]^+$, 739.2 $[\text{M}-\text{Na}^++2\text{H}^+]$, 715.2 $[\text{M}-2\text{Na}^+]$.

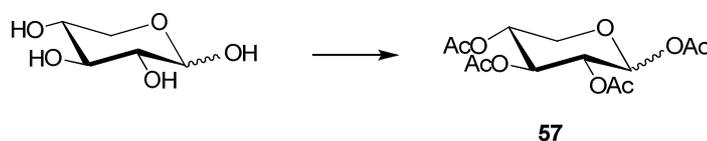
VIII. General procedure for peracetylation carbohydrates synthesis



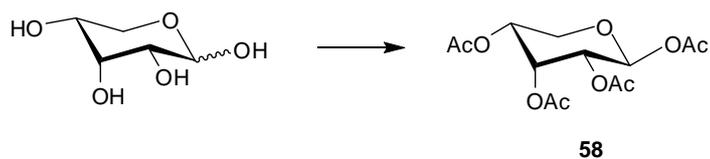
Synthesized as described in reference H.M.I. Osborn Carbohydrates, Academic Press, Ed **2003**.



From 813.7 mg of compound **27** in dichloromethane (15 mL), was added acetic anhydride (340 μ L, 3.60 mmol, 2 equiv.), triethylamine (506 μ L, 3.60 mmol, 2equiv.) and catalytic amount of DMPA. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h, then washed with water (2*10 mL), dried over Na_2SO_4 and evaporated. The crude was filtered on silica (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.45) to give a white solid (812.3 mg, 99 %). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 6.05-5.87 (5s, 5H), 5.54-5.40 (m, 6H), 5.27 (d, J = 3.5Hz, 1H), 4.20-4.11 (m, 3H), 2.51 (s, 3H), 1.84-1.69 (4s, 12H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 167.7-165.4, 135.7-135.0, 126.8-125.7, 90.4, 70.4, 69.2, 68.7, 65.4, 61.8, 20.5, 17.9.

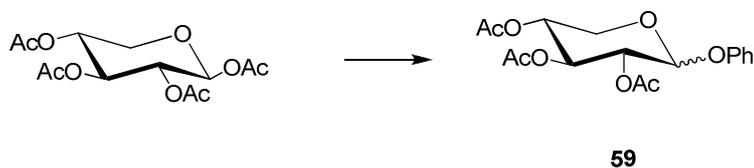


From 500 mg of xylose, 1.0 g of compound **57** as a white solid (yield: 99 %) was recovered (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.20). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 6.21 (d, J = 3.6Hz, 0.2H, Hano α), 5.68 (d, J = 7.3Hz, 1H, Hano β), 5.50-5.30 (m, 0.4H), 5.20-5.12 (m, 1H), 5.02-4.88 (m, 2.4H), 4.60-4.50 (m, 0.2H), 4.22-4.06 (m, 1.2H), 3.93-3.85 (m, 0.2H), 3.72-3.61 (m, 0.2H), 3.54-3.44 (m, 1H), 2.06-2.01 (m, 15H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 169.8-169.0, 92.0, 89.2, 71.0, 69.5, 69.4, 68.3, 62.7, 60.6, 20.8-20.6.

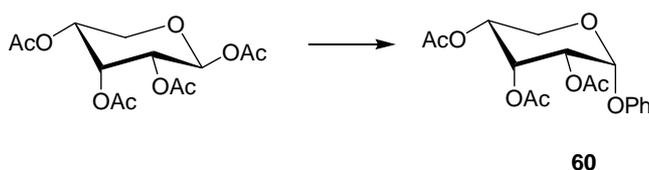


From 1.0 g of ribose, 2.1 g of compound **58** as a white solid (yield: 100 %) was recovered (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 7/3, $R_f = 0.15$). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 6.02 (m, 1H), 5.47 (m, 1H), 5.14-5.01 (m, 2H), 4.00-3.89 (m, 2H), 2.15-2.04 (m, 12H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) 170.0-168.8, 98.3 (furanose), 91.0, 88.7, 79.4 (furanose), 74.2 (furanose), 70.6 (furanose), 67.4, 67.1, 66.4, 66.3, 65.6, 62.8, 59.3 (furanose), 21.1-20.6.

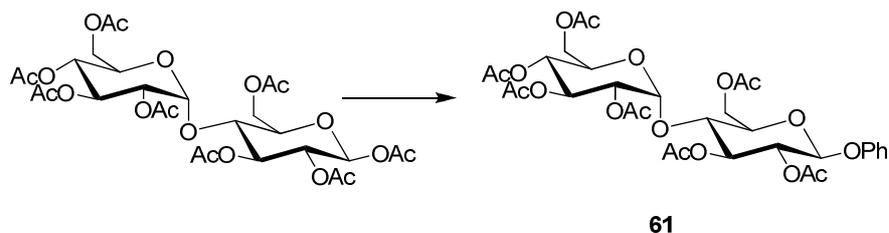
IX. General procedure for glycosidation with $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ on peracetylated carbohydrates



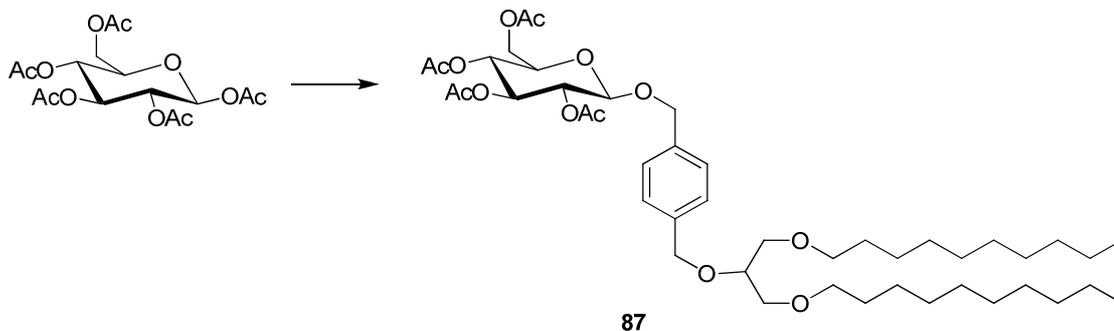
Peracetylated xylose (1.0 g, 3.14 mmol, 1 equiv.) and phenol (296.0 mg, 3.77 mmol, 1.2 equiv.) are dissolved in dry dichloromethane (10 mL). The reaction mixture was cooled down to 0 °C, then $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (1.2 mL, 9.42 mmol, 3 equiv.) was slowly added. The reaction mixture was allowed to warm up to room temperature and stirred overnight, then quenched at 0 °C with water (10 mL), extracted with dichloromethane (2*10 mL), dried over Na_2SO_4 and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.35) to give the compound **59** as a white solid (220.0 mg, yield: 20 %). ^1H NMR (CDCl_3 , 200MHz) δ (ppm) 7.38-7.08 (m, 5H), 5.79-5.70 (m, 2H), 5.16-4.98 (m, 2H), 3.90-3.76 (m, 2H), 2.10-2.07 (m, 9H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50MHz) δ (ppm) 170.4-170.1, 156.3, 129.7, 123.0, 116.7, 94.4, 70.8, 69.6, 69.3, 59.1, 20.9, 20.8; MM-ES: 375.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



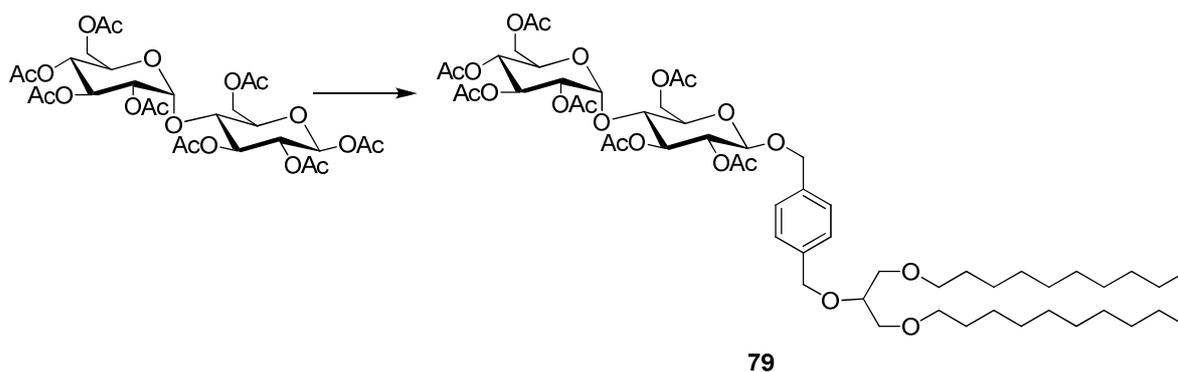
From 2.1 g of peracetylated ribose, 797.9 mg of compound **60** as a white solid (yield: 34 %) was recovered (cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.33). ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) 7.27-7.04 (m, 5H), 5.56-5.52 (m, 2H), 5.25 (m, 2H), 4.10-4.83 (m, 2H), 2.17-2.06 (m, 9H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50MHz) δ (ppm) 170.2-168.9, 156.0, 129.5, 122.8, 116.4, 96.5, 68.1, 66.6, 65.7, 61.7, 20.9-20.7; MM-ES: 375.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



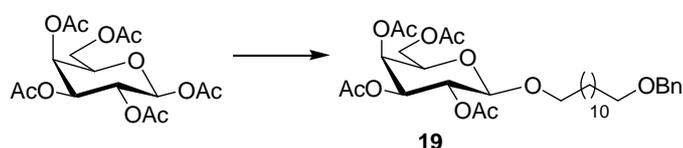
From 500 mg of peracetylated maltose, 235.7 mg of compound **61** as a white solid (yield: 45 %) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 5/5, R_f = 0.44). ¹H NMR (CDCl₃, 200MHz) δ (ppm) 5.74 (d, *J* = 7.4Hz, 1H), 5.41-5.25 (m, 4H), 5.10-4.82 (m, 5H), 4.49-4.42 (m, 2H), 4.27-4.18 (m, 4H), 4.09-3.80 (m, 7H), 2.14-2.02 (m, 24H); ¹³C NMR (CDCl₃, 50MHz) δ (ppm) 170.2-169.3, 135.1, 129.8, 123.5, 117.1, 98.6, 95.8, 75.5, 72.9, 72.4, 72.2, 70.2, 69.5, 68.9, 68.2, 63.0, 61.7, 20.8; IR: ν (cm⁻¹) 2360, 1752, 1580, 1371; API-ES Pos: 735.2 [M+Na]⁺.



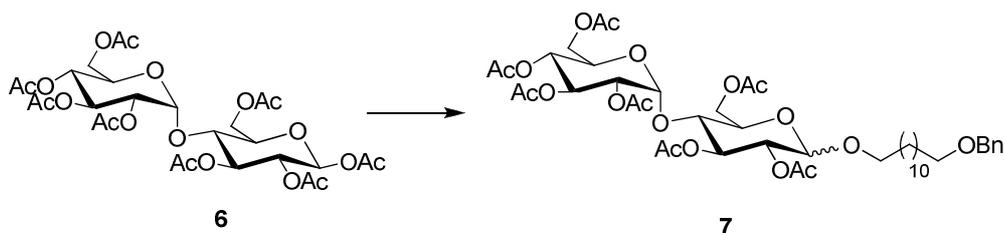
From 259.0 mg (0.66 mmol) of peracetylated glucose, 194.3 mg of compound **87** as a colorless oil (yield: 36 %) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.36). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.37-7.23 (m, 5H), 5.17-5.07 (m, 3H), 4.88 (d, *J* = 12.1Hz, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.61 (d, *J* = 12.1Hz, 1H), 4.54 (d, *J* = 8.0Hz, 1H), 4.32-4.14 (m, 2H), 3.74-3.54 (m, 2H), 3.54 (m, 4H), 3.43 (t, *J* = 6.8Hz, 4H), 2.11-2.01 (4s, 12H), 1.57 (m, 4H), 1.27 (m, 32H), 0.88 (m, 6H); ¹³C Jmod (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) 170.8-169.4, 139.0, 135.8, 127.9, 99.2, 77.4, 73.0, 71.9, 71.8, 71.4, 71.2, 70.6, 68.6, 62.1, 32.0, 29.8-29.5, 26.3, 22.8, 20.8, 14.2; IR: ν (cm⁻¹) 2926, 2855, 1759, 1466, 1367, 1228, 1118, 1044; MM-ES+APCI : 845.1 [M+Na]⁺, 865.1 [M+K]⁺.



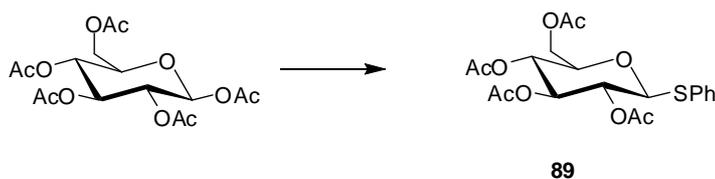
From 500 mg of peracetylated maltose, 208.0 mg of compound **79** as a colourless oil (yield: 25 %) was recovered (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 5/5, $R_f = 0.60$). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) 7.31 (m, 4H), 5.42 (m, 1H), 5.37 (d, $J = 4.4\text{Hz}$, 1H), 5.28 (t, $J = 10.2\text{Hz}$, 1H), 5.10 (t, $J = 9.6\text{Hz}$, 1H), 4.89 (m, 3H), 4.72 (s, 2H), 4.60 (m, 3H), 4.27 (m, 2H), 4.08 (m, 4H), 3.71 (m, 1H), 3.55 (m, 4H), 3.45 (m, 4H), 2.18-2.01 (7s, 21H), 1.59 (m, 4H), 1.29 (bs, 32H), 0.90 (m, 6H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm) 170.6-169.5, 139.0, 135.7, 128.0, 98.4, 95.3, 77.4, 75.6, 72.7, 72.2, 71.7, 71.1, 70.5, 70.1, 69.4, 68.6, 62.9, 61.6, 32.0, 29.7-29.4, 26.2, 22.8, 21.0-20.7, 14.1; IR: ν (cm^{-1}) 3374, 3247, 2928, 1752, 1694, 1614, 1378, 1260, 1110, 1046, 833, 751; MM-ES: 1133.1 $[\text{M}-\text{H}+\text{Na}]^+$, 1149.1 $[\text{M}+\text{K}]^+$.



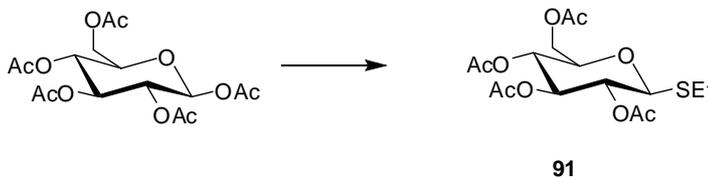
From 1.0 g of peracetylated galactose, 802.4 mg of compound **19** as a colorless oil (yield: 46 %) was recovered (SiO_2 , cyclohexane/EtOAc = 7/3, $R_f = 0.35$). ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm): 7.27 (m, 5H), 5.33 (m, 1H), 5.13 (m, 1H), 4.96 (m, 1H), 4.40 (s, 2H), 4.38 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 1H), 4.10 (m, 2H), 3.84 (m, 2H), 3.40 (m, 3H), 2.08-1.92 (3s, 12H), 1.53 (m, 4H), 1.20 (m, 16H); ^{13}C (CDCl_3 , 75Hz) δ (ppm): 170.4-170.2, 138.8, 128.4, 127.6, 127.5, 101.4, 72.9, 71.0, 70.6, 70.5, 70.3, 69.0, 67.1, 61.3; HRMS: m/z : calc for $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_{11}\text{Li}$: 629.35 $[\text{M}+\text{Li}]^+$; found 629.3505.



From 500.0 mg (0.74 mmol) of peracetylated maltose **6**, 344.6 mg of compound **7** as a white solid (yield: 38 %) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.55). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz,) δ (ppm) 7.30 (m, 5H), 5.41-5.33 (m, 2H), 5.27 (t, *J* = 8.7Hz, 1H), 5.07 (t, *J* = 9.4Hz, 1H), 4.88-4.78 (m, 2H), 4.46 (m, 4H), 4.27-4.20 (m, 2H), 4.06-3.94 (m, 3H), 3.87-3.80 (m, 1H), 3.66 (m, 1H), 3.43 (m, 3H), 2.13-2.00 (7s, 21H), 1.61-1.54 (m, 4H), 1.25 (m, 17H), ¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) 170.8-169.8, 138.7, 128.5, 127.8, 127.6, 100.5, 95.7, 75.7, 73.0, 72.4, 72.3, 70.8, 70.4, 70.2, 69.6, 68.7, 68.2, 63.1, 61.7, 30.0-29.6, 26.4, 26.0, 21.1-20.8, MM-ES: 933.1 [M+Na]⁺.

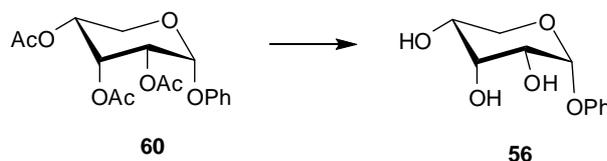


From 1.0 g (2.56 mmol) of peracetylated glucose, 1.0 g of compound **89** as a white solid (yield: 93 %) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.46). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.51 (m, 2H), 7.32 (m, 3H), 5.24 (t, *J* = 9.6Hz, 1H), 5.05 (m, 2H), 4.72 (d, *J* = 9.6Hz, 1H), 4.21 (m, 2H), 3.74 (m, 1H), 2.10-2.00 (4s, 12H), ¹³C NMR (CDCl₃, 50MHz) δ (ppm) 170.7-169.4, 133.3, 131.7, 129.1, 128.6, 85.9, 75.9, 74.1, 70.1, 68.3, 62.3, 20.9-20.7. MM-ES: 463.1 [M+Na]⁺, 479.0 [M+K]⁺.

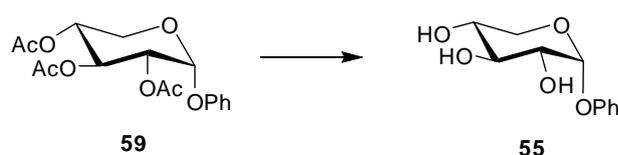


From 5.0 g (12.8 mmol) of peracetylated glucose, 4.6 g of compound **91** as a white solid (yield: 92 %) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.44). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 5.22 (t, *J* = 8.9Hz, 1H), 5.12-5.01 (m, 2H), 4.50 (t, *J* = 8.8Hz, 1H), 4.26-4.12 (m, 2H), 2.78-2.62 (m, 2H), 2.08-2.02 (4s, 12H), 1.27 (t, *J* = 7.9Hz, 1H). MM-ES: 415.1 [M+Na]⁺, 431.0 [M+K]⁺.

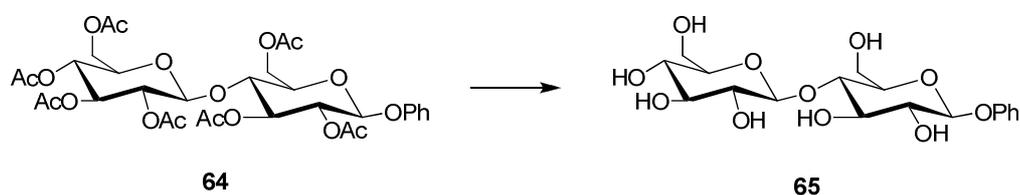
X. General procedure for acetate hydrolysis



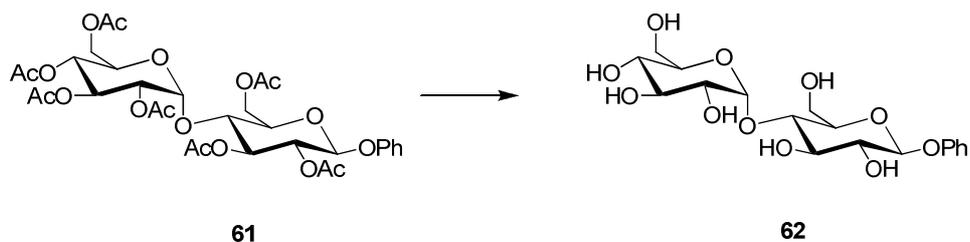
Compound **60** (220.0 mg, 0.62 mmol, 1 equiv.) was dissolved in methanol (1 mL) and sodium methoxide (5 mg, 0.07 mmol, cata) was added. The reaction mixture was stirred at RT until all the reactant was hydrolysed, then quenched with DOWEX until a acidic pH (4-5) was obtained, then filtered on celite and evaporated to give the compound **56** as a white solid (131.2 mg, yield: 93 %). ^1H NMR (MeOD, 400MHz) δ (ppm) 7.30-6.98 (m, 5H), 5.45 (d, $J = 3.7\text{Hz}$, 1H), 3.81-3.77 (m, 1H), 3.62-3.53 (m, 4H); ^{13}C NMR (MeOD, 100MHz) δ (ppm) 158.5, 130.4, 123.4, 118.0, 99.1, 75.2, 73.4, 71.4, 63.7; MM-ES: 249.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



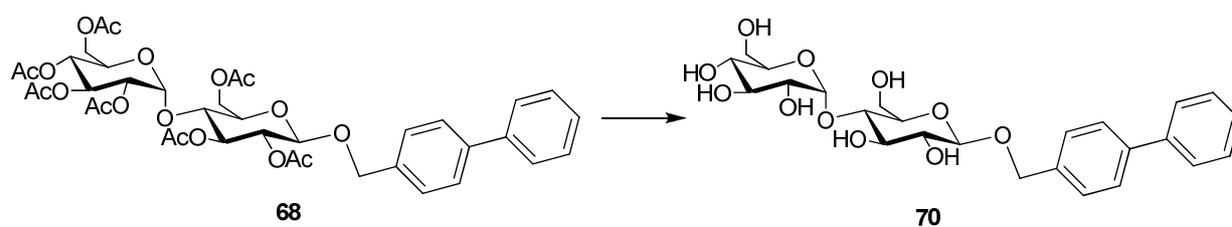
From 795.0 mg of compound **59**, 397.0 mg of compound **56** as a white solid (yield: 99 %) was recovered. ^1H NMR (MeOD, 300MHz) δ (ppm) 7.23-6.73 (m, 5H), 5.45 (m, 1H), 3.95-3.69 (m, 5H); ^{13}C NMR (MeOD, 75MHz) δ 156.6, 129.7, 122.6, 116.6, 99.1, 71.1, 69.6, 65.9, 64.5; MM-ES: 249.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



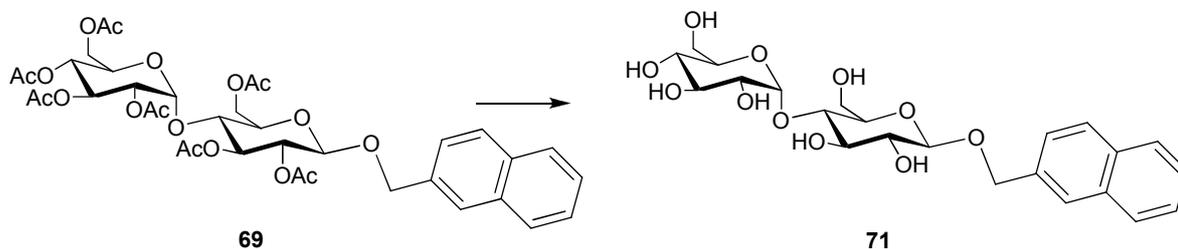
From 50.0 mg of compound **64**, 28.7 mg of compound **65** as a white solid (yield: 98 %) was recovered. ^1H NMR (MeOD, 200MHz) δ (ppm) 7.23 (m, 2H), 7.12-6.93 (m, 3H), 4.90 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 0.25H), 4.41 (d, $J = 8\text{Hz}$, 1H), 3.70-3.49 (m, 12H), 3.28-3.21 (m, 2H); ^{13}C J-mod NMR (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm) 130.4, 123.7, 118.0, 104.8, 102.2, 80.5, 78.4, 78.1, 76.8, 76.6, 75.2, 74.9, 71.6, 62.7, 61.9; API-ES Pos: 441.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



From 50.0 mg of compound **61**, 29.1 mg of compound **62** as a white solid (yield: 99 %) was recovered. ^1H NMR (MeOD, 200MHz) δ (ppm) 7.26-7.20 (m, 2H), 7.12-6.93 (m, 3H), 5.43 (d, $J = 4.0\text{Hz}$, 0.2H, iso α), 5.16 (d, $J = 4.0\text{Hz}$, 1H), 4.89 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 0.8H, iso β), 3.84-3.41 (m, 12H), 3.27-3.23 (m, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm) 130.4, 123.4, 117.7, 102.9, 102.1, 80.9, 77.7, 76.6, 75.1, 74.8, 74.5, 74.1, 71.5, 62.7, 61.9; API-ES Pos: 441.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

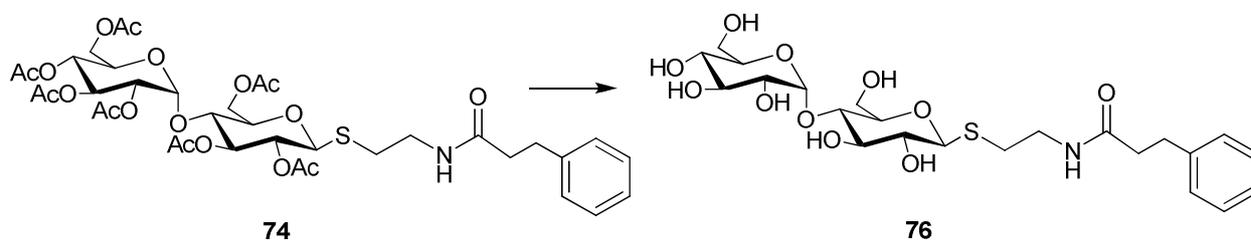


From 66.6 mg of compound **68**, 39.9 mg of compound **70** as a white solid (yield: 95 %) was recovered. ^1H NMR (MeOD, 300MHz) δ (ppm) 7.59-7.31 (m, 2H), 5.17 (d, $J = 4.0\text{Hz}$, 1H), 4.71 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 1H), 3.91-3.31 (m, 16H); ^{13}C NMR (MeOD, 75MHz) δ (ppm) 142.1, 141.9, 138.1, 129.8, 129.7, 128.3, 127.9, 127.8, 103.2, 102.8, 81.3, 77.8, 76.7, 75.0, 74.7, 74.1, 71.5, 62.7, 62.2, 38.4; IR: ν (cm^{-1}) 3350, 2925, 1662, 1451, 1325, 1058.

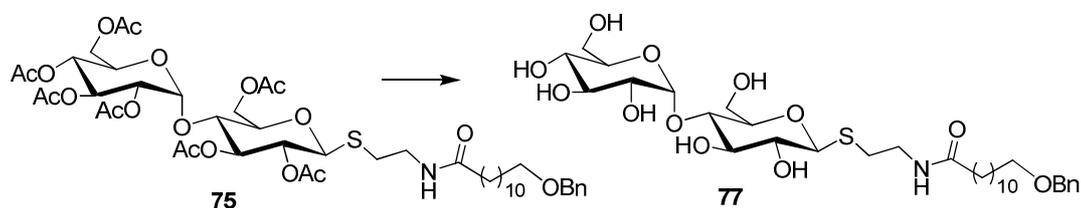


From 33.8 mg of compound **69**, 20.4 mg of compound **71** as a white solid (yield: 96 %) was recovered. ^1H NMR (MeOD, 300MHz) δ (ppm) 8.22-8.19 (m, 1H), 7.87-7.81 (m, 2H), 7.61-7.41 (m, 4H), 5.16 (d, $J = 4.0\text{Hz}$, 1H), 4.45 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 1H), 3.97-3.23 (m, 18H); ^{13}C NMR (MeOD, 75MHz) δ (ppm) 135.2, 135.0, 133.2, 129.7, 129.4, 128.0, 127.2, 126.8, 126.2,

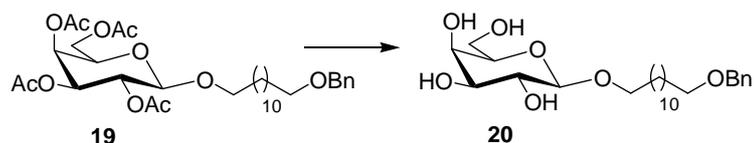
125.4, 103.4, 102.9, 81.3, 77.8, 76.8, 75.1, 74.8, 74.7, 74.2, 71.5, 70.1, 62.7, 62.3, 54.8 ; IR: ν (cm⁻¹) 3381, 2925, 1662, 1337, 1102, 1074, 1032.



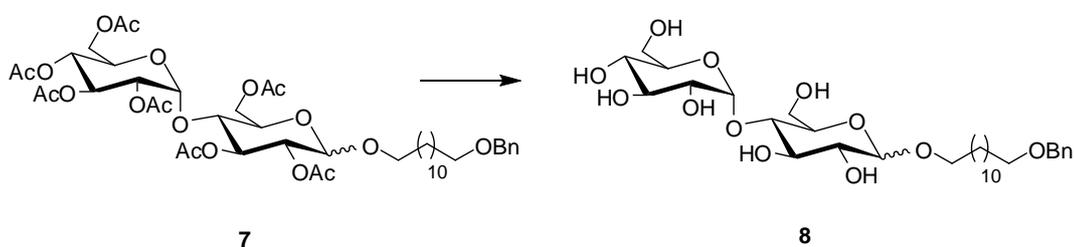
From 104.5 mg of compound **74**, 62.3 mg of compound **76** as a white solid (yield: 93 %) was recovered. ¹H NMR (MeOD, 300MHz) δ (ppm) 7.25-7.16 (m, 5H), 5.15 (d, J = 4.1Hz, 1H), 4.33 (d, J = 8.1Hz, 1H), 3.87-3.20 (m, 16H), 2.93-2.42 (m, 6H); ¹³C NMR J Mod (MeOD, 75MHz) δ (ppm) 175.3, 142.1, 129.5, 129.4, 127.2, 102.9, 87.2, 81.0, 80.6, 79.3, 75.1, 74.8, 74.2, 73.9, 71.5, 62.7, 62.4, 41.1, 39.9, 32.9, 30.7; IR: ν (cm⁻¹) 3336, 2943, 2832, 1605, 1449, 1030; MM-ES+APCI: 556.2 [M+Na]⁺.



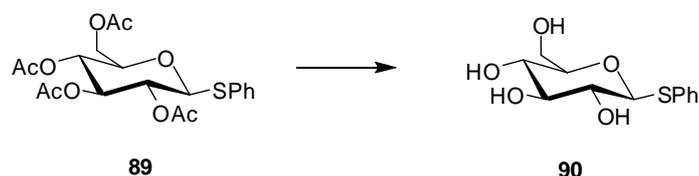
From 11.4 mg of compound **75**, 8.0 mg of compound **77** as a white solid (yield: 96 %) was recovered. ¹H NMR (MeOD, 400MHz) δ (ppm) 7.31 (m, 5H), 5.15 (d, J = 4.0Hz, 1H), 4.38 (d, J = 7.8Hz, 1H), 3.65-3.31 (m, 16H), 2.86-2.70 (m, 2H), 2.19-2.13 (m, 2H), 1.57 (m, 4H), 1.27 (m, 16H); ¹³C NMR Jmod (MeOD, 100MHz) δ (ppm) 175.3, 139.9, 129.4-128.9, 103.0, 87.2, 81.2, 80.7, 79.4, 75.2, 74.8, 74.3, 74.0, 73.9, 71.6, 71.5, 62.7, 62.4, 41.0, 37.2, 30.7, 27.2; MM-ES: 690.3 [M+H]⁺, 712.3 [M+Na]⁺.



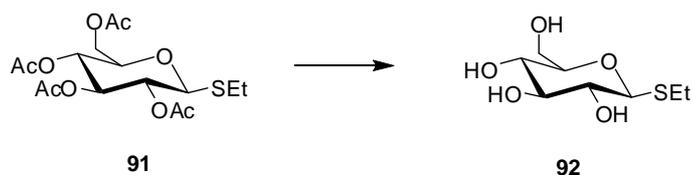
From.....of compound **19**, 446.7 mg of compound **20** as a white solid (yield: 77 %) was recovered. ^1H NMR (MeOD, 300MHz) δ (ppm): 7.27 (m, 5H), 4.43 (m, 2H), 4.13 (d, $J = 7.9\text{Hz}$, 1H), 3.85-3.68 (m, 5H), 3.30-3.26 (m, 2H), 1.55 (m, 4H), 1.24 (m, 16H); ^{13}C NMR (MeOD, 75MHz) δ (ppm): 129.3, 128.8, 128.6, 105.0, 76.5, 75.0, 73.8, 72.6, 71.4, 70.8, 62.4, 30.8-30.5, 27.2 ; IR: ν (cm^{-1}) 3384, 2927, 1597, 1454; HRMS: m/z : calc for $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{Li}$: 4601.31 $[\text{M}+\text{Li}]^+$; found 461.3086.635.38



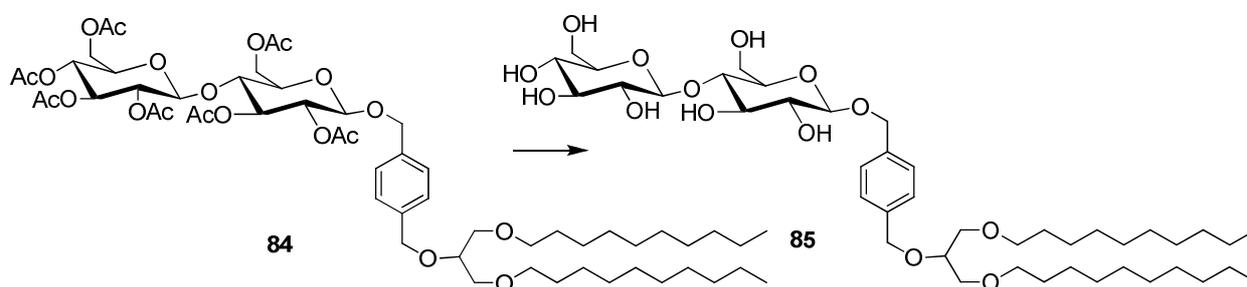
From 300.0 mg of compound **7**, 204.9 mg of compound **8** as a white solid (yield: 95 %) was recovered. ^1H NMR (MeOD, 300MHz) δ (ppm) 7.32-7.29 (m, 5H), 5.15 (d, $J = 4.3\text{Hz}$, 1H), 4.52 (s, 2H), 4.26 (d, $J = 8.5\text{Hz}$, 1H), 3.90-3.34 (m, 17H), 3.28-3.22 (m, 2H), 1.65-1.57 (m, 4H), 1.29 (m, 18H); ^{13}C NMR J Mod (MeOD, 50MHz) δ (ppm) 129.5, 128.8, 128.6, 104.2, 102.9, 81.2, 77.9, 76.5, 75.0, 74.7, 74.6, 74.1, 73.8, 71.5, 71.4, 70.9, 62.7, 62.1, 30.8-30.6; MM-ES : 639.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



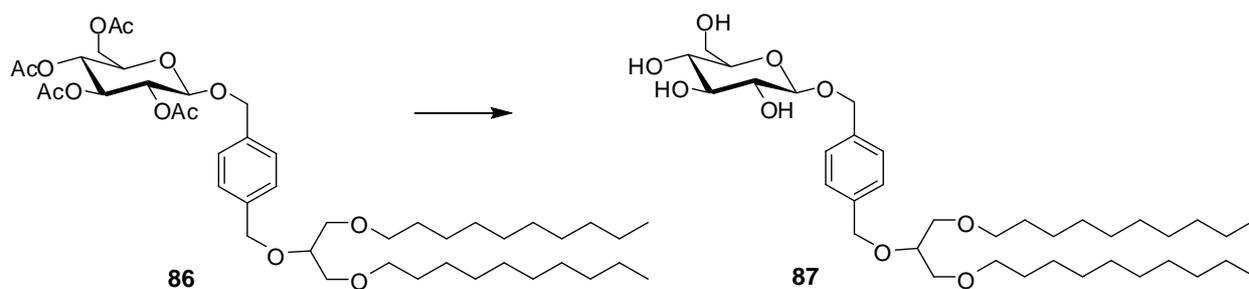
From 100.0 mg of compound **89**, 70.0 mg of compound **90** as white solid (yield: 100 %) was recovered. ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) 7.56 (m, 2H), 7.29 (m, 3H), 4.63 (d, $J = 9.7\text{Hz}$, 2H), 3.84 (m, 1H), 3.66 (m, 1H), 3.40-3.16 (m, 4H), ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50MHz) δ (ppm) 135.3, 132.7, 129.8, 128.3, 89.4, 82.0, 79.7, 73.7, 71.3, 62.8. MM-ES Pos: 273.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 311.0 $[\text{M}+\text{K}]^+$.



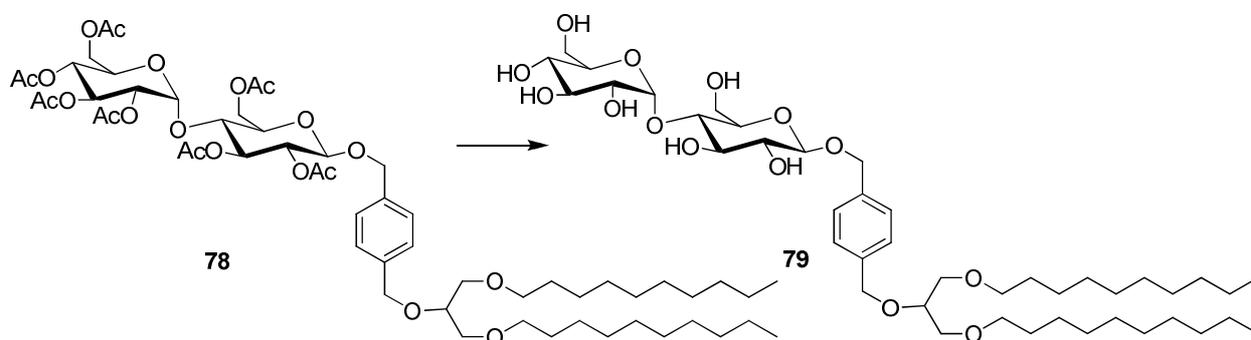
From 100.0 mg of compound **91**, 65.6 mg of compound **92** as a white solid (yield: 100 %) was recovered. ^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ (ppm) 4.34 (m, 1H), 3.82 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 3.27-3.18 (m, 4H), 2.72 (m, 2H), 1.27 (t, 3H), ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ (ppm) 86.9, 81.0, 79.5, 74.2, 71.4, 70.9, 62.3, 24.7, 15.0; MM-ES Pos: 247.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



From 130.5 mg of compound **84**, 56.2 mg of compound **85** as a white solid (yield: 60 %) was recovered (SiO_2 , $\text{DCM}/\text{MeOH} = 9/1$, $R_f = 0.55$). ^1H NMR (MeOD, 200 MHz) δ (ppm) 7.41 (m, 4H), 4.70 (m, 3H), 4.44 (m, 2H), 3.92 (m, 3H), 3.59 (m, 14H), 1.59 (m, 4H), 1.33 (ls, 32H), 0.96 (m, 6H); ^{13}C NMR (MeOD, 50 MHz) δ (ppm) 139.6, 136.4, 129.2, 128.9, 104.7, 103.2, 80.6, 78.6, 78.2, 77.9, 76.6, 76.5, 75.0, 73.0, 72.6, 72.0, 71.8, 71.4, 62.5, 61.9, 33.2, 30.9-30.6, 27.4, 23.9, 14.6; IR: ν (cm^{-1}) 3374, 3247, 2928, 1752, 1694, 1614, 1378, 1260, 1110, 1046, 833, 751.

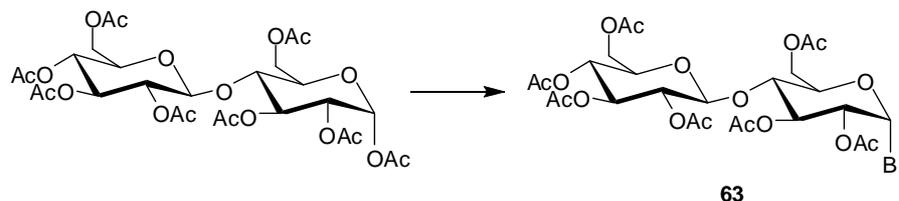


Compound **86** (133.0 mg, 0.16 mmol, 1 equiv.) was dissolved in methanol (5 mL) and K_2CO_3 (22.4 mg, 0.16 mmol, 1 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 min then filtered off (SiO_2 , DCM/MeOH = 9/1, R_f = 0.60) to give the compound **87** as a white solid (81.7mg, yield: 77 %). 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm) 7.27 (m, 5H), 4.79 (d, $J=11.6$ Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.52 (d, $J=11.6$ Hz, 1H), 4.29 (d, $J=7.0$ Hz, 1H), 3.72-3.62 (m, 2H), 3.52-3.43 (m, 5H), 3.38 (m, 6H), 3.14 (m, 1H), 1.51 (m, 4H), 1.22 (m, 32H), 0.83 (m, 6H), ^{13}C Jmod ($CDCl_3$, 75MHz,) δ (ppm) 138.7, 136.4, 128.3, 127.9, 102.0, 77.4, 76.4, 75.6, 73.5, 72.0, 71.8, 71.0, 69.6, 61.6, 32.0, 29.8-29.5, 26.3, 22.8, 14.2.

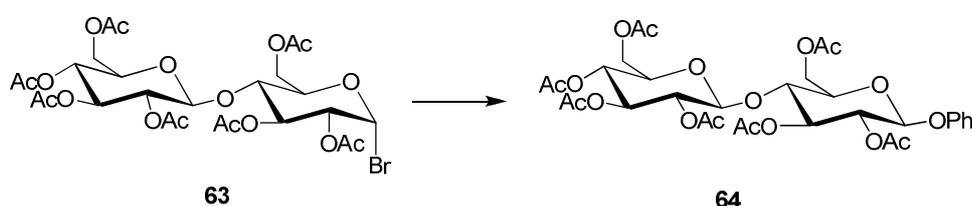


From 120.0 mg of compound **78**, 85.2 mg of compound **79** as a white solid (yield: 97 %) was recovered (SiO_2 , DCM/MeOH = 9/1, R_f = 0.53). 1H NMR ($CDCl_3/MeOD$, 300 MHz) δ (ppm) 7.26 (m, 4H), 5.03 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 4.81 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.53 (m, 1H), 3.75 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 3.70 (m, 3H), 3.54 (m, 6H), 3.44 (m, 4H), 3.34 (m, 4H), 3.24 (m, 3H), 1.45 (m, 4H), 1.16 (ls, 32H), 0.77 (m, 6H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ (ppm) 138.3, 136.3, 128.0, 127.7, 101.9, 101.6, 80.0, 76.1, 75.0, 73.6, 73.1, 72.5, 71.8, 71.6, 70.9, 70.7, 70.1, 61.7, 60.7, 31.8, 29.5-29.2, 26.0, 22.5, 13.9; IR: ν (cm^{-1}) 3374, 3247, 2928, 1752, 1694, 1614, 1378, 1260, 1110, 1046, 833, 751; MM-ES: 839 $[M+Na]^+$.

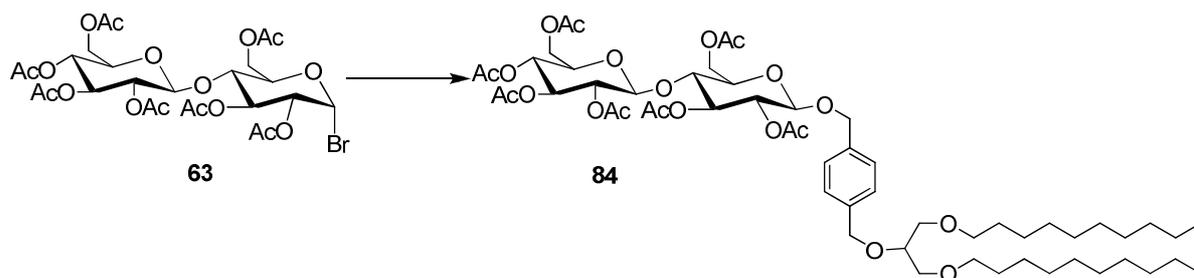
XI. General procedure for glycosidation with AgOTf:



Synthesized as described in reference C. Shannon, D.L. Jakman *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1227.

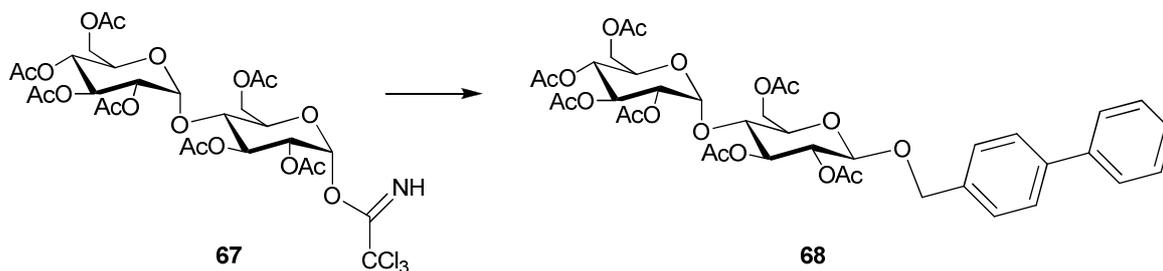


Compound **63** (503.3 mg, 0.72 mmol, 1 equiv.) and phenol (81.3 mg, 0.86 mmol, 1.2 equiv.) are dissolved in dry dichloromethane (20 mL). Molecular sieves were added and the reaction mixture was stirred during 30min, then cooled down to - 40 °C and silver triflate (277.3 mg, 1.08 mmol, 1.5 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at - 40 °C during 5 min then allowed to warm up to room temperature slowly. A yellow precipitate appeared. The reaction mixture was stirred at room temperature during 1 h in absence of light then filtered off, and water (10 mL) was added. The two layers were separated and the aqueous phase extracted with dichloromethane (1*10 mL), dried over Na₂SO₄ then evaporated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, cyclo/EtOAc = 5/5, R_f = 0.45) to give the compound **64** as a white solid (352.2 mg, yield: 63 %). ¹H NMR (CDCl₃, 200MHz) δ (ppm) 7.34-7.27 (m, 2H), 7.12-6.97 (m, 3H), 5.29-4.92 (m, 6H), 4.58-4.52 (m, 2H), 4.45-4.36 (m, 1H), 4.21-4.05 (m, 2H), 3.95-3.68 (m, 3H), 2.11-2.01 (m, 21H); ¹³C NMR (CDCl₃, 50MHz) δ (ppm) 170.5-169.3, 129.6, 123.5, 117.0, 101.0, 99.1, 76.6, 73.1, 73.0, 72.7, 72.2, 71.8, 71.6 (2C), 70.0, 62.2, 61.8, 20.8; IR : ν (cm⁻¹) 2360, 1752, 1580, 1371; API-ES Pos: 735.2 [M+Na]⁺.

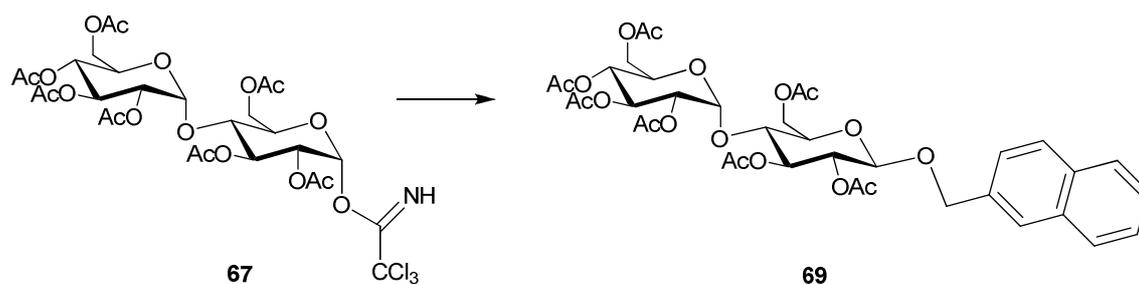


From 525.0 mg of compound **63**, 224.9 mg of compound **84** as a colourless oil (yield: 27 %) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.63). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) 7.34 (m, 2H), 7.22 (m, 2H), 5.42 (m, 1H), 4.90 (m, 5H), 4.70 (s, 2H), 4.59 (m, 3H), 4.36 (m, 1H), 4.07 (m, 2H), 3.65 (m, 8H), 3.42 (m, 4H), 2.15-1.98 (7s, 21H), 1.55 (m, 4H), 1.26 (bs, 32H), 0.88 (m, 6H); ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) 170.8, 169.1, 139.0, 135.8, 127.9, 100.9, 99.1, 77.4, 73.1, 72.8, 72.6, 72.1, 72.0, 71.8, 71.7, 71.2, 70.6, 62.0, 61.7, 32.0, 29.8-29.5, 26.3, 22.8, 21.0-20.7, 14.3; IR ν (cm⁻¹) 3374, 3247, 2928, 1752, 1694, 1614, 1378, 1260, 1110, 1046, 833, 751; MM-ES: 1133.1 [M-H+Na]⁺.

XII. General procedure for glycosylation with TMSOTf

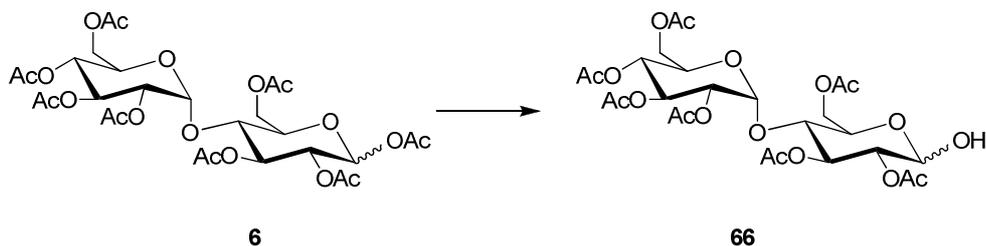


Compound **67** (100 mg, 0.13 mmol, 1 equiv.) and 4-benzylphenylalcohol (35.4 mg, 0.19 mmol, 1.5 equiv.) were dissolved in dry dichloromethane (3 mL). Molecular sieves were added and the reaction mixture was stirred at RT for 30 min, then cooled down to -50 °C and TMSOTf (12 μ L, 0.06 mmol, 0.5 equiv.) was slowly added. After 30 min at -50 °C, the mixture was allowed to warm up to room temperature then quenched with water (5 mL), extracted with dichloromethane (2*5 mL), dried over Na₂SO₄ and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, cyclo/EtOAc = 5/5, R_f = 0.46) to give the compound **68** as a white solid (20.6 mg, yield: 20 %). ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 7.60-7.56 (m, 2H), 7.46-7.34 (m, 4H), 5.42 (d, *J* = 3.9Hz, 1H), 5.36 (t, *J* = 9.8Hz, 1H), 5.24 (t, *J* = 9.7Hz, 1H), 5.06 (t, *J* = 9.8Hz, 1H), 4.85 (m, 2H), 4.68-4.59 (m, 2H), 4.45 (m, 1H), 4.26 (dd, 2H, *J* = 12.2Hz, *J* = 4.1Hz), 4.13-3.95 (m, 3H), 3.67 (m, 1H), 2.17-1.99 (7s, 21H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) 170.7-169.5, 141.2, 140.3, 135.7, 128.4, 127.6, 127.4, 98.9, 95.6, 75.6, 72.9, 72.3, 70.6, 70.1, 69.5, 68.6, 68.2, 63.0, 61.7, 21.1-20.7; IR: ν (cm⁻¹) 2925, 1754, 1528, 1371, 1234, 1043; API-ES Pos: 824.9 [M+Na]⁺, 840.8 [M+K]⁺.

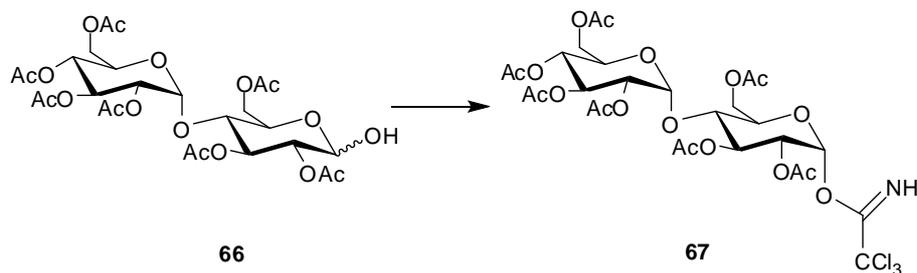


From 90.0 mg of compound **67**, 12.3 mg of compound **69** as a white solid (yield: 14 %) was recovered (SiO₂, cyclo/EtOAc = 5/5, R_f = 0.50). ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 8.07-8.04 (m, 1H), 7.90-7.85 (m, 2H), 7.53-7.44 (m, 4H), 5.41-5.31 (m, 3H), 5.14 (t, *J* = 9.1Hz, 1H), 5.05 (t, *J* = 9.7Hz, 1H), 5.02 (t, *J* = 9.7Hz, 1H), 4.90-4.82 (m, 2H), 4.60-4.53 (m, 2H), 4.32-4.24 (m, 2H), 4.09-3.95 (m, 3H), 3.68-3.63 (m, 1H), 2.21-1.93 (m, 21H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) 170.7-169.6, 134.0, 132.0, 131.8, 129.6, 128.8, 127.7, 126.5, 126.1, 125.2, 124.3, 98.0, 95.6, 75.6, 72.8, 72.3, 72.1, 70.1, 69.5, 69.3, 68.6, 68.2, 63.0, 61.6, 21.0-20.6; IR: ν (cm⁻¹) 2928, 1754, 1369, 1234, 1045; MM-ES: 824.9 [M+Na]⁺, 840.8 [M+K]⁺.

XIII. General procedure for anomeric hydrolysis

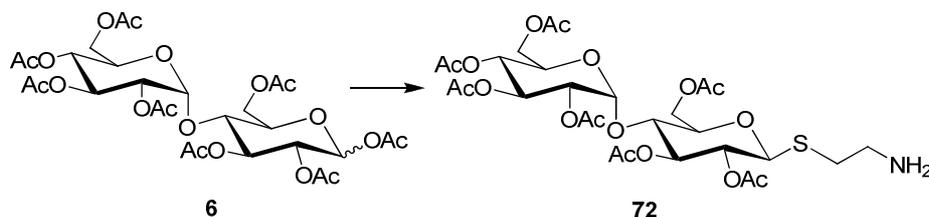


Peracetylated maltose (9.5 g, 14.0 mmol 1 equiv.) was dissolved in anhydrous tetrahydrofuran (100 mL), then benzylamine (1.84 mL, 17.0 mmol, 1.2 equiv.) was added. The reaction mixture is then stirred overnight at room temperature. The crude was evaporated and purified by column chromatography (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 5/5, $R_f = 0.50$) to give the compound as a colourless oil (4.0 g, yield: 39 %, mixture α and β). ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) 5.55 (t, $J = 8.7\text{Hz}$, 0.8H), 5.39-5.20 (m, 2.8H), 5.04-4.97 (m, 1H), 4.83-4.68 (m, 2.3H), 4.44 (m, 1H), 4.22-4.12 (m, 2.7H), 4.05-3.91 (m, 2.8H), 3.72-3.65 (m, 1H), 2.09-1.92 (7s, 21H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm) 170.8-169.6, 127.7, 127.6, 95.5, 94.8, 89.7, 75.1, 73.7, 72.7, 72.4, 71.7, 70.5, 69.4, 68.4, 68.0, 67.6, 62.9, 61.4, 20.7-20.6; IR: ν (cm^{-1}) 3392, 2962, 1751, 1370, 1237, 1040; API-ES Pos: 659.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

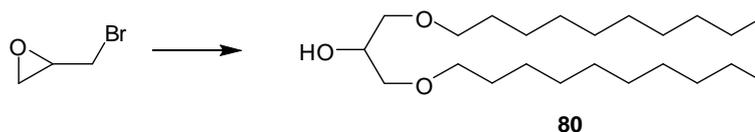
XIV. General procedure for the Schmidt reagent synthesis:

Compound **66** (3.2 g, 4.9 mmol, 1 equiv.) was dissolved in anhydrous dichloromethane (50 mL), then trichloroacetonitrile (1.5 mL, 14.8 mmol, 3 equiv.) and DBU (74 μ L, 0.49 mmol, 0.1 equiv.) were added. The reaction mixture was then stirred for 1 h, at room temperature then evaporated. The crude was directly purified by column chromatography (SiO₂, cyclo/EtOAc = 7/3, R_f = 0.49) to give the compound **67** as a yellow solid (3.0 g, yield: 78 %). ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 8.66 (s, 1H), 6.41 (d, J = 4.0Hz, 1H), 5.54 (t, J = 9.5Hz, 1H), 5.37 (d, J = 3.8Hz, 1H), 5.31 (d, J = 10.3Hz, 1H), 5.04-4.93 (m, 2H), 4.41 (dd, J = 4.0Hz, J = 10.3Hz, 1H), 4.45-4.42 (m, 1H), 4.20-4.11 (m 4H), 3.98-3.89 (m, 2H), 2.06-1.92 (7s, 23H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) 170.8-169.4, 95.8, 92.8, 72.3, 71.9, 70.6, 70.1, 70.0, 69.3, 68.6, 68.0, 62.3, 61.4, 20.9-20.6 ; IR: ν (cm⁻¹) 3446, 2925, 1749, 1370, 1238, 1042; API-ES Pos: 804.1 [M+Na]⁺.

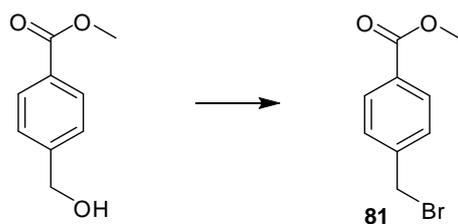
XV. Other procedures



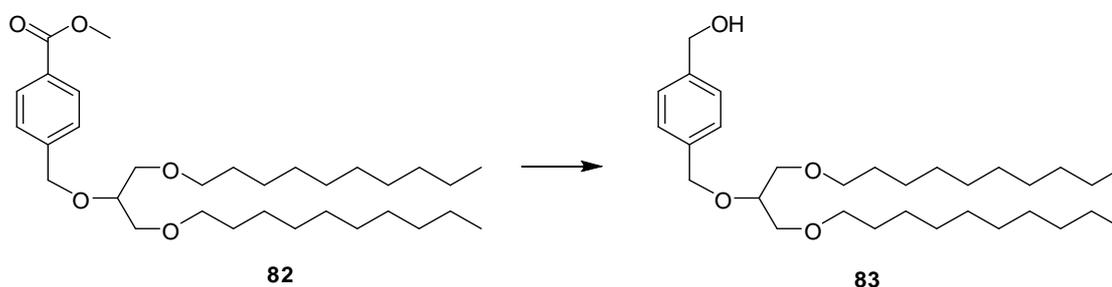
Peracetylated maltose (200 mg, 0.29 mmol, 1 equiv.) and tert-Butyl-N-(2-mercaptoethyl) carbamate (60 μ L, 0.35 mmol, 1.2 equiv.) were dissolved in anhydrous dichloromethane (5 mL). The reaction mixture was cooled down to 0°C and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (112 μ L, 0.88 mmol, 3 equiv.) was slowly added. The reaction mixture was then stirred at 45 °C overnight. The pink-purple mixture obtained was purified by column chromatography (SiO_2 , DCM/MeOH = 9/1, R_f = 0.26) to give the compound **72** as a white solid (162.4 mg, yield: 80 %). ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) 5.38-5.19 (m, 5H), 5.07 (t, J = 8.8Hz, 1H), 4.87-4.78 (m, 3H), 4.64 (d, J = 8.8Hz, 1H), 4.29-3.97 (m, 5H), 3.82-3.79 (m, 1H), 3.42-3.35 (m, 1H), 3.30-3.23 (m, 1H), 3.15-3.11 (m, 1H), 2.97-2.91 (m, 1H), 2.15-1.98 (m, 22H); ^{13}C NMR JMod (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm) 171.9-169.9, 95.7, 83.8, 77.1, 75.7, 72.1, 70.3, 69.5, 68.5, 68.1, 62.1, 61.5, 41.2, 28.7, 21.0-20.7; MM-ES: 696.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



Synthesized as reported in T. Li, J. Hamdi, F/F. Hawthorne *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 15.



To a solution of methyl-4-(hydroxymethyl)-benzoate (1 g, 6.02 mmol, 1 equiv.) in dichloromethane (30 mL) was slowly added phosphorus tribromide (850 μ L, 9.03 mmol, 1.5 equiv.) and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was then quenched with water (30 mL), extracted with dichloromethane (2*20 mL), dried over Na_2SO_4 then evaporated to give the compound **81** as a white solid (1.35 g, yield: 98 %). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 8.04-8.01 (m, 2H), 7.46-7.52 (m, 2H), 4.51 (bs, 2H), 3.93 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 166.4, 142.4, 130.3, 129.1, 51.9, 31.7; FAST-GC: 149 [M-Br], 151 [M-Br+2H] $^{2+}$.

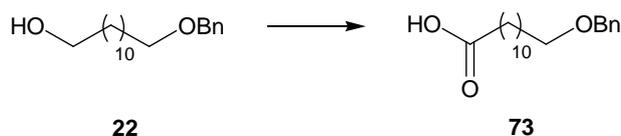


Compounds **82** (2.3 g, 6.11 mmol, 1 equiv.) and **83** (1.35 g, 5.89 mmol, 0.96 equiv.) were dissolved in dichloromethane (50 mL). Molecular sieves were added and the reaction mixture was stirred during 30 min, then cooled down to -40 $^\circ\text{C}$ and silver triflate (1.9 g, 7.33 mmol, 1.2 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at -40 $^\circ\text{C}$ during 5 min then allowed to warm up to room temperature slowly. A precipitate appeared. The reaction mixture was stirred at room temperature during 3 h in absence of light then filtered off, washed with water (30 mL), extracted with dichloromethane (1*40 mL), dried over Na_2SO_4 then evaporated. The crude product of this reaction was slowly added to a suspension of lithium hydride (928 mg, 24.45 mmol, 4 equiv.) in ether (40 mL) at 0 $^\circ\text{C}$. The reaction mixture was stirred at 0 $^\circ\text{C}$ during 1 h then quenched slowly with water (30 mL), extracted with ether (3*30 mL), dried over Na_2SO_4

and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, cyclo/EtOAc = 8/2, R_f = 0.45) to give a yellow oil (2.05 g, yield: 78 %).

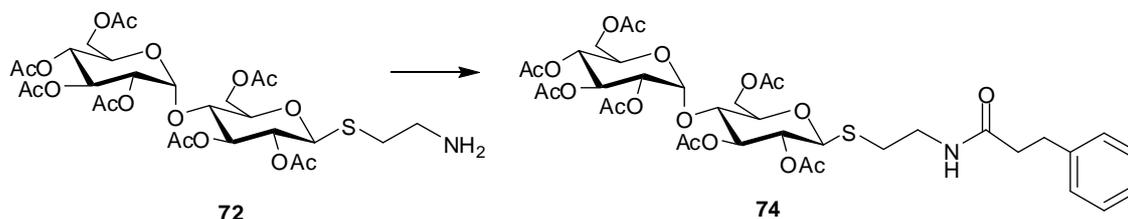
Compound 82: ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 8.00 (m, 2H), 7.45 (m, 2H), 4.78 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.74 (m, 1H), 3.55 (m, 4H), 3.45 (m, 4H), 1.56 (m, 4H), 1.26 (ls, 32H), 0.88 (m, 6H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 167.2, 144.2, 129.6, 127.4, 71.8, 71.2, 51.9, 32.0, 29.8-29.4, 26.3, 22.7, 14.3; FAST-GC: 522 [M+2H]⁺.

Compound 83: ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.33 (m, 4H), 4.70 (s, 2H), 4.66 (s, 2H), 3.71 (m, 1H), 3.53 (m, 4H), 3.44 (m, 4H), 1.88 (ls, 1H), 1.58 (m, 4H), 1.29 (ls, 32H), 0.90 (m, 6H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 140.3, 138.3, 128.0, 127.0, 72.0, 71.1, 65.1, 31.9, 29.7-29.4, 26.2, 22.7, 14.1; IR: ν (cm⁻¹) 3452, 2927, 2857, 1724, 1463, 1270, 1114, 744; MM-ES: 515.32 [M+Na]⁺.

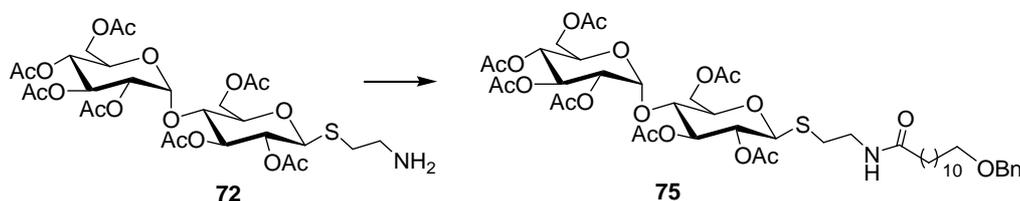


A stock solution of H₅IO₆/CrO₃ was prepared by dissolving H₅IO₆ (195.0 mg, 0.86 mmol, 2.5 equiv.) and CrO₃ (2.0 mg, 0.06 equiv.) in wet acetonitrile (2 mL). This solution was added to compound **22** (100.0 mg, 0.34 mmol, 1 equiv.), dissolved in acetonitrile (2 mL) at 0 °C over 30 min. The mixture was stirred at 0 °C for 1 h, then water (5 mL) and EtOAc (5 mL) were added. The aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2*5 mL), then hydrochloric acid was added. The organic phase was washed with water (1*10 mL), dried over Na₂SO₄ and evaporated to give the compound **73** as a red oil (122.5 mg, yield: 93 %). ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) 7.35-7.27 (m, 5H), 4.51 (s, 2H), 3.47 (t, *J* = 7.1Hz, 1H), 2.36 (t, *J* = 7.1Hz, 1H), 1.65-1.60 (m, 4H), 1.28 (m, 22H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) 179.9, 138.8, 128.4, 127.8 127.6, 72.9, 70.6, 34.2, 29.9-29.2, 26.3, 24.8; IR: ν (cm⁻¹) 2920, 2851, 1701, 1459, 1297, 1106; MM-ES: 329.2 [M+Na]⁺.

XVI. General procedure for amide bond formation:



1-phenylpropionic acid (74.7 mg, 0.21 mmol, 1.98 equiv.) was dissolved in dry dichloromethane (5 mL) and EDC (45.6 mg, 0.24 mmol, 1.3 equiv.) and N-hydroxysuccinimid (27.4 mg, 0.24 mmol, 1.3 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h, then the amine **72** (146.0 mg, 0.21 mmol, 1 equiv.) and triethylamine (51 μ L, 0.44 mmol, 2 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight then quenched with water (5 mL), extracted with dichloromethane (1*5 mL), dried over Na_2SO_4 and evaporated. The crude product was purified by column chromatographic (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 0/1, R_f = 0.76) to give the compound **74** as a colourless oil (104.5 mg, yield: 60 %). ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) 7.32-7.24 (m, 5H), 5.41-5.32 (m, 2H), 5.07 (t, J = 9.4Hz, 1H), 4.88-4.77 (m, 2H), 4.60-4.55 (m, 1H), 4.43 (d, J = 10.5Hz, 1H), 4.28-4.22 (m, 1H), 4.16-4.08 (m, 2H), 3.97-3.90 (m, 2H), 3.62-3.57 (m, 1H), 3.47-3.39 (m, 2H), 2.99-2.93 (m, 2H), 2.86-2.77 (m, 1H), 2.71-2.62 (m, 1H), 2.52-2.46 (m, 2H), 2.09-2.00 (m, 23H); ^{13}C NMR Jmod (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm) 172.4, 170.6-169.5, 128.6, 128.5, 126.4, 95.7, 83.7, 76.4, 76.2, 72.4, 70.6, 70.1, 69.4, 68.7, 68.1, 62.6, 61.6, 39.4, 38.4, 31.7, 31.1, 20.9-20.7; MM-ES: 828.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 850.3 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

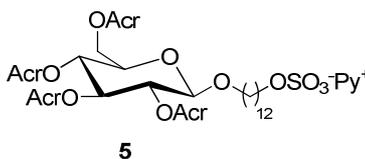


From 77.0 mg of compound **72**, 57.3 mg of compound **75** as a colourless oil (yield: 60 %) was recovered (SiO_2 , cyclo/EtOAc = 3/7, R_f = 0.40). ^{13}C NMR Jmod (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm) 173.4, 170.5-169.4, 138.7, 128.5, 127.7, 127.6, 95.7, 83.7, 76.6, 76.2, 73.0, 72.4, 70.1, 69.4, 68.7, 68.1, 62.6, 61.6, 39.1, 36.8, 31.0, 29.8, 29.8-29.5, 26.3, 25.8, 21.0, 20.8, 20.7; IR: ν (cm^{-1}) 2924, 2852, 1755, 1660, 1537, 1463, 1455, 1370, 1233, 1041, 912, 736; MM-ES: 1006.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1022.4 $[\text{M}+\text{K}]^+$

XVII. General optimized procedure for mini-emulsion polymerization with monosaccharides templates:

Mini-emulsification was obtained with a Bioblok Scientific Vibra-cell instrument, Model 72412, 40% power.

Commercially available styrene and divinyl benzene were distilled before use.



The template **5** (52 mg, 0.072 mmol), styrene (1.4 ml, 12.4 mmol), divinylbenzene (0.35 ml, 2.5 mmol), hexadecane (0.1 ml, 0.34 mmol) were injected in a bicol under inert atmosphere and were sonicated for 1 min in a bath. Then the radical initiator 2,2'-azo(2-methylbutyronitrile) (AMBN, 16 mg, 0.083 mmol), sodium dodecyl sulfate (SDS, 63 mg, 0.26 mmol) and water (8 ml) were added and the mixture was stirred vigorously for 15 min at room temperature under an argon atmosphere. Miniemulsification was then obtained by sonication using a Bioblok Scientific Vibra-cell, Model 72412, 40 % power, for 2 min at room temperature. The polymerization was carried out by heating the reaction mixture at 80° C for 20 h. At the end of the reaction, the latex was separated in two parts and 20 mL of acetone was added. The solid was separated by centrifugation, at 4100 tr/min, the decantation was not easy and among 30 and 50 % of the theoretical mass formed stayed in suspension. The decanted solid was washed intensively with a mixture of water/acetone (1:1, v/v) and dried in vacuum overnight to afford polymer **MIPglu1**.

When problems occurred during the decantation, the ultracentrifugation can be used at 27 000 tr/min or a total evaporation of the crude polymerization mixture before washings.

For all polymers, the percentage of solid was fixed to 17 % as usual in mini-emulsion polymerization.

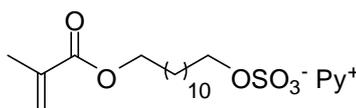
The percentage of AMBN was fixed to 0.15 %, of SDS to 0.64 %, of hexadecane to 0.7 % and of water to 79.5 % (w/w).

Polymers	Template 5 (mg)	Styrène (mL)	DVB (mL)	Mass % of DVB
MIPglu2	10.7	1.4	0.375	20
MIPglu4	9.8	0.745	1.0	58
MIPglu6	8.6	0.370	1.5	80
MIPglu8	18.2	1.3	0.330	20
MIPglu10	10.9	0.475	0.650	60
MIPglu11	16.4	0.360	1.5	80
MIPglu1	39.5	0.955	0.240	20
MIPglu12	31.4	0.450	0.600	58
MIPglu13	37.7	0.240	0.940	80
MIPglu14	38.5	0.460	0.115	20
MIPglu15	41.7	0.290	0.390	58
MIPglu16	32.0	0.100	0.400	80

Quantities of styrene and DVB used for the preparation of **MIPglu2** to **MIPglu16**

XVIII. General optimized procedure for mini-emulsion polymerization with surfactant monomers, for the preparation of control polymers

The control polymer **C2** was prepared by the same method used for **MIPglu1** (cf. page 330) by replacing the template **5** by four equivalents of the surfactant monomer **M1** in order to have the same theoretical quantity of carboxylic acids at the surface of the polymer **C2c**.



Surfactant Monomer M1

The control polymer **C1** is prepared using the same composition and protocol as for **C2** but without the template **M1**.

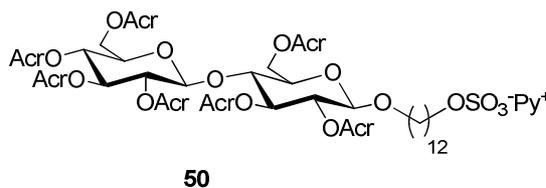
The same work up procedure was followed by addition of acetone, decantations and washings with a mixture of acetone/water.

The polymers were dried in vacuum to afford the control polymers **Ci**.

Polymers	Template 5 (mg)	Styrène (mL)	DVB (mL)
C2	101.0	1.1	0.260
C3	25.7	0.810	0.210
C4	93.3	0.490	0.125
C5	139.0	1.0	0.270

XIX. General optimized procedure for mini-emulsion polymerization with disaccharides templates:

The imprinted polymers **MIPmaltoi** and **MIPcelloi** were prepared by the same method used for **MIPglu1** by replacing the template **5** by the template **50**.



All percentages were kept constant except the percentage of hexadecane which was fixed to 3 %.

At the end of the polymerization, a latex was not recovered but a mass of solid. All the polymers were, this time, decanted very easily by centrifugation; at 4100 tr/min without loss of polymers (more than 80 % of the theoretical mass was recovered).

Template 50 (mg)	Styrène (mL)	DVB (mL)	Mass % of DVB
73.7	1.2	0.302	20
75.2	0.900	0.610	38
72.6	0.600	0.900	58
79.2	0.310	1.3	80

Quantities of styrene and DVB used for the preparation of **MIPcello1** to **MIPcello4**

XX. Polymer cleavages:

Between 300 to 600 mg of polymers were refluxed in a Teflon flask for a fixed time (3 days for monosaccharides and 4 days for disaccharides) in a methanol/NaOH mixture (1/1 (v/v), 30 to 60 mL). The concentration of aqueous NaOH was 5 M for monosaccharides and 10 M for disaccharides.

The polymers were then washed with hydrochloric acid (12 N) and decanted by centrifugation (4100 tr/min). No decantation problem was noticed.

The polymers were then washed with water (until a pH of 6-7 of the aqueous phase was obtained), stirred and decanted by centrifugation at 4100 tr/min.

The polymers were finally dried by lyophilisation to give the corresponding cleaved polymers.

XXI. Polymer characterizations:

TEM Microscopy:

The morphological characterization of the functionalized nanospheres was carried out with transmission electron microscopy (TEM) observation (Philips CM-120 microscope operating at 100 kV or Tecnai G2 Sphera at 200kv or CM12 microscopes at 120kv). The samples were deposited as a water suspension on a copper grid. After drying by removal of the aqueous phase, the examination was performed directly without prior any coloration.

Light scattering measurements:

For the measurements of the polydispersity or the particle size distribution, 1-2 mg of polymers was suspended in ethanol and analyzed by Malvern instrument.

BET measurements:

The specific surface area of the nanospheres was determined by gravimetric nitrogen gas adsorption measurements (BET method), using a Carlo Erba Sorpty 1750 instrument. For the BET measurements, the samples (30-70 mg) were first dried and degassed at 50 °C, until constant mass prior analysis.

XPS analysis:

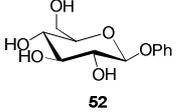
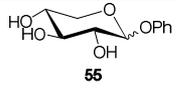
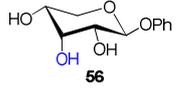
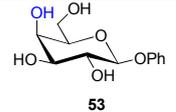
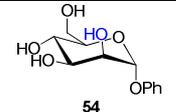
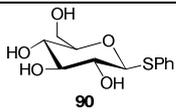
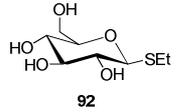
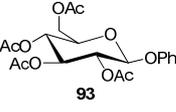
The XPS analysis was made with a spectrometer from Thermo VG, Multilab 2000 with a vacuum of 10^{-9} mmbar.

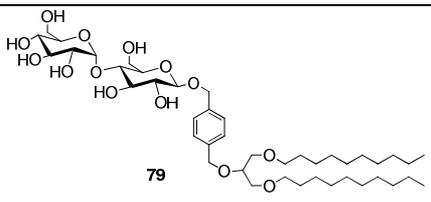
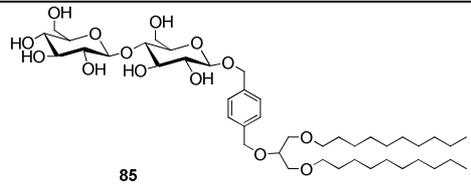
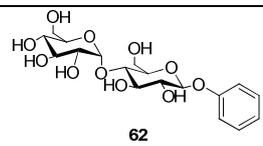
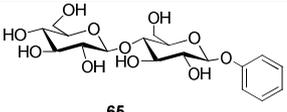
XXII. Binding experiments using the batch process and HPLC analysis:

The percentage of binding was measured and quantified by HPLC (Shimadzu LC 10 ADVP) using a Thermo Betasil Column (4,6 mm 5u BS diol 100).

For all the analytes, a calibration curve was drawn. Each values of the concentration is the average of three injections in HPLC (standard deviation) and the reproductibility of the result was checked by two or three differents incubations made in parallel.

The table below shows the different mobile phase, retention time and wavelength for all ath analytes for a Betasil Column (4,6 mm 5u BS diol 100).

Analytes	Mobile phase MeCN/H ₂ O	Total flow (mL/min)	Retention time (min)	Wavelength (nm)
 52	95/5	1	6.17	267
 55	97/3	1	5.0	268
 56	97/3	1	4.7	267
 53	95/5	1	6.20	268
 54	95/5	1	6.8	268
 90	95/5	1	5.3	246
 92	95/5	1	6.3	-
 93	95/5	1	3.3	225

Analytes	Mobile phase MeCN/H ₂ O	Total flow (mL/min)	Retention time (min)	Wavelength (nm)
 79	95/5	1	5.9	210
 85	95/5	1	6.8	210
 62	95/5	1	10.6 13.0	210
 65	95/5	1	11.2 13.6	210

Incubations in acetonitrile (batch process procedure)

For the measurements of the binding ability of the polymers, 5 mg of imprinted and control polymers were dispersed in acetonitrile with different concentrations of analytes **52**, **53**, **54**, **55**, **56**, **90**, **92**, **93**, **62** et **65** at 10 °C and for the desired incubation time. The particles were separated by centrifugation without any problem of decantation and the carbohydrate concentration before and after the particle suspension was measured and quantified by HPLC. The concentration of the missing template in the solution after the suspension and the remove of the polymer particles was assigned to the portion being absorbed by the different polymers.

Incubations in chloroform (batch process procedure)

For the measurements of the binding ability of the polymers, 5 mg of imprinted and control polymers were dispersed in acetonitrile with different concentrations of analytes **79** et **85** at 10 °C and for the desired incubation time. The particles were separated by centrifugation. The decantation was not easy and small particles stayed in suspension. The filtration did not afford a better separation and the use of a precolumn was necessary to avoid injection of small particles on chromatography column.

The carbohydrate concentration before and after the particle suspension was measured and quantified by HPLC. The concentration of the missing template in the solution after the suspension and the remove of the polymer particles was assigned as the portion being absorbed by the different polymers.

Bibliographie

-
- ¹. T. K. Lindhorst *Topics in Current Chemistry* **2002**, 218, 201
 - ². L. Pauling *Chem Eng News* **1949**, 27, 913
 - ³. M. Glad, O. Norrlöw, B. Sellergren, N. Siegbahn, K. Mosbach *J. Chromatogr.* **1985**, 347, 11.
 - ⁴. G. Wulff, A. Sarhan *Angew. Chem. Int.. Ed. Engl.* **1972**, 11, 341.
 - ⁵. A.G. Mayes, M.J. Whitcombe *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, 57, 1742.
 - ⁶. C. Alexander, H.S. Andersson, L.I. Andersson, R.J. Ansell, N. Kirsch, I.A. Nicholls, M.J. Whitcombe *J. Mol. Recognit.* **2006**, 19, 106.
 - ⁷. N. Pérez-Moral, A.G. Mayes *Analytica Chimica Acta* **2004**, 504, 15.
 - ⁸. K. Mosbach, O. Ramson *Biotechnology* **1996**, 14, 163.
 - ⁹. G. Wulff *Angew. Chem, Int, Ed, Eng* **1995**, 34, 1812.
 - ¹⁰. J. Pan, X. Xue, J. Wang, H. Xie, Z. Wu *Polymer*, **2009**, 50, 2365.
 - ¹¹. A.G. Mayes, K. Mosbach *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3769.
 - ¹². L. Ye, K. Mosbach *Anal. Commun.* **1999**, 36, 35.
 - ¹³. L. Ye, K. Mosbach *Reac. Func Polym.* **2001**, 48, 149.
 - ¹⁴. X. Kan, Q. Zhao, Z. Zhang, Z. Wang, J.J. Zhu *Talanta*, **2008**, 75, 22.
 - ¹⁵. K. Hosaya, K. Yoshimozako, N. Tanaka, K. Kimita, T. Araki, J. Haginika *Chem. Lett.*, **1994**, 1437.
 - ¹⁶. J. Haginika, Y. Sagai *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, 22, 899.
 - ¹⁷. N. Pérez, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, 77, 1851.
 - ¹⁸. N. Pérez, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson *Macromolecules* **2001**, 34, 830.
 - ¹⁹. D. Vaihinger, K. Landfester, I. Kraüter, H. Brunner, G.E.M. Tovar *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, 203, 1965.
 - ²⁰. C.J. Tan, S. Wangrangsimakul, R. Bai, Y.W. Tong *Chem. Mater.* **2008**, 20, 118.
 - ²¹. X. Kan, Z. Geng, Z. Wang, J.J. Zhu *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, 9, 2008.
 - ²². K. Landfester *Annual Review of Materials Research* **2006**, 36, 231.
 - ²³. K. Landfester *Macromol. Rapid Commun.* **2001**, 22, 896.

-
- ²⁴. K. Landfester, F.J. Schork, V.A. Kusuma *C. R. Chimie* **2003**, *6*, 1337.
- ²⁵. D. Du, S. Chen, J. Cai, Y. Tao, H. Tu, A. Zhang *Electrochimica Acta*, **2008**, *53*, 6589.
- ²⁶. R.H. Schmidt, A-S Belmont, K. Haupt *Anal. Chem. Acta* **2005**, *542*, 118.
- ²⁷. Q.Z. Feng, L.X. Zhao, B.L. Chu, W. Yan, J.M. Lin *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392*, 1419.
- ²⁸. B. Sellergren, A.J Hall. In B. Sellegren, Ed. Molecular imprinted polymers. Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry **2001**, *23*, 47.
- ²⁹. G. Wulff In: W.T. Ford, Ed. **Polymeric reagents and catalysts**. Washington, ACS Symp. Ser. **1986**, *308*, 186.
- ³⁰. B. Sellergren, K.J.I. Shea *J. Chromatogr.* **1993**, *635*, 31.
- ³¹. D.J. O'Shannessy, B. Ekberg, K. Mosbach *Anal. Biochem.* **1989**, *177*, 144.
- ³². J. Haginaka, H. Takehira, K. Hosoya, N. Tanaka *J. Chromatogr. A* **1998**, *816*, 113.
- ³³. Y. Lu, C. Li, X. Wang, P. Sun, X. Xing *J. Chromatogr. B* **2004**, *804*, 53.
- ³⁴. G. Wulff, J. Vietmeier, H.G. Poll *Makromol. Chem.* **1987**, *188*, 731.
- ³⁵. G. Wulff, R. Kemmerer, J. Vietmeier, H.G. Poll *Nouv. J. Chim.* **1982**, *6*, 731.
- ³⁶. G. Wulff, W. Best, A. Akelah *React. Polym. Ion Exch. Sorb.* **1984**, *2*, 167.
- ³⁷. G. Wulff, J. Vietmeier *Makomol. Chem.* **1989**, *190*, 1727.
- ³⁸. K.J. Shea, G.J. Stoddard, D.M. Shavelle, F. Wakui *Macromolecules* **1990**, *23*, 4497.
- ³⁹. G. Wulff, B. Heide, G. Helfmeier *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 1089.
- ⁴⁰. K.J. Shea, T.K. Dougherty *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 1091.
- ⁴¹. K.J. Shea, D.Y. Sasaki, G.J. Stoddard *Macromolecules* **1989**, *22*, 1722.
- ⁴². K.J. Shea, D.Y. Sasaki *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1091.
- ⁴³. G. Wulff, M. Minarik *In Chromatographic Chiral Separations* **1988**, 15.
- ⁴⁴. G. Wulff, D. Oberkobusch, M. Minarik *Proceedings of the XVIIIth Solvay Conference on Chemistry* **1986**, 229.
- ⁴⁵. G. Wulff, S. Schauhoff *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 395.
- ⁴⁶. G. Wulff, A. Sarhan *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1972**, *11*, 341.

-
- ⁴⁷. A. Kugiyama, J. Matsui, T. Takeuchi, K. Yano, H. Muguruma, A.V. Eigersma, I. Karube *Anal. Lett.* **1995**, *28*, 2317.
- ⁴⁸. G. Wulff, H. Stellbrink *Journal of The Royal Netherlands Chemical Society* **1990**, *109*, 216.
- ⁴⁹. G. Wulff, J. Vietmeier *Makromol. Chem.* **1989**, *190*, 1717.
- ⁵⁰. G. Wulff, H.G. Poll *Makromol. Chem.* **1987**, *188*, 741.
- ⁵¹. G. Wulff, R. Vesper, R. Grobe-Einsler, A. Sarhan *Makromol. Chem.* **1977**, *178*, 2799.
- ⁵². G. Wulff, J. Haarer *Makromol. Chem.* **1991**, *192*, 1329.
- ⁵³. G. Wulff, S. Schauhoff *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 395.
- ⁵⁴. G. Wulff, J. Vietmeier *Makromol. Chem.* **1989**, *190*, 1727.
- ⁵⁵. G. Wulff, M. Minarik *J. Liq. Chromatogr.* **1990**, *13*, 2987.
- ⁵⁶. C. Alexander, C.R. Smith, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6640.
- ⁵⁷. J. Damen, D.C. Neckers *Tet. Lett.* **1980**, *21*, 1913.
- ⁵⁸. J. Damen, D.C. Neckers *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1382.
- ⁵⁹. J. Damen, D.C. Neckers *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3265.
- ⁶⁰. K.J. Shea, E.A. Thompson *J. Org. Chem* **1978**, *43*, 4253.
- ⁶¹. K.J. Shea, E.A. Thompson, S.D. Pandey, P.S. Beauchamp *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3149.
- ⁶². S.E. Byström, A. Börje, B. Akemark *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2081.
- ⁶³. B. Sellergren, L. Andersson *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3381.
- ⁶⁴. N. Zhong, H-S Byun, R. Bittman *Tet. Lett.* **2001**, *42*, 1839.
- ⁶⁵. M.J. Whitcombe, M.E. Rodriguez, P. Villar, E.N. Vulfson *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7105.
- ⁶⁶. A. Flores, D. Cunliffe, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *77*, 1841.
- ⁶⁷. N. Pérez, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *77*, 1851.
- ⁶⁸. C.C. Hang, W.C. Lee *J. Chromatogr. A* **2002**, *962*, 73.

-
- ⁶⁹. M. Petcu, J. Cooney, C. Cook, D. Lauren, P. Schaare, P. Holland *Anal. Chim. Acta* **2001**, *435*, 49.
- ⁷⁰. M. Petcu, P. Schaare, C. Cook *Anal. Chim. Acta* **2004**, *504*, 73.
- ⁷¹. S. Striegler *J. Chromatogr. B* **2004**, *804*, 183.
- ⁷². K. Mosbach *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 9.
- ⁷³. K. Haupt, K. Mosbach *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2495.
- ⁷⁴. R. Arshady, K. Mosbach *Makromol. Chem.* **1981**, *182*, 687.
- ⁷⁵. O. Norrlöw, M. Glad, K. Mosbach *J. Chromatogr.* **1984**, *299*, 29.
- ⁷⁶. G. Vlatakis, L.I. Andersson R. Müller, K. Mosbach *Nature*, **1993**, *361*, 645.
- ⁷⁷. B. Sellergren, K.J. Shea *J. Chromatogr.* **1993**, *635*, 31.
- ⁷⁸. G. Wulff, A. Biffis In *Molecular Imprinted Polymers-Man-Made-Mimics of Antibodies and their Applications in Analytical Chemistry* **2001**, 71.
- ⁷⁹. J.M. Kim, B.O. Chong, K.D. Ahn *Bull. Kor. Chem. Soc.* **1998**, *19*, 143.
- ⁸⁰. H. Dong, A.J. Tong, L.D. Li *Spectrochim. Acta, A* **2003**, *59*, 279.
- ⁸¹. D.A Spivak, K.J. Shea *Macromolecules* **1998**, *31*, 2160.
- ⁸². M. Kempe *Let. Pept. Sci.* **2000**, *7*, 27.
- ⁸³. L. Andersson, B. Sellergren, K. Mosbach *Tet. Let.* **1984**, *25*, 5211.
- ⁸⁴. B. Sellergren, B. Ekberg, K. Mosbach *J. Chromatogr.* **1985**, *347*, 1.
- ⁸⁵. Y. Shi, J-H Z., D. Shi, M. Jiang, Y-X Zhu, S-R Mei, Y-R Zhou, K. Dai, B. Lu, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, *42*, 549.
- ⁸⁶. H.S. Andersson, L.A. Nicholl *Bioorg. Chem.* **1997**, *25*, 203.
- ⁸⁷. B. Sellergren, M. Lepistö, K. Mosbach *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5853.
- ⁸⁸. G. Wulff, T. Gross, R. Schönfeld, T. Schrader, C. Kirsten *ACS Symp. Ser.* **1998**, *703*, 10.
- ⁸⁹. K. Tanabe, T. Takeuchi, J. Matsui, K. Ikebukuro, K. Yano, I. Kurub *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 2303.
- ⁹⁰. K. Hosaya, K. Yoshizako, H. Sasaki, K. Kimata, N. Tanaka *J. Chromatogr.* **1998**, *828*, 91.
- ⁹¹. B. Sellergren, J. Wieschemeyer, K.S. Boos, D. Seidel *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 4037.

-
- ⁹². Y. Fujii, K. Matsutani, K. Kikuchi *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 7, 415.
- ⁹³. M. Subat, A.S. Borovik, B. König *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3185.
- ⁹⁴. J. Matsui, Y. Tachinaba, T. Takeuchi *Anal. Commun.* **1998**, 35, 225.
- ⁹⁵. B.R. Hart, K.J. Shea *Macromolecules* **2002**, 35, 6192.
- ⁹⁶. S. Striegler, M. Dittel *Anal. Chim. Acta* **2003**, 484, 53.
- ⁹⁷. C.J. Tan, Y.W. Tong *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 389, 369.
- ⁹⁸. P.A. Lieberzeit, S. Gazda-Miarecka, K. Halikias, C. Schirk, J. Kauling, D.L. Dickert *Sensor Actuat B* **2005**, 111, 259.
- ⁹⁹. M. Kempe, M. Glad, K. Mosbach *J. Mol. Recognit* **1995**, 8, 35.
- ¹⁰⁰. N. Pérez-Moral, A.G. Mayes *Anal. Chim. Acta* **2004**, 504, 15.
- ¹⁰¹. N. Pérez, M.J. Withcombe, E.N. Vulfson *Macromolecules* **2001**, 34, 830.
- ¹⁰². K.J. Shea, D.A. Spivak, B. Sellergren *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3368.
- ¹⁰³. K.J. Shea, D.Y. Sasaki *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4109.
- ¹⁰⁴. Y.N. Zen, N. Zheng, P.G. Osborne, Y.Z. Li, W.B. Chang, M.J. Wen *J. Mol. Recogn.* **2002**, 15, 204.
- ¹⁰⁵. S.A. Piletsky, E.V. Piletskaya, A.V. EI'skaya, R. Levi, K. Yano, I. Karube *Anal. Lett.* **1997**, 30, 445.
- ¹⁰⁶. O. Güney, Y. Yilmaz, O. Pekcan *Sens. Actuators B* **1997**, 85, 86.
- ¹⁰⁷. A.D. Spivak, in *Molecularly Imprinted Materials*, Eds: Marcel Dekker, **2005**, 395-417.
- ¹⁰⁸. R.J. Umpleby, S.C. Baxter, A.M. Rampey, G.T. Rushton, Y. Chen, K.D. Shimizu *J. Chromatogr. B* **2004**, 804, 141.
- ¹⁰⁹. S. Striegler *Tetrahedron* **2001**, 57, 2349.
- ¹¹⁰. K. Yoshizako, K. Hosoya, Y. Iwakoshi, K. Kimata, N. Tanaka *Anal. Chem.* **1998**, 70, 386.
- ¹¹¹. J. Svenson, I.A. Nicholls *Anal. Chim. Acta* **2001**, 435, 19.
- ¹¹². J.Y. Ju, C. Shin, M. Whitcombe, E. Vulfson *Biotechnology and bioengineering* **1999**, 64, 232.
- ¹¹³. W.M. Mullett, E.P.C. Lai *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3636.

-
- ¹¹⁴. S.A. Bernhard *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 4946.
- ¹¹⁵. K. Kim, D. Kim *Journal of Applied Science* **2005**, *96*, 200.
- ¹¹⁶. E. Turiel, J.L. Tadeo, P.A.G. Cormack, A. Martin-Esteban *Analyst* **2005**, *130*, 1601.
- ¹¹⁷. V. Pichon, F. Chapuis-Hugon *Analytica Chimica Acta* **2008**, *622*, 48.
- ¹¹⁸. F.B. Kaabi, V. Pichon *LCGC North America* **2007**, *25*, 732.
- ¹¹⁹. L.I. Andersson *Bioseparation* **2002**, *10*, 353
- ¹²⁰. F.G. Tamayo, E. Turiel, A. Martin-Esteban *J. Chromatogr. A* **2007**, *32*, 1152.
- ¹²¹. B. Sellergren *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1578.
- ¹²². G.P. Gonzalez, P.F. Hernando, J.S. Durand Alegria *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, *23*, 1754.
- ¹²³. G.H. Chen, Z.B. Guan, C.T. Chen, L.T. Fu, V. Sundaresan, F.H. Arnold *Nature Biotechnol.* **1997**, *15*, 354.
- ¹²⁴. C.D. Liang, H. Peng, X.Y. Bao, L.H. Nie, S.Z. Yao *Analyst* **1999**, *124*, 1781.
- ¹²⁵. D. Kriz, K. Mosbach *Anal. Chim. Acta* **1995**, *300*, 71.
- ¹²⁶. K. Haupt, K. Mosbach *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2495.
- ¹²⁷. R.A. Lerner, S.J. Benkovic, P.G. Schulz *Science* **1991**, *252*, 659.
- ¹²⁸. P.G. Schulz *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1972**, *11*, 341.
- ¹²⁹. G. Wulff, T. Gross, R. Schönfeld *Angew. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1961.
- ¹³⁰. J.V. Beach, K.J. Shea *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 379.
- ¹³¹. X.C. Liu, K. Mosbach *Macromol. Rapid Commun.* **1997**, *18*, 609.
- ¹³². G. Wulff *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1.
- ¹³³. C. Alexander, L. Davidson, W. Hayes *Tetrahedron* **2003**, *59*, 2025.
- ¹³⁴. K. Tong, S. Xiao, S. Li, J. Wang *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* **2008**, *3*, 426.
- ¹³⁵. Y. Yu, L. Ye, K. Haupt, K. Mosbach *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4460.
- ¹³⁶. K. Mosbach, Y. Yu, J. Andersch, L. Ye *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12420.

-
- ¹³⁷. H. Zhang, T. Piacham, M. Drew, M. Patek, K. Mosbach, L. Ye *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4178 - 4179
- ¹³⁸. C. Alexander, C.R. Smith, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *113*, 6640.
- ¹³⁹. A.G. Mayes, L.I. Andersson, K. Mosbach *Anal. Biochem.* **1994**, *222*, 483.
- ¹⁴⁰. K.G.I. Nilsson, K. Sakaguchi, P. Gemeiner, K. Mosbach *J. Chromatogr. A* **1995**, *707*, 199.
- ¹⁴¹. P. Parmpi, P. Kofinas *Biomaterials* **2004**, *25*, 1969.
- ¹⁴². J.D. Lee, N.T. Greene, G.T. Rushton, K.D. Shimizu, J.I. Hong *Org. Lett.* **2005**, *7*, 963.
- ¹⁴³. F. Sineriz, Y. Ikeda, E. Petit, L. Bultel, K. Haupt, J. Kovensky, D. Papy-Garcia *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1857.
- ¹⁴⁴. Y. Ikeda, F. Sineriz, L. Bultel, E. Grand, J. Kovensky, D. Papy-Garcia *Carbohydr. Reas.* **2008**, *343*, 587.
- ¹⁴⁵. B. Okutucu, S. Onal, A. Telefoncu *Talanta* **2009**, *78*, 1190.
- ¹⁴⁶. S. Striegler *Bioseparation* **2002**, *10*, 307.
- ¹⁴⁷. S. Striegler *Macromolecules* **2003**, *36*, 1310.
- ¹⁴⁸. A.P. Davis, R.S. Wareham *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2978.
- ¹⁴⁹. W.I. Weis, K. Drickamer *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 441.
- ¹⁵⁰. G. Zemplén, A. Gerecs, I. Hadacsy *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1936**, *69*, 1827.
- ¹⁵¹. R.H. Treadway, E. Yanovsky *J. Am. Chem. Soc.*, **1945**, *67* 1038.
- ¹⁵². W. Pigman, H.S. Isbell *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem* **1968**, *23*, 11.
- ¹⁵³. R.S. Shallenberger *Advanced Sugar Chemistry*, Chichester, Ed. 1982.
- ¹⁵⁴. S.J. Angyal *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1984, *42*, 15.
- ¹⁵⁵. F. Franks *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I* **1989**, *85*, 2417.
- ¹⁵⁶. M. Pagnotta, C.L.F. Pooley, B. Gurland, M. Choi *Journal of Physical Organic Chemistry* **1993**, *6*, 407.
- ¹⁵⁷. C.L. Perrin *Tetrahedron* **1995**, *51*, 11901.
- ¹⁵⁸. D.E. Levy, P. Fügedi, *The organic chemistry of sugars*, CRC Press, Ed 2006.
- ¹⁵⁹. W. Steglich, G. Höfle *Angew. Chem. Int. Ed.* **1969**, *8*, 981.
- ¹⁶⁰. Z. Wang, M. Matin, S. Sheikh *Molecules* **2005**; *10*, 1325.

-
- ¹⁶¹. H.M.I. Osborn *Carbohydrates*, Academic Press, Ed **2003**.
- ¹⁶². J. Thiem, B. Meyers *Chem. Ber.* **1980**, *113*, 3075.
- ¹⁶³. C. Shannon, D.L. Jakman *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1227.
- ¹⁶⁴. D.L. Boger, S. Teramoto, J. Zhou *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**; *28*, 7344.
- ¹⁶⁵. M.M. Sim, H. Kondo, C.H. Wong *J. Am. Chem. Soc.* **1993**; *115*, 2260.
- ¹⁶⁶. R.R. Schmidt, G. Grundler *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 781.
- ¹⁶⁷. B. Wegmann, R.R. Schmidt *J. Carbohydr. Chem.* **1987**, *6*, 357.
- ¹⁶⁸. A. Dobarro-Rodriguez, M. Trumtel, H.P. Wessel *J. Carbohydr. Chem.* **1992**, *11*, 255.
- ¹⁶⁹. F.J. Urban, B.S. Moore, R. Breitenbach *Tet. Lett.* **1990**, *31*, 4421.
- ¹⁷⁰. S.P. Douglas, D.M. Whitfield, J.J. Krepinsky *J. Carbohydr. Chem.* **1993**, *12*, 131.
- ¹⁷¹. B. Mathieu, L. Ghosez *Tet. Lett.* **1997**, *38*, 5497.
- ¹⁷². M.B. Boxer, H. Yamamoto *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 48.
- ¹⁷³. N. Kuhnert, J. Perveley, J. Robertson *Tet. Lett.* **1998**, *39*, 3215.
- ¹⁷⁴. B. Mathieu, L. Ghosez *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8219.
- ¹⁷⁵. K. Jayakantha, Y.D. Vankar *Carbohydr. Reas.* **2005**, *340*, 2688.
- ¹⁷⁶. E. Vedejs, R.A. Buchanan, Y. Watanabe *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8430.
- ¹⁷⁷. M. Zupan, P. Krajnc, S. Stavber *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.*, **1996**, *34*, 34
- ¹⁷⁸. M. Assali, M.P. Leal, I. Fernandez, R. Baati, C. Mioskowski, N. Khier *Soft Matter*, **2009**, *5*, 948.
- ¹⁷⁹. T. Li, J. Hamdi, F.F. Hawthorne *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 15.
- ¹⁸⁰. G. Odian, *Principles of Polymerization*, 3rd edition, Wiley-VCH, New York, **1991**, 259-266.
- ¹⁸¹. S.H. Cheong, S. McNiven, A.E. Rachkov, R. Levi, K. Yano, I. Karube *Macromolecules*, **1997**, *30*, 1317.
- ¹⁸². M. Shimojo, K. Matsumoto, M. Hatanaka, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9281.