



Titre: Mise au point d'un échafaudage moléculaire modulable pour le
Title: génie tissulaire

Auteur: Gwendoline Tallec
Author:

Date: 2018

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Tallec, G. (2018). Mise au point d'un échafaudage moléculaire modulable pour le
Citation: génie tissulaire [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal].
PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/3701/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/3701/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Gregory De Crescenzo
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MISE AU POINT D'UN ÉCHAFAUDAGE MOLÉCULAIRE MODULABLE
POUR LE GÉNIE TISSULAIRE

GWENDOLINE TALLEC

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

NOVEMBRE 2018

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

MISE AU POINT D'UN ÉCHAFAUDAGE MOLÉCULAIRE
MODULABLE POUR LE GÉNIE TISSULAIRE

présenté par : TALLEC Gwendoline

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. VIRGILIO Nick, Ph. D., président

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. LAVERTU Marc, Ph. D. , membre

REMERCIEMENTS

Je remercie avant tout mon directeur de recherche, le professeur Gregory De Crescenzo, de m'avoir offert la chance de réaliser une maîtrise recherche au sein de son laboratoire. Merci de m'avoir guidée tout au long de mon projet avec gentillesse et bienveillance, faisant de cette maîtrise une expérience enrichissante à la fois scientifiquement et humainement.

Je remercie également le professeur Xavier Banquy, de la faculté de pharmacie de l'Université de Montréal qui, alors qu'il n'était pas officiellement mon co-directeur, m'a « adoptée » en cours de maîtrise et a suivi avec attention ma progression.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe et spécialement mes compagnons du « 2086 » : Benoit, Florian, Romane, Audrey et Fred. Merci pour votre aide, votre soutien et votre amitié ! Merci aussi à celles qui sont restées moins longtemps, Celestine, Gwladys et Chloé, mais avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.

Merci enfin à toutes les personnes qui m'ont aidée et guidée dans mes expériences. Merci à Yuan pour son expertise et sa connaissance des laboratoires. Merci à Sylvie Bilodeau pour les innombrables spectres RMN qu'elle a réalisés pour mon projet. Merci à Colleen Matthieu pour m'avoir formée en histologie. Merci à Matthieu Gauthier pour les longues heures à regarder des gels au microscope électronique à balayage.

Pour finir, je remercie bien évidemment ma famille et tous mes amis pour leur soutien sans faille dans tous mes projets !

RÉSUMÉ

Les hydrogels sont devenus, au cours des dernières décennies, très populaires, particulièrement dans le domaine du biomédical. Du fait de leur grande ressemblance aux tissus vivants, ils sont fréquemment utilisés dans le génie tissulaire comme échafaudages pour la culture cellulaire. La fonctionnalisation de ces polymères par des biomolécules permet de s'approcher des conditions naturelles des cellules et ainsi d'obtenir des tissus biologiques plus performants pour les applications médicales.

Cependant, malgré les nombreux progrès effectués dans le domaine, l'immobilisation de protéines sur un polymère reste un défi. En effet, les protéines sont des macromolécules fragiles et sensibles à leur environnement. Pour préserver leur bioactivité, il ne faut pas ou peu modifier leur structure et correctement les présenter à leurs partenaires cellulaires. Pour cela, l'utilisation de peptides intermédiaires a fait ses preuves. Parmi eux, le couple *Ecoil/Kcoil* est particulièrement intéressant du fait de la forte affinité entre les deux peptides et permet également une bonne orientation et présentation du facteur de croissance aux cellules.

L'objectif du projet été de réaliser un hydrogel de dextrane poreux, permettant l'adhésion, la prolifération et la migration des cellules, et fonctionnalisé avec des peptides *Kcoils* pour permettre l'immobilisation et la relâche contrôlée de facteurs de croissance couplés au peptide *Ecoil* par génie génétique.

L'immobilisation du *Kcoil* sur le dextrane s'est révélée délicate due à l'oxydation extrêmement rapide du peptide. Une première étude sur la réduction simultanée à la réaction de greffage a été réalisée, aboutissant au manuscrit « Adequate reducing conditions enable conjugation to polymer by one pot thiol click chemistry », accepté dans le journal *Bioconjugate chemistry* et présenté dans le chapitre 4 du mémoire.

En parallèle, une autre réaction chimique, la cycloaddition azide/alcyne a été envisagée. Celle-ci a donné des résultats concluants quant au greffage des peptides et a permis de réaliser des tests préliminaires sur les hydrogels. Malheureusement, les propriétés mécaniques et de porosité de l'hydrogel n'ont pas été atteintes pour réaliser une culture cellulaire en son sein.

ABSTRACT

Over the past decades, hydrogels have become very popular, especially in the biomedical field. This can be attributed to the fact that they highly resemble living tissues, and as such are frequently used in tissue engineering as scaffolds for cell culture. Natural cell growth conditions can be approached by functionalizing polymers with biomolecules. This helps achieve more viable biological tissues for medical applications.

Although great progresses were made in this field, immobilizing proteins on polymers is still really challenging. Indeed, proteins are big macromolecules that are extremely delicate and sensitive to their environment. Intermediary peptides can be efficiently used to aid in this step. Among them, the *Ecoil/Kcoil* pair is particularly interesting because of the high affinity between the two peptides. It also allows for good orientation and presentation of the growth factor to the cells.

This project aims to produce a porous dextran hydrogel, allowing for the adhesion, proliferation and migration of cells. The hydrogel should first be functionalized with *Kcoils* peptides to allow for the immobilization and controlled release of genetically engineered growth factors that are coupled to the *Ecoil* peptide.

The immobilization of *Kcoil* on dextran was made difficult by the extremely fast oxidation of the peptide. A first study, on simultaneous reduction and grafting reaction was carried out, resulting in the manuscript "Adequate Reducing Conditions Enable Conjugation to Polymer by One Pot Thiol Click Chemistry". This manuscript was accepted in the journal *Bioconjugate Chemistry* and will be presented in Chapter 4 of this master thesis.

Meanwhile, another chemical reaction, the azide/alkyne cycloaddition was considered. It gave conclusive results for the peptide grafting and made it possible to carry out preliminary experiments on the hydrogels. Unfortunately, the hydrogel's mechanical and porosity properties were not suited for cell culture.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIII
LISTE DES ANNEXES	XVI
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Contexte	1
1.2 Problématique.....	3
1.3 Objectifs	4
CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE	5
2.1 Les hydrogels	5
2.1.1 Définition	5
2.1.2 Classification des différents hydrogels	6
2.1.3 Le dextrane.....	7
2.1.4 Principales applications biomédicales.....	9
2.2 Techniques de bioconjugaison	13
2.2.1 Chimie click	14
2.2.2 « Thiol click »	15

2.3	Les peptides et protéines	18
2.3.1	Définition	18
2.3.2	Les peptides superhélices	20
2.3.3	Méthodes de synthèse.....	22
CHAPITRE 3 DÉMARCHE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT		26
CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : ADEQUATE REDUCING CONDITIONS ENABLE CONJUGATION OF OXIDIZED PEPTIDES TO POLYMER BY ONE POT THIOL CLICK CHEMISTRY.....		29
4.1	Présentation de l'article	29
4.2	Entête de l'article	29
4.3	Abstract	30
4.4	Keywords	30
4.5	Introduction	30
4.6	Results and discussion.....	35
4.6.1	Compatibility of in situ reduction with thiol-disulfide interchange and thiol alkylation.	35
4.6.2	Competitive reactions between reducing agents and dextran-vinyl sulfone	39
4.6.3	Optimization of one-pot thiol conjugation of oxidized K5 peptides with dextran-vinyl sulfone.....	44
4.7	Conclusion.....	49
4.8	Experimental procedures.....	49
4.8.1	Materials.....	49
4.8.2	Biomolecule and bioconjugate synthesis, purification and characterization	50
4.8.3	Thiol-Reactive Surface Preparation	51

4.8.4	K5 Conjugation and Characterization	52
4.8.5	NMR Analysis.....	52
4.8.6	Thiol and reductant quantification	53
4.8.7	Data Treatment.....	53
4.9	Acknowledgments	53
4.10	References	53
CHAPITRE 5 UNE NOUVELLE RÉACTION DE GREFFAGE, LA CYCLOADDITION AZIDE/ALCYNE.....		60
5.1	Dextrane-alkyne	60
5.2	Mise au point de la réaction azide/alkyne	62
5.3	Dextrane-RGD et Dextrane- <i>Kcoil</i>	65
CHAPITRE 6 LES HYDROGELS.....		66
6.1	Fabrication et caractérisation des hydrogels	66
6.2	Adhésion des cellules	68
6.3	Prolifération des HUVECs en surface.....	71
6.4	Pénétration et prolifération des HUVECs à l'intérieur du gel	73
6.4.1	Mise au point d'une technique d'histologie	73
6.4.2	Perforation de la surface.....	75
6.4.3	Retour en arrière - formulation du gel.....	77
CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE		79
CHAPITRE 8 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....		81
BIBLIOGRAPHIE		82
ANNEXES		94

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : Principales applications des hydrogels, exemples de matériaux utilisés et détails de l'application	9
Table 4-1: Relative peptide density obtained after incubating the K5 peptide in PBS or PBS supplemented with 100 μ M TCEP on vinyl sulfone, maleimide and pyridyldithiol-derivatized surfaces and on unreactive control surfaces, as monitored by ELISA.	37

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1: Représentation schématique du dextrane	8
Figure 2-2 : Schéma de la cycloaddition alcyne/azide avec et sans catalyse au cuivre (I)	15
Figure 2-3 : Schéma des réactions classiques de chimie thiol-click	16
Figure 2-4 : Produits d'oxydation du groupement thiol.....	17
Figure 2-5 : Réaction de condensation entre un acide carboxylique et une amine à l'origine de la formation d'un lien peptidique.....	18
Figure 2-6 : Représentation schématique de structures secondaires courantes : les feuillets β en bleu à gauche, une hélice α en rouge à droite. Image adaptée de Creative Commons Attribution 4.0 International.....	19
Figure 2-7 : Représentation schématique de l'hétérodimère <i>Kcoil/Ecoil</i> (image de la thèse de Nesrine Riahi 2017 [113]).....	22
Figure 2-8 : Principales étapes d'une synthèse de peptide en phase solide ou SPPS	24
Figure 2-9 : Structure de l'acide aminé non-naturel azido-homoalanine	25
Figure 4-1 : Reaction schemes of one-pot thiol chemistry for the grafting of the K5 peptide (R_2 -SH) to dextran (R_1) in presence of reducing agents. (A) Reactions between the K5 peptide and dextran modified with vinyl sulfone and maleimide moieties for thiol-alkylation or with pyridyldithiol moieties for thiol-disulfide interchange. (B) Mechanism of oxidized K5 peptide reduction by a phosphine, tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), or by thiol-containing reductants, dithiothreitol (DTT) and β -mercaptoethanol (BME).	34
Figure 4-2 : Grafting of oxidized K5 peptide in PBS (10 mM, pH 7.4) co-incubated with reducing agents on (A) vinyl sulfone, (B) maleimide and (C) pyridyldithiol-derivatized dextran surfaces, as monitored by ELISA. The lines are guides for the eyes only.....	36
Figure 4-3 : Influence of peptide and TCEP concentration on the grafting of oxidized K5 peptide in PBS (10 mM, pH 7.4), on vinyl sulfone-derivatized dextran surfaces, as monitored by ELISA. The data are relative to the ELISA signal obtained for 1 μ M of K5 co-incubated with 100 μ M of TCEP. The lines are guides for the eyes only.....	41

Figure 4-4 : ^1H NMR spectroscopy of vinyl sulfone-derivatized dextran incubated for 6 or 24 hours with (A) TCEP, (B) DTT and (C) BME at 0.1 and 50 mM. H atoms of interest are highlighted on the schematic compounds on the right. % values in insets are NMR areas under curve divided by the number of equivalent H atoms, relative to dextran saccharide units (calculated from area under curve of the H atoms labelled “c”).	42
Figure 4-5. Grafting of K5 peptides on dextran-VS in presence or absence of 100 μM TCEP in various buffers – Phosphate, HEPES, Tris and Borate Buffered Saline – as monitored by ELISA.	45
Figure 4-6. Kinetics of (A) K5 conjugation to dextran-VS in 10 mM PBS, pH 7.4, with or without 100 μM TCEP, and kinetics of (B) TCEP oxidation in test tubes or in dextran-VS-modified well plates, with or without 1 μM K5. Monitoring was performed by ELISA and by reduction of Ellman’s reagent, respectively. The red dashed lines are guides for the eye only whereas the black dashed lines are linear fits.	46
Figure 5-1 : Spectroscopie RMN du proton ^1H du dextrane-GPE après réaction du dextrane avec 1mmol, 10mmol ou 30mmol de GPE. Les protons H d’intérêts sont colorés en rouge (alcyne) ou en vert (quantification du dextrane total)	61
Figure 5-2 : Spectroscopie RMN du proton ^1H du produit de la réaction dextrane-GPE et PEG-N3. Les hydrogènes d’intérêt ont été colorés. Le spectre avant réaction est identique aux spectres de la figure précédente	64
Figure 6-1 : Schéma de la stratégie utilisée pour former les hydrogels fonctionnalisés	66
Figure 6-2 : Taux de gonflement d'hydrogels non fonctionnalisés avec ou sans sel ajouté dans la formulation, dans de l'eau MilliQ ou du PBS. Les colonnes grises marquées d’un (#) sont les résultats reportés dans Riahi et al [116]. *** signifie une p value < 0,005 selon un test de student	67
Figure 6-3 : Niveaux d'adhésion mesurés par un test WST-1 des HUVECs sur des hydrogels contenant 0,1% à 10% de VS-RGD ou de AHA-RGD. Les pentes sont calculées à partir de valeurs mesurées toutes les 30 minutes pendant 2 heures.	69

- Figure 6-4 : Photographies des surfaces des hydrogels au microscope (grossissement 10x) après 3h d'adhésion (80000 cellules/puits) et avant rinçage. Le gel (A) contient 1% de dextrane-AHA-RGD alors que le gel (B) ne contient pas de RGD.....70
- Figure 6-5 : Prolifération des HUVECs sur des hydrogels de dextrane fonctionnalisés mesurée par des tests au WST-1 à jour 0 (J0), jour 3 (J3) et jour (J7). Les pentes sont calculées à partir de valeurs mesurées toutes les 30 minutes pendant 2heures.72
- Figure 6-6 : Photographies des surfaces des hydrogels au microscope (grossissement 10X). La photo (A) a été prise au 4ème jour, la photo (B) le 7ème jour. Les barres d'échelle correspondent à une distance de 100µm.73
- Figure 6-7 : Photographies au microscope classique de tranches de gel. Les plaques ont été préparées : (A) par la méthode classique, (B) avec l'utilisation d'un morceau d'adhésif. Les cellules ont été marquées avec de la fluorescéine. La flèche rouge pointe la surface du gel, la barre d'échelle blanche correspond à 0,5mm.....74
- Figure 6-8 : Photographie au microscope électronique à balayage de la surface d'un hydrogel de dextrane après rinçage et lyophilisation (grossissement 30X).....75
- Figure 6-9 : Photographies prises au microscope électronique à balayage (grossissement 60X) d'hydrogels sur lesquels des cristaux de NaCl ont été déposés après 6 ou 10 minutes de gélification. La flèche rouge indique la direction de la surface du gel sur les photos des tranches.....76
- Figure 6-10 : Photographies prises au microscope électronique à balayage (grossissement 30X) d'un hydrogel contenant 33% m/m totale de dextrane de bicarbonate de potassium et 10% m/m totale de dextrane de NaCl.....78

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN – Acide désoxyribonucléique

AHA – Azido-homoalanine

BME – β -mercaptoéthanol

BSA – Albumine de sérum bovin (*Bovin Serum Albumine*)

CMD – Dextrane carboxyméthylé (*Carboxymethylated dextran*)

CO₂ – Dioxyde de carbone

Cu - Cuivre

D₂O – Eau deutérée

Dextrane-GPE – Dextrane modifié par du glycidyl propargyl éther

DMSO – Diméthylsulfoxyde

DTNB – Acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque ou réactif d'Ellman

DTT – Dithiothréitol

DVS – Divinylsulfone

EDC – 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

EDTA – Acide éthylènediaminetétraacétique

EGF – Facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor*)

ELISA – Méthode immuno-enzymatique (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EMCH – N-(ϵ -maleimidocaproic acid) hydrazide

EPFL – Ecole polytechnique fédérale de Lausanne

FBS – Sérum de veau fœtal (*Fetal Bovine Serum*)

FDA – Administration américaine des denrées alimentaires et médicaments (*Food and Drug Administration*)

GPE – Glycidyl Propargyl Ether

H₂SO₄ – Acide sulfurique

HCl – Acide chlorhydrique

HEK – Cellules humaines embryonnaires de rein (*Human Embryonic Kidney*)

HEPES – acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HUVECs – cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (*Human umbilical vein endothelial cell*)

KCl – Chlorure de potassium

KHCO₃ – Bicarbonate de potassium

LC-MS – Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (*Liquid Chromatography – Mass spectrometry*)

MEB – Microscope électronique à balayage

MQ – Milli-Q (grade de pureté de l'eau)

NaAsc – Sodium Ascorbate

NaCl – Chlorure de sodium

NaH₂PO₄ – Dihydrogénophosphate de sodium

NaOH – Hydroxyde de sodium

NCL – Ligation chimique native (*Native Chemical Ligation*)

NHS – N-hydroxysuccinimide

OCT – composé de découpe à la température optimale (*optimum cutting temperature*)

PAAm – Poly(allylamine)

PBS – Tampon phosphate salin (*Phosphate Buffer Saline*)

PDPH – 3-(2-pyridyldithio)propionyl hydrazide

PEA – Poly(ethyl acrylate)

PEG – Polyéthylène Glycol

PHEMA – Poly(2-hydroxyethyl méthacrylate)

Ppm – Parties par millions

PVA – Poly(vinylalcool)

RFP – Protéine fluorescente rouge (*Red fluorescent protein*)

RGD – Nom du peptide composé des acides aminés R (Arginine), G (Glycine) et D (acide aspartique)

RMN – Résonance magnétique nucléaire (*NMR, Nuclear Magnetic Resonance*)

SAP – Polymère super-absorbant (*super absorbant polymer*)

SLS – Synthèse peptidique en solution

SPPS – Synthèse peptidique sur support solide (*Solid Phase Peptide Synthesis*)

STMP – Sodium Trimétaphosphate

TCEP – Tris(2-carboxyethyl)phosphine

THPTA – Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine

UV – Ultraviolet

VEGF – Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*Vascular endothelial growth factor*)

VS – Vinylsulfone

WST-1 – Réactif pour la quantification de la prolifération des cellules

LISTE DES ANNEXES

Annexe A – Protocole de preparation du dextrane-GPE.....	94
Annexe B – Protocole de la préparation du dextrane- <i>Kcoil</i> par cycloaddition azide-alcyne.....	96

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Contexte

Le dysfonctionnement d'un organe ou la perte d'un tissu est l'un des problèmes majeurs de santé publique. Actuellement, aux États-Unis, plus de 110 000 personnes attendent la greffe d'un organe vital alors que seulement une vingtaine de milliers de donneurs sont disponibles chaque année. En 2017, 35 000 transplantations ont eu lieu dans ce pays [1]. En moyenne, cela correspond, aux États-Unis seulement, à la mort de vingt personnes par jour pour ne pas avoir reçu une greffe à temps [1]. De plus, si une large majorité des adultes (> 90%) s'exprime en faveur du don d'organes aux États-Unis, seulement la moitié d'entre eux s'inscrit réellement sur les listes de donneurs. Pour cette raison, dans certains pays, comme en France, la loi applique un principe de consentement présumé. Cela signifie que tous les Français sont par défaut donneurs d'organes sauf s'ils s'y opposent au cours de leur vie. Sachant que seulement 3 décès sur 1000 vont actuellement permettre le prélèvement et la transplantation des organes, de telles mesures favorisant l'inscription massive des habitants dans les listes de donneurs, sont cruciales pour augmenter le nombre d'organes disponibles.

À ce manque de disponibilité des organes, s'ajoute le fort risque de rejet auquel sont confrontés les patients. De telles greffes ou transplantations nécessitent la prise de lourds traitements médicamenteux d'immunosuppression à vie. Ces traitements dispendieux ont de nombreux effets secondaires indésirables : ils augmentent considérablement le risque d'infections des patients ainsi que leur tendance à développer des tumeurs, favorisent le développement de diabète ou d'obésité et entraînent fréquemment une insuffisance rénale [2], [3]. Bien qu'étant une alternative intéressante, les greffes d'organes artificiels sont elles aussi sujettes à de sérieuses limitations : en particulier l'augmentation des risques d'infections et de thromboembolisme, et surtout la durée de vie limitée du greffon qui oblige parfois à réopérer plusieurs fois le même patient. Il s'agit de lourdes opérations chirurgicales qui vont considérablement diminuer le confort et le bien-être du patient.

Ainsi, un nouveau champ de recherche, à l'interface entre la biologie, la physique et les matériaux, a fait son apparition dans les années 1980 : le génie tissulaire. Le principe est

d'appliquer les méthodes de l'ingénierie à la science du vivant afin de créer des substituts biologiques pour restaurer, maintenir ou améliorer les tissus des patients [4]. L'objectif est d'aller vers une médecine plus personnalisée pour répondre aux besoins de chaque patient et idéalement de reconstruire ses tissus ou organes à partir de ses propres cellules pour s'affranchir des traitements immunosuppresseurs. Plusieurs stratégies sont actuellement envisagées : (1) supporter la guérison naturelle des tissus en utilisant une simple matrice support pour que les cellules puissent recoloniser le site et se restructurer correctement, (2) injecter des cellules sous forme de solution au patient pour stimuler la régénération notamment dans les zones peu vascularisées, ou enfin (3) administrer des tissus ou organes préformés en laboratoire, c'est-à-dire des cellules à l'intérieur de matrices. Cette dernière solution est la plus fréquemment envisagée.

Pour servir de support aux cellules, les hydrogels sont de parfaits candidats car ils sont structurellement similaires à la matrice extracellulaire [5]. Cette matrice est le support biologique naturel des cellules. Composée de protéoglycanes, de collagène et d'élastine, elle fournit un soutien mécanique aux cellules tout en leur présentant les protéines et facteurs de croissance nécessaires à la création, à l'expansion et au maintien de nouveaux tissus. La recherche sur les hydrogels a donc pour objectif de reproduire au mieux cette matrice. L'hydrogel doit présenter un certain nombre de caractéristiques : supporter l'attachement des cellules, être suffisamment poreux pour permettre la migration des cellules et la diffusion de molécules (déchets cellulaires, nutriments, etc.) et faciliter l'organisation et la différenciation vers une structure biomimétique hautement ordonnée. Idéalement, il stimule également la réparation du tissu et l'intégration de la greffe au reste du corps par la présence de molécules bioactives.

Polymères naturels présents dans de très nombreux processus du vivant, les polysaccharides forment une famille intéressante de polymères pour les applications en génie tissulaire. Ils sont hautement biocompatibles, biodégradables et facilement modifiables chimiquement [6], [7]. Parmi eux, le dextrane attire particulièrement l'attention des chercheurs car il possède des propriétés répulsives et empêche ainsi l'absorption de protéines ou l'adhésion des cellules [8]. Cette particularité permet de créer un environnement contrôlé et ainsi de réguler précisément les interactions entre le gel et les cellules par l'intermédiaire de biomolécules immobilisées [9].

De plus, l'incorporation de peptides ou de protéines dans les hydrogels permet d'améliorer leurs performances. Les facteurs de croissances, en particulier, jouent un rôle clé dans la signalisation

cellulaire et vont ainsi améliorer la régénération des tissus en recrutant certains types de cellules, stimulant leur prolifération, et guidant la différenciation cellulaire. Entre autre, le facteur de croissance VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) va supporter l'activité d'angiogénèse et favoriser la vascularisation primordiale du greffon et par conséquent sa survie [10]. Immobiliser les facteurs de croissances sur les hydrogels présente plusieurs avantages. Cela permet d'obtenir une activité prolongée des facteurs de croissances en contrôlant la relâche, la diffusion et l'élimination dans le temps. De plus, l'activité est localisée évitant ainsi des effets indésirables dans d'autres tissus (une concentration inapproprié d'un facteur de croissance peut être toxique pour certains types de cellules, voire provoquer une réaction tumorale) [10].

Cependant, l'immobilisation de ces facteurs de croissance est une étape délicate. Pour qu'ils restent bioactifs, ils faut conserver leur structure et correctement les orienter [11]. De plus, ces protéines sont des macromolécules fragiles et difficilement produites ce qui limite financièrement leur utilisation. L'utilisation d'un couple de peptide *Kcoil/Ecoil* qui joue le rôle à la fois d'un espaceur entre le dextrane et la protéine et d'un orienteur, va considérablement faciliter leur attachement sur le polymère tout en préservant leur bioactivité [12]. Même si le greffage d'un peptide est plus abordable, il n'en reste pas moins une étape délicate qui demande beaucoup de précautions.

1.2 Problématique

L'enjeu de ce projet de recherche est de s'inspirer de la matrice extracellulaire pour recréer en laboratoire un environnement propice à la culture cellulaire. L'hydrogel doit donc posséder des propriétés physiques, mécaniques et biologiques semblables, tout en présentant à sa surface un cocktail de facteurs de croissances. Or, en fonction des cellules utilisées, les facteurs de croissance nécessaires à leur bon développement vont différer. Il serait donc particulièrement intéressant de créer un hydrogel modulable, où le cocktail de facteurs de croissance présentés pourrait être facilement modifié. L'utilisation du couple *Ecoil/Kcoil* permet de répondre efficacement à cette demande grâce à l'existence d'une bibliothèque existante de facteurs de croissance couplés au peptide *Ecoil* par génie génétique.

1.3 Objectifs

L'objectif général de mon projet était de générer un hydrogel facilement adaptable à la culture de plusieurs types de cellules nécessitant un support solide pour proliférer. L'hydrogel devait aussi permettre la délivrance contrôlée de facteurs de croissances indispensables à la survie et à la différenciation cellulaire.

Mon projet a été divisé en trois sous-objectifs :

- attacher de façon covalente et efficiente le peptide *Kcoil* sur un polymère (le dextrane) en contournant le problème d'oxydation causée par l'homodimérisation des peptides;
- obtenir un hydrogel poreux, solide et facilement manipulable dans lequel les cellules adhèrent et prolifèrent dans un milieu complet;
- démontrer l'adaptabilité de l'hydrogel et sa capacité à présenter aux cellules des facteurs de croissances bioactifs.

CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 Les hydrogels

2.1.1 Définition

Les hydrogels sont apparus pour la première fois dans les années 1960 lorsque Wichterle et ses collaborateurs ont reporté dans la littérature la formation d'un gel transparent obtenu à base de poly(2-hydroxyethyl méthacrylate) ou PHEMA. Ils développaient ce gel pour produire des lentilles de contact [13]. Depuis, le nombre d'hydrogels reportés dans la littérature ne cesse d'augmenter et les applications se multiplient et se diversifient. On retrouve aujourd'hui les hydrogels dans de nombreuses applications comme les lentilles de contact, les biosenseurs, les biomembranes, certains produits d'hygiène ou encore pour la délivrance de médicaments et de protéines [14]–[16].

Un hydrogel est défini comme un réseau tridimensionnel formé par des macromolécules ou des chaînes polymériques hydrophiles reliées entre elles au niveau de points de réticulation. La structure finale est capable d'absorber de grandes quantités d'eau ou de solutions aqueuses telles que des fluides biologiques (jusqu'à 1000 fois son poids sec) tout en restant insoluble [16]–[18]. Le produit final est mou, gorgé d'eau et présente une forte similarité avec les tissus cellulaires.

La grande diversité des hydrogels existants et la possibilité de les altérer pour modifier leurs propriétés physico-chimiques font des hydrogels un produit de choix pour la recherche qui peut être adapté aux besoins de chaque projet. Par exemple, certains hydrogels sont biocompatibles, biodégradables ou biorésorbables. D'autres sont sensibles à l'environnement physiologique ou biologique dans lequel ils se trouvent. Ces derniers, surnommés hydrogels « à réponse », se transforment par exemple en fonction du pH, de la température, de la force ionique, de la nature du fluide, ou des radiations électromagnétiques de leur environnement [19]–[23]. Pour travailler sur les hydrogels, il est donc important de bien comprendre tous les facteurs influençant les propriétés physiques, mécaniques, chimiques et biologiques des hydrogels afin de choisir le matériau avec précaution.

2.1.2 Classification des différents hydrogels

Un hydrogel peut théoriquement être formé à partir de n'importe quelle macromolécule suffisamment hydrophile. On retrouve donc une très grande variété d'hydrogels aux propriétés tout aussi variées [16]. Plusieurs paramètres contribuent à la structure et à ses propriétés et vont ainsi permettre de classer les hydrogels en différentes catégories :

1) Naturel ou synthétique

La molécule ou polymère de départ peut être d'origine naturelle ou synthétique. C'est un des choix importants à faire lors du design d'un nouvel hydrogel, en particulier lorsqu'il est destiné à des applications industrielles.

D'un côté, on retrouve les molécules synthétiques telles que le PEG (polyéthylène glycol), le PVA (alcool de polyvinyle) ou le PEO (oxyde de polyéthylène) [24]. Elles permettent de contrôler plus facilement les propriétés de l'hydrogel final, d'augmenter la reproductibilité d'un lot à l'autre et surtout facilitent une montée en échelle dans la production.

De l'autre côté, les molécules naturelles telles que le collagène, la fibrine, l'acide hyaluronique, la gélatine, l'agarose ou l'alginate, sont très abondantes, variées et souvent moins chères que leurs concurrentes synthétiques. Cependant, la variabilité d'un lot à l'autre est moins bien contrôlée. La structure de ces hydrogels est très similaire à celle de la matrice extracellulaire, ce qui fait d'eux des matériaux très prometteurs pour des applications biomédicales. Leur principal avantage repose sur le fait que grand nombre de ces hydrogels est déjà été utilisé dans l'alimentation ou dans le secteur pharmaceutique. Ils sont donc déjà reconnus par la FDA (« Food and drug administration »), Santé Canada ou l'Agence européenne des médicaments (EMA, « *European medicines agency* ») comme étant biocompatibles et non toxiques dans les utilisations sur les humains, ce qui les rend particulièrement attractifs pour le développement de nouvelles applications biomédicales [25]–[27].

2) Homopolymère, hétéropolymère ou copolymère

Le gel peut être réalisé à partir d'un seul ou de plusieurs polymères. Dans le cas où le gel est composé d'un seul polymère, on parle d'homopolymère lorsque celui-ci est composé d'une seule unité répétitive ou de copolymère lorsque le polymère est obtenu à partir d'au moins deux types

d'unités répétitives. Le gel peut aussi être composé à partir de plusieurs polymères mélangés entre eux avant la réticulation, on parlera alors plutôt d'hétéropolymères [28].

L'intérêt de mélanger plusieurs polymères est d'obtenir des propriétés physico-chimiques intermédiaires par rapport à celles des homopolymères correspondants.

3) Anionique, cationique, neutre ou ampholytique

Le polymère de départ peut être neutre, anionique, cationique ou ampholytique (c'est-à-dire posséder des charges négatives et positives simultanément). Ces charges vont grandement influencer le comportement de l'hydrogel en solution, en particulier sa sensibilité aux solutions ioniques [29]–[31]. Elles permettent par exemple d'obtenir des hydrogels avec un potentiel électrique local. On peut même envisager d'utiliser ces charges pour effectuer une réticulation physique du polymère et ainsi obtenir un hydrogel qui se solidifie en fonction de la composition ionique de son environnement.

4) Chimique ou physique

La réticulation des chaînes polymériques peut être chimique ou physique. Une réticulation chimique signifie que les chaînes sont reliées entre elles par des liaisons covalentes. On parle alors de caractère « permanent » des nœuds de réticulation. Ces hydrogels ne sont donc pas ou peu dépendants des facteurs extérieurs. Contrairement aux gels dits chimiques, les gels physiques présentent des nœuds de réticulation non permanents. Il s'agit d'interactions réversibles comme par exemple les interactions coulombiennes, de Van der Waals ou les liaisons hydrogène. Selon les conditions extérieures (pH, température...), le gel va donc pouvoir passer de l'état de solution à l'état de solide, et vice-versa, et ce, indéfiniment [32]. La densité et la force des nœuds de réticulation vont influencer les propriétés de gonflement de l'hydrogel, ainsi que sa réponse à l'environnement dans le cas des hydrogels physiques [21], [23]. Ainsi un hydrogel très réticulé aura généralement un taux de gonflement plus faible qu'un même hydrogel faiblement réticulé.

2.1.3 Le dextrane

Parmi la multitude d'hydrogels existants, nous avons choisi de travailler sur le dextrane, polymère ramifié de dextrose (Figure 2-1). Polysaccharide naturel qui peut également être

synthétisé, il se caractérise par la simplicité de son monomère : une unité glucopyranose ne possédant que des groupements alcools. Les monomères sont reliés entre eux principalement par des liaisons de type α -1,6 avec un faible pourcentage de liaisons α -1,2, α -1,3 et α -1,4 [6], [25], [33], [34].

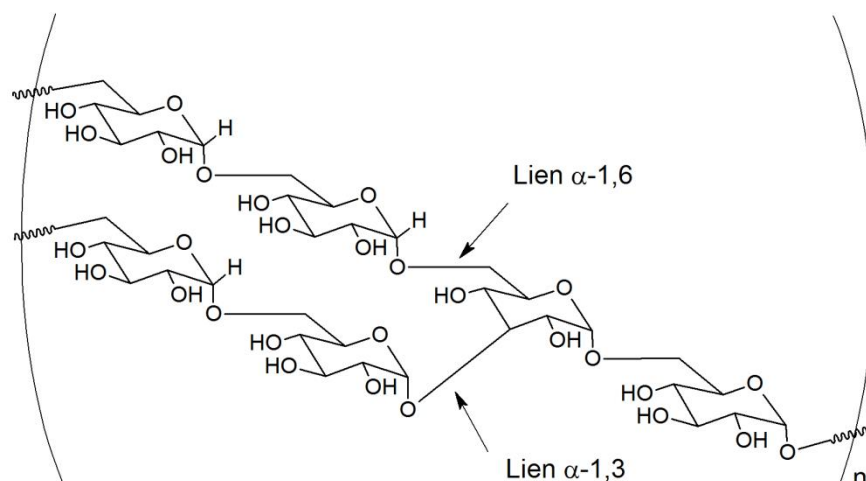


Figure 2-1: Représentation schématique du dextrane

La multitude des groupements alcools présents sur le monomère permet de mettre en place une chimie simple pour modifier, fonctionnaliser ou réticuler chimiquement les chaînes de dextrane. De plus, le groupement -OH peut facilement être utilisé dans des réticulations physiques. Enfin le dextrane est fortement biocompatible puisqu'il est obtenu à partir de l'action enzymatique de bactéries sur le saccharose, et peut être dégradé dans le corps humain par des enzymes, les dextranases, présentes au niveau de l'estomac, du foie, de la rate et du colon [33], [35]. Il est commercialisé sous différents poids moléculaires et avec différents degrés de ramification. Il est déjà utilisé depuis une cinquantaine d'années dans différentes applications cliniques comme l'expansion du volume plasmatique.

Enfin, notre choix s'est porté sur le dextrane car il est résistant à l'adsorption des protéines et à l'adhésion des cellules [8]. Il est donc un excellent candidat pour la réalisation d'un échafaudage cellulaire où les interactions cellules/échafaudages sont contrôlées avec précision par la présence de peptides d'adhésion et de facteurs de croissance.

2.1.4 Principales applications biomédicales

Les hydrogels sont des structures fortement hydratées qui s'apparentent aux tissus vivants naturels. Cette ressemblance les rend particulièrement attractifs pour un grand nombre d'applications biomédicales [14], [15]. Ils peuvent être produits sous de nombreuses formes allant des micros ou nanosphères à des hydrogels ou échafaudages cellulaires macroscopiques. En fonction de l'utilisation souhaitée, le choix de l'hydrogel doit être réalisé avec soin en tenant compte des propriétés physiques du gel (propriétés mécaniques, de dégradation et de gélification), de ses propriétés de transfert de masse et de ses propriétés biologiques (adhésion des cellules, signalisation, etc.) [36]. Pour être utilisé dans la recherche en biomédical, l'hydrogel doit être biocompatible. De plus, la porosité va jouer un rôle crucial sur son comportement. Il est donc important de maîtriser plusieurs paramètres tels que la taille des pores et leur interconnectivité.

On retrouve actuellement les hydrogels dans de nombreuses applications présentées dans le tableau suivant (Tableau 2-1).

Tableau 2-1 : Principales applications des hydrogels, exemples de matériaux utilisés et détails de l'application

Applications	Exemples de matériaux	Explications
Lentilles de contact	PHEMA [13]	Application historique des hydrogels puisque le premier hydrogel fut reporté dans la littérature à cette fin, les lentilles de contacts non-rigides (ou molles) utilisent encore aujourd'hui les hydrogels, presque 60 ans plus tard. L'hydrogel optimal doit regrouper les caractéristiques suivantes : être perméable à l'oxygène, éviter le dépôt de protéines, être confortable et léger, respecter les normes d'hygiène et posséder de bonnes propriétés optiques.
Pansement	Granugel® (Pectine,	Les hydrogels permettent de maintenir un

	<p>carboxymethylcellulose et propylene glycol) [37].</p> <p>Intrasite Gel® (carboxymethylcellulose et propylene glycol modifié) [38].</p>	<p>environnement hydraté qui accélère le processus de guérison dans le cas des blessures profondes. Ils peuvent absorber et retenir l'exsudat et les toxines et isoler les plaies des bactéries extérieures [39]. Ils peuvent également être combinés avec des traitements contre les infections ou la revascularisation des tissus [40], [41].</p>
Produits d'hygiène	<p>SAP (« <i>Super absorbant products</i> »), à base d'acrylamide ou d'acrylate. Utilisés pour la première fois dans les couches en 1982 par Unicharm au Japon [42].</p>	<p>Les principaux hydrogels utilisés dans l'hygiène sont les gels super absorbants. On les retrouve par exemple dans les protections féminines et les couches. Pratiques et confortables car ils sont jetables et retiennent efficacement les liquides. Le développement industriel de ces produits a connu un essor important au cours des dernières décennies avec un impact économique considérable. Aujourd'hui, face à la quantité considérable de déchets produits (un enfant utilise en moyenne 6 couches par jour jusqu'à l'âge de 30 mois, créant plus de 1000 m³ de déchets par an) des solutions plus écologiques sont activement recherchées [43].</p>
Livraison de molécules bioactives	<p>Cervidil® depuis 1995 (polyethylene oxide/urethane) [44].</p>	<p>La structure poreuse des hydrogels est particulièrement intéressante pour la livraison de molécules bioactives car elle permet un chargement et une délivrance contrôlée des molécules dans le corps. Cela permet d'obtenir une forte concentration locale de la molécule bioactive pendant une longue période de temps contrairement aux médicaments administrés par voie orale ou par piqûre. De plus, des</p>

		<p>molécules thérapeutiques plus fragiles comme de l'ADN thérapeutique ne supportent pas une administration orale par exemple. La molécule peut être relâchée selon plusieurs mécanismes : la diffusion contrôlée, un gonflement contrôlé, une réponse environnementale du gel, une chimie contrôlée ou enfin une dégradation du gel contrôlée [19], [34], [45], [46].</p>
Revêtement des implants ou prothèses	Dextrane [47]	<p>Les hydrogels sont utilisés pour remplir les espaces lors d'opérations chirurgicales. Ils agissent comme une glue biologique et permettent d'isoler et d'empêcher un contact direct entre les implants et les tissus environnants. Ils favorisent ainsi une meilleure intégration des implants ou prothèses dans le corps en évitant la formation d'une capsule fibrotique. Pour augmenter leur efficacité, ils peuvent être combinés avec des antibiotiques, des molécules actives favorisant l'angiogenèse ou limitant la réponse immunitaire [47]–[52].</p>
Remplissage ou transport de cellules et tissus	Alginate [53]	<p>Il s'agit d'une des applications les plus récentes des hydrogels, souvent surnommé génie tissulaire. Les hydrogels sont utilisés comme support poreux pour l'adhésion et la croissance des cellules. Ils peuvent être un simple échafaudage ou incorporer des facteurs biologiques qui vont guider et orienter la croissance des cellules, on parle alors de biofonctionnalisation [6], [24], [54]–[56]. L'objectif est de s'approcher au maximum des conditions de croissance des cellules dans leur milieu naturel pour améliorer la guérison de</p>

		<p>plaies. Ainsi, ils peuvent être utilisés pour (i) livrer des cellules ou des tissus préformés à des sites de blessures ou (ii) pour remplir des espaces créés par les opérations chirurgicales, permettant ainsi aux cellules de mieux recoloniser cette zone. En fonction de l'application, deux stratégies peuvent être envisagées : soit les cellules sontensemencées sur les gels poreux préfabriqués puis elles vont diffuser à l'intérieur soit les cellules sont encapsulées pendant le processus de gélification [56], [57]. Afin que les cellules survivent à l'intérieur de l'hydrogel, celui-ci doit permettre une bonne circulation des nutriments et des signaux intercellulaires ainsi qu'une élimination efficace des déchets [58], [59].</p>
--	--	---

2.2 Techniques de bioconjugaison

Afin d'améliorer les performances des hydrogels dans certaines des applications vues précédemment, les polymères vont être de plus en plus fréquemment décorés par des peptides ou des protéines [17]. Au cours des dernières décennies, deux champs distincts de recherche, la chimie des matériaux et des polymères d'un côté et la biologie du vivant et des protéines de l'autre, se sont ainsi intimement combinés. On parle alors de matériaux bioconjugués ou biofonctionnalisés. Les avantages de ces matériaux sont multiples : biocompatibilité accrue, meilleure intégration dans le corps, meilleure dégradation, et surtout de bien meilleurs résultats grâce à une meilleure imitation des conditions naturelles.

Pour fonctionnaliser les hydrogels, il existe différentes stratégies qui dépendent bien évidemment de l'application souhaitée ainsi que de la fragilité et du nombre de peptides ou protéines utilisés [60]. La fonctionnalisation peut avoir lieu une fois l'hydrogel formé ou avant, sur un polymère encore non réticulé et peut être de nature physique ou chimique. L'adsorption physique des protéines une fois le produit formé permet généralement un recouvrement plus important de la surface disponible. Cependant la simple adsorption est souvent accompagnée d'une relâche brutale dès l'incorporation dans le corps. Pour un effet prolongé, qui permet une régulation du comportement cellulaire dans le temps, une conjugaison chimique est souvent souhaitée. On trouve ici encore de très nombreuses solutions possibles à adapter à ces besoins, allant d'un greffage non spécifique (irradiation aux rayons gamma, traitement de surface au plasma, réaction concernant des groupements très fréquents tels les amines ou les alcools), à un greffage très spécifique et orienté (utilisation d'enzyme, de peptides d'affinités, réactions orthogonales après modifications chimiques ou utilisation d'acides aminés non naturels) [61]. Si un greffage spécifique et orienté va diminuer grandement le nombre de peptides ou de protéines immobilisés à la surface du polymère, il augmente en revanche leur bioactivité. En effet, le greffage chimique est une étape très délicate si on ne veut altérer ni la forme ni la fonction de la molécule [62]. Pour cette raison, on choisit parfois d'utiliser des intermédiaires peptidiques courts et facilement produits lorsque l'on souhaite immobiliser des protéines complexes et très chères comme des facteurs de croissance. Deux types de réactions ont été utilisées dans ces travaux et sont donc détaillées dans la suite de cette revue.

2.2.1 Chimie click

2.2.1.1 Description

Les réactions de cycloadditions de Huisen forment un ensemble de réactions particulièrement intéressantes pour la bioconjugaison car elles sont efficaces pour une vaste gamme de conditions. Rapides, avec de hauts rendements dans des conditions douces (pH neutre, température ambiante), elles sont bioorthogonales, c'est-à-dire que les réactifs ne réagissent qu'entre eux et pas avec les autres groupements disponibles dans leur environnement. Elles permettent ainsi un attachement contrôlé, orienté et reproductible de la protéine [63], [64]. Pour ces raisons, on les surnomme fréquemment réactions de « chimie click », image représentant deux réactifs qui se clipsent rapidement l'un à l'autre.

Parmi ces réactions de cycloaddition, une est particulièrement utilisée : il s'agit de la réaction entre un alcyne et un azide qui mène à la formation d'un triazole. Cette réaction se déroulait originalement à des températures très élevées et donnait un mélange d'isomères 1,4 et 1,5 (Figure 2-2). Puis Rostovtsev et ses collaborateurs ont découvert que du cuivre (I) permettait de catalyser la réaction à température ambiante et d'obtenir sélectivement le régioisomère 1,4 avec un processus excessivement simple pour des rendements très élevés (Figure 2-2) [65]. Les sources de Cuivre (I) possibles sont nombreuses mais la solution la plus utilisée est de réduire *in situ* des ions de cuivre (II) avec des réducteurs tels que l'acide ascorbique ou le sodium ascorbate. La réaction se complète alors entre 6 et 36 heures et peut se dérouler dans de nombreux solvants, comme l'éthanol ou l'eau. De plus elle résiste à des valeurs de pH entre 4 et 12, ce qui la rend extrêmement robuste et fiable d'où l'engouement qu'elle suscite [65]–[71].

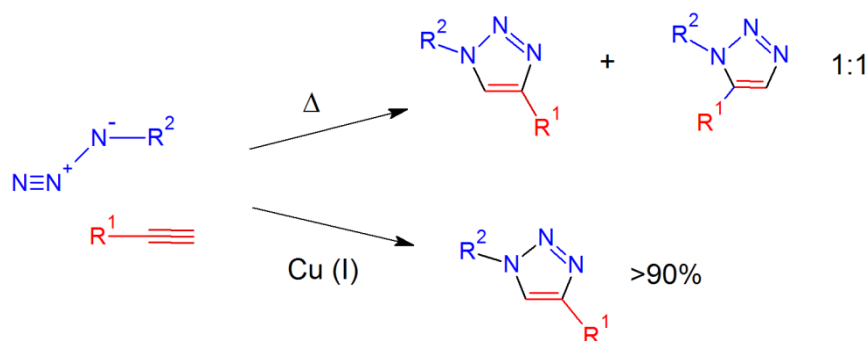


Figure 2-2 : Schéma de la cycloaddition alcyne/azide avec et sans catalyse au cuivre (I)

2.2.1.2 Limites

Cependant cette réaction présente quelques limitations. Premièrement, elle utilise une catalyse au cuivre (I) qui est cytotoxique. La réaction ne peut donc pas être utilisée *in vivo*, et nécessite une purification précise pour enlever toute trace de cuivre avant d'être utilisée en médecine. Plusieurs laboratoires travaillent actuellement sur des composés « activés » qui permettent de s'affranchir de la catalyse au cuivre sans avoir à chauffer afin de réaliser cette cycloaddition *in vivo* [72]–[74]. Deuxièmement, aucun des groupements réactifs n'est présent naturellement sur les acides aminés, il faut donc ajouter une étape supplémentaire de modification du peptide ou de la protéine. Or cette étape peut se révéler très compliquée et limitante dans le cas de protéines délicates.

2.2.2 « Thiol click »

2.2.2.1 Description

Une autre famille de réaction est très largement utilisée en bioconjugaison : la chimie du thiol. Parfois surnommées chimie « thiol click » pour ses similarités avec les cycloadditions de Huisen, ces réactions sont également rapides, orthogonales et s'adaptent à une vaste gamme de conditions [75]–[78]. Cette famille de réactions est particulièrement intéressante car elle se base sur la chimie du thiol, naturellement présent dans les cystéines. Or cet acide aminé est suffisamment rare dans les protéines ($< 3\%$) pour que le site de la réaction soit généralement unique et contrôlé [79]. Chez les protéines ne contenant pas de cystéine, l'ajout artificiel d'une cystéine (par génie génétique) dans la chaîne peptidique permet également d'obtenir un thiol disponible pour la réaction de greffage. La cystéine est généralement insérée en bout de chaîne,

lors de la synthèse du peptide, soit en N-terminal soit en C-terminal, ce qui permet d'orienter facilement le greffage. Ces réactions présentent donc le considérable avantage d'utiliser des protéines et peptides pouvant être directement produits biologiquement car tous les acides aminés sont naturels.

Plusieurs groupes sont connus pour réagir avec les thiols à pH neutre. On trouve deux grandes catégories de réactions : d'une part les réactions entre les thiols et les alcènes, d'autre part les échanges au sein de ponts disulfures. La première, aussi appelée alkylation du thiol ou addition de Michael, mène à des composés généralement plus stables car elle est irréversible contrairement à la deuxième, réversible en présence de nouveaux thiols (Figure 2-3) [77].

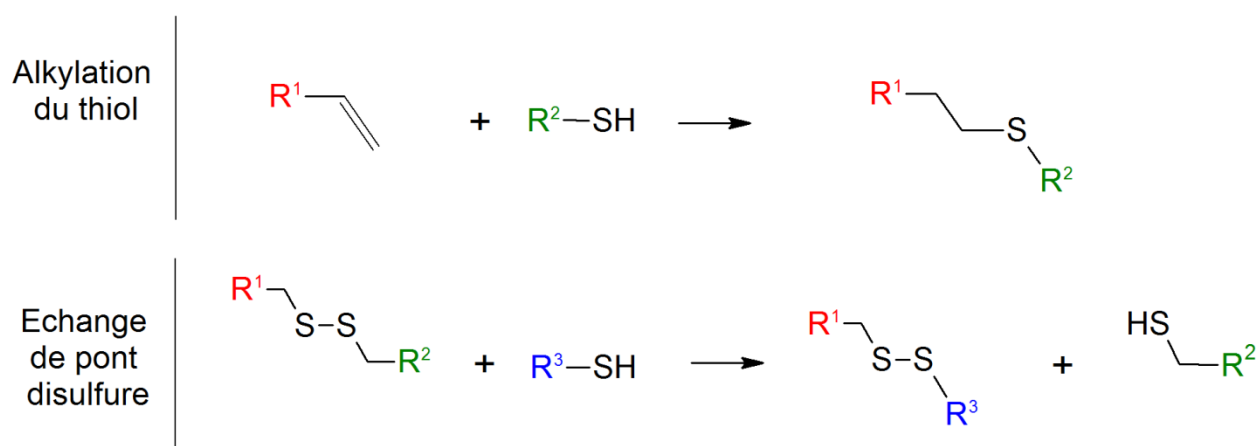


Figure 2-3 : Schéma des réactions classiques de chimie thiol-click

2.2.2.2 Limites

Cependant un des principaux problèmes de cette stratégie est l'oxydation inévitable de la fonction thiol dans l'air ou dans des solutions aqueuses. Elle peut avoir lieu soit de manière réversible par la formation de ponts disulfures, soit de manière irréversible par la dégradation du composé en acide sulfinique ou sulfonique (Figure 2-4, [80]). Pour cette raison, les peptides contenant des thiols doivent être manipulés et stockés avec précaution pour obtenir des résultats optimaux lors des réactions de greffages. Pour les plus enclins à l'oxydation, cela peut aller jusqu'à de lourdes procédures et l'utilisation d'équipements spécialisés comme des solutions dégazées et des atmosphères inertes (chambres anaérobiques). Il est généralement recommandé de les stocker sous forme lyophilisée sous argon à -80°C et d'éviter le plus possible les cycles de

congélations/décongélations. Toutes ces précautions alourdissent considérablement le travail des chercheurs surtout dans les phases de recherche préliminaires où les travaux sont effectués à de nombreuses reprises avec de petites quantités de peptides thiolés.

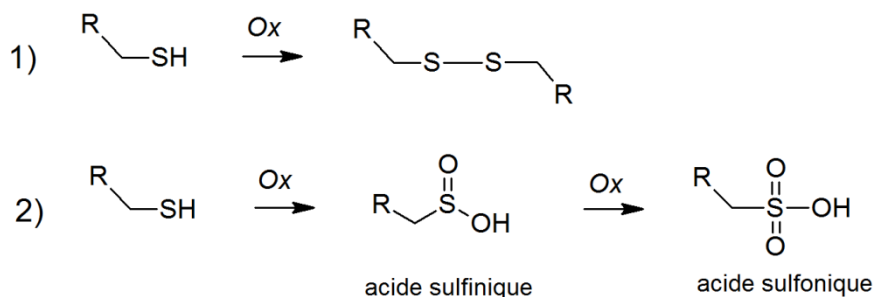


Figure 2-4 : Produits d'oxydation du groupement thiol

Malgré toutes les précautions, une oxydation est inévitable. Pour continuer à utiliser ces composés tout en maximisant les rendements de greffage, plusieurs stratégies de réduction des thiols ont été développées. La plus communément utilisée consiste à incuber le peptide ou la protéine dans une solution concentrée en agent réducteur contenant un sulfhydre comme le dithiothreitol (DTT) ou le β -mercaptoethanol (BME) puis de retirer l'excès de réducteurs par dialyse ou par chromatographie d'exclusion par la taille avant la conjugaison. Récemment de nouveaux composés réducteurs, des phosphines solubles dans l'eau, ont suscité un intérêt grandissant dans la réduction des ponts disulfures car ils facilitent les phases de purification avant la conjugaison et sont particulièrement efficaces pour la réduction [60], [81], [82]. Le composé phare de ces nouvelles molécules est le tris(2-carboxyethyl)phosphine ou TCEP. Pour les peptides s'oxydant très rapidement, ou pour des applications nécessitant un retrait plus précis du TCEP des stratégies particulières ont été développées comme des gels d'agarose dans lesquels le réducteur est immobilisé de façon covalente. Après incubation en présence de ces billes d'agarose, une simple centrifugation permet de récupérer la solution de notre peptide réduit sans agent réducteur et sans résidus d'agarose (ref). En 2017, Zwyssig et al, ont développé une approche similaire mais qui s'appuie sur des nanoparticules magnétiques de cobalt avec du TCEP immobilisé à la surface. Cette approche minimise les pertes dues à l'absorption souvent rencontrées avec les gels d'agaroses [83]. Henkel *et al.* puis Kantner ont tous deux reporté des approches élégantes pour désactiver le TCEP *in situ* avec respectivement de l'acide benzoïque

puis du diazido-polyéthylène glycol, ce qui permet de contourner le problème du retrait de TCEP [84], [85].

2.3 Les peptides et protéines

2.3.1 Définition

Les peptides sont des hétéropolymères composés d'acides aminés reliés entre eux par des liens appelés liens peptidiques. Ces liens s'effectuent entre le groupement carboxylique d'un acide aminé et le groupement amine de l'acide aminé suivant dans la chaîne, selon une réaction de condensation (Figure 2-5). La distinction entre les peptides et les protéines est un peu vague et se fait généralement sur la taille de la chaîne d'acides aminés. La longueur communément admise pour un peptide varie de 2 à quelques dizaines de résidus. En termes de masse moléculaire, une molécule qui ne dépasse pas les 6000 Da est généralement considérée comme un peptide, au-delà de cette taille on parle plutôt de protéines [86].

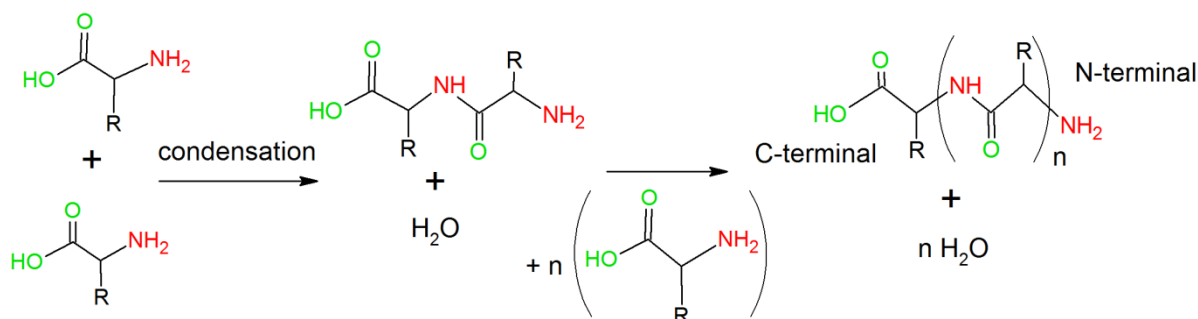


Figure 2-5 : Réaction de condensation entre un acide carboxylique et une amine à l'origine de la formation d'un lien peptidique

Les peptides et les protéines jouent tous deux des rôles essentiels dans de nombreux processus biologiques et physiologiques chez les organismes vivants [87]. Ils agissent par exemple comme des hormones, des neurotransmetteurs ou autres signaux intercellulaires, des anticorps (indispensables à notre système immunitaire pour protéger l'organisme contre les corps

étrangers), des transporteurs de substances à travers certaines membranes biologiques ou des molécules structurantes retrouvées entre autres dans le cytosquelette des cellules [88].

Les peptides et protéines ont plusieurs niveaux d'organisation structurale. La structure primaire correspond à l'enchaînement des acides aminés. Cette structure se replie ensuite dans l'espace pour former des structures tridimensionnelles locales : on parle alors de structure secondaire (Figure 2-6). Enfin la chaîne se replie intégralement dans l'espace pour former la structure tertiaire. Cette structure est intimement liée à l'activité même de la protéine, lorsque la structure est modifiée la protéine peut perdre partiellement ou totalement son activité, ce qui explique l'enjeu de l'immobilisation des protéines. Lorsque plusieurs chaînes polypeptidiques sont impliquées dans la formation d'une seule et même protéine, on parle alors de structure quaternaire [89].

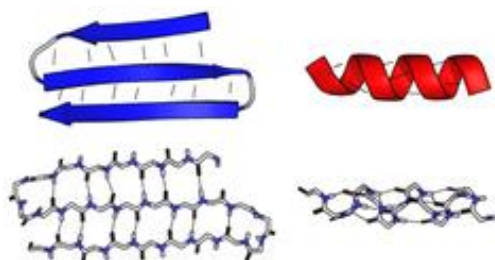


Figure 2-6 : Représentation schématique de structures secondaires courantes : les feuillets β en bleu à gauche, une hélice α en rouge à droite. Image adaptée de Creative Commons Attribution 4.0 International.

Bien que le repliement des protéines soit codé par la structure primaire, la conception de protéines artificielles est une tâche extrêmement compliquée car le repliement est encore mal compris et mal maîtrisé. Pour cette raison, l'utilisation de peptides, plus courts et moins complexes que les protéines, est souvent favorisée dans les bioconjugués. De plus, si la conception de nouvelles protéines est encore à la limite de nos capacités, de nouveaux « peptides », s'inspirant de la nature, voient le jour et permettent d'améliorer les propriétés existantes voire d'en obtenir de nouvelles [90]–[92]. On parle alors de design « *de novo* » de

peptides. Ainsi, certains domaines actifs de protéines ont un fonctionnement bien compris et des limites bien marquées. Ils sont donc maintenant produits sous forme de peptides, moins chers et plus stables mais permettant d'obtenir les mêmes résultats. C'est le cas par exemple du peptide RGD, retrouvé dans de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire qui est responsable de l'adhésion des protéines à l'intégrine [57], [93]–[97]. D'autres peptides ont également été conçus pour s'auto-assembler afin de jouer un rôle structurel dans la formation d'un biomatériau ou pour être utilisés comme système de greffage, espaceurs et orienteurs de protéines plus complexes.

2.3.2 Les peptides superhélices

Dans la conception de peptides auto-assembleurs, une des structures secondaires locales a particulièrement été étudiée et utilisée. Il s'agit des hélices α . Plusieurs hélices peuvent s'assembler pour former ce qu'on appelle une superhélice ou un peptide "*coiled-coil*" [98], [99].

Dans les protéines naturelles, ce motif d'hélice α est présent dans près de 10% des protéines eucaryotes [100]. Il participe par exemple à la formation de structures larges et rigides (kératine des cheveux et des écailles, fibrine des caillots sanguins, etc.), on le retrouve aussi dans les protéines du cytosquelette, les protéines motrices, les systèmes de reconnaissance moléculaire et même parfois dans la formation de canaux ioniques [101]–[104]. La synthèse « *de novo* » de ces peptides est désormais possible grâce à une bonne compréhension des impliqués dans la structure tridimensionnelle. Chaque hélice est généralement composée de 2 à 6 répétitions d'un motif de 7 acides aminés, notés $(gabcdef)_n$ où n représente le nombre de répétitions. Le peptide forme une hélice avec 3,6 acides aminés par tour de manière à ce que l'acide aminé en position $(i+7)$ soit toujours au-dessus de l'acide aminé (i) . Les résidus e et g sont polaires et souvent de charges opposées. Ils participent au maintien de la structure grâce à des interactions électrostatiques intra et inter hélices. Ce sont eux qui jouent un rôle prépondérant sur les tendances à homo ou hétérodimériser des hélices. En position a et d , on retrouve des résidus apolaires aliphatiques qui assurent la formation d'un cœur hydrophobe solide et maintiennent ainsi la stabilité de l'hélice. Ce sont généralement les seuls acides aminés de la structure à être hydrophobes. Tous les autres, hydrophiles, facilitent la solubilité du peptide dans l'eau. a et d vont également jouer un rôle prépondérant dans la formation du dimère en formant un motif appelé « *knobs-into-holes* ».

C'est-à-dire que le résidu a d'une hélice va s'insérer dans une cavité formée par les résidus a', d', e' et a' de l'autre hélice assurant ainsi une forte cohésion entre les deux hélices par la présence d'interactions hydrophobes interhélices. A cela s'ajoute des liaisons hydrogènes qui finissent d'assurer la cohérence de la structure.

Ces peptides auto-assembleurs ont récemment connu un regain d'intérêt comme un outil puissant dans le développement des bioconjugués. D'une part, ils peuvent jouer un rôle structurant : ils sont utilisés par exemple pour former des fibres, des hydrogels, des dendrimères. D'autre part, ils peuvent faciliter le greffage d'une molécule complexe (telle un facteur de croissance) à une structure rigide comme des nanoparticules, un hydrogel, une surface [12], [105]–[109].

Au cours des dernières années, l'hétérodimère E/K, complexe formé par l'enchevêtrement de deux hélices alpha appelées *Ecoil* et *Kcoil*, a été extensivement étudié (Figure 2-7). Les peptides sont basés sur 3 à 5 répétitions des séquences suivantes (EVSALEK) et (KVSALKE) ou des analogues, principalement dans la région « abcd » (VSAL, VAAL, IAAL, LAAL ou IAAI) [101], [107], [108], [110], [111]. Ce complexe est particulièrement intéressant car chaque peptide est globalement neutre, le cœur hydrophobe est solide, l'hétérodimérisation est favorisée par rapport à l'homodimérisation et les peptides sont solubles dans l'eau [98]. Les peptides E et K ont été conçus pour former un hétérodimère à pH neutre et en présence de faibles concentrations de chacun des deux peptides. On les note fréquemment E_n et K_n , avec n le nombre de répétitions d'heptades. Des travaux sur cet hétérodimère ont permis de contrôler efficacement l'immobilisation et la relâche de facteurs de croissance. Des chimères E5-facteur de croissance recombinant sont ainsi immobilisées sur des polymères où le peptide K5 a préalablement été attaché [50], [112]. La stratégie de conjugaison reposait dans ce cas sur l'ajout d'une cystéine en bout de chaîne sur les peptides K5 synthétisés chimiquement (5). L'inconvénient du peptide K5 est qu'il a tendance à homodimériser, accélérant considérablement l'oxydation de la fonction thiol en bout de chaîne. Les deux thiols ainsi rapprochés forment alors un pont disulfure. La chimère E5-VEGF était quant à elle produite biologiquement.

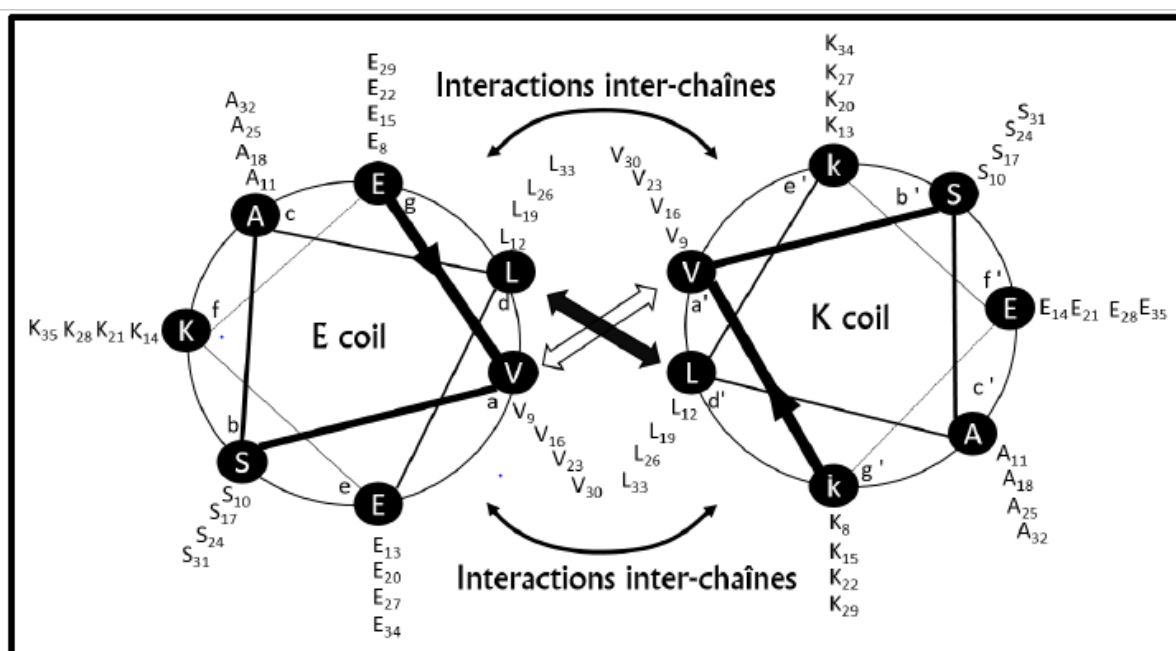


Figure 2-7 : Représentation schématique de l'hétérodimère *Kcoil/Ecoil* (image de la thèse de Nesrine Riahi 2017 [113])

2.3.3 Méthodes de synthèse

Avec l'essor des biomatériaux et l'apparition de nouveaux traitements s'appuyant sur des anticorps et des facteurs de croissance, une demande croissante de la production de protéines et de peptides a vu le jour. Les méthodes de synthèse ont donc, elles aussi, fait l'objet de nombreuses études afin d'améliorer les processus et d'augmenter les rendements. On connaît actuellement deux grandes catégories de productions : la synthèse chimique et la synthèse biologique.

Parmi les synthèses chimiques on trouve : la synthèse chimique en solution (SLS), la synthèse de peptide en phase solide (SPPS) et la ligation chimique native (NCL). La synthèse chimique en solution est une synthèse en phase organique délicate qui utilise de nombreux groupements protecteurs pour que seuls les groupements fonctionnels devant réagir soient disponibles. Elle présente comme toute synthèse chimique plusieurs inconvénients : un manque de chiralité, une incapacité de purifier et de caractériser le peptide en cours de synthèse et une faible solubilité des produits dans les solvants organiques. La réaction est donc lente et incomplète et par conséquent

beaucoup de sous-produits sont générés (chaînes plus courtes) et les pertes sont considérables. Cette approche est donc très peu utilisée dans la synthèse de peptides à haut poids moléculaire [88].

La synthèse de peptide en phase solide est la méthode actuellement la plus utilisée. Elle remonte au début des années 1960. Le principe est assez similaire et consiste à attacher un acide aminé à la fois sur la chaîne déjà formée [114]. La différence repose sur le fait que le premier acide aminé est lié à un support insoluble par une forte liaison (c.-à-d., résistante à tous types de composés chimiques) ; ceci assure que le peptide reste greffé sur le support solide pendant les différentes étapes d'assemblage. A chaque cycle de greffage, l'acide aminé en bout de chaîne est sélectivement déprotégé et un résidu supplémentaire est introduit. Chaque réaction est suivie d'une étape de filtration qui permet d'éliminer l'excès de réactifs et les produits secondaires dissous dans le solvant, et ce jusqu'au dernier acide aminé. Enfin, une dernière étape de clivage détache le peptide du support (Figure 2-8). L'approche présente plusieurs avantages : rendements plus élevés, moins de manipulations, durée écourtée et réduction significative des pertes. Son développement a valu le prix Nobel de chimie à Merrifield en 1984. Si elle permet d'obtenir de plus longs peptides que la SLS elle reste limitée à une quarantaine de peptides. C'est la raison pour laquelle la ligation chimique a été investiguée. Elle consiste à assembler plusieurs peptides de plus petite taille pour en obtenir de plus longs. Il s'agit donc d'une méthode complémentaire aux précédentes [115].

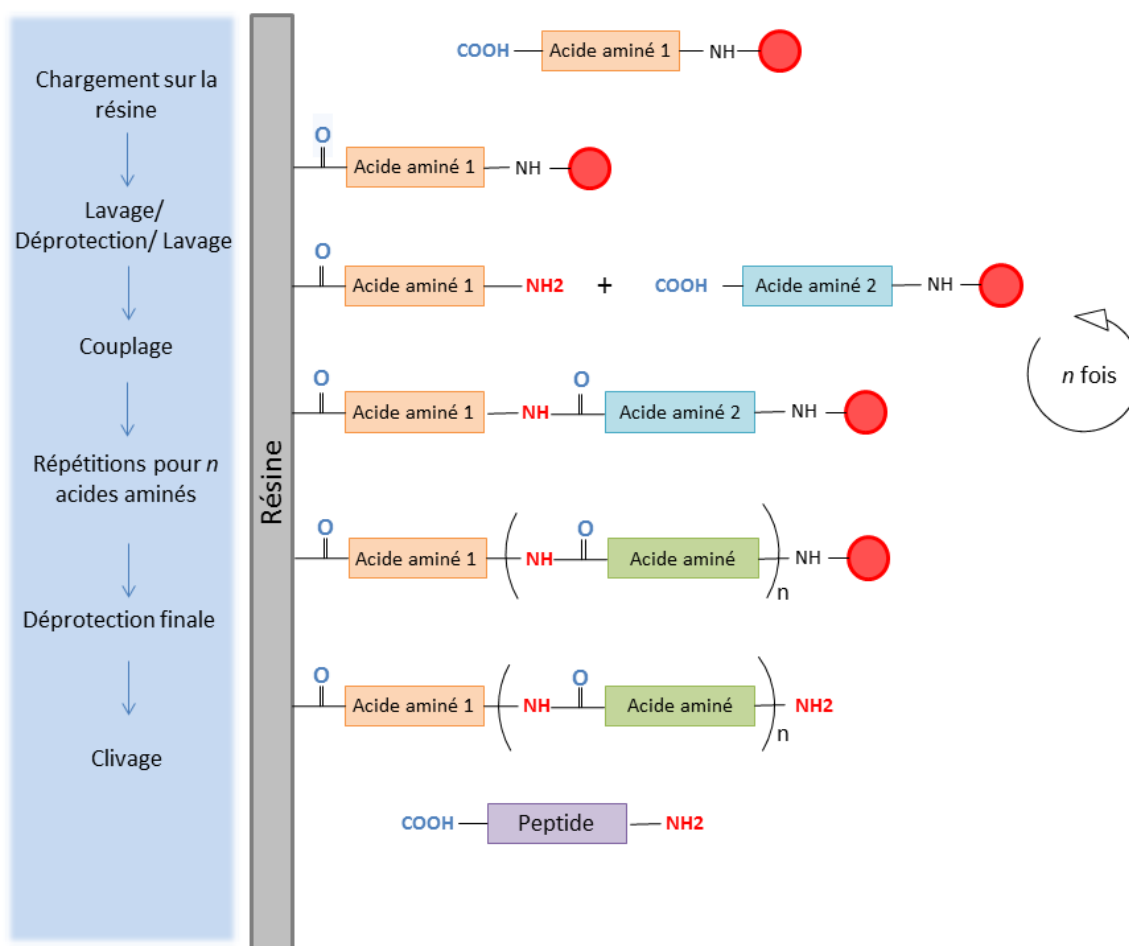


Figure 2-8 : Principales étapes d'une synthèse de peptide en phase solide ou SPPS

Ces méthodes de synthèses chimiques sont très dispendieuses, en raison du grand nombre de pertes occasionnées et de la durée des synthèses. Cependant elles présentent l'avantage de pouvoir ajouter un acide aminé non naturel sur une chaîne et ainsi d'éviter une étape de réaction chimique. Cela permet d'obtenir des fonctions uniques disponibles pour des réactions de greffage comme un azide sur l'azidohomoalanine (AHA), une alanine légèrement transformée qui possède un azide dans sa chaîne latérale (Figure 2-9).

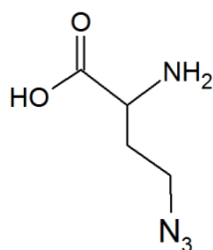


Figure 2-9 : Structure de l'acide aminé non-naturel azido-homoalanine

Même si de nombreux progrès ont été faits sur la synthèse chimique, en particulier la synthèse en phase solide, la synthèse biologique reste le standard pour la production de masse de protéines en raison de son prix fort avantageux. De plus les protéines sont ainsi plus proches des protéines naturelles puisqu'elles subissent des modifications post-traductionnelles qui ne sont pas présentes sur les protéines issues de synthèse chimique. La production biologique permet également de s'affranchir des problèmes de repliement des protéines. Elle permet donc de produire en grande quantité, avec une pureté élevée, des peptides ou des protéines beaucoup plus longues et complexes que ne le permet la synthèse chimique. Elle nécessite cependant un matériel important pour la production et la purification de la protéine avant son utilisation.

CHAPITRE 3 DÉMARCHE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT

Mon projet de maîtrise s'inscrit dans la continuité de plusieurs projets menés au cours des dernières années dans le laboratoire de Gregory De Crescenzo. En 2016, Noel et al. développent un revêtement de surface à base de dextrane en co-immobilisant un facteur de croissance par l'intermédiaire du couple *Ecoil/Kcoil* (VEGF) et un peptide d'adhésion (RGD) [50]. Ce revêtement, destiné aux surfaces des implants vasculaires, améliore l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales à la surface de l'implant. L'année suivante, Riahi et al. fabriquent un hydrogel poreux aux caractéristiques mécaniques intéressantes, dans lequel du RGD immobilisé va permettre l'adhésion des cellules [116]. Un début de migration et de prolifération semble même être observé. Mon travail de recherche visait à regrouper ces deux résultats en un seul et même produit : un hydrogel permettant l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire grâce à la co-immobilisation du peptide d'adhésion RGD et de facteurs de croissance par l'intermédiaire du couple *Ecoil/Kcoil*. Comme dans l'hydrogel de Nesrine Riahi, la stratégie choisie consiste à d'abord fonctionnaliser les chaînes de dextrane avec un des peptides (soit le RGD, soit le *Kcoil*). Ensuite, les chaînes fonctionnalisées sont réticulées, avec du dextrane nu, pour former un hydrogel. Il est ainsi possible de jouer sur les différents ratios séparément.

Jusqu'à présent, la réaction qui a été utilisée pour immobiliser les peptides aussi bien sur la surface que sur le gel, est une réaction de chimie thiol-click. Le dextrane est tout d'abord modifié par du divinylsulfone (DVS) qui réagit à pH 10 avec les groupements alcools. Ensuite, les groupements vinylsulfone restants peuvent réagir avec les thiols présents sur les peptides. Le RGD et le *Kcoil* ont donc été produits avec des cystéines terminales et disposent d'un unique thiol en bout de chaîne. Or cette fonction thiol s'oxyde extrêmement rapidement, en particulier dans le cas du *Kcoil* car il a tendance à homodimériser. Le premier problème auquel je me suis confronté est que cette réaction ne pouvait plus être utilisée telle quelle pour mon projet. La quantité de *Kcoil* nécessaire pour fonctionnaliser un gel est bien supérieure à celle nécessaire pour une surface. De plus, malgré une conservation à -80 °C, les stocks de *Kcoil* étaient déjà grandement oxydés. Le rendement de cette réaction était donc trop faible et il n'était économiquement plus envisageable de garder les mêmes conditions.

La première partie de mon travail a donc consisté à améliorer le rendement de cette réaction de chimie thiol click. La première solution proposée a été de réduire le peptide en même temps que la réaction de greffage, avec du TCEP. Des résultats intéressants nous ont conduits à élargir nos recherches à plusieurs réactions de greffages et à comparer brièvement différents agents réducteurs entre eux. Ces travaux ont mené au manuscrit « *Adequate reducing conditions enable conjugation of oxydized peptides to polymers by one-pot thiol click chemistry* » soumis dans Bioconjugate Chemistry et présenté dans le chapitre 4 de ce document.

L'étude de la réduction des thiols ayant pris une ampleur inattendue sur la durée limitée de ma maîtrise, j'ai décidé de développer en parallèle une deuxième approche qui consistait à remplacer la réaction vinylsulfone/thiol par une cycloaddition de Huisen azide/alcyne. Pour cela, nous nous sommes procuré commercialement des peptides *Kcoil* et RGD dont la chaîne ne se terminait plus par une cystéine mais par un acide aminé non-naturel, l'azidohomoalanine. Les peptides disposant ainsi d'un azide disponible pour la réaction, il nous a fallu trouver une solution pour insérer une fonction alcyne sur le dextrane, puis optimiser la réaction azide/alcyne. Ces travaux sont présentés dans le chapitre 5 de ce mémoire.

Enfin, l'avancée de la deuxième approche a permis de commencer à travailler sur des hydrogels. Cela s'est malheureusement fait assez tardivement, je n'ai donc pas pu atteindre l'intégralité de mes objectifs. La démarche envisagée consistait à :

- 1) Reproduire les travaux de Nesrine Riahi, en remplaçant uniquement la réaction de greffage du RGD afin de valider que la nouvelle chimie n'affecte pas le comportement des cellules, ni la structure globale du gel.
- 2) Ajouter du dextrane-*Kcoil* dans la formulation du gel, et vérifier que cela n'a pas d'incidence sur l'adhésion, la prolifération et la migration des cellules lorsque celles-ci sont incubées dans un milieu complet avec sérum et facteurs de croissance.
- 3) Mettre en évidence l'effet de VEGF sur les cellules, lorsqu'immobilisé (grâce à son étiquette *Ecoil*) à l'intérieur du gel.
- 4) Optimiser la quantité de VEGF et de RGD immobilisés.

- 5) Étendre ces résultats à de nouvelles lignées cellulaires et éventuellement à différents facteurs de croissance.

En parallèle, une technique d'histologie a été développée pour observer les cellules à l'intérieur du gel. Cependant, si les cellules adhèrent correctement au gel, leur migration et prolifération à l'intérieur du gel n'ont jamais pu être reproduites que ce soit avec les nouveaux gels ou avec les anciens. Un véritable retour en arrière sur la composition du gel a donc été effectué. L'intégralité des travaux concernant les hydrogels est présentée dans le chapitre 6 de ce mémoire.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : ADEQUATE REDUCING CONDITIONS ENABLE CONJUGATION OF OXIDIZED PEPTIDES TO POLYMER BY ONE POT THIOL CLICK CHEMISTRY

4.1 Présentation de l'article

La première réaction de bioconjugation envisagée a été une réaction de chimie « thiol click ». Cette réaction facile à mettre en œuvre a déjà été appliquée avec succès sur des surfaces ou sur des polymères en trois dimensions avec des peptides simples par d'anciens membres du laboratoire [50], [116]. Malheureusement, dans le cas du *Kcoil*, l'oxydation très rapide du peptide ainsi que son prix élevé ne permettent plus d'utiliser cette réaction qui demanderait des quantités trop importantes de réactifs pour obtenir la quantité greffée souhaitée. Aucune des différentes solutions existantes aujourd'hui pour traiter ce problème d'oxydation ne permet dans notre cas de répondre efficacement à cette problématique d'oxydation. Le *Kcoil*, chargé positivement, ne s'oxyde pas juste rapidement mais s'absorbe également très facilement sur toutes les parois. Il faut donc limiter au maximum les manipulations, les transferts de contenants, et toutes les étapes de purification afin de limiter les pertes par adsorption. Nous nous sommes donc penchés sur la faisabilité d'une réduction simultanée à la réaction de greffage. Trois agents réducteurs classiques : le 2-mercaptoethanol (BME), le dithirithiol (DTT) et le tricarboxylethylphosphine (TCEP) ont été comparés lors de différentes réaction « Thiol-click » courantes. Nous nous sommes par la suite concentrés sur la réaction vinylsulfone/thiol en présence de TCEP car cette combinaison semblait être la plus prometteuse.

4.2 Entête de l'article

ADEQUATE REDUCING CONDITIONS ENABLE CONJUGATION OF OXIDIZED
PEPTIDES TO POLYMERS BY ONE-POT THIOL CLICK CHEMISTRY

Gwendoline Tallec[‡], Celestine Loh[†], Benoit Liberelle[‡], Araceli Garcia-AC, Sung Vo Duy, Sebastien Sauve, Xavier Banquy[§], Frederic Murschel^{§,*} and Gregory De Crescenzo^{‡,*}

Bioconjugate Chemistry, October 16, 2018

4.3 Abstract

Thiol(-click) chemistry has been extensively investigated to conjugate (bio)molecules to polymers. Handling of cysteine-containing molecules may however be cumbersome, especially in the case of fast-oxidizing coiled-coil-forming peptides. In the present study, we investigated the practicality of a one-pot process to concomitantly reduce and conjugate an oxidized peptide to a polymer. Three thiol-based conjugation chemistries (vinyl sulfone (VS), maleimide and pyridyldithiol) were assayed along with three reducing agents (tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), dithiothreitol and β -mercaptoethanol). Seven out of the 9 possible combinations significantly enhanced the conjugation yield, provided that an adequate concentration of reductant was used. Among them, the co-incubation of an oxidized peptide with TCEP and a VS-modified polymer displayed the highest level of conjugation. Our results also provide insights into two topics that currently lack of consensus: TCEP is stable in 10 mM phosphate buffered saline and it reacts with thiol-alkylating agents at sub-millimolar concentrations, and thus should be carefully used in order to avoid interference with thiol-based conjugation reactions.

4.4 Keywords

Coiled-coil, oxidation, polymer biofunctionalization, thiol chemistry

4.5 Introduction

Considerable efforts have been put over the last decades into developing functional biomaterials based on bioconjugates for all fields of life sciences. Combining the most interesting properties of natural or synthetic polymers and peptides or proteins, bioconjugates may indeed provide a suitable solution for numerous applications. Their preparation currently remains the subject of many studies, with emerging strategies focusing on site-specific and bioorthogonal reactions to be carried out in mild conditions to preserve the biological activity and the integrity of the (bio)molecules of interest [1]. “Click” chemistry reactions have been increasingly developed in that endeavor, since they enable fast, controlled, oriented, reproducible and high-yield conjugation of chemically-delicate molecules [2],[3].

Solid-phase peptide synthesis enables the introduction of virtually any functional/reactive group into a peptide via the side-chain of an unnatural amino acid. New methods, such as native chemical ligation, also allow for the synthesis of increasingly long and complex peptide chains [4]. Nonetheless, biological production of peptides and proteins remains the gold standard, especially for mass production of complex proteins [5]. The sulfhydryl group that is borne by one natural amino acid, cysteine, has probably been the second most common functional group used for biomolecules crosslinking or conjugation [6]. It has been the target of an ever-increasing number of strategies based on “thiol-click” chemistry [7], [8]. Indeed, thiol(-click) chemistry can be applied to both biologically- and chemically-produced peptides/proteins and does not require chemical modification prior to conjugation. Furthermore, given that most proteins rarely display more than one free cysteine residue [9], the use of thiol groups often provides site-specificity and orientation. If need be, a cysteine residue can be introduced in the sequence of a recombinant protein to provide a single reactive site, usually at the N- or C-terminus [10], [11].

The intertwining of 2 or more α helices, or α -helical coiled-coil, is an ubiquitous motif found in proteins that has been extensively studied and is among the best-understood protein folds [12]. The rational design of de novo coiled-coil multimers usually comprises 2 to 6 repeats of a 7 amino-acid sequence, denoted (gabcdef)_n. Solvent-exposed polar residues occupy positions e and g, participate in intra- and interhelical polar/electrostatic interactions and largely determine the homo- vs heteromultimerization state. Nonpolar and mostly aliphatic residues are positioned in positions a and d to form an interhelical hydrophobic core that is the main determinant for stability [13]. Coiled-coil peptides have recently (re)gained keen interest as a powerful tool for the development of bioconjugates that may “solve problems across many different biological systems” [14]. To form fibers, hydrogels and dendrimers, or even to act as linker between subcellular structures, coiled-coil-forming peptides have been conjugated to polymers, recombinant protein fusions and nanoparticles [15]-[18]. In the past few years, a specific E/K heterodimeric coiled-coil complex has been extensively studied: the peptides sequences are based on 3 to 5 repeats of the (EVSALEK) and (KVSALKE) heptads or on close analogs that mostly differ in the abcd region (VSAL, VAAL, IAAL, LAAL or IAAI) [12], [14], [15], [17], [19]. This allowed for an increasing control over parallelism and oligomerization state [14], [17], as well as specificity and stability [12], [19], [20]. Our work on the coiled-coil-forming peptides

(KVSALKE)₅ and (EVSALEK)₅, or K₅ and E₅, has enabled the immobilization and controlled release of recombinant growth factor-E₅ chimeras on K₅-conjugated polymeric substrates [21], [22]. Our bioconjugation strategy has been based on thiol-ene chemistry using cysteine-tagged K₅ peptides that were either chemically synthesized or produced in bacteria [5].

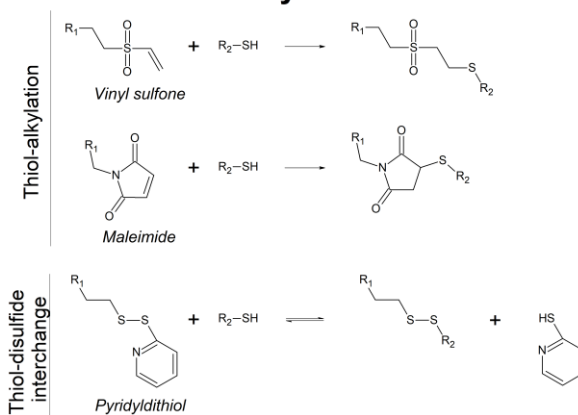
Any thiol-containing molecule loses reactivity over time, in air or in an aqueous solution, due to oxidation, be it to reversible disulfide or to irreversible sulfinic/sulfonic acid [23]. However, unlike most peptides, cysteine-tagged coiled-coil-forming peptides are highly prone to oxidation, which can be complete within a few hours in aqueous solutions even in mild conditions [24]. This could be explained by the propensity of the coil peptide to homodimerize, even if it is carefully designed with charged residues introduced to promote preferential heterodimerization via electrostatic repulsion [15]. Nonetheless, all thiol-containing peptides require careful handling for optimal results, which include cumbersome procedures and specialized equipment, such as degassed solutions and an inert atmosphere (see anaerobic chambers). Moreover, to prevent oxidation, most suppliers recommend storing peptides in lyophilized form under argon at -80°C and avoiding repeated freeze-thaw cycles, which strongly deviates from the genuine needs of early research in many laboratories that only require, and may afford, minimal amounts of peptides for experimentation.

The most commonly reported strategy to reverse the oxidation of cysteine residues is to incubate the peptide or protein in a concentrated solution of a sulfhydryl-containing reducing agent such as dithiothreitol (DTT) or β -mercaptoethanol (BME) then remove the excess reductant by size-exclusion chromatography or dialysis prior to conjugation [6]. The water-soluble reductant tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) has also been used in that endeavour and, according to many sources, can eliminate the need for lengthy purification before conjugation, in particular with maleimides [6], [25], [26]. For fast oxidizing peptides and/or for specific applications that inevitably require TCEP removal, including gel electrophoresis and protein labeling, agarose gels have been commercialized with the reductant being covalently immobilized to the matrix; they have even been successfully applied to coiled-coil-forming peptides [27]. After incubation, a simple centrifugation step is performed to pellet the slurry and collect a solution of reduced sample with no reductant. Interestingly, Zwyssig and colleagues presented in 2017 their work on magnetic cobalt nanoparticles functionalized with TCEP, an approach minimizing the loss of

sample due to adsorption that is often encountered with the agarose beads [28]. Henkel and colleagues followed by Kantner et al. reported, in 2016 and 2017, respectively, elegant approaches based on the quenching of TCEP in situ with 4-azidobenzoic acid and with diazido-polyethylene glycol, respectively, that circumvents the need for TCEP removal [29], [30]

Nonetheless, all these efforts neither resolve cysteine oxidation during conjugation, which may strongly affect yield, nor build consensus around whether non-sulfhydryl containing reductants interfere or are compatible with thiol chemistry. Indeed, the need to remove TCEP before thiol-ene conjugation remains a topical bone of contention [31], [32]. In an effort to build consensus around reductant compatibility with thiol(-click) chemistry, we here investigated the thiol-based covalent grafting of a peptide to a polymer in highly unfavorable conditions. More precisely, and to the extent of our knowledge, we carried out a set of unprecedented experiments by examining the conjugation of a coil peptide (fast oxidizing peptide, starting with a fully oxidized stock) to a surface-immobilized polymer (kinetics of thiol reaction limited by diffusion) in a simple aqueous solution (no other solvent, no degassing and no inert atmosphere). Such unfavourable conditions can indeed be brought together when developing biofunctionalized surfaces, e.g. for medical implants, biosensors and immunoassays [33]. Our rationale was to determine the feasibility of one-pot thiol chemistry by co-incubating the peptide with (i) a commonly used reducing agent (TCEP, DTT or BME, see Figure 4-1.B) and (ii) a model polymer that was modified with a pyridyldithiol group, to obtain a cleavable disulfide bond, or with the thiol-alkylating maleimide and vinyl sulfone groups (see Figure 4-1, A).

A. Thiol chemistry



B. Disulfide reduction

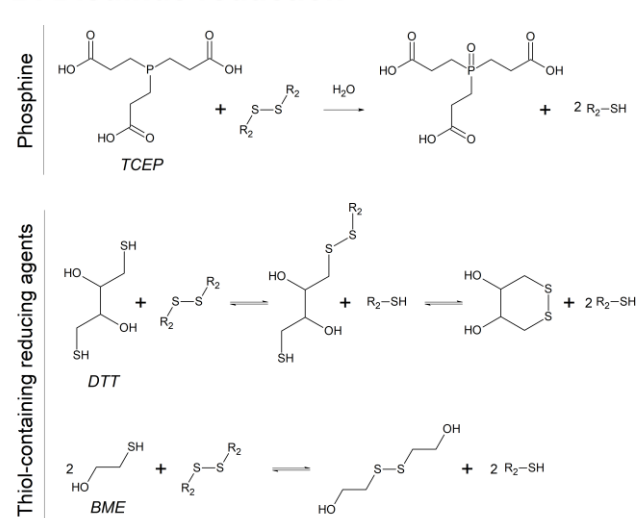


Figure 4-1 : Reaction schemes of one-pot thiol chemistry for the grafting of the K5 peptide (R_2 -SH) to dextran (R_1) in presence of reducing agents. (A) Reactions between the K5 peptide and dextran modified with vinyl sulfone and maleimide moieties for thiol-alkylation or with pyridyldithiol moieties for thiol-disulfide interchange. (B) Mechanism of oxidized K5 peptide reduction by a phosphine, tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), or by thiol-containing reductants, dithiothreitol (DTT) and β -mercaptoethanol (BME).

4.6 Results and discussion

4.6.1 Compatibility of in situ reduction with thiol-disulfide interchange and thiol alkylation.

A covalent layer of low-fouling dextran bearing either vinyl sulfone or carboxymethyl groups was first generated in polystyrene-based 96-well plates. The surfaces with carboxymethylated dextran were further modified with a crosslinker, namely EMCH or PDPH, to introduce maleimide or pyridyldithiol moieties, respectively. The cysteine-terminated K5 peptide was then incubated on the three reactive surfaces for 6 hours with different concentrations of a reducing agent among tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), dithiothreitol (DTT) or β -mercaptoethanol (BME) in phosphate buffered saline (PBS, 10 mM, pH 7.4). It is here noteworthy that the K5 peptide was largely oxidized at the beginning of the experiments (less than 1.2% of free thiol groups, as assessed using Ellman's reagent, data not shown). The resulting K5 peptide density in the wells was evaluated by incubating the E5-tagged epidermal growth factor (E5-EGF), in order to capture EGF via the formation of the E5/K5 coiled-coil complex. The amount of tethered EGF was then assayed by performing an ELISA against EGF. For each type of thiol-reactive surface, the concentration ranges with the three reducing agents were performed and analyzed within the same plate, and the data are presented as relative to the maximal ELISA response of said plate (Figure 4-2). A series of controls was performed by incubating the K5 peptide in PBS or PBS supplemented with 100 μ M of TCEP on thiol-reactive and quenched surfaces (Table 4-1).

The discussion of the data is here presented in two steps: first, a global interpretation of the curve profiles shown in Figure 4-2 in light of the controls in Table 4-1, with a distinction between the thiol alkylating agents (maleimide and vinyl sulfone) and pyridyldithiol and second, an in-depth analysis of the data from Figure 4-2, with a comparison between the thiol-containing reducing agents (DTT and BME) and the phosphine (TCEP).

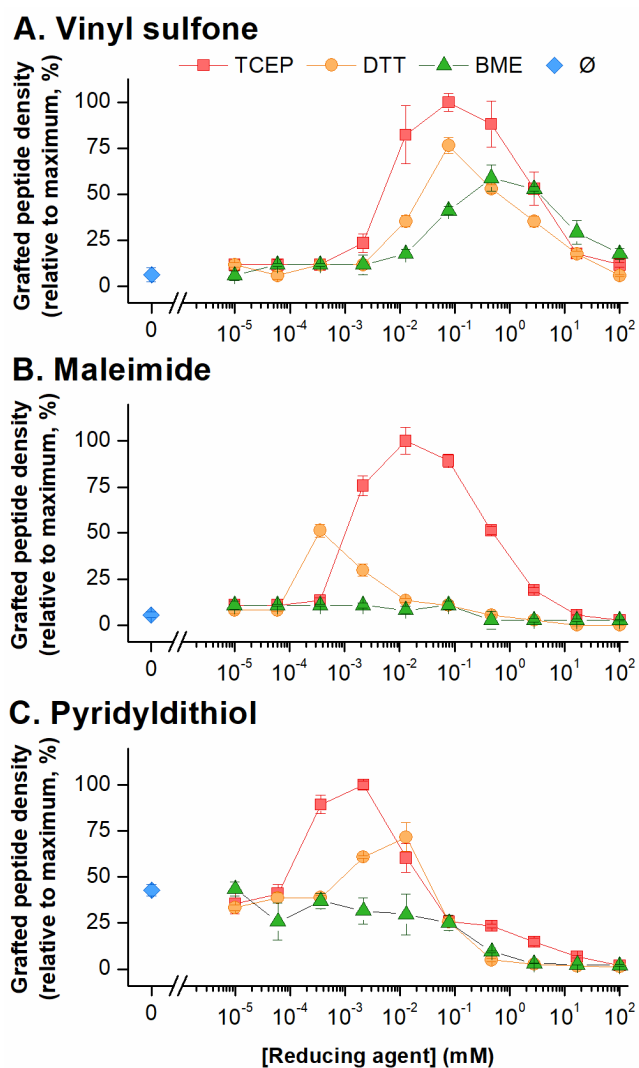


Figure 4-2 : Grafting of oxidized K5 peptide in PBS (10 mM, pH 7.4) co-incubated with reducing agents on (A) vinyl sulfone, (B) maleimide and (C) pyridyldithiol-derivatized dextran surfaces, as monitored by ELISA. The lines are guides for the eyes only.

4.6.1.1 Incubation with reductants promotes covalent grafting of the K5 peptide in 7 out of 9 cases

Regarding the thiol alkylating agents (vinyl sulfone and maleimide), the incubation of oxidized K5 peptides in the absence of reducing agent induced a very low ELISA response ($6 \pm 4\%$ and $5 \pm 2\%$ for vinyl sulfone and maleimide, respectively, Table 4-1). The data thus indicated that there was little to no reactivity of the oxidized peptide towards those functional groups. The addition of BME to the K5 peptide on dextran-maleimide did not significantly improve the ELISA response which remained minimal, in good agreement with the high reactivity of BME towards maleimide at neutral pH [34]. Bell-shaped curves were obtained for all other reductant/thiol alkylating agent combinations. Importantly, the incubation of K5 peptides on unreactive surfaces induced a relative response inferior to 4%, be it in plain PBS or in PBS supplemented with $100 \mu\text{M}$ TCEP (Table 4-1). The evolution of the ELISA response on Figure 4-2.A and Figure 4-2.B thus depicts an increased covalent grafting of the K5 peptide *via* thiol chemistry and not its adsorption, as expected on dextran [21].

Table 4-1: Relative peptide density obtained after incubating the K5 peptide in PBS or PBS supplemented with $100 \mu\text{M}$ TCEP on vinyl sulfone, maleimide and pyridyldithiol-derivatized surfaces and on unreactive control surfaces, as monitored by ELISA.

	Vinyl sulfone		Maleimide		Pyridyldithiol	
	Active	Blocked ^a	Active	Blocked ^a	Active	No linker ^b
K5 in PBS	6 ± 4	3.0 ± 0.1	5 ± 2	1.7 ± 0.8	43 ± 3	25 ± 9
K5 in PBS with $100 \mu\text{M}$ TCEP	100 ± 5	3.2 ± 0.2	89 ± 4	1.6 ± 0.2	26 ± 2	26 ± 2

^aBlocked surface indicates that the thiol alkylating agent was incubated with 50 mM of BME for 30 minutes then thoroughly rinsed prior to K5 incubation.

^bBare carboxymethylated dextran (no linker) was used as control for pyridyldithiol instead of a linker previously incubated with 50 mM of BME to avoid possible bias due to disulfide exchange.

As for the pyridyldithiol-derivatized surfaces, the unreacted linker was neither blocked with 50 mM of BME nor stored overnight in PBS after the K5 peptide incubation, so as to prevent the

release of the peptide grafted on the surface *via* a reversible disulfide bond. In this context, the signal on control unreactive surfaces (bare carboxymethylated dextran) reached ca. 25 % of the maximum level (see Table 4-1). In terms of raw absorbance values, this was ca. 18 times more than what was observed on the carboxymethylated dextran surfaces with blocked maleimide surfaces, which is indicative of non-negligible adsorption in this particular setup. Nonetheless, the response for the oxidized K5 peptide on the pyridyldithiol linker in PBS with no reductant was significantly higher than on bare CMD ($43 \pm 3\%$ of the maximal value of the plate, see Table 4-1 and Figure 4-2.C). Here, free thiol groups that could interchange with the cystine disulfide can be generated on the surface by a partial degradation of the linker (liberation of the pyridine-2-thione). When the peptide was co-incubated with the reducing agents, bell-shaped curves were obtained on pyridyldithiol surfaces, except for BME which only decreased the ELISA signal.

4.6.1.2 TCEP interferes with thiol coupling reactions, but to a lesser extent than thiol-containing reductants

Regarding DTT (and BME on vinyl sulfone only), the bell-shaped curves shown in Figure 4-2 and the negative controls shown in Table 4-1 confirmed that: (i) thiol-disulfide exchange occurred between the K5 peptide and the thiol-containing reducing agents and (ii) an increase in reductant concentration promoted peptide grafting, until an optimum was reached. At high concentrations, the two agents most likely competed with the free thiol of the cysteine residue for the maleimide, vinyl sulfone and pyridyldithiol moieties. Interestingly, for most cases, peptide grafting was completely thwarted only when the reducing agent was in large excess, that is, when the agent-to-peptide ratio was over 10 for DTT on maleimide, 500 for both DTT and BME on pyridyldithiol and even 10^5 for both agents on vinyl sulfone. The capacity of the K5 peptide to react with the thiol-reactive moieties in the presence of a high excess of reducing agent might be explained by an even higher excess of thiol-reactive moieties on the surfaces compared to the reducing agent. Another explanation would be that the K5 thiol is more reactive than BME and DTT towards vinyl sulfone, maleimide and pyridyldithiol. More precisely, the N-terminal cysteine of the K5 moiety may be, at pH 7.4, less protonated than DTT and BME, and the deprotonated thiolate group $R-S^-$ is known to be dramatically more reactive than the thiol group $R-SH$ [35]. Indeed, DTT and BME feature pK_a values of 9.2 and 9.6, respectively [36], [37], which are significantly higher than the cysteine value which is usually reported at 8.3-8.5 [35],

[38]. In the present study, the cysteine pK_a value could be even lower, insofar as the residue is located at the N-terminus of a peptide with high helical propensity [39]. A similar reasoning could explain the overall lower peptide densities obtained with BME, when compared to DTT, since BME features a higher pK_a value and lower disulfide reduction potential than DTT [37].

Regarding TCEP, similar results were obtained, although the phosphine consistently led to higher peptide density for the three chemistries, at the optimal concentration. In the case of pyridyldithiol, it could be argued that TCEP concomitantly reduced the peptide disulfide and cleaved the linker disulfide on the surface, thus rendering it inert towards the reduced peptide. This would explain why the optimal TCEP concentration was very close to the peptide concentration in this mixture (2 μ M and 1 μ M, respectively, Figure 4-2.C) and that high TCEP concentrations thwarted peptide grafting. As for surfaces derivatized with maleimide and vinyl sulfone moieties, the phosphine at high concentration appeared to have prevented their reaction with the peptide. This result is in disagreement with the oversimplified presentation that TCEP and alkylating agents are compatible during thiol chemistry, which remains often found in the literature, especially of commercial sources [40]. It however agrees with several reports investigating and demonstrating TCEP and maleimide cross-reactivity, starting from Shafer and colleagues who obtained by-products when mixing TCEP and N-ethylmaleimide ³⁴. Many others have since then confirmed the early observations, showing that an excess of the reducing agent is detrimental to one-pot thiol chemistry [31], [32], [41], [42]. Conversely, TCEP has been used successfully in one-pot thiol chemistry with other alkenes, including vinyl sulfone [43], vinyl phenyl [44] and acrylate [45] moieties, and not only as reducing agent but as a catalyst for the thiol-ene reaction. In our study, it however appeared that an excess amount of TCEP is also detrimental for thiol/vinyl sulfone conjugation.

4.6.2 Competitive reactions between reducing agents and dextran-vinyl sulfone

The data shown on Figure 4-3 demonstrated that the conjugation of a fully oxidized K5 peptide to a thiol-reactive polymer can be performed in the presence of a well-chosen reducing agent at an adequate concentration, *via* vinyl sulfone, maleimide or even pyridyldithiol chemistry.

In terms of stability, it is here noteworthy that the disulfide bond obtained with pyridyldithiol is susceptible to breaking or reforming in the presence of competing thiols or reducing agents. Regarding the thiol-Michael addition reactions, vinyl sulfones are more reactive towards thiols than (meth)acrylates and acrylamides, second only to maleimides [46]. Maleimides however yield a reversible succinimide bond that features a considerably higher susceptibility to hydrolytic degradation than the thioether sulfone obtained with vinyl sulfones [46], [47]. Moreover, vinyl sulfone (VS) was, in the present study, the only thiol-reactive moiety compatible with the three assayed reducing agents, and VS moieties can be readily integrated in polysaccharides using inexpensive divinyl sulfone, in a controlled manner over a wide range of grafting ratio and without side crosslinking reactions [21]. Dextran-VS was therefore selected for further characterization.

K5 peptides were then incubated at different concentrations over dextran-VS well-plates, with various concentrations of TCEP, and grafting density was monitored by ELISA (Figure 4-4). Interestingly, the maximal amount of grafted peptide, which was always obtained with 100 μ M of TCEP, increased with peptide concentration, by 2.8 ± 0.1 , 5.1 ± 0.4 and 6.4 ± 0.2 -fold when increasing the concentration from 1 μ M of K5 to 2, 5 and 10 μ M of K5, respectively. The data were thus in agreement with the VS moieties being in large excess in the wells compared to the peptide. Further characterization was carried out by incubating a high concentration of cysteamine on dextran-VS and by quantifying the amount of resulting amino groups. Quantities of VS moieties were estimated to be between 4000 and 5800 pmol in each well (data not shown). This further confirmed that the VS moieties were in large excess when compared to the cysteine-tagged peptide ($50 \mu\text{L} \times 1 \mu\text{M} = 50 \text{ pmol}$) but not necessarily compared to the reducing agents.

Dextran-VS (17.4 mM of VS moieties) was incubated at room temperature with the reductants TCEP, DTT and BME at a concentration of either 0.1 mM or in excess at 50 mM for 6 and 24 hours. Unreacted reducing agents and salts were then thoroughly removed by centrifugal filtration and the polymer was lyophilized before ^1H NMR spectroscopy in D_2O (Figure 4-5). NMR analysis of dextran-VS revealed a series of peaks between 3 and 4.5 ppm that correspond to the hydrogen atoms within the saccharide unit, except for the atom labeled c in Figure 4-5 which was well separated at 4.8-5.2 ppm and thus used for normalization. The Michael addition of divinyl sulfone to the saccharide unit was responsible for the doubling of peak c and for the

apparition of the peaks corresponding to the three hydrogen atoms of the VS carbon-carbon double bond which can be seen in Figure 4-5: 1 H atom a and 2 H atoms b integrated in the ranges 6.77-7 ppm and 6.2-6.45 ppm, respectively [21].

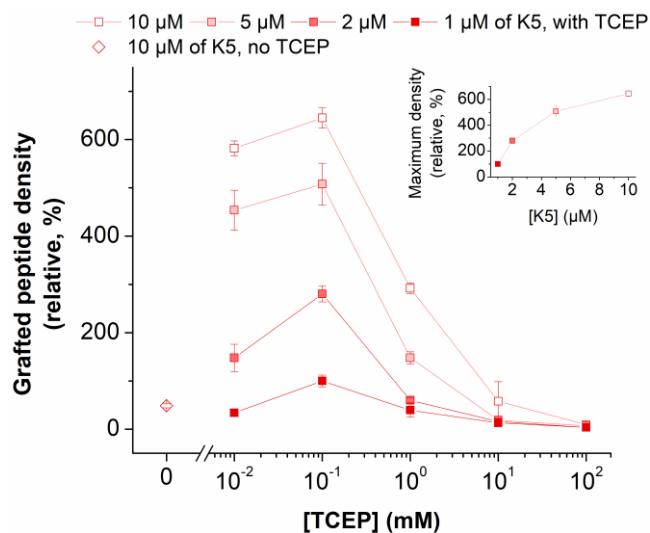


Figure 4-3 : Influence of peptide and TCEP concentration on the grafting of oxidized K5 peptide in PBS (10 mM, pH 7.4), on vinyl sulfone-derivatized dextran surfaces, as monitored by ELISA. The data are relative to the ELISA signal obtained for 1 μ M of K5 co-incubated with 100 μ M of TCEP. The lines are guides for the eyes only.

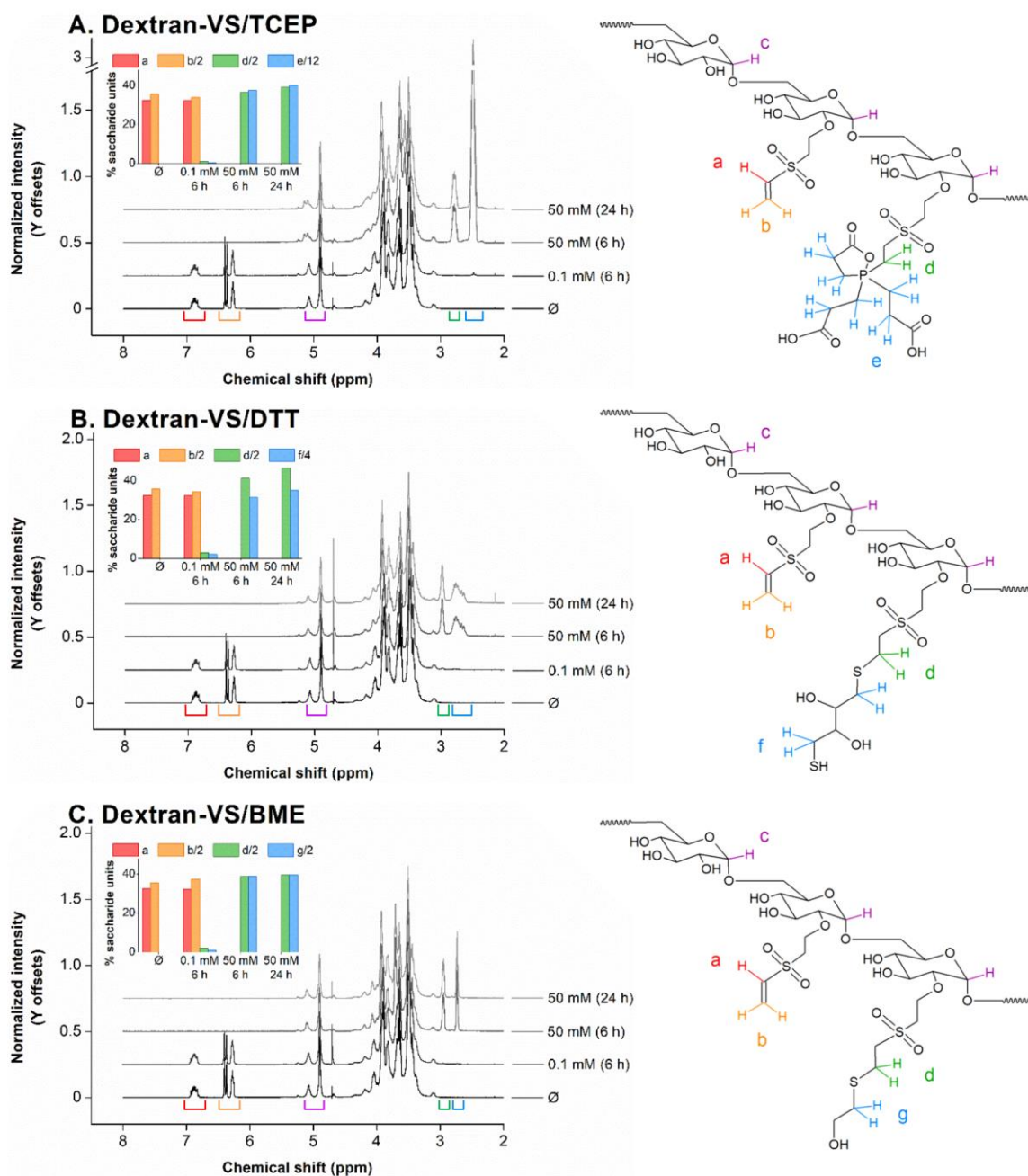


Figure 4-4 : ^1H NMR spectroscopy of vinyl sulfone-derivatized dextran incubated for 6 or 24 hours with (A) TCEP, (B) DTT and (C) BME at 0.1 and 50 mM. H atoms of interest are highlighted on the schematic compounds on the right. % values in insets are NMR areas under curve divided by the number of equivalent H atoms, relative to dextran saccharide units (calculated from area under curve of the H atoms labelled “c”).

Regarding the thiol-containing reductants, the incubation of dextran-VS with 50 mM of either DTT or BME caused the complete disappearance of the VS carbon-carbon double bond after 6 hours, with little to no change after 24 hours (Figure 4-5.B and Figure 4-5.C). This observation was associated with the apparition of the 2 hydrogen atoms d of the β -thiosulfonyl linkage at ca. 3 ppm, as well as a peak at ca. 2.7 ppm that could be attributed to the 4 hydrogen atoms f of DTT and the 2 hydrogen atoms g of BME, respectively, using the EPFL ^1H NMR online prediction tool. All other hydrogen atoms for the reductants were either predicted to be between 3.5 and 5 ppm, and therefore embedded in the dextran signal, or undetectable when using the D_2O solvent (for hydroxyl groups). Unsurprisingly, when normalized per number of hydrogen atoms (see insets in Figure 4-4), the integral values were consistent with a complete and equimolar conjugation of DTT/BME with dextran-VS via thiol alkylation, that is, all the vinyl sulfone moieties (17.4 mM) reacted within 6 hours with the thiol-containing reducing agent (50 mM). Interestingly, although the integration was too low to be reliable, the peaks corresponding to the β -thiosulfonyl linkage and the reductant started to appear after a 6-hour incubation with only 0.1 mM of DTT or BME. This might indicate their conjugation to the polymer in the aforementioned conditions, which would agree with our interpretation of ELISA results on the possible competition for grafting between the K5 peptide and both reductants at low concentrations (Figure 4-3.A).

As for TCEP, when incubating dextran-VS with 50 mM of the reducing agent during 6 or 24 hours, the peaks corresponding to the VS carbon-carbon double bond completely disappeared and the peak corresponding to the VS carbon-carbon single bond appeared with a similar magnitude (Figure 4-4.A). The same NMR spectra also featured a high intensity peak at 2.3-2.7 ppm, accounting for 12 hydrogen atoms that could not be attributed to the polymer. A peak at the same displacement was also detected when incubating TCEP at the above-determined optimal concentration for K5 peptide grafting with dextran-VS (100 μM), although the integration was too low to reliably estimate the reaction yield.

Two possible reaction products between VS and TCEP were hypothesized. One possible reaction product is a phosphonium ion adduct based on Wang et al.'s work [48]. However, the peaks predicted for this product are reported at 2.78 ppm (6 H atoms closer to the phosphorus) and 3.25 ppm (6 H atoms closer to the carboxylic acids), which strongly deviates from our data. The

second conjectured product contains a pentacoordinate phosphorus atom, as schematized in Figure 4-5.A., with 12 atoms denoted e and highlighted in blue. This structure is inspired by the work of Kantner et al. which revealed a cyclization reaction involving the formation of an intermolecular covalent bond between the phosphorus atom of TCEP and the terminal carbon of VS as well as the formation of an intramolecular bond between the same phosphorus atom and one of the carboxylic acids oxygen atoms [49]. The formation of the pentacoordinate product over the phosphonium ion adduct was confirmed by infrared spectroscopy in their work, and the NMR spectrum displayed one peak accounting for 11.84 H atoms with a ca. 2.6 ppm displacement. Interestingly enough, NMR predictions for this compound were significantly different from our data and featured two separate peaks at 2.32-2.42 ppm and at 2.84-2.88 ppm, which would represent the 4 H atoms in the heterocycle and the 8 remaining H atoms, respectively. Nonetheless, the results from the present study further demonstrated that TCEP does react with the thiol alkylating agent vinyl sulfone and cannot be merely said to be compatible with thiol-ene chemistry. The mechanisms and products of reaction between TCEP and VS may however require further investigation and clarification.

4.6.3 Optimization of one-pot thiol conjugation of oxidized K5 peptides with dextran-vinyl sulfone

Despite the side-reaction between TCEP and vinyl sulfone, the phosphine reductant was proven to dramatically enhance the conjugation efficiency of the initially oxidized K5 peptide to dextran-VS within 6 hours in PBS, to a higher extent than DTT and BME (ca. 16, 12 and 9-fold increase in signal between PBS only and PBS supplemented with 100 μ M TCEP, 100 μ M DTT and 500 μ M BME, respectively, Figure 4-3). The superiority of the phosphine group in PBS could be explained by: (i) faster kinetics of K5 reduction by TCEP, (ii) slower kinetics of competitive side-reactions between TCEP and VS and (iii) a possible catalysis of thiol-VS Michael addition by TCEP [48]. We therefore further examined the mechanisms of the K5/Vs/TCEP one-pot incubation. We specifically explored different buffering agents at various pH values to try to improve grafting efficiency of the peptide on dextran-VS-modified surfaces (Figure 4-6) and studied the kinetics of K5/Vs and TCEP/Vs conjugation (Figure 4-6).

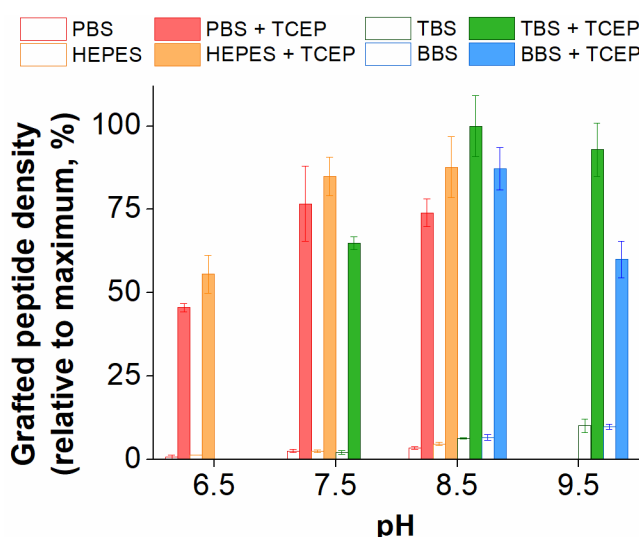


Figure 4-5. Grafting of K5 peptides on dextran-VS in presence or absence of 100 μ M TCEP in various buffers – Phosphate, HEPES, Tris and Borate Buffered Saline – as monitored by ELISA.

Using 100 μ M of TCEP in phosphate and HEPES buffered saline (pKa values of 7.21 and 7.55 at 20°C, respectively), the ELISA signal obtained with 1 μ M of K5 peptides incubated on dextran-VS increased with pH between 6.5 and 7.5, with no significant difference between pH 7.5 and 8.5 ($p > 0.66$, see Figure 4-5). A similar but offset trend was obtained with 100 μ M of TCEP in tris buffered saline (TBS, pKa of 8.08 at 20°C), that is, an increase in signal between pH 7.5 and 8.5 and then no statistical difference between pH 8.5 and 9.5 ($p = 0.37$). Conversely, the incubation of the K5 peptide in presence of TCEP in borate buffered saline (pKa of 9.14 at 20°C) decreased dramatically between pH 8.5 and 9.5 ($p < 0.0001$).

Regarding the levels of K5 grafting in absence of TCEP, a clear trend of increased signal with increasing pH values was observed: $2.0 \pm 0.5\%$, $3.2 \pm 0.2\%$, $6 \pm 1\%$ and $14 \pm 3\%$ of the maximal value at pH 6.5, 7.5, 8.5 and 9.5 respectively. The elevated peptide density could be attributed to changes in the adsorption level or, more probably, due to the undesirable reaction between VS and residues other than cysteine, including the primary amino group of the lysine side-chain and the aliphatic alcohol group of the serine side-chain [50].

Altogether the data seemed to indicate that the maximal amount of immobilized K5 peptides is obtained with tris buffered saline at pH 8.5. The increase in signal without TCEP however

suggested non-specific covalent grafting or adsorption. Moreover, the ELISA signal for that condition was not statistically different from the results obtained with HEPES buffered saline at pH 7.5 and 8.5 (p values of 0.07 and 0.16, respectively) and almost not significantly different from those obtained with PBS at pH 7.5 ($p = 0.049$). Our results can be explained by the higher instability of TCEP in PBS, when compared to HEPES, tris and borate buffers [51]. In Han and Han's report, the oxidation of TCEP was found to be the fastest in PBS at near neutral pH values, although 72 hours were required to reach 57% oxidation at pH 7.4 in 150 mM PBS. We thus kept PBS as diluting buffer and investigated the kinetics of the three reactions at hand, that is, reduction of the oxidized peptide by TCEP, conjugation of the reduced peptide to dextran-VS and side-reaction between TCEP and dextran-VS (Figure 4-6).

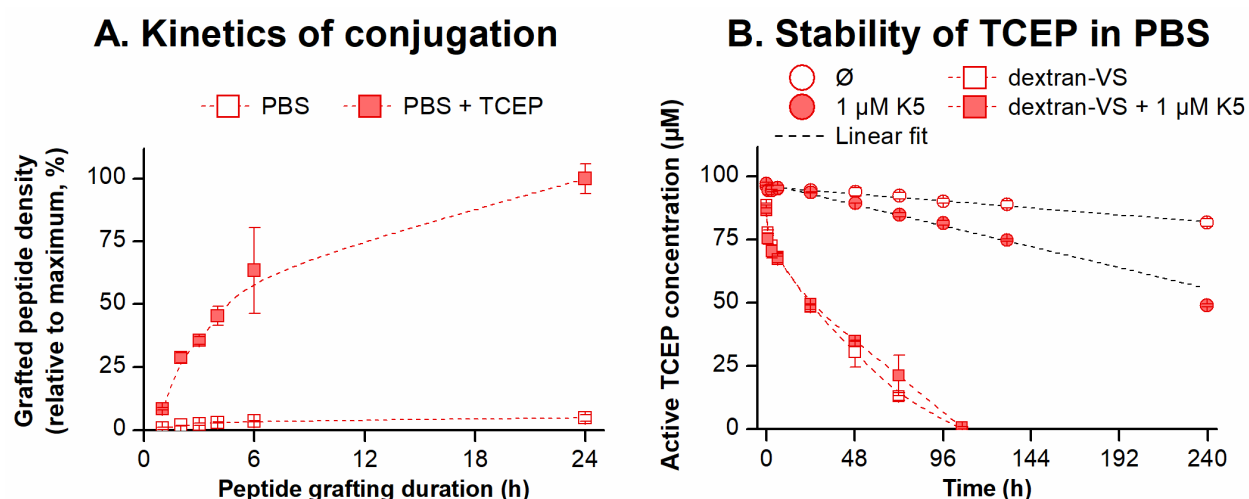


Figure 4-6. Kinetics of (A) K5 conjugation to dextran-VS in 10 mM PBS, pH 7.4, with or without 100 μ M TCEP, and kinetics of (B) TCEP oxidation in test tubes or in dextran-VS-modified well plates, with or without 1 μ M K5. Monitoring was performed by ELISA and by reduction of Ellman's reagent, respectively. The red dashed lines are guides for the eye only whereas the black dashed lines are linear fits.

The data in Figure 4-6.A showed that, in presence of an initial concentration of 100 μ M of TCEP, the grafting of the K5 peptide on dextran-VS continued over a relatively long period of time. More precisely, the final K5 densities obtained for the 1, 2, 4, 6 and 24-hour time points were all

significantly different from one another ($p < 0.05$), except for the 4 and 6-hour time points ($p = 0.15$, filled squares). Conversely, although the ELISA response in absence of TCEP slightly increased with time, there was no statistical difference in signal between 4, 6 and 24 hours ($p > 0.07$, empty squares). The ratio between the K5 peptide density obtained in PBS only and the density obtained with PBS supplemented with $100\ \mu\text{M}$ of TCEP also consistently decreased over time and reached $5 \pm 1\%$ after 24 hours. The data further demonstrated that the grafting via thiol-ene chemistry and/or adsorption of the oxidized peptide in absence of reductant was not favourable even after a long duration. This result was indicative of little rebalancing between the oxidized and reduced forms of the peptide cysteine residues in PBS without reductant, and thus indicative of the high stability of the coiled-coil disulfide bond.

Given that the oxidized peptide could be grafted for at least 24 hours in presence of TCEP, we examined the stability of the reducing agent in our experimental conditions by quantifying its potential to reduce 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) into two 2-nitro-5-thiobenzoate molecules that adsorb strongly at 405 nm [51]. The reduction of DTNB by the reactive K5 peptides ($\leq 1\ \mu\text{M}$) was here neglected.

When solutions of $100\ \mu\text{M}$ TCEP in PBS, with or without $1\ \mu\text{M}$ K5 peptide, were incubated in polypropylene test tubes, DTNB reduction decreased very slowly (\bullet and \circ , respectively, Figure 4-6.B). Without K5 peptide, $82 \pm 2\ \mu\text{M}$ of active reductant were still detected after 10 days, which indicated that oxidation of TCEP was almost negligible in 10 mM PBS, pH 7.4. When compared to the results obtained by Han and Han [51], who used between 150 and 350 mM of PBS, our data demonstrated that the phosphine can be fairly stable in a phosphate buffered saline when the latter is not too concentrated. Interestingly, when the same experiment was performed with DTT or BME, both reductants oxidized much faster and active reductant could not be detected after 48 and 72 hours, respectively (Supporting Information, Figure S 1). When $1\ \mu\text{M}$ of K5 peptide was added to the $100\ \mu\text{M}$ of TCEP in polypropylene test tubes, a significant decrease in absorbance signal was measured starting from 48 hours, and the active TCEP concentration after 10 days was evaluated at $49 \pm 1\ \mu\text{M}$ (\bullet , Figure 4-6.B). More precisely, curve-fitting revealed a linear decrease of active TCEP concentration with steady rates of -0.0568 and $-0.1889\ \mu\text{M.h}^{-1}$, in absence and presence of K5 peptides, respectively ($R^2 \geq 0.98$). The data thus

indicated that the K5 peptides contributed to the consumption of 0.1321 μM of TCEP per hour, which is equivalent to a 3.8-hour cycle of 1 μM K5 peptide oxidation and reduction (based on a consumption of 0.5 μM of TCEP to form 1 μM of free thiol groups). This is further indicative of the fast oxidation rate of the coiled-coil-forming K5 peptides, despite the electrostatic repulsion expected from the lysine side-chains. The results are also in good agreement with previous work, which showed more than 50% oxidation of the K5 peptide within 150 minutes, in 10 mM PBS, pH 7.4, at 25°C [24].

Interestingly, when the same solutions (100 μM TCEP in PBS, with or without 1 μM K5 peptide) were incubated in dextran-VS well-plates, a dramatically faster decrease in active reductant concentration was observed (■ and □, respectively, Figure 4-6.B). A drop from 100 μM to ca. 67 μM was measured within the first 6 hours, and complete disappearance of active TCEP occurred within 4.5 days. In this time frame, the co-incubation with 1 μM of K5 peptide did not significantly influence DTNB reduction. Considering the data obtained in the test tubes, the decrease in active TCEP concentration that was observed in dextran-VS wells was not attributed to the phosphine oxidation. It was much more likely due to TCEP reacting with the VS moieties, as previously observed (see Figure 4-4 and discussion thereof). Within 6 hours, ca. 33 μM of the phosphine covalently reacted with vinyl sulfone, which product we conjectured to be a pentacoordinate conjugate (cf. scheme in Figure 4-4.A). A small amount of TCEP (≤ 1 μM) could also have been consumed to catalyze the reaction of K5 with VS [48]. It is here worth mentioning that the reaction product obtained by incubating TCEP with the VS-modified polymer does not contain any reactive moieties other than carboxylic groups. The incubation of DTT or BME in the dextran-VS well-plates also led to a dramatic decrease in active reductant concentration, faster than TCEP (complete reaction within 24 hours, Supporting Information, Figure S1). The drop was particularly fast for β -mercaptoethanol: 95% of the reductant reacted with VS within 6 hours. The kinetics we observed could further explain why TCEP improved the grafting of K5 on dextran-VS to an extent higher than the thiol-containing reducing agents, especially BME (Figure 4-2.A).

4.7 Conclusion

The present work demonstrated the practicality of the concomitant reduction of an oxidized/fast-oxidizing peptide and its covalent conjugation to a polysaccharide *via* thiol-based chemistry. Using dextran that was previously modified with either VS, maleimide or pyridyldithiol moieties and a reductant among TCEP, DTT or BME, a dramatic increase in fully oxidized K5 peptide conjugation was demonstrated in 7 out of 9 cases, provided that the concentration of the reducing agent was adequately chosen. The VS/TCEP combination provided the best results. Further investigation shed light on unclear statements in the literature. Our data indeed confirmed that TCEP does react with thiol-alkylating agents, although it can be used as a reductant if the alkylating agent is in excess. Moreover, the side-reaction between TCEP and VS is limited to the generation of carboxyl moieties on the polymer. We here also demonstrated that TCEP is stable in the commonly used Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (10 mM phosphate, pH 7.4).

4.8 Experimental procedures

4.8.1 Materials

Milli-Q grade water (18.2 M Ω .cm, referred to here as water) was generated with a Millipore Gradient A 10 purification system (Etobicoke, ON). CellBIND microplates were obtained from Corning Inc. (Corning, NY). Linear poly(allylamine) (PAAm, 25 kDa) was obtained from Polysciences, Inc. (Warrington, PA). 500-kDa dextran (technical grade T) was purchased from Pharmacosmos A/S (Holbaek, Denmark). EMCH (3,3'-N-[ϵ -maleimidocaproic acid] hydrazide, trifluoroacetic acid salt) and PDPH (3-(2-pyridyldithio)propionyl hydrazide) were purchased from Pierce Biotechnology (Rockford, IL). Sodium hydroxide (NaOH, 99.3% purity) and hydrochloric acid (HCl, 37.7% v/v) were obtained from VWR International, Ltd. (Mont-Royal, QC). Deuterium oxide (99% purity) was purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA). Unless mentioned otherwise, all chemicals were purchased from MilliporeSigma (Oakville, ON). Anti-human EGF ELISA DuoSet kit was purchased from R&D systems (Minneapolis, MN). All absorbance measurements were carried out on a Victor V Multilabel Counter from PerkinElmer Inc. (Woodbridge, ON).

4.8.2 Biomolecule and bioconjugate synthesis, purification and characterization

4.8.2.1 Peptides and Proteins

Cysteine-tagged K5 peptides (CGG-(KVSALKE)₅) were synthesized at the peptide facility at the University of Colorado, Denver (> 98% purity). Chimeric protein E5-EGF, consisting of an epidermal growth factor protein fused to a N-terminal E5 tag (EVSALEK)₅, was produced by transient transfection of HEK 293-6E cells, purified by immobilized metal-ion affinity and size-exclusion chromatographies, as previously described [20]. Protein quantification was performed by ELISA and all peptides and proteins were stored at -80°C until use.

4.8.2.2 Dextran-Vinyl Sulfone

Technical grade T dextran (500 kDa) was modified with divinyl sulfone (DVS) as previously described ²¹. Briefly, 450 mg of dextran were dissolved in 9 mL of Milli-Q water containing 30 mM of NaOH. 13.5 mL of a freshly prepared solution of DVS (0.11 M in water containing 30 mM NaOH) was added to the dextran solution. The reaction was carried out for 3 minutes at room temperature under vigorous vortexing and was quenched by adding 0.3% v/v of pure HCl (12.1 M). The preparations were then desalted against water five times using 10-kDa centrifugal filter devices (Amicon Ultra-15 from MilliporeSigma). Purified dextran-VS was lyophilized and stored at 4°C until use. ¹H NMR was performed on the purified preparation and peak integration revealed that ca. 33 % of the saccharide units were modified with vinyl sulfone.

4.8.2.3 Carboxymethylated Dextran

Dextran carboxymethylation and characterization were performed as previously described [52]. Briefly, 400 mg of dextran was dissolved in 10 mL of a solution containing 3 M NaOH and 1 M monochloroacetic acid. The solution was stirred for 2 hours at room temperature and the reaction was quenched by the addition of 40 mg of NaH₂PO₄ followed by pH adjustment to neutrality using 18 M H₂SO₄. The solution was then filtered through a 0.2-μm PTFE filter and dialyzed five times against Milli-Q water for 1 hour to remove reagents and salts. Purified carboxymethylated

dextran was lyophilized and stored at 4°C until use. ^1H NMR revealed that ca. 46% of the saccharide units were modified with carboxyl moieties.

4.8.3 Thiol-Reactive Surface Preparation

4.8.3.1 Amination

Carboxylated CellBIND® 96-well microplates were used to prepare a reactive surface for thiol-based K5 peptide grafting as previously described [20]. Briefly, the surfaces were first modified with poly(allylamine) (PAAm) through carbodiimide chemistry by exposing the wells to 50 μL of a solution containing 380 μM PAAm, 40 mM EDC and 10 mM NHS in 100 mM MES buffer pH 4.7 for 22 hours. The wells were rinsed three times with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS; 10 mM with 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4). Free amines on the surface were then used to covalently graft a sulfhydryl reactive moiety.

4.8.3.2 Vinyl Sulfone

Dextran-VS was dissolved at 10 mg/mL in 50 mM borate pH 10. 50 μL of the solution were added to each PAAm-coated well for 16 hours, which was found to be the optimal incubation duration (data not shown). The wells were rinsed three times with PBS before K5 incubation.

4.8.3.3 Pyridyldisulfide and Maleimide

Carboxymethylated dextran (CMD) was dissolved at 2 mg/mL in MilliQ water containing 50 mM EDC and 12.5 mM NHS. 50 μL of the NHS-activated CMD solution were added to each PAAm-coated well for 16 h. The wells were rinsed three times with PBS and three times with MilliQ water. The free carboxyl groups on CMD were then reactivated by a solution containing 167 mM EDC, 42 mM NHS and 17 mM MES for 10 minutes. The solution was discarded before adding 50 μL of EMCH or PDPH (heterobifunctional linkers that both feature a hydrazide moiety as well as a maleimide and a pyridyldithiol moiety, respectively). The linkers were incubated for 1 hour at a concentration of 1 mM in PBS containing 10% v/v DMSO. The wells were rinsed three times with PBS. 50 μL of ethanolamine (100 mM, pH 8.5) was then added to each well to deactivate the remaining COO-NHS groups for 15 minutes. The wells were finally rinsed three times with PBS before K5 incubation.

4.8.4 K5 Conjugation and Characterization

Thiol-based grafting of cysteine-tagged K5 peptides was performed by incubating, in each well, 50 μ L of a solution containing 1 μ M of K5 peptide, unless otherwise mentioned, and reducing agents (DTT, BME or TCEP) at concentrations ranging from 0 to 10 mM in PBS at room temperature, for 6 hours unless otherwise indicated. Other conditions include 10 mM buffered saline (150 mM NaCl) of HEPES, borate and tris base with adjustment to indicated pH with concentrated HCl or NaOH solutions. The surfaces were then rinsed three times with PBS and remaining sulfhydryl reactive moieties were blocked by incubating 50 mM of BME for 30 min (for VS and EMCH only) before rinsing three times with PBS.

The amount of grafted peptide was measured by its capacity to capture its biological partner, E5. The nonspecific binding sites on the surfaces were first blocked with 10% fetal bovine serum in PBS prior to a 1-h incubation of 500 pM E5-tagged epidermal growth factor (E5-EGF) in PBS supplemented with 0.1% v/v bovine serum albumin (PBS-BSA). The amount of immobilized EGF was then quantified by a direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to a protocol adapted from the manufacturer's instructions. Briefly, the surfaces were incubated with 50 μ L of biotinylated anti-EGF antibody in PBS-BSA for 30 minutes, then with 50 μ L of horseradish-streptavidin conjugate in PBS-BSA for 20 minutes. The wells were rinsed three times with PBS supplemented with 0.05% Tween 20 between the different steps. Finally, 50 μ L of the substrate solution (50:50 v/v mixture of hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine) was added to each well and substrate oxidation was monitored for 10 min by repetitious absorbance readings at 630 nm. Absorbance slopes were compiled and are referred to as ELISA signal in the manuscript.

4.8.5 NMR Analysis

Dextran-VS was dissolved at a concentration of 10 mg/mL in PBS supplemented with either TCEP, DTT or BME at the indicated concentration (0.1 mM or 50 mM). The reaction was carried out at room temperature for 6 to 24 hours. The samples were then purified against Milli-Q water using 10-kDa centrifugal filters and freeze dried. The samples were examined by ^1H NMR as 5 mg/mL solutions in D_2O . The EPFL ^1H NMR Predict tool (http://www.nmrdb.org/new_predictor/) was used for H atom displacement prediction.

4.8.6 Thiol and reductant quantification

The concentrations of free thiol groups of the K5 peptide and of active reductant were measured using Ellman's reagent (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB) [51]. Briefly, 140 μL of sample diluted in PBS were mixed with 60 μL of DTNB (1 mg/mL in PBS supplemented with 1 mM EDTA) and 10 μL of Tween 20 (0.05% v/v in water). The concentration of the 2-nitro-5-thiobenzoate product was measured in 96-well plates at an absorbance of 405 nm.

4.8.7 Data Treatment

All data are represented as the mean value \pm standard deviation and, when indicated, statistical analysis was carried out by independent two-sample *t*-test, with (in)equality of variances based on an *F*-test.

4.9 Acknowledgments

This work was supported by the Canada Research Chairs on Protein-enhanced Biomaterials (G.D.C) and on Bioinspired Materials (X.B.), by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Discovery Grant (G.D.C and X.B.), by the Biomedical Science and Technology Research Group (G.T., B.L., F.M. and G.D.C.). The present work was funded by the TransMedTech Institute (A.G.A., B.L. and F.M.) and its main funding partner, the Canada First Research Excellence Fund. We would like to thank S. Bilodeau for NMR measurements. The authors are grateful to Dr. Alexandra Fürtös at the Department of Chemistry, Université de Montréal for her helpful advice on LC-MS analyses. We thank the Canadian Foundation for Innovation for the support for the mass spectrometry instrumentation.

4.10 References

- (1) Braun, A. C., Gutmann, M., Luhmann, T., and Meinel, L. (2018) Bioorthogonal strategies for site-directed decoration of biomaterials with therapeutic proteins. *J. Control. Release* 273, 68-85.
- (2) McKay, C. S., and Finn, M. G. (2014) Click chemistry in complex mixtures: bioorthogonal bioconjugation. *Chem. Biol.* 21, 1075-101.

- (3) Zou, Y., Zhang, L., Yang, L., Zhu, F., Ding, M., Lin, F., Wang, Z., and Li, Y. (2018) "Click" chemistry in polymeric scaffolds: Bioactive materials for tissue engineering. *J. Control. Release* 273, 160-179.
- (4) Thapa, P., Zhang, R. Y., Menon, V., and Bingham, J. P. (2014) Native chemical ligation: a boon to peptide chemistry. *Molecules* 19, 14461-83.
- (5) Riahi, N., Cappadocia, L., Henry, O., Omichinski, J., and De Crescenzo, G. (2016) Soluble expression, purification and functional characterization of a coil peptide composed of a positively charged and hydrophobic motif. *Amino Acids* 48, 567-77.
- (6) Hermanson, G. T. (2013) Chapter 2 - Functional Targets for Bioconjugation, in *Bioconjugate Techniques (Third edition)* pp 127-228, Academic Press, Boston.
- (7) Dondoni, A. (2008) The emergence of thiol-ene coupling as a click process for materials and bioorganic chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47, 8995-7.
- (8) Stenzel, M. H. (2012) Bioconjugation Using Thiols: Old Chemistry Rediscovered to Connect Polymers with Nature's Building Blocks. *ACS Macro Letters* 2, 14-18.
- (9) Thornton, J. M. (1981) Disulphide bridges in globular proteins. *J Mol Biol* 151, 261-87.
- (10) Riahi, N., Murschel, F., Lerouge, S., Durocher, Y., Henry, O., and De Crescenzo, G. (2017) Bioavailability of immobilized epidermal growth factor: Covalent versus noncovalent grafting. *Biointerphases* 12, 010501.
- (11) Backer, M. V., Patel, V., Jehning, B. T., Claffey, K. P., and Backer, J. M. (2006) Surface immobilization of active vascular endothelial growth factor via a cysteine-containing tag. *Biomaterials* 27, 5452-8.
- (12) Thomas, F., Boyle, A. L., Burton, A. J., and Woolfson, D. N. (2013) A Set of de Novo Designed Parallel Heterodimeric Coiled Coils with Quantified Dissociation Constants in the Micromolar to Sub-nanomolar Regime. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 5161-5166.
- (13) Monera, O. D., Sereda, T. J., Zhou, N. E., Kay, C. M., and Hodges, R. S. (1995) Relationship of sidechain hydrophobicity and alpha-helical propensity on the stability of the single-stranded amphipathic alpha-helix. *J. Pept. Sci.* 1, 319-29.

- (14) Fletcher, J. M., Boyle, A. L., Bruning, M., Bartlett, G. J., Vincent, T. L., Zaccai, N. R., Armstrong, C. T., Bromley, E. H. C., Booth, P. J., Brady, R. L., et al. (2012) A Basis Set of de Novo Coiled-Coil Peptide Oligomers for Rational Protein Design and Synthetic Biology. *ACS Synthetic Biology* 1, 240-250.
- (15) Gerling-Driessen, U. I., Mujkic-Ninnemann, N., Ponader, D., Schone, D., Hartmann, L., Kokschi, B., Gerling-Driessen, U. I., Schone, D., Kokschi, B., Ponader, D., et al. (2015) Exploiting Oligo(amido amine) Backbones for the Multivalent Presentation of Coiled-Coil Peptides. *Biomacromolecules* 16, 2394-402.
- (16) Fortier, C., De Crescenzo, G., and Durocher, Y. (2013) A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery. *Biomaterials* 34, 1344-1353.
- (17) Pechar, M., Pola, R., Laga, R., Braunová, A., Filippov, S. K., Bogomolova, A., Bednářová, L., Vaněk, O., and Ulbrich, K. (2014) Coiled Coil Peptides and Polymer–Peptide Conjugates: Synthesis, Self-Assembly, Characterization and Potential in Drug Delivery Systems. *Biomacromolecules* 15, 2590-2599.
- (18) Jing, P., Rudra, J. S., Herr, A. B., and Collier, J. H. (2008) Self-assembling peptide-polymer hydrogels designed from the coiled coil region of fibrin. *Biomacromolecules* 9, 2438-46.
- (19) Aronsson, C., Danmark, S., Zhou, F., Oberg, P., Enander, K., Su, H., and Aili, D. (2015) Self-sorting heterodimeric coiled coil peptides with defined and tuneable self-assembly properties. *Sci. Rep.* 5, 14063.
- (20) Murschel, F., Fortier, C., Jolicœur, M., Hodges, R. S., and De Crescenzo, G. (2017) Two Complementary Approaches for the Controlled Release of Biomolecules Immobilized via Coiled-Coil Interactions: Peptide Core Mutations and Multivalent Presentation. *Biomacromolecules* 18, 965-975.
- (21) Noel, S., Fortier, C., Murschel, F., Belzil, A., Gaudet, G., Jolicœur, M., and De Crescenzo, G. (2016) Co-immobilization of adhesive peptides and VEGF within a dextran-based coating for vascular applications. *Acta Biomater.* 37, 69-82.

- (22) Addi, C., Murschel, F., and De Crescenzo, G. (2017) Design and Use of Chimeric Proteins Containing a Collagen-Binding Domain for Wound Healing and Bone Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 23, 163-182.
- (23) Bagiyan, G. A., Koroleva, I. K., Soroka, N. V., and Ufimtsev, A. V. (2003) Oxidation of thiol compounds by molecular oxygen in aqueous solutions. *Russ. Chem. Bull.* 52, 1135-1141.
- (24) Noel, S. (2015) Développement de revêtements polymériques bioactifs pour prothèses vasculaires synthétiques. *Institut de génie biomédical*, 266. École polytechnique de Montréal.
- (25) Visser, C. C., Voorwinden, L. H., Harders, L. R., Eloualid, M., van Bloois, L., Crommelin, D. J., Danhof, M., and de Boer, A. G. (2004) Coupling of metal containing homing devices to liposomes via a maleimide linker: use of TCEP to stabilize thiol-groups without scavenging metals. *J. Drug Target.* 12, 569-73.
- (26) ThermoScientific. (2013) User Guide: TCEP HCl. Pierce Biotechnology Inc., Rockford (IL). https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011306_TCEP_HCl_UG.pdf.
- (27) Oude Blenke, E. E., van den Dikkenberg, J., van Kolck, B., Kros, A., and Mastrobattista, E. (2016) Coiled coil interactions for the targeting of liposomes for nucleic acid delivery. *Nanoscale* 8, 8955-65.
- (28) Zwysig, A., Schneider, E. M., Zeltner, M., Rebmann, B., Zlateski, V., Grass, R. N., and Stark, W. J. (2017) Protein Reduction and Dialysis-Free Work-Up through Phosphines Immobilized on a Magnetic Support: TCEP-Functionalized Carbon-Coated Cobalt Nanoparticles. *Chemistry (Easton)* 23, 8585-8589.
- (29) Henkel, M., Rockendorf, N., and Frey, A. (2016) Selective and Efficient Cysteine Conjugation by Maleimides in the Presence of Phosphine Reductants. *Bioconjug. Chem.* 27, 2260-2265.
- (30) Kantner, T., Alkhawaja, B., and Watts, A. G. (2017) In Situ Quenching of Trialkylphosphine Reducing Agents Using Water-Soluble PEG-Azides Improves Maleimide Conjugation to Proteins. *ACS Omega* 2, 5785-5791.

- (31) Sanchez, A., Pedroso, E., and Grandas, A. (2013) Oligonucleotide cyclization: the thiol-maleimide reaction revisited. *Chem. Commun. (Camb.)* 49, 309-11.
- (32) Armstrong, A. E., Zerbes, R., Fournier, P. A., and Arthur, P. G. (2011) A fluorescent dual labeling technique for the quantitative measurement of reduced and oxidized protein thiols in tissue samples. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 510-7.
- (33) Liberelle, B., Bartholin, L., Boucher, C., Murschel, F., Jolicoeur, M., Durocher, Y., Merzouki, A., and De Crescenzo, G. (2010) New ELISA approach based on coiled-coil interactions. *J. Immunol. Methods* 362, 161-7.
- (34) Shafer, D. E., Inman, J. K., and Lees, A. (2000) Reaction of Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) with maleimide and alpha-haloacyl groups: anomalous elution of TCEP by gel filtration. *Anal Biochem* 282, 161-4.
- (35) Poole, L. B. (2015) The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radic. Biol. Med.* 80, 148-57.
- (36) Riemer, J., and Herrmann Johannes, M. (2011) 6 Protein import into the intermembrane space of mitochondria, in *Methods in Protein Biochemistry*.
- (37) Lukesh, J. C., 3rd, Palte, M. J., and Raines, R. T. (2012) A potent, versatile disulfide-reducing agent from aspartic acid. *J Am Chem Soc* 134, 4057-9.
- (38) Tajc, S. G., Tolbert, B. S., Basavappa, R., and Miller, B. L. (2004) Direct determination of thiol pKa by isothermal titration microcalorimetry. *J Am Chem Soc* 126, 10508-9.
- (39) Kortemme, T., and Creighton, T. E. (1995) Ionisation of cysteine residues at the termini of model alpha-helical peptides. Relevance to unusual thiol pKa values in proteins of the thioredoxin family. *J Mol Biol* 253, 799-812.
- (40) Kantner, T. (2015) Bioconjugation Strategies Through Thiol-Alkylation of Peptides and Proteins. *Doctor of Philosophy (PhD)*, 295. University of Bath.
- (41) Schumacher, F. F., Nobles, M., Ryan, C. P., Smith, M. E., Tinker, A., Caddick, S., and Baker, J. R. (2011) In situ maleimide bridging of disulfides and a new approach to protein PEGylation. *Bioconjug. Chem.* 22, 132-6.

- (42) Maret, B., Regnier, T., Rossi, J. C., Garrelly, L., Vial, L., and Pascal, R. (2014) Reduction with tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) enables the use of an S-sulphonate protecting group for thiol-mediated bioconjugation. *Rsc Advances* 4, 7725-7728.
- (43) Grover, G. N., Alconcel, S. N., Matsumoto, N. M., and Maynard, H. D. (2009) Trapping of Thiol Terminated Acrylate Polymers with Divinyl Sulfone to Generate Well-Defined Semi-Telechelic Michael Acceptor Polymers. *Macromolecules* 42, 7657-7663.
- (44) Zhang, L., Vila, N., Klein, T., Kohring, G. W., Mazurenko, I., Walcarius, A., and Etienne, M. (2016) Immobilization of Cysteine-Tagged Proteins on Electrode Surfaces by Thiol-Ene Click Chemistry. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 17591-8.
- (45) Jones, M. W., Mantovani, G., Ryan, S. M., Wang, X., Brayden, D. J., and Haddleton, D. M. (2009) Phosphine-mediated one-pot thiol-ene "click" approach to polymer-protein conjugates. *Chem. Commun. (Camb.)*, 5272-4.
- (46) Nair, D. P., Podgorski, M., Chatani, S., Gong, T., Xi, W. X., Fenoli, C. R., and Bowman, C. N. (2014) The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry. *Chem. Mater.* 26, 724-744.
- (47) Baldwin, A. D., and Kiick, K. L. (2011) Tunable degradation of maleimide-thiol adducts in reducing environments. *Bioconjug. Chem.* 22, 1946-53.
- (48) Wang, C., and Qi, C. (2013) Mechanistic insights into N- or P-centered nucleophile promoted thiol-vinylsulfone Michael addition. *Tetrahedron* 69, 5348-5354.
- (49) Kantner, T., and Watts, A. G. (2016) Characterization of Reactions between Water-Soluble Trialkylphosphines and Thiol Alkylating Reagents: Implications for Protein-Conjugation Reactions. *Bioconjug. Chem.* 27, 2400-2406.
- (50) Morales-Sanfrutos, J., Lopez-Jaramillo, J., Ortega-Munoz, M., Megia-Fernandez, A., Perez-Balderas, F., Hernandez-Mateo, F., and Santoyo-Gonzalez, F. (2010) Vinyl sulfone: a versatile function for simple bioconjugation and immobilization. *Org. Biomol. Chem.* 8, 667-75.
- (51) Han, J. C., and Han, G. Y. (1994) A procedure for quantitative determination of tris(2-carboxyethyl)phosphine, an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol. *Anal Biochem* 220, 5-10.

- (52) Fortier, C., Louvier, E., Durocher, Y., and De Crescenzo, G. (2015) Tailoring the Surface of a Gene Delivery Vector with Carboxymethylated Dextran: A Systematic Analysis. *Biomacromolecules* 16, 1671-81.

CHAPITRE 5 UNE NOUVELLE RÉACTION DE GREFFAGE, LA CYCLOADDITION AZIDE/ALCYNE

En parallèle des efforts consacrés à améliorer les rendements de la réaction « thiol-click », classiquement utilisée dans le laboratoire pour la bioconjugaison du dextrane, l'utilisation d'une autre réaction a été envisagée dans l'espoir d'obtenir de meilleurs rendements et de limiter au maximum le nombre de réactifs utilisés.

5.1 Dextrane-alcyne

La nouvelle réaction utilisée est la cyclo-addition alcyne/azide. Très largement documentée et utilisée pour des réactions de bioconjugaison depuis de nombreuses années, cette réaction présente l'avantage d'être rapide, orthogonale, et de se dérouler à température ambiante dans des solvants aqueux. Il a été choisi que la fonction alcyne serait introduite sur le dextrane alors que l'azide serait introduit en bout de chaîne du peptide par l'utilisation d'un acide aminé non naturel : l'azido-homoalanine (AHA).

Afin d'introduire l'alcyne sur le polymère, un protocole adapté de Nielson et al. a été utilisé; protocole selon lequel le dextrane est directement modifié par du glycidyl-propargyl-ether (GPE), à 35°C pendant 16h dans une solution de NaOH 0,5M (voir Annexe A, [117]). Après purification par dialyse contre de l'eau milli-Q, le dextrane obtenu (dextrane-GPE) a été analysée par RMN (Figure 5-1). L'alcyne ayant une signature très particulière en RMN, il peut facilement être identifié (singulet aux alentours de 2,5ppm). Une gamme de différents dextrane-GPE a ainsi été obtenue en faisant varier la concentration en GPE introduite pour la réaction. Le pourcentage de monomères modifiés sur le produit final est proportionnel à la quantité de GPE introduite en début de réaction. Il est donc possible de contrôler avec précision le degré de substitution du dextrane-GPE.

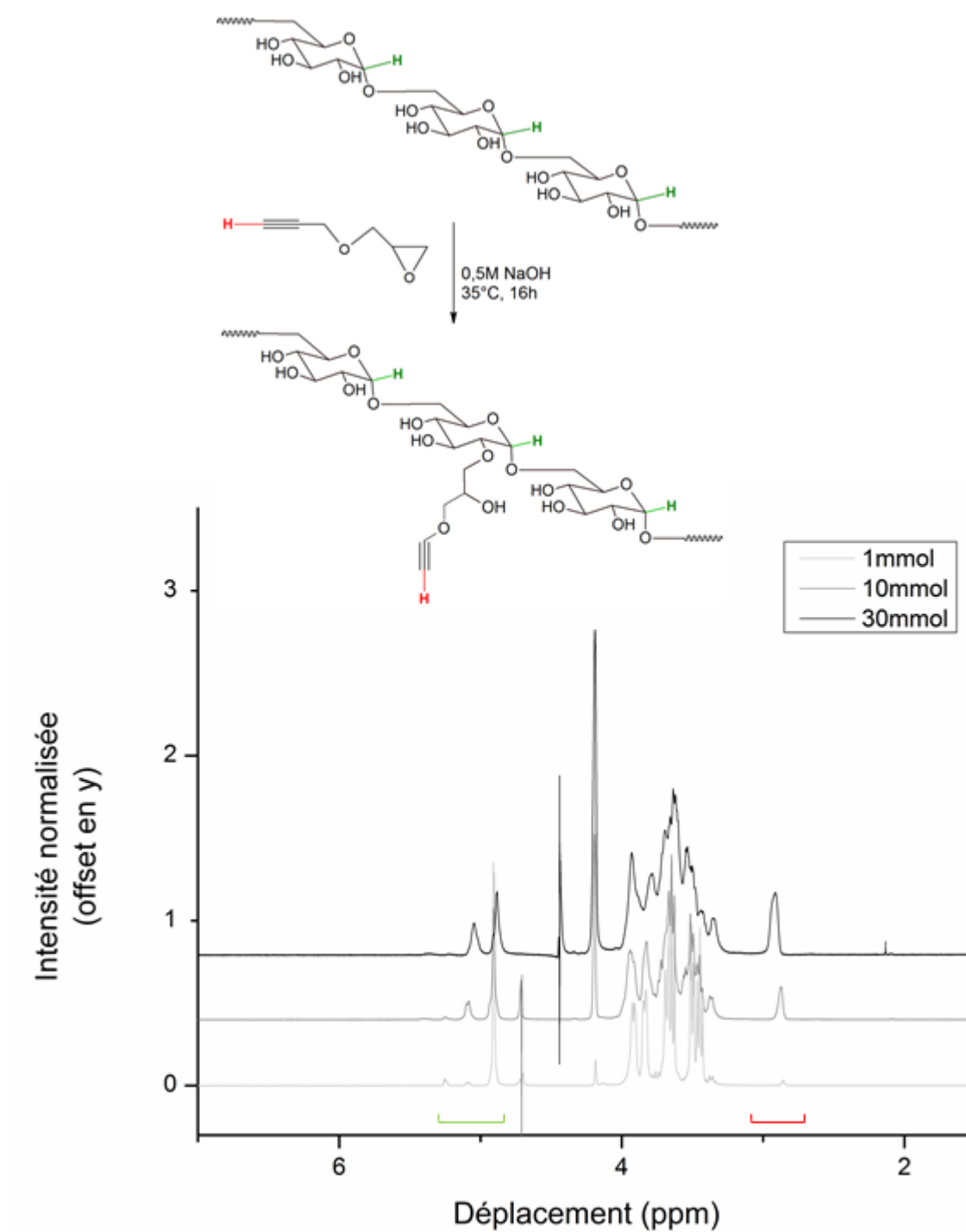


Figure 5-1 : Spectroscopie RMN du proton ^1H du dextrane-GPE après réaction du dextrane avec 1mmol, 10mmol ou 30mmol de GPE. Les protons H d'intérêts sont colorés en rouge (alcyne) ou en vert (quantification du dextrane total)

Un degré de substitution intermédiaire de 10% a été choisi pour continuer les réactions de chimie-click. Cela signifie qu'en moyenne 10% des monomères de la chaîne de dextrane comportent un alcyne. Un trop gros pourcentage de modification augmente l'hydrophobicité des chaînes de dextrane, ce qui n'est pas souhaité pour la suite. Un trop faible pourcentage diminuerait les rendements de la réaction de greffage des peptides, réactifs limitant de la cyclo-addition.

5.2 Mise au point de la réaction azide/alcyne

Les peptides commerciaux AHA-RGD et AHA-*Kcoil* étant très dispendieux, la réaction a été mise au point en utilisant un polymère d'un poids moléculaire similaire au *Kcoil* : du poly(éthylène) glycol, ou PEG, de 5000Da. Le polymère a été transformé chimiquement pour ajouter un azide en bout de chaîne puis a été purifié et stocké sous forme lyophilisée à -20°C et à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

La réaction de cyclo-addition a ensuite été réalisée dans de l'eau à température ambiante, pendant 48h, avec une catalyse au cuivre (I). Le protocole a été adapté à partir de Nielsen et al. (voir protocole en Annexe B, [117]). L'eau MilliQ est dégazée avant la réaction pour éviter la réoxydation trop rapide du cuivre. L'utilisation, ou non, du THPTA (Tris(benzyltriazolylmethyl)amine) pour stabiliser les ions Cu⁺, ne semble pas affecter le rendement de la réaction, ni la qualité des produits. Une plus grande quantité de cuivre (II) que celle mentionnée dans l'article a été utilisée pour obtenir un rendement plus élevé (un ratio 1:5 cuivre/alcyne). De même, un très large excès de sodium ascorbate a finalement été utilisé (50:1 ascorbate/cuivre). Après 24h de réaction, de l'agent réducteur frais peut être de nouveau ajouté au milieu réactionnel (ratio final ascorbate/cuivre de 10:1), puis la réaction est laissée vingt-quatre heures supplémentaires sous agitation.

Après 48h, le produit a ensuite été purifié en deux étapes. Tout d'abord, une dialyse dans une solution concentrée d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA 100mM) a permis d'éliminer toute trace de cuivre. Cette étape est indispensable car les ions cuivre sont cytotoxiques mais comme ils forment des complexes avec les triazoles, ils sont difficiles à retirer. Ensuite, le produit a été

filtré sur Amicon 10K contre de l'eau MilliQ. Finalement, le produit a été lyophilisé puis analysé par RMN (Figure 5-2). Une totale disparition du pic de l'alcyne a été observée, tandis qu'un pic de même intégrale est apparu à 8ppm, correspondant au triazole formé. Le rendement de la réaction est donc estimé à 100% avec la faible précision de la RMN dans le cas d'un excès de PEG-N3 par rapport aux alcynes (3 :1). Dans une condition 1:1, le rendement est estimé par RMN à 90%.

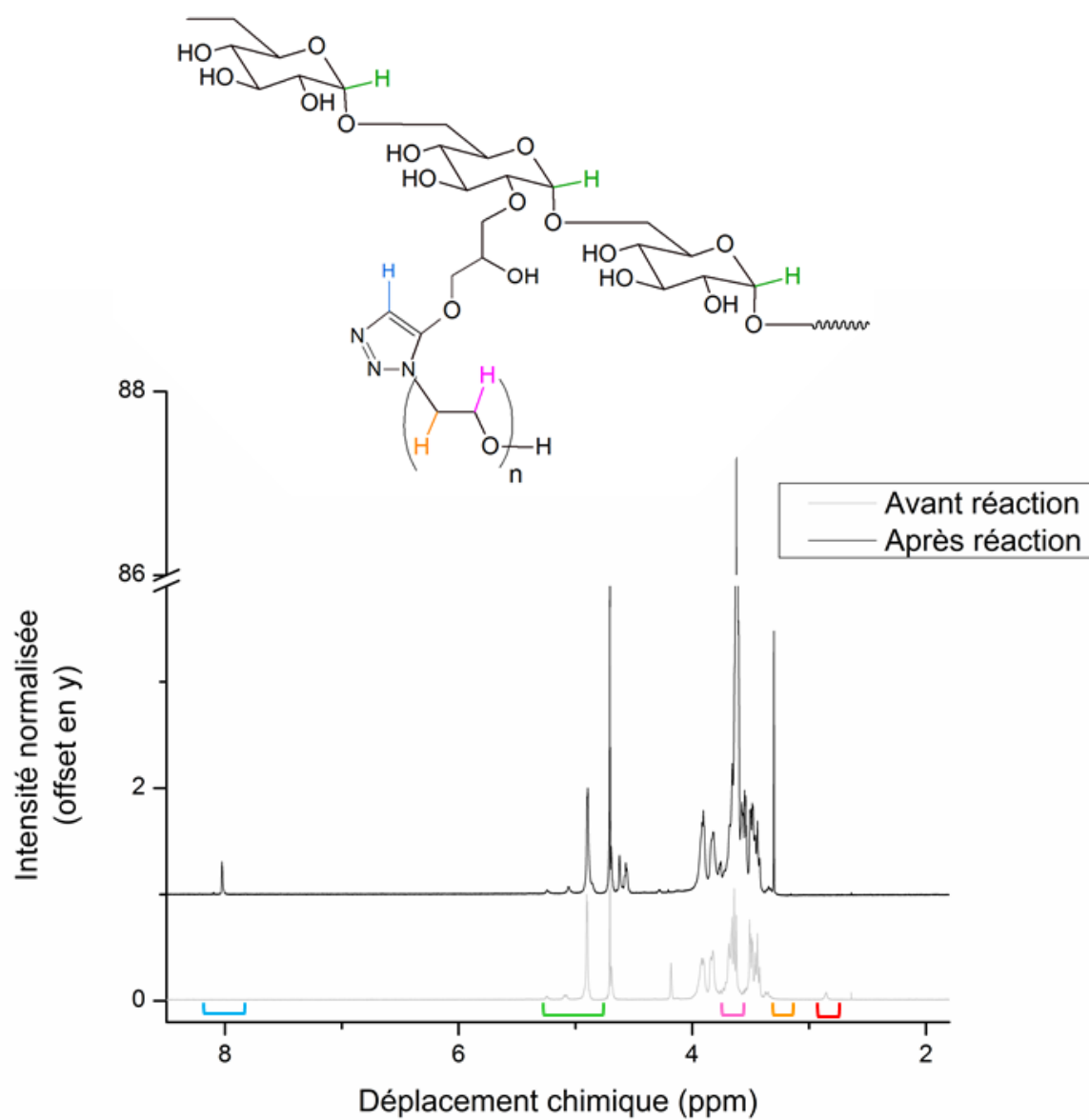


Figure 5-2 : Spectroscopie RMN du proton ^1H du produit de la réaction dextrane-GPE et PEG-N3. Les hydrogènes d'intérêt ont été colorés. Le spectre avant réaction est identique aux spectres de la figure précédente

5.3 Dextrane-RGD et Dextrane-*Kcoil*

Une fois le protocole validé, la réaction a pu être réalisée avec les peptides AHA-RGD et AHA-*Kcoil* (Annexe B, tableau B.2).

La quantité de RGD introduite a été calculée afin d'obtenir le même pourcentage final de RGD sur les chaînes de dextrane que dans le dextrane-VS-RGD utilisé dans Riahi et al. (2017) (c'est-à-dire approximativement 3% des monomères sont porteurs d'un RGD) [116]. Ainsi les mêmes ratios de dextrane modifié/dextrane total pourront être utilisés dans la formulation des gels.

De la même manière, la quantité de *Kcoil* a été calculée afin que le Dextran-AHA-*Kcoil* représente environ 0,1% de la masse totale de dextrane lors de la gélification. Le greffage du *Kcoil* étant plus délicat, il a été revérifié par un test de quantification des amines au TNBS (2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid), réactif qui se lie aux amines primaires pour former un composé coloré. Le rendement trouvé est plus faible que celui calculé avec la RMN du dextrane-GPE-PEG. Cela pourrait s'expliquer par une très forte absorption du *Kcoil* sur les surfaces, le rendant moins disponible pour réagir. Il est également possible que les pertes lors de la purification et des transferts de contenant se fassent de manière sélective, diminuant ainsi artificiellement le rendement, car le dextrane-*Kcoil* s'adsorbe plus facilement sur les surfaces que des chaînes non modifiées. Le produit final comporte 1% de monomères modifiés.

CHAPITRE 6 LES HYDROGELS

6.1 Fabrication et caractérisation des hydrogels

Les hydrogels sont fabriqués en mélangeant les chaînes de dextrane modifiées à du dextrane nu avant de les réticuler entre elles dans de l'eau à une concentration totale de 200mg/mL de dextrane. La réticulation est assurée par du sodium trimetaphosphate, ou STMP, et s'effectue dans des conditions basiques (NaOH 1M) à 50°C pendant 15min pour un volume de 250µL de solution. Un ratio dextrane/STMP de 3:1 en masse a été utilisé pour obtenir un gel transparent, facilement manipulable.

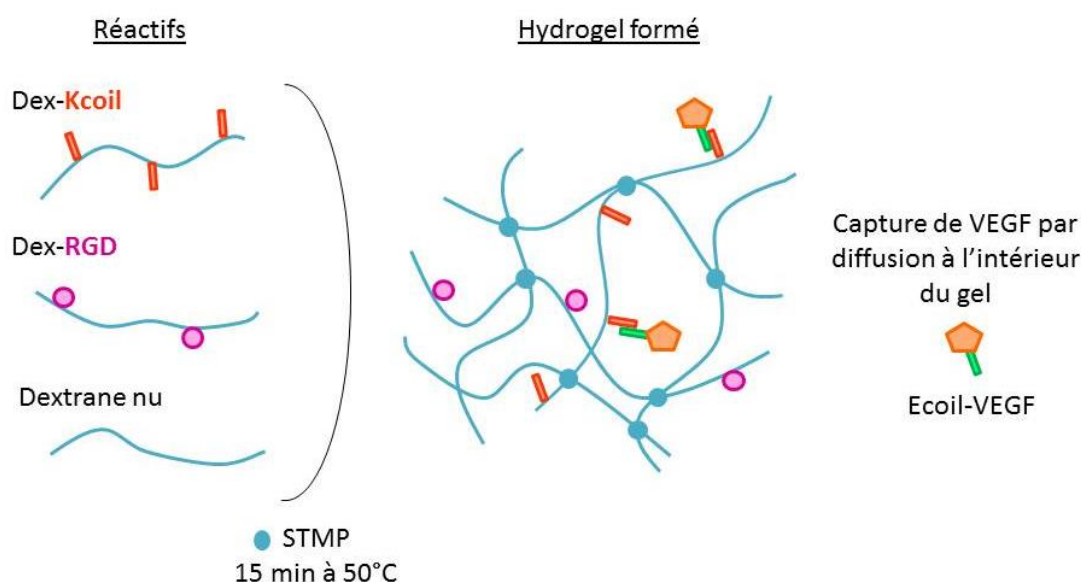


Figure 6-1 : Schéma de la stratégie utilisée pour former les hydrogels fonctionnalisés

Pour obtenir des pores interconnectés de l'ordre de la centaine de micromètres, un agent porogène, le chlorure de sodium (NaCl), a été ajouté à la limite de sa solubilité dans la solution de dextrane avant la réticulation. Comme dans «Impact of RGD amount in dextran-based hydrogels for cell delivery» de Riahi et al. (2017), le ratio dextrane/NaCl optimal de 1:0,25 a été utilisé dans tous les gels présentés dans la suite de ce mémoire sauf mention contraire [116].

Malgré une formulation identique, les taux de gonflements de mes gels sont légèrement supérieurs à ceux ayant été rapportés par *Riahi et al* (Figure 6-2, comparer colonnes bleues et grises). Cela pourrait peut-être s'expliquer par l'utilisation de nouveaux produits, pouvant avoir une réactivité légèrement différente. Une différence très significative a été observée dans le gonflement de gels immergés dans de l'eau ou dans du PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pendant 48h. Le taux de gonflement est calculé selon la formule suivante :

$$Q(\%) = \frac{W_{wet} * 100}{W_{dry}}$$

Avec W_{wet} la masse de l'hydrogel hydraté et W_{dry} la masse de l'hydrogel après lyophilisation.

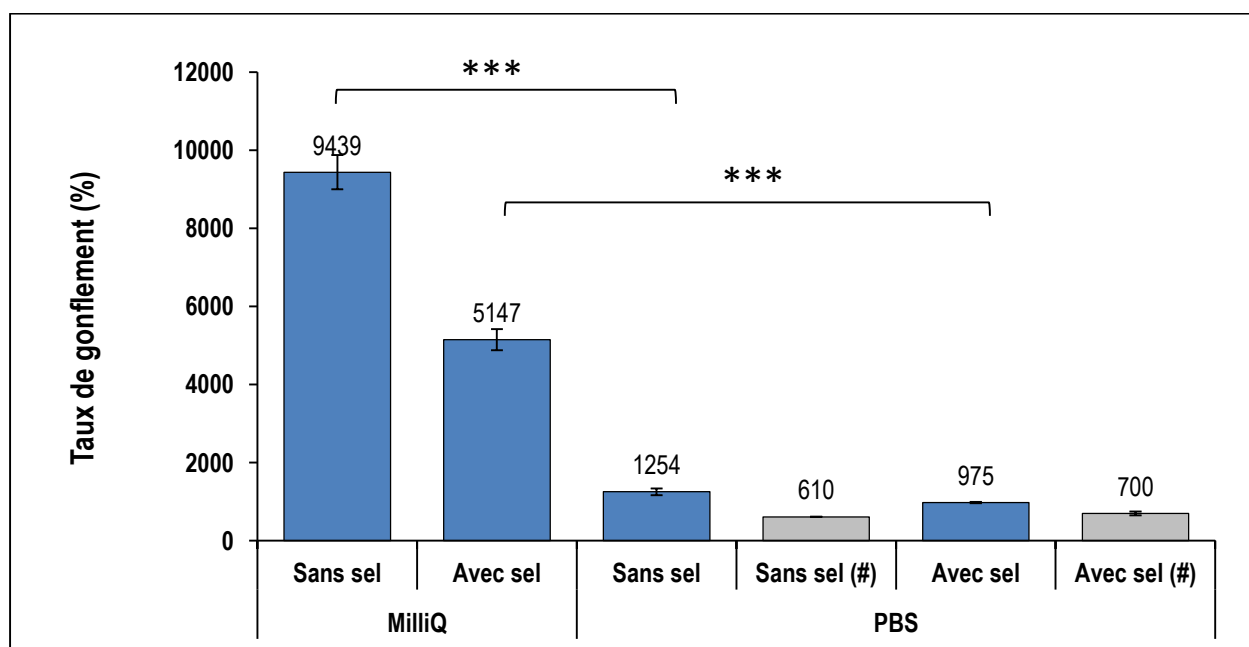


Figure 6-2 : Taux de gonflement d'hydrogels non fonctionnalisés avec ou sans sel ajouté dans la formulation, dans de l'eau MilliQ ou du PBS. Les colonnes grises marquées d'un (#) sont les résultats reportés dans Riahi et al [116]. *** signifie une p value < 0,005 selon un test de student

La procédure de stérilisation utilisée par Riahi et al, pour utiliser les gels pour la culture cellulaire, a été modifiée car elle dénaturait les gels [116]. En effet, après un rinçage de 30min à l'éthanol, des fissures ont été observées en surface, ce qui n'avait jamais été reporté précédemment. Une plus longue incubation dans de l'éthanol mène même à la déshydratation

complète du gel en 3h. L'hydrogel se rétracte pour former une petite pastille blanche opaque. Malheureusement, cette pastille ne se réhydrate pas correctement et le gel se détruit lorsqu'il est plongé dans de l'eau.

Remplacer cette stérilisation fut un véritable casse-tête. La filtration ne pouvait être utilisée car la solution préparée est trop concentrée en dextrane et donc trop visqueuse. Une stérilisation par UV dégrade la surface du gel et ne permet pas une stérilisation en profondeur. Finalement, un compromis assez simple a été adopté. Comme la réticulation s'effectue dans une solution concentrée de NaOH, nous avons émis l'hypothèse que cette étape ainsi que la présence d'antibiotique dans le milieu de culture suffiraient à maintenir un environnement stérile pour la durée de nos expériences. Les gels sont donc coulés dans des plaques stériles, fermées avant passage au four, et qui ne sont ouvertes que sous la hotte biologique. Les rinçages pour revenir à un pH neutre et enlever le surplus de sel sont effectués avec du PBS stérile. Ces précautions se sont révélées suffisantes pour la durée de nos expériences (un maximum de 7 jours).

6.2 Adhésion des cellules

Une fois les différents stocks de dextrans modifiés prêts et caractérisés, il fut question de valider cette nouvelle chimie et de prouver sa non-toxicité vis-à-vis des cellules. Pour cela, les premiers tests (adhésion et prolifération des cellules) publiés par *Riahi et al* furent reproduits [116].

Des gels contenant de 0,1% à 10% de dextrane modifié RGD soit par la méthode VS soit par la méthode AHA ont été comparés pour l'adhésion des HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). Dans une plaque 48 puits, des gels de 250µL ont été préparés de façon stérile. Puis 80 000 cellules par puits ont été incubées pour une durée de trois heures sur les différents hydrogels dans 250µL de milieu complet par puits. Les gels avaient été incubés pendant la nuit précédente dans du milieu de culture complet. Après 3h d'adhésion, un rinçage au PBS a été effectué puis la quantité des cellules ayant réellement adhérees a été évaluée par WST-1 (dilution 1 :10 du composé dans du milieu complet). Ce composé, qui mesure l'activité métabolique des cellules par colorimétrie, permet d'estimer la quantité de cellules restantes, car la réponse colorimétrique est proportionnelle au nombre de cellules à l'intérieur du puits (Figure 6-3). Une différence significative est observée entre des puits contenant ou non du RGD. En revanche, aucune différence n'est observée entre les deux réactions de greffages. Cela confirme que la

nouvelle réaction de greffage n'affecte pas l'adhésion des cellules et que le rendement du greffage a été correctement approximé puisqu'il permet d'obtenir la réponse souhaitée. Enfin, aucune différence significative n'est observée entre les différents niveaux de dextrane-RGD au sein d'une même réaction (de 0,1% à 10%) et ce, quelle que soit la réaction utilisée pour le greffage. Cela signifie que de faibles niveaux de RGD suffisent à l'adhésion des cellules en surface du gel. Il faudra cependant poursuivre les études sur de plus longues durées pour voir si la quantité de RGD affecte la migration et la pénétration des cellules dans le gel.

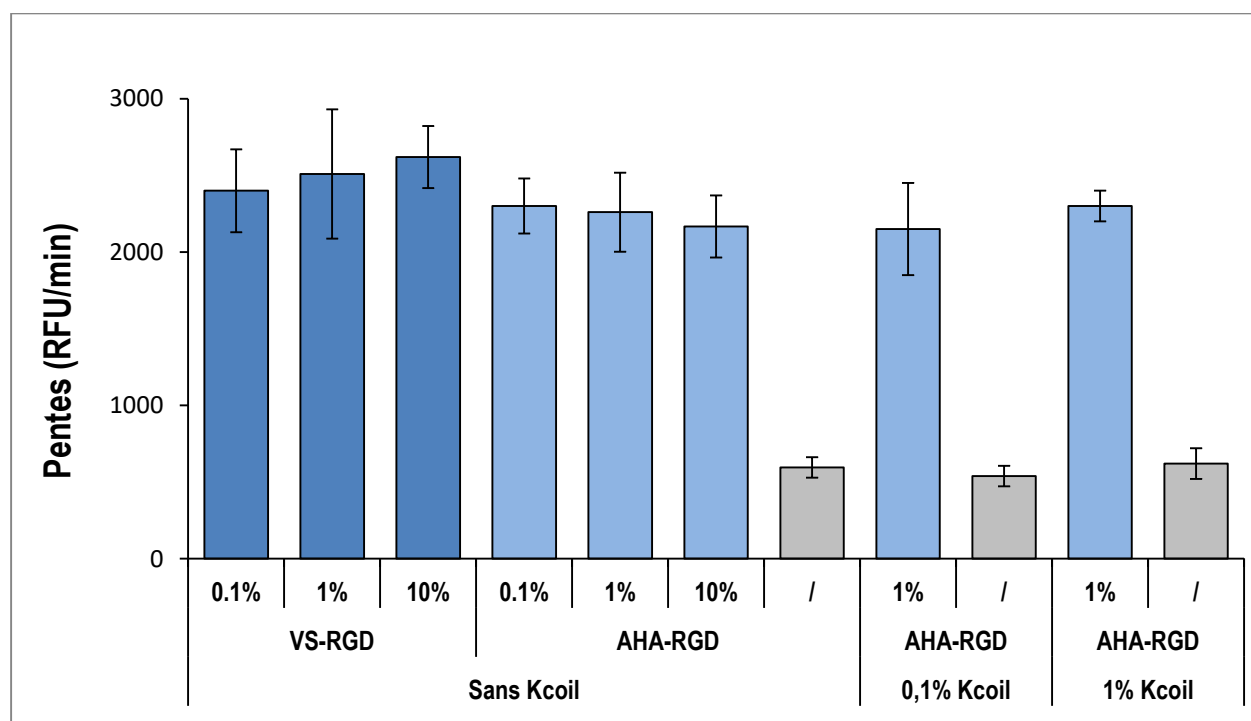


Figure 6-3 : Niveaux d'adhésion mesurés par un test WST-1 des HUVECs sur des hydrogels contenant 0,1% à 10% de VS-RGD ou de AHA-RGD. Les pentes sont calculées à partir de valeurs mesurées toutes les 30 minutes pendant 2 heures.

Pour finir, la présence de 0,1% dextrane-*Kcoil* (non dimérisé avec un *Ecoil*-VEGF) n'affecte pas l'adhésion des cellules sur une durée de 3h (Figure 6-3)

Après 3h à la surface de gels contenant du RGD, les cellules sont déjà allongées et bien réparties alors qu'elles sont bien rondes et regroupées entre elles quand il n'y a pas de RGD (Figure 6-4). Cependant, un rinçage un peu trop brutal décolle facilement les cellules, pour observer une

différence marquée entre les conditions avec et sans RGD, les cellules sont incubées 30 minutes en milieu basal pour retirer les cellules mal adhérentes puis un seul rinçage au PBS est réalisé (contrairement aux 3 rinçages dans Riahi et al. [116]).

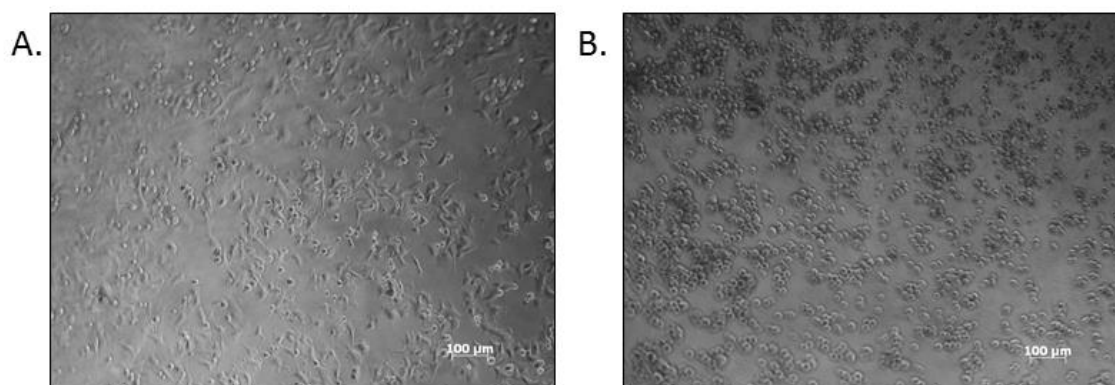


Figure 6-4 : Photographies des surfaces des hydrogels au microscope (grossissement 10x) après 3h d'adhésion (80000 cellules/puits) et avant rinçage. Le gel (A) contient 1% de dextrane-AHA-RGD alors que le gel (B) ne contient pas de RGD.

Si la disponibilité et la bio-activité du RGD ont ainsi été démontrées, il n'en est rien pour le *Kcoil*. Pour cela, nous avons utilisé un peptide synthétisé biologiquement, *Ecoil*-mRFP (*Red Fluorescent Protein*), qui a été incubé en excès sur des hydrogels contenant 0%, 1% et 10% de Dextran-AHA-*Kcoil*. Ensuite les hydrogels ont été longuement rincés puis la différence de fluorimétrie a été mesurée. Malheureusement, les niveaux de fluorescence étaient trop faibles pour être détectés avec précision et aucune différence n'a pu être observée entre ces trois conditions. Il faudrait pour cela augmenter la quantité de *Kcoil* dans le gel ce qui n'a pas été réalisé vu nos stocks limités de dextrane-*Kcoil*. La sensibilité des cellules aux facteurs de croissance étant bien supérieure à celle des instruments de fluorimétrie (de l'ordre du pM au lieu de µM), ce test a été abandonné. Les tests de prolifération avec facteurs de croissances devaient suffire pour déterminer la disponibilité du *Kcoil* immobilisé.

6.3 Prolifération des HUVECs en surface

L'adhésion des cellules sur une courte durée fonctionnant bien, le temps d'incubation a été rallongé afin d'observer la pénétration et la prolifération des cellules à l'intérieur du gel.

Dans un premier temps, les tests ont été réalisés sur des gels identiques à ceux utilisés pour l'adhésion dans du milieu complet jusqu'à 7 jours. Le protocole pour observer la prolifération des cellules sur les hydrogels a été adapté de Riahi et al. (2017) [116]. A leur 4^{ème} passage, les cellules sont incubées une nuit dans un milieu appauvri en sérum (0,5% de *fetal bovine serum* (FBS)), au lieu de 2% dans le milieu complet). Cela a pour effet de ralentir leur métabolisme et de limiter la variabilité inter cellules. Puis elles sont incubées à 80 000 cellules/puits dans 250µL de milieu complet. Après 3h, les puits sont rincés et le milieu est changé. Une plaque est analysée par WST-1 afin de donner le niveau d'adhésion au temps 0. Une autre plaque donnera le niveau intermédiaire à J3 et une dernière à J7 (Figure 6-5). Le milieu est renouvelé tous les 2 jours. Les hydrogels quant à eux, ont préalablement été rincés et incubés dans un milieu basal avant de recevoir les cellules.

Au jour 0, les niveaux d'adhésion sont similaires quels que soient les pourcentages de RGD, et le *Kcoil* n'a pas d'impact sur l'adhésion, corroborant les résultats d'adhésion obtenus antérieurement. Jusqu'au jour 4, aucune prolifération n'est observée. Au contraire, il y a même systématiquement une légère diminution du nombre de cellules. Cela peut être expliqué par une mortalité initiale importante due à un changement important des conditions de culture des cellules et par le fait que les cellules ayant mal adhérees augmentent artificiellement la valeur à J0 (l'étape d'incubation dans un milieu basal ayant été retirée). A partir du jour 7, on remarque une augmentation du nombre de cellules sur les gels contenant du AHA-RGD, allant jusqu'au double pour les gels contenant 1% de dextrane-AHA-RGD. Lorsque les gels ne contiennent pas de RGD, aucune prolifération n'est observée et les cellules continuent de mourir lentement. Étrangement, le gel de 0,1% de dextrane-VS-RGD n'a pas permis d'obtenir une prolifération en surface des cellules. Ceci pourrait s'expliquer par une plus faible disponibilité ou force du VS-RGD par rapport au AHA-RGD : les cellules, adhérant moins bien à la surface, se décolent et meurent.

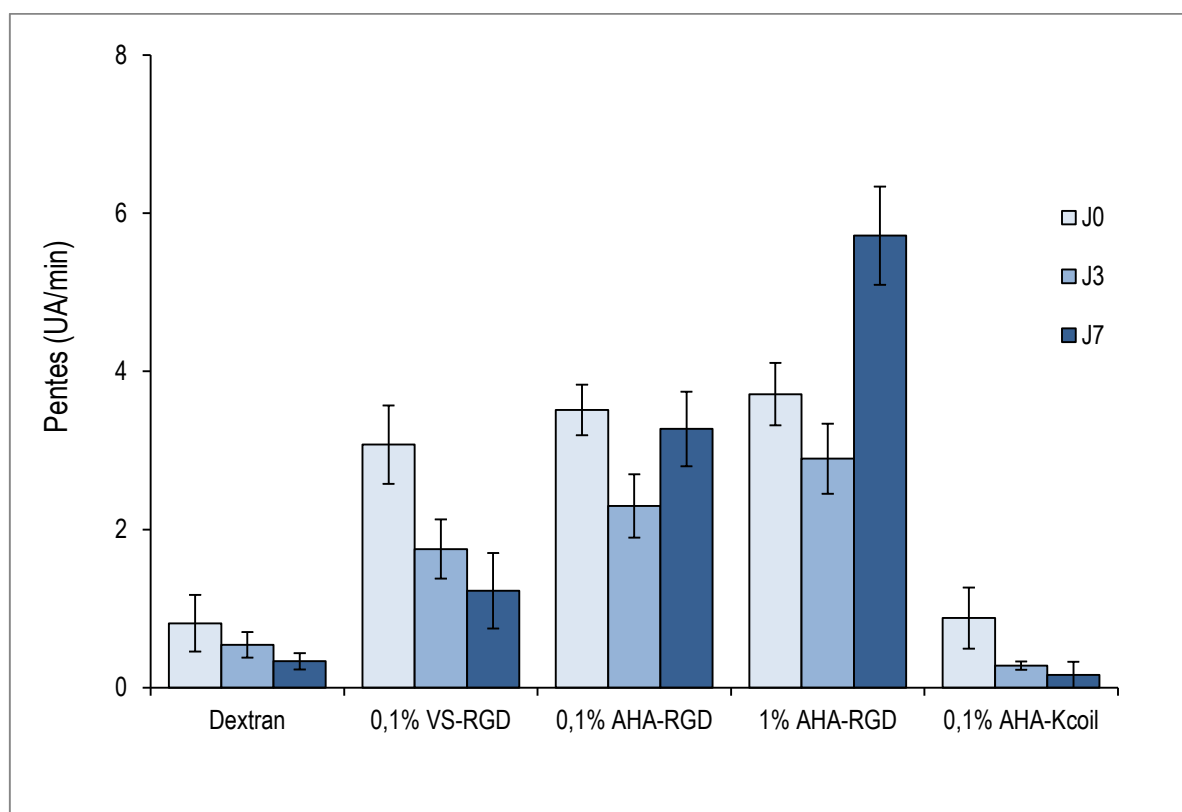


Figure 6-5 : Prolifération des HUVECs sur des hydrogels de dextrane fonctionnalisés mesurée par des tests au WST-1 à jour 0 (J0), jour 3 (J3) et jour (J7). Les pentes sont calculées à partir de valeurs mesurées toutes les 30 minutes pendant 2heures.

Une observation régulière de la surface des gels au microscope a permis de constater qu'à partir du quatrième jour, les cellules montrent les premiers signes de tubulogénèse. Les cellules commencent par s'organiser en cercles à la surface (Figure 6-6, image A) puis forment des fibres (Figure 6-6, image B). Cela traduit une bonne santé des cellules endothéliales vasculaires, mais ces fibres ne sont pas solidement attachées à la surface et elles se décollent lors des changements de milieu ou des rinçages, diminuant artificiellement la prolifération observée, en particulier pour les petits pourcentages de RGD.

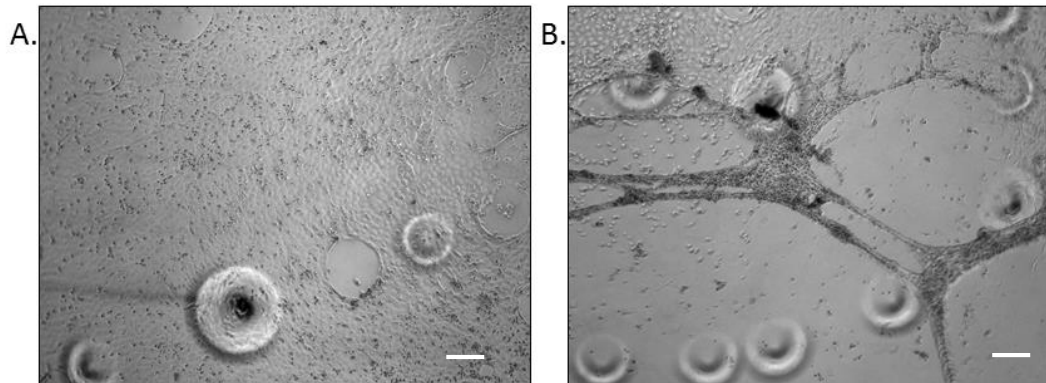


Figure 6-6 : Photographies des surfaces des hydrogels au microscope (grossissement 10X). La photo (A) a été prise au 4^{ème} jour, la photo (B) le 7^{ème} jour. Les barres d'échelle correspondent à une distance de 100 μ m.

6.4 Pénétration et prolifération des HUVECs à l'intérieur du gel

6.4.1 Mise au point d'une technique d'histologie

La simple observation au microscope ne permet pas de distinguer des cellules ailleurs que sur les surfaces des hydrogels. Un nouveau protocole a donc été développé pour observer les cellules présentes dans les gels. Pour cela, des techniques d'histologies classiques ont été adaptées à notre problématique.

A la fin d'une expérience, les cellules sont directement fixées sur le gel avec 800 μ L de formaldéhyde (parafilm 4%) pour la nuit. Les gels peuvent ensuite être stockés plusieurs semaines au réfrigérateur (4°C) dans du PBS. Il est important de préciser qu'une fois fixées, les cellules en surface des hydrogels se décollent très facilement en films, il faut donc éviter le plus possible les étapes de rinçages. Pour colorer le gel et préparer les cellules à la cryogénisation simultanément, les gels sont ensuite incubés dans un mélange 1:1 en volume, rouge de ponceau concentré (5mg/mL)/solution d'OCT (*Optimal cutting temperature compound*). Ensuite, les gels sont cryogénisés dans un bain d'acétone et de glace sèche pour former des blocs d'OCT. La coloration du gel permet alors de bien distinguer le gel à l'intérieur du bloc et facilite la coupe et l'orientation du bloc. Des coupes plus épaisses que ce qu'il se fait habituellement en histologie

(ici 16 μ m) ont été réalisées afin d'augmenter le nombre de cellules observées sur une seule coupe. Les coupes sont espacées les unes des autres d'une centaine de micromètres.

Deux techniques sont alors complémentaires. La méthode classique utilise l'électrostaticité pour coller la coupe sur une lame de verre. L'OCT étant parfaitement transparent, cette technique permet d'observer clairement l'hydrogel et ses contours au microscope (Figure 6-7, A). Malheureusement, le volume de l'hydrogel est très sensible à la température et aux changements de milieu. A l'air libre, il se déshydrate très rapidement, se rétractant et se décollant en l'espace de quelques minutes uniquement. Au microscope, on observe alors parfois des cellules qui ne sont plus dans le gel car celui-ci s'est trop rétracté. Pour minimiser cet effet, nous avons donc décidé de colorer les cellules avec de la fluorescéine, un fluorophore qui colore les noyaux des cellules, tout en scellant l'échantillon sur la plaque pour éviter qu'il se décolle ou sèche, le plus rapidement possible.

La deuxième technique d'histologie, utilise un morceau d'adhésif pour fixer l'échantillon sur la plaque de verre et permet ainsi d'éviter que le gel change de volume ou se décolle lors de la coloration des cellules et du scellement. Malheureusement, le morceau d'adhésif n'est pas parfaitement transparent et cette méthode apporte donc une certaine incertitude sur les contours du gel, plus difficiles à distinguer (Figure 6-7, B). Elle est également plus chère à mettre en œuvre.

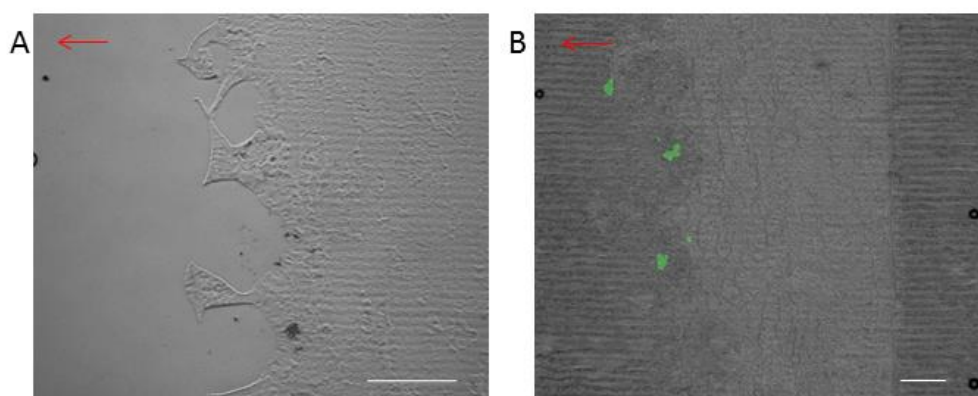


Figure 6-7 : Photographies au microscope classique de tranches de gel. Les plaques ont été préparées : (A) par la méthode classique, (B) avec l'utilisation d'un morceau d'adhésif. Les

cellules ont été marquées avec de la fluorescéine. La flèche rouge pointe la surface du gel, la barre d'échelle blanche correspond à 0,5mm.

6.4.2 Perforation de la surface

Jusqu'alors, aucune pénétration des cellules à l'intérieur du gel n'avait pu être observée. Les cellules restaient toujours à la surface du gel. Un comportement similaire avait été observé par Riahi et al, et l'hypothèse émise était que la surface ne possédait pas de pores. En effet, en gélifiant, une couche compacte et dense se formait à l'interface entre le gel et l'air, ne permettant pas aux cellules de pénétrer dans le gel. Cette hypothèse a pu de nouveau être confirmée par observation au microscope électronique à balayage (MEB ou SEM, *scanning electron microscope*) de la surface de notre hydrogel (Figure 6-8).

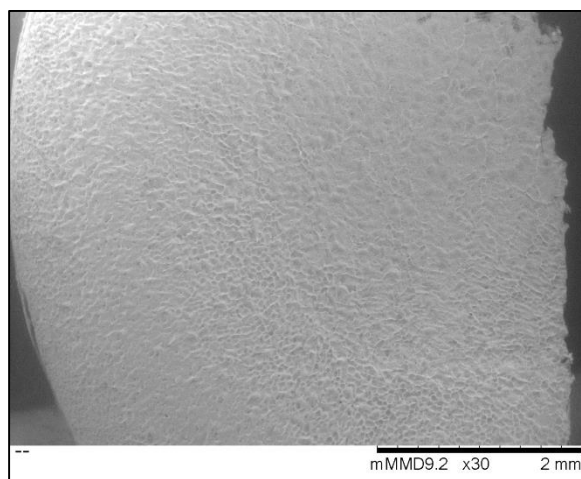


Figure 6-8 : Photographie au microscope électronique à balayage de la surface d'un hydrogel de dextrane après rinçage et lyophilisation (grossissement 30X)

Pour perforer la surface et ainsi accéder aux pores à l'intérieur du gel, la solution proposée dans l'article était de déposer à la surface du gel des cristaux de NaCl pendant la gélification (10^{ème} minute sur 15). Malheureusement, malgré une formulation identique des gels, je n'ai pas été en mesure de reproduire les résultats publiés. De manière assez inattendue, des cristaux de NaCl déposés selon le même protocole lors de la gélification ne suffisaient plus à perforer la surface (Figure 6-9, A). La première hypothèse de travail fut qu'il s'agissait de réactifs différents et donc

que leur réactivité était sûrement légèrement différente. La première idée a donc été de tester différents temps de dépôts (6, 8, 10, 12, 14 minutes). A partir de 10 minutes, la gélification est trop avancée et les cristaux ne créent plus aucun pore en surface, contrairement à ce qui avait pu être observé sur les gels de Nesrine Riahi [116]. En revanche, le dépôt de cristaux à 6 et 8 minutes, lorsque le gel est encore partiellement liquide a bel et bien abîmé la surface (Figure 6-9, C). Cependant, cela n'a pas permis d'accéder aux pores à l'intérieur du gel. La surface possède des cratères, mais ces derniers ne sont pas ouverts sur le reste du gel. De plus, l'ajout de sel en surface avait pour effet d'écraser le gel, et cet effet s'accroît lorsque le sel est ajouté plus tôt (Figure 6-9, B et D). L'intérieur du gel n'est donc plus poreux et homogène comme souhaité.

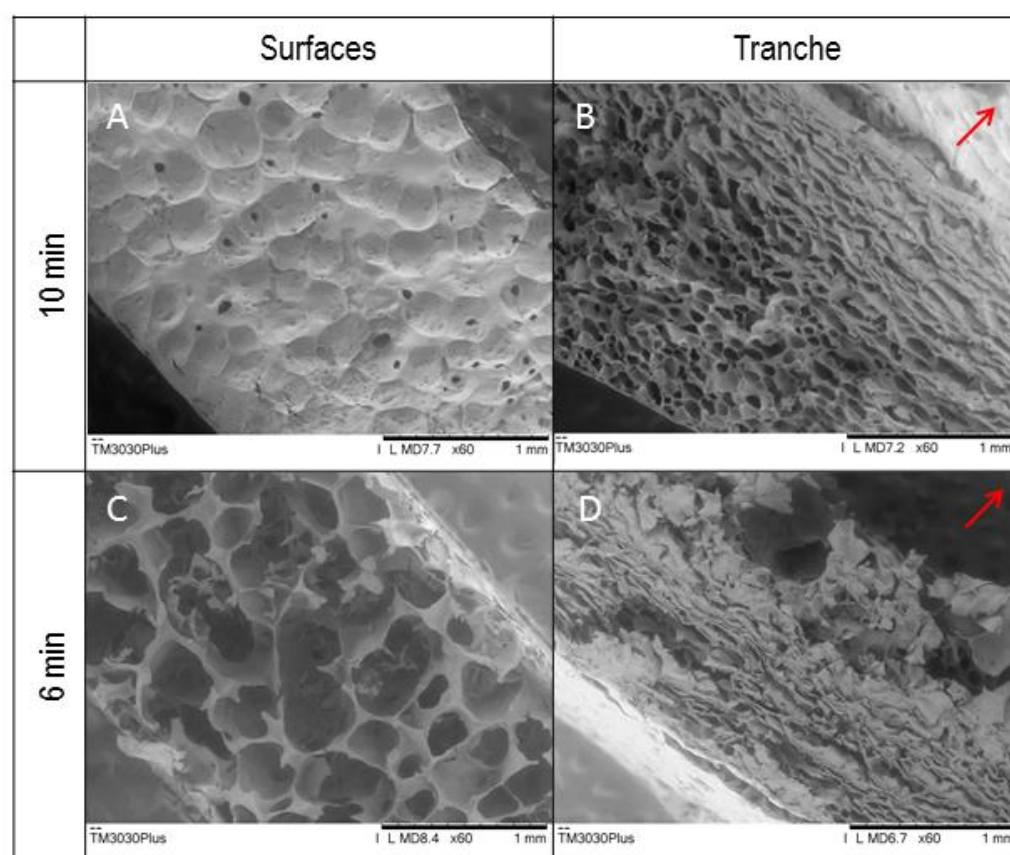


Figure 6-9 : Photographies prises au microscope électronique à balayage (grossissement 60X) d'hydrogels sur lesquels des cristaux de NaCl ont été déposés après 6 ou 10 minutes de gélification. La flèche rouge indique la direction de la surface du gel sur les photos des tranches.

Face à ses résultats surprenants, l'idée est alors venue de remplacer les cristaux de NaCl par des cristaux plus fins et plus légers de bicarbonate de potassium, KHCO_3 . De nouveau, différents temps ont été testés mais aucune solution satisfaisante n'a pu être trouvée. Même à 6 minutes, le dépôt de cristaux de KHCO_3 n'a pas permis de perforer efficacement la surface sans écraser le reste du gel.

6.4.3 Retour en arrière - formulation du gel

Une nouvelle solution pour perforer la surface devait donc être trouvée. En effet, la finalité de l'hydrogel est de servir d'échafaudage cellulaire, il faut donc absolument que les cellules pénètrent et colonisent facilement la structure. Or, le chargement des cellules ne peut se faire que par la surface car les cellules ne résisteraient pas aux conditions de réticulation (NaOH 1M, 50°C pendant 15min). L'hydrogel doit donc être entièrement poreux et homogène, y compris la surface. De plus, la taille des pores doit être supérieure à la taille d'une cellule et les pores doivent être interconnectés afin de permettre la migration des cellules et les échanges de nutriments.

Une nouvelle formulation de gel, inspirée de Purnama *et al* (2013), a alors été envisagée. En effet, le bicarbonate de potassium à l'intérieur du gel se dégrade en revenant à pH neutre en CO_2 [118]. De petites bulles vont abîmer le gel de l'intérieur et la surface par la même occasion. Ainsi, cela présente l'avantage de jouer à la fois le rôle d'agent porogène à l'intérieur et de perforer la surface, contrairement au NaCl qui nécessitait une manipulation supplémentaire pour la surface. Différentes quantités de KHCO_3 ont été testées, allant de 1% à 200% de la masse totale du dextrane. Au-delà de 50%, le bicarbonate n'est plus soluble dans une solution de 200mg/mL de dextrane T500. Les gels formés ne résistent pas aux rinçages et se décomposent. Les petits pourcentages de bicarbonate de potassium conduisent à une faible taille de pores et une surface peu perforée. L'ajout de 33% est donc le meilleur compromis. L'hydrogel obtenu est intéressant : poreux et homogène avec une surface perforée. Cependant, l'interconnexion des pores semble assez limitée. L'ajout d'une petite quantité de NaCl (10%) permet d'augmenter cette interconnexion (Figure 6-10).

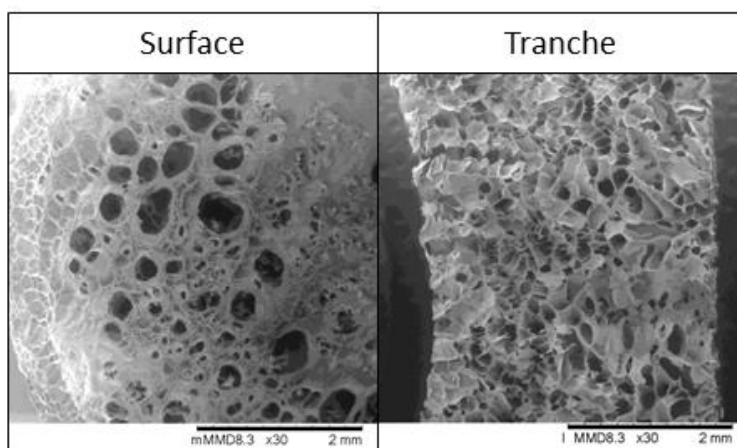


Figure 6-10 : Photographies prises au microscope électronique à balayage (grossissement 30X) d'un hydrogel contenant 33% m/m totale de dextrane de bicarbonate de potassium et 10% m/m totale de dextrane de NaCl.

Enfin, le rinçage de ces hydrogels est délicat et doit être réalisé avec précision, sinon le relargage du CO_2 ne se fait pas à la même vitesse et l'aspect de la surface peut fortement différer. Un manque de temps ne m'a malheureusement pas permis d'affiner le travail sur ces hydrogels et de les tester avec des cellules.

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce projet de maîtrise a été réalisé dans la continuité du projet de doctorat de Nesrine Riahi, précédente étudiante du professeur De Crescenzo. Dans un contexte où les échafaudages cellulaires doivent ressembler toujours plus à la matrice extracellulaire pour répondre aux besoins cliniques, nous avons cherché à développer un hydrogel de dextrane fonctionnalisé et facilement utilisable. Ses travaux ont abouti à un hydrogel ayant les bonnes propriétés physique et mécanique, et permettant l'adhésion des cellules mais qui ne présentait aucun facteur de croissance à sa surface. En m'appuyant sur les recherches préalables du groupe, j'ai souhaité immobiliser le peptide *Kcoil* sur le polymère afin de pouvoir ensuite utiliser la large bibliothèque disponible de facteurs de croissances couplés au peptide *Ecoil*. L'efficacité du complexe *Kcoil/Ecoil* pour immobiliser les facteurs de croissance et prolonger leur bioactivité a déjà été démontrée sur différentes surfaces mais n'a pas encore été utilisée dans notre laboratoire sur des structures tridimensionnelles. Le résultat final de mon projet devait être un hydrogel facilement adaptable à la culture de différents types cellulaires grâce à une technique d'immobilisation excessivement simple des facteurs de croissance de notre choix : c'est-à-dire une simple diffusion sur un hydrogel déjà formé.

Le greffage chimique du *Kcoil* sur le dextrane a été abordé selon deux méthodes. La première consistait à réaliser une addition de Michael d'un groupement vinylsulfone sur un thiol, et la deuxième, une cycloaddition de Huisen entre un azide et un alcyne. Dans le premier cas, le principal problème rencontré a été l'oxydation rapide du peptide *Kcoil* avec la formation d'un pont disulfure entre deux thiols destinés au greffage. Nous avons donc effectué une étude sur la réduction simultanée au greffage avec pour objectif d'augmenter les rendements de réaction tout en limitant la perte de réactifs. Les travaux ont été étendus à des groupements voisins du VS, tel que le maléimide ou à d'autres réactions utilisant un thiol comme l'échange de ponts disulfures. Dans tous les cas, l'utilisation d'agents réducteurs, en particulier le TCEP, a permis d'augmenter la quantité de peptides greffés. Malheureusement, le rendement des réactions n'a jamais pu être mesuré avec précision, principalement car nous disposions de stocks trop limités pour réaliser des quantifications telles que la RMN qui demande des quantités importantes de matériel.

Pour la deuxième réaction, les rendements obtenus ont été très satisfaisants. Cependant, la disponibilité du *Kcoil* à l'intérieur du gel n'a pas encore été réellement prouvée. La bonne

disponibilité du RGD lors des tests d'adhésion laisse tout de même penser que cette réaction classique de bioconjugaison a permis d'attacher le *Kcoil* sans affecter son activité biologique.

Il est difficile de comparer les deux méthodes, car les travaux sur la première réaction ont été intégralement réalisés sur des surfaces. La question se pose cependant à savoir quelle méthode est la plus intéressante pour réaliser des hydrogels. Même si les rendements sont probablement moins élevés, la chimie du thiol reste plus accessible économiquement. Le peptide *Kcoil* peut être produit biologiquement selon le protocole décrit dans Riahi et al. (2016) *Amino Acids* [119], ce qui reste plus abordable que l'achat d'un *Kcoil* se terminant par un acide aminé non naturel. De plus, pour cette méthode, les groupements actifs (c'est-à-dire les VS) sont neutralisés par une petite molécule en large excès se terminant par un groupement hydroxyle hydrophile (le mercaptoethanol). En revanche dans le cas de la cycloaddition, les alcynes n'ayant pas réagi restent libres dans le gel. Plusieurs études montrent qu'ils ne sont pas toxiques pour les cellules mais ils sont hydrophobes et il n'est pas exclu que leur présence influence le comportement des cellules à l'intérieur du gel. Ces questions devront être adressées pour choisir la méthode de greffage puis optimiser la quantité de groupements réactifs présents sur la chaîne de dextrane avant le greffage du peptide.

Enfin, les travaux de Nesrine Riahi n'ont pas pu être reproduits malgré l'utilisation des mêmes protocoles. Une différence de réactivité des nouveaux produits, ou une différence subtile dans le protocole pourrait être à l'origine de telles modifications macroscopiques sur la structure des hydrogels. Malheureusement, cela m'a fait perdre un temps précieux sur la courte durée d'une maîtrise car j'ai longtemps essayé de reproduire la structure de ces gels pour faire pénétrer les cellules et je n'ai donc pas pu m'intéresser à l'immobilisation des facteurs de croissance. En effet, la pénétration des cellules à l'intérieur du gel est essentielle pour l'utilisation de cet hydrogel en tant qu'échafaudage cellulaire. D'autres méthodes de colonisation du gel sont difficilement envisageables car la gélification du dextrane par le STMP est un procédé qui se fait dans des conditions difficiles auxquelles les cellules ne survivraient pas. Elle doit donc avoir lieu après la gélification. La pénétration par la surface reste le procédé le plus simple à mettre en œuvre.

Les résultats finaux sont proches d'une structure souhaitable. Notre étude sur la porosité l'hydrogel a permis d'améliorer cette dernière même si elle semble encore manquer d'interconnexion et d'homogénéité. Les travaux doivent continuer dans cette direction pour obtenir à nouveau un hydrogel aux propriétés structurales adéquates avant de recommencer à s'intéresser aux facteurs de croissance.

CHAPITRE 8 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

L'objectif de mon projet de recherche était de développer un hydrogel adaptable à la culture de plusieurs types cellulaires grâce à l'utilisation du couple de peptides *Ecoil/Kcoil*. Les travaux précédents du laboratoire ont fourni une bibliothèque de facteurs de croissance bioactifs, couplés au peptide *Ecoil* pouvant être utilisés.

Le greffage du *Kcoil* sur le polymère a été réalisé selon deux réactions chimiques de façon concluante. La première réaction, utilisant un thiol libre, a été optimisée sur des surfaces par l'utilisation d'une réduction simultanée au greffage. Ces résultats ont principalement montré que l'utilisation d'agents réducteurs en même temps que le greffage permet d'améliorer significativement les rendements. Cependant tous les agents réducteurs testés (BME, DTT, TCEP) interagissent de façon non négligeable avec les groupements réactifs de la surface. Il faut donc les utiliser avec précaution. La deuxième réaction, déjà largement utilisée dans la littérature a été pour la première fois, à ma connaissance, appliquée au *Kcoil*. Elle a démontré des résultats très encourageants pour la suite. Ces deux réactions sont donc deux outils puissants pour la bioconjugaison et peuvent facilement être adaptés à d'autres polymères ou peptides utilisés dans le laboratoire.

La création d'une bibliothèque de dextrans modifiés (avec les peptides RGD et *Kcoil*) permet de former en quelques minutes un hydrogel en jouant facilement sur sa composition, puis d'y incorporer le cocktail de facteurs de croissance souhaité en fonction du type de cellule. Cependant le produit final n'a pas permis de fournir aux cellules un environnement propice à leur migration et prolifération à l'intérieur du gel. Il ne remplit donc pas le cahier des charges. L'hypothèse est que la porosité et l'interconnexion des pores ne sont pas suffisantes. L'approfondissement des travaux sur les agents porogènes devrait mener à des résultats prometteurs. Une fois la porosité atteinte, des tests de pénétration et prolifération des cellules à l'intérieur du gel pourront être effectués afin d'optimiser la quantité de *Kcoil* immobilisée et la composition des cocktails de facteurs de croissance. L'observation en histologie des échafaudages permettra une analyse plus précise et visuelle des résultats. Pour finir, l'utilisation de cellules souches pourra être envisagée afin d'étudier la différenciation et la formation d'un tissu mature.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] “United Network for Organ Sharing (UNOS).” [Online]. Available: <https://unos.org/>.
- [2] J. R. Fuchs, B. A. Nasser, and J. P. Vacanti, “Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 72, no. 2, pp. 577–591, Aug. 2001.
- [3] L. E. Niklason and R. Langer, “Prospects for Organ and Tissue Replacement,” *JAMA*, vol. 285, no. 5, p. 573, Feb. 2001.
- [4] R. Langer and J. Vacanti, “Tissue engineering,” *Science* (80-.), vol. 260, no. 5110, pp. 920–926, May 1993.
- [5] J. L. Drury and D. J. Mooney, “Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 24, pp. 4337–4351, Nov. 2003.
- [6] A. K. A. Silva, M. Juenet, A. Meddahi-Pellé, and D. Letourneur, “Polysaccharide-based strategies for heart tissue engineering,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 116, pp. 267–277, 2015.
- [7] S. M. Muthana, C. T. Campbell, and J. C. Gildersleeve, “Modifications of Glycans: Biological Significance and Therapeutic Opportunities,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 7, no. 1, pp. 31–43, Jan. 2012.
- [8] S. P. Massia, J. Stark, and D. S. Letbetter, “Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 22, pp. 2253–2261, Nov. 2000.
- [9] S. G. Lévesque, R. M. Lim, and M. S. Shoichet, “Macroporous interconnected dextran scaffolds of controlled porosity for tissue-engineering applications,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 35, pp. 7436–7446, 2005.
- [10] J. E. Leslie-Barbick, J. J. Moon, and J. L. West, “Covalently-immobilized vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell tubulogenesis in poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 20, no. 12, pp. 1763–1779, 2009.
- [11] R. J. Galas and J. C. Liu, “Surface density of vascular endothelial growth factor modulates endothelial proliferation and differentiation,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 115, no. 1, pp. 111–120, 2014.
- [12] F. Murschel, B. Liberelle, G. St-Laurent, M. Jolicœur, Y. Durocher, and G. De Crescenzo,

- “Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor,” *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 6, pp. 6806–6813, 2013.
- [13] O. Wichterle and D. Lim, “Hydrophilic Gels for Biological Use,” *Nature*, vol. 185, no. 4706, pp. 117–118, Jan. 1960.
- [14] E. Caló and V. V. Khutoryanskiy, “Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products,” *Eur. Polym. J.*, vol. 65, pp. 252–267, Apr. 2015.
- [15] A. S. Hoffman, “Hydrogels for biomedical applications,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. SUPPL., pp. 18–23, 2012.
- [16] N. A. Peppas, B. V. Slaughter, and M. A. Kanelberger, “Hydrogels,” in *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, Elsevier, 2012, pp. 385–395.
- [17] A. M. Jonker, D. W. P. M. Löwik, and J. C. M. van Hest, “Peptide- and Protein-Based Hydrogels,” *Chem. Mater.*, vol. 24, no. 5, pp. 759–773, Mar. 2012.
- [18] N. A. Peppas, Y. Huang, M. Torres-Lugo, J. H. Ward, and J. Zhang, “Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology,” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 2, pp. 9–29, 2000.
- [19] M. A. Casadei, G. Pitarresi, R. Calabrese, P. Paolicelli, and G. Giammona, “Biodegradable and pH-Sensitive Hydrogels for Potential Colon-Specific Drug Delivery : Characterization and In Vitro Release Studies,” *Biomacromolecules*, vol. 9, pp. 43–49, 2008.
- [20] T. Wallmersperger, K. Keller, B. Kröplin, M. Günther, and G. Gerlach, “Modeling and simulation of pH-sensitive hydrogels,” *Colloid Polym. Sci.*, vol. 289, no. 5–6, p. 535.
- [21] Y. Zhao, C. Shi, X. Yang, B. Shen, Y. Sun, Y. Chen, X. Xu, H. Sun, K. Yu, B. Yang, and Q. Lin, “pH- and Temperature-Sensitive Hydrogel Nanoparticles with Dual Photoluminescence for Bioprobes,” *ACS Nano*, vol. 10, no. 6, pp. 5856–5863, Jun. 2016.
- [22] V. Singh, S. S. Bushetti, R. Appala, A. Shareef, S. S. Imam, and M. Singh, “Stimuli-sensitive hydrogels: a novel ophthalmic drug delivery system,” *Indian J. Ophthalmol.*, vol. 58, no. 6, pp. 477–81, 2010.
- [23] Y. Qiu and K. Park, “Environment-sensitive hydrogels for drug delivery,” *Adv. Drug*

Deliv. Rev., vol. 53, no. 3, pp. 321–339, Dec. 2001.

- [24] A. Altunbas and D. J. Pochan, “Peptide-Based and Polypeptide-Based hydrogels for drug delivery and tissue Engineering,” in *TripleC*, vol. 11, no. 1, 2013, pp. 136–170.
- [25] T. Coviello, P. Matricardi, C. Marianecci, and F. Alhaique, “Polysaccharide hydrogels for modified release formulations,” *J. Control. Release*, vol. 119, no. 1, pp. 5–24, May 2007.
- [26] D. Pasqui, M. De Cagna, and R. Barbucci, “Polysaccharide-based hydrogels: The key role of water in affecting mechanical properties,” *Polymers (Basel)*, vol. 4, no. 3, pp. 1517–1534, 2012.
- [27] T. M. Aminabhavi and A. S. Deshmukh, “Polysaccharide-Based Hydrogels as Biomaterials,” 2016, pp. 45–71.
- [28] S. Kalia, Ed., *Polymeric Hydrogels as Smart Biomaterials*. Cham: Springer International Publishing, 2016.
- [29] J. P. Schillemans, E. Verheyen, A. Barendregt, W. E. Hennink, and C. F. Van Nostrum, “Anionic and cationic dextran hydrogels for post-loading and release of proteins,” *J. Control. Release*, vol. 150, no. 3, pp. 266–271, Mar. 2011.
- [30] J. Araki and Y. Yamanaka, “Anionic and cationic nanocomposite hydrogels reinforced with cellulose and chitin nanowhiskers: effect of electrolyte concentration on mechanical properties and swelling behaviors,” *Polym. Adv. Technol.*, vol. 25, no. 10, pp. 1108–1115, Oct. 2014.
- [31] C. T. Huynh, M. K. Nguyen, and D. S. Lee, “Dually cationic and anionic pH/temperature-sensitive injectable hydrogels and potential application as a protein carrier,” *Chem. Commun.*, vol. 48, no. 89, p. 10951, 2012.
- [32] B. Jeong, S. W. Kim, and Y. H. Bae, “Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, pp. 154–162, Dec. 2012.
- [33] J. Maia, M. B. Evangelista, H. Gil, and L. Ferreira, “Dextran-based materials for biomedical applications,” in *Carbohydrates Applications in Medicine*, vol. 37661, no. 2, 2014, pp. 31–53.

- [34] S. R. Van Tomme and W. E. Hennink, "Biodegradable dextran hydrogels for protein delivery applications," *Expert Rev Med Devices*, vol. 4, no. 2, pp. 147–164, 2007.
- [35] W. N. E. van Dijk-Wolthuis, J. A. M. Hoogeboom, M. J. van Steenberg, and S. K. Y. Tsang, and W. E. Hennink*, "Degradation and Release Behavior of Dextran-Based Hydrogels," 1997.
- [36] G. Gainza, S. Villullas, J. L. Pedraz, R. M. Hernandez, and M. Igartua, "Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 11, no. 6, pp. 1551–1573, 2015.
- [37] "Granugel." [Online]. Available: <https://www.convatec.co.uk/products/pc-wound-granugel/granugel-gel>.
- [38] "Intrasite Gel." [Online]. Available: <https://e-pansement.fr/dispositifs/intrasite-gel>.
- [39] V. Jones, J. E. Grey, and K. G. Harding, "Wound dressings.," *BMJ*, vol. 332, no. 7544, pp. 777–80, Apr. 2006.
- [40] J. D. Cabral, "Antimicrobial Polymeric Hydrogels," 2016, pp. 153–170.
- [41] A. S. Veiga and J. P. Schneider, "Antimicrobial hydrogels for the treatment of infection.," *Biopolymers*, vol. 100, no. 6, pp. 637–44, Nov. 2013.
- [42] "Unicharm Japon." [Online]. Available: <http://www.unicharm.vn/index.html>.
- [43] A. Sannino, C. Demitri, and M. Madaghiele, "Biodegradable cellulose-based hydrogels: Design and applications," *Materials (Basel)*, vol. 2, no. 2, pp. 353–373, 2009.
- [44] "Cervidil website." [Online]. Available: www.cervidil.com.
- [45] A. Kumar, S. S. Lahiri, and H. Singh, "Development of PEGDMA : MAA based hydrogel microparticles for oral insulin delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 323, pp. 117–124, 2006.
- [46] A. K. Nayak and D. Pal, "Sterculia Gum-Based Hydrogels for Drug Delivery Applications," 2016, pp. 105–151.
- [47] S. Noel, A. Hachem, Y. Merhi, and G. De Crescenzo, "Development of a polyester coating combining antithrombogenic and cell adhesive properties: Influence of sequence and

- surface density of adhesion peptides,” *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 6, pp. 1682–1694, 2015.
- [48] W. Boot, D. Gawlitta, P. G. J. Nikkels, B. Pouran, M. H. P. van Rijen, W. J. A. Dhert, and H. C. Vogely, “Hyaluronic Acid-Based Hydrogel Coating Does Not Affect Bone Apposition at the Implant Surface in a Rabbit Model,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 475, no. 7, pp. 1911–1919, Jul. 2017.
- [49] P. Singha, J. Locklin, and H. Handa, “A Review of the Recent Advances in Antimicrobial Coatings for Urinary Catheters,” *Acta Biomater.*, 2016.
- [50] S. Noel, C. Fortier, F. Murschel, A. Belzil, G. Gaudet, M. Jolicœur, and G. De Crescenzo, “Co-immobilization of adhesive peptides and VEGF within a dextran-based coating for vascular applications,” *Acta Biomater.*, vol. 37, pp. 69–82, 2016.
- [51] M. C. Frost, M. M. Reynolds, and M. E. Meyerhoff, “Polymers incorporating nitric oxide releasing/generating substances for improved biocompatibility of blood-contacting medical devices,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 14, pp. 1685–1693, May 2005.
- [52] B. Butruk, M. Trzaskowski, and T. Ciach, “Fabrication of biocompatible hydrogel coatings for implantable medical devices using Fenton-type reaction,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 32, no. 6, pp. 1601–1609, Aug. 2012.
- [53] J. L. Drury and D. J. Mooney, “Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 24, pp. 4337–51, Nov. 2003.
- [54] B. V. Slaughter, S. S. Khurshid, O. Z. Fisher, A. Khademhosseini, and N. A. Peppas, “Hydrogels in Regenerative Medicine,” *Adv. Mater.*, vol. 21, no. 32–33, pp. 3307–3329, Sep. 2009.
- [55] K. Vulic and M. Shoichet, “Affinity-based drug delivery systems for tissue repair and regeneration,” *Biomacromolecules*, vol. 15, pp. 3867–3880, 2014.
- [56] G. D. Nicodemus and S. J. Bryant, “Cell Encapsulation in Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications,” *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 14, no. 2, pp. 149–165, Jun. 2008.

- [57] L. S. Ferreira, S. Gerecht, J. Fuller, H. F. Shieh, G. Vunjak-Novakovic, and R. Langer, “Bioactive hydrogel scaffolds for controllable vascular differentiation of human embryonic stem cells,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 17, pp. 2706–2717, 2007.
- [58] L. Gasperini, J. F. Mano, and R. L. Reis, “Natural polymers for the microencapsulation of cells,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 11, no. 100, p. 20140817, 2014.
- [59] R. Zhang, A. Bowyer, R. Eienthal, and J. Hubble, “A smart membrane based on an antigen-responsive hydrogel,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 97, no. 4, pp. 976–984, Jul. 2007.
- [60] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques: Third Edition*. 2013.
- [61] Y. M. Shin, Y. Bin Lee, S. J. Kim, J. K. Kang, J. C. Park, W. Jang, and H. Shin, “Mussel-inspired immobilization of vascular endothelial growth factor (VEGF) for enhanced endothelialization of vascular grafts,” *Biomacromolecules*, vol. 13, no. 7, pp. 2020–2028, 2012.
- [62] J. M. Goddard and J. H. Hotchkiss, “Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 7, pp. 698–725, 2007.
- [63] C. S. McKay and M. G. Finn, “Click chemistry in complex mixtures: Bioorthogonal bioconjugation,” *Chemistry and Biology*, vol. 21, no. 9, pp. 1075–1101, 2014.
- [64] J. M. Baskin and C. R. Bertozzi, “Bioorthogonal click chemistry: Covalent labeling in living systems,” *QSAR and Combinatorial Science*, vol. 26, no. 11–12, pp. 1211–1219, 2007.
- [65] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless, “A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective ‘ligation’ of azides and terminal alkynes,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 41, no. 14, pp. 2596–2599, 2002.
- [66] B. P. Duckworth, J. Xu, T. A. Taton, A. Guo, M. D. Distefano, B. P. Duckworth, J. Xu, T. A. Taton, A. Guo, and M. D. Distefano, “Site-Specific , Covalent Attachment of Proteins to a Solid Surface Site-Specific , Covalent Attachment of Proteins to a Solid Surface,” vol. 17, no. 4, pp. 967–974, 2006.
- [67] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, and C. R. Bertozzi, “A comparative study

- of bioorthogonal reactions with azides.,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 1, no. 10, pp. 644–648, 2006.
- [68] B. Parrish, R. B. Breitenkamp, and T. Emrick, “PEG- and Peptide-Grafted Aliphatic Polyesters by Click Chemistry PEG- and Peptide-Grafted Aliphatic Polyesters by Click Chemistry,” *Biomaterials*, vol. 127, no. 17, pp. 7404–7410, 2005.
- [69] A. C. Engler, H. Il Lee, and P. T. Hammond, “Highly efficient ‘grafting onto’ a polypeptide backbone using click chemistry,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 48, no. 49, pp. 9334–9338, 2009.
- [70] J. F. Lutz and Z. Zarafshani, “Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide-alkyne ‘click’ chemistry,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 9, pp. 958–970, 2008.
- [71] D. A. Ossipov, “Poly (vinyl alcohol) -Based Hydrogels Formed by ‘ Click Chemistry ,”” no. i, pp. 1709–1718, 2006.
- [72] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, and C. R. Bertozzi, “Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 43, pp. 16793–16797, Oct. 2007.
- [73] P. V Chang, J. A. Prescher, E. M. Sletten, J. M. Baskin, I. A. Miller, N. J. Agard, A. Lo, and C. R. Bertozzi, “Copper-free click chemistry in living animals.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 5, pp. 1821–6, Feb. 2010.
- [74] G. de Almeida, E. M. Sletten, H. Nakamura, K. K. Palaniappan, and C. R. Bertozzi, “Thiacycloalkynes for Copper-Free Click Chemistry,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 51, no. 10, pp. 2443–2447, Mar. 2012.
- [75] A. B. Lowe, “Thiol-ene ‘click’ reactions and recent applications in polymer and materials synthesis,” *Polym. Chem.*, vol. 1, no. 1, pp. 17–36, 2010.
- [76] C. E. Hoyle, A. B. Lowe, and C. N. Bowman, “Thiol-click chemistry: a multifaceted toolbox for small molecule and polymer synthesis,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 4, p. 1355, 2010.

- [77] D. P. Nair, M. Podgórski, S. Chatani, T. Gong, W. Xi, C. R. Fenoli, and C. N. Bowman, “The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry,” *Chem. Mater.*, vol. 26, no. 1, pp. 724–744, Jan. 2014.
- [78] A. Dondoni, “The emergence of thiol-ene coupling as a click process for materials and bioorganic chemistry,” *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 47, no. 47, pp. 8995–8997, 2008.
- [79] A. Miseta and P. Csutora, “Relationship Between the Occurrence of Cysteine in Proteins and the Complexity of Organisms,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 17, no. 8, pp. 1232–1239, Aug. 2000.
- [80] G. A. Bagiyani, I. K. Koroleva, N. V. Soroka, and A. V. Ufimtsev, “Oxidation of thiol compounds by molecular oxygen in aqueous solutions,” *Russ. Chem. Bull.*, vol. 52, no. 5, pp. 1135–1141, 2003.
- [81] T. Instruction guide, “Instructions TCEP • HCl,” 2013.
- [82] C. C. Visser, L. Heleen Voorwinden, L. R. Harders, M. Eloualid, L. van Bloois, D. J. A. Crommelin, M. Danhof, and A. G. de Boer, “Coupling of Metal Containing Homing Devices to Liposomes via a Maleimide Linker: Use of TCEP to Stabilize Thiol-groups without Scavenging Metals,” *J. Drug Target.*, vol. 12, no. 9–10, pp. 569–573, Dec. 2004.
- [83] A. Zwyssig, E. M. Schneider, M. Zeltner, B. Rebmann, V. Zlateski, R. N. Grass, and W. J. Stark, “Protein Reduction and Dialysis-Free Work-Up through Phosphines Immobilized on a Magnetic Support: TCEP-Functionalized Carbon-Coated Cobalt Nanoparticles,” *Chem. - A Eur. J.*, vol. 23, no. 36, pp. 8585–8589, Jun. 2017.
- [84] M. Henkel, N. Röckendorf, and A. Frey, “Selective and Efficient Cysteine Conjugation by Maleimides in the Presence of Phosphine Reductants,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 27, no. 10, pp. 2260–2265, Oct. 2016.
- [85] T. Kantner, B. Alkhawaja, and A. G. Watts, “In Situ Quenching of Trialkylphosphine Reducing Agents Using Water-Soluble PEG-Azides Improves Maleimide Conjugation to Proteins,” *ACS Omega*, vol. 2, no. 9, pp. 5785–5791, Sep. 2017.
- [86] F. Guzmán, S. Barberis, and A. Illanes, “Peptide synthesis: chemical or enzymatic,”

- Electron. J. Biotechnol.*, vol. 10, no. 2, pp. 279–314, 2007.
- [87] T. Kimmerlin and D. Seebach, “‘100 years of peptide synthesis’: ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to β -peptide assemblies*,” *J. Pept. Res.*, vol. 65, no. 2, pp. 229–260, Dec. 2008.
 - [88] S. B. H. Kent, “Total chemical synthesis of proteins,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 2, pp. 338–351, Jan. 2009.
 - [89] H. F. Lodish, “Section 3.2 Folding, Modification and Degradation of Proteins,” in *Molecular cell biology*, W.H. Freeman, 2000, p. 36.
 - [90] Wayne D. Kohn, Cyril M. Kay, and Brian D. Sykes, and R. S. Hodges*, “Metal Ion Induced Folding of a de Novo Designed Coiled-Coil Peptide,” 1998.
 - [91] B. I. Dahiyat and S. L. Mayo, “De novo protein design: fully automated sequence selection,” *Science*, vol. 278, no. 5335, pp. 82–7, Oct. 1997.
 - [92] Y. Hamuro, J. P. Schneider, and W. F. DeGrado, “De Novo Design of Antibacterial β -Peptides,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 121, no. 51, pp. 12200–12201, 1999.
 - [93] S. Bondalapati, E. Ruvinov, O. Kryukov, S. Cohen, and A. Brik, “Rapid End-Group Modification of Polysaccharides for Biomaterial Applications in Regenerative Medicine,” *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 35, no. 20, pp. 1754–1762, Oct. 2014.
 - [94] G. Delaittre, A. M. Greiner, T. Pauloehrl, M. Bastmeyer, and C. Barner-Kowollik, “Chemical approaches to synthetic polymer surface biofunctionalization for targeted cell adhesion using small binding motifs,” *Soft Matter*, vol. 8, no. 28, p. 7323, 2012.
 - [95] P. D. Drumheller and J. A. Hubbell, “Polymer Networks with Grafted Cell Adhesion Peptides for Highly Biospecific Cell Adhesive Substrates,” *Anal. Biochem.*, vol. 222, no. 2, pp. 380–388, Nov. 1994.
 - [96] J. R. Klim, L. Li, P. J. Wrighton, M. S. Piekarczyk, and L. L. Kiessling, “A defined glycosaminoglycan-binding substratum for human pluripotent stem cells,” *Nat. Methods*, vol. 7, no. 12, pp. 989–94, Dec. 2010.
 - [97] T. G. Vladkova, “Surface Engineered Polymeric Biomaterials with Improved Biocontact

- Properties,” *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2010, pp. 1–22, Jun. 2010.
- [98] H. Chao, M. E. Houston, S. Grothe, C. M. Kay, M. O’Connor-McCourt, R. T. Irvin, and R. S. Hodges, “Kinetic study on the formation of a de novo designed heterodimeric coiled-coil: Use of surface plasmon resonance to monitor the association and dissociation of polypeptide chains,” *Biochemistry*, vol. 35, no. 37, pp. 12175–12185, 1996.
- [99] G. De Crescenzo, J. R. Litowski, R. S. Hodges, and M. D. O’Connor-McCourt, “Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: Effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding,” *Biochemistry*, vol. 42, no. 6, pp. 1754–1763, 2003.
- [100] G. Grigoryan and A. E. Keating, “Structural specificity in coiled-coil interactions,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 18, no. 4, pp. 477–483, Aug. 2008.
- [101] J. M. Fletcher, A. L. Boyle, M. Bruning, G. J. Bartlett, T. L. Vincent, N. R. Zaccai, C. T. Armstrong, E. H. C. Bromley, P. J. Booth, R. L. Brady, A. R. Thomson, and D. N. Woolfson, “A Basis Set of *de Novo* Coiled-Coil Peptide Oligomers for Rational Protein Design and Synthetic Biology,” *ACS Synth. Biol.*, vol. 1, no. 6, pp. 240–250, Jun. 2012.
- [102] P. Burkhard, J. Stetefeld, and S. V. Strelkov, “Coiled coils: a highly versatile protein folding motif,” *Trends Cell Biol.*, vol. 11, no. 2, pp. 82–88, Feb. 2001.
- [103] E. H. C. Bromley and K. J. Channon, “Alpha-Helical Peptide Assemblies: Giving New Function to Designed Structures,” *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 103, pp. 231–275, Jan. 2011.
- [104] B. Apostolovic, M. Danial, and H.-A. Klok, “Coiled coils: attractive protein folding motifs for the fabrication of self-assembled, responsive and bioactive materials,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 9, p. 3541, Sep. 2010.
- [105] P. Jing, J. S. Rudra, A. B. Herr, and J. H. Collier, “Self-Assembling Peptide-Polymer Hydrogels Designed From the Coiled Coil Region of Fibrin,” *Biomacromolecules*, vol. 9, no. 9, pp. 2438–2446, Sep. 2008.
- [106] C. Fortier, G. De Crescenzo, and Y. Durocher, “A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery,” *Biomaterials*,

- vol. 34, no. 4, pp. 1344–1353, Jan. 2013.
- [107] M. Pechar, R. Pola, R. Laga, A. Braunová, S. K. Filippov, A. Bogomolova, L. Bednářová, O. Vaněk, and K. Ulbrich, “Coiled Coil Peptides and Polymer–Peptide Conjugates: Synthesis, Self-Assembly, Characterization and Potential in Drug Delivery Systems,” *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 7, pp. 2590–2599, Jul. 2014.
- [108] U. I. M. Gerling-Driessen, N. Mujkic-Ninnemann, D. Ponader, D. Schöne, L. Hartmann, B. Koksche, U. I. M. Gerling-Driessen, D. Schöne, B. Koksche, D. Ponader, N. Mujkic-Ninnemann, and L. Hartmann, “Exploiting Oligo(amido amine) Backbones for the Multivalent Presentation of Coiled-Coil Peptides,” *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 8, pp. 2394–2402, Aug. 2015.
- [109] P. Lequoy, F. Murschel, B. Liberelle, S. Lerouge, and G. De Crescenzo, “Controlled co-immobilization of EGF and VEGF to optimize vascular cell survival,” *Acta Biomater.*, vol. 29, pp. 239–247, Jan. 2016.
- [110] F. Thomas, A. L. Boyle, A. J. Burton, and D. N. Woolfson, “A Set of *de Novo* Designed Parallel Heterodimeric Coiled Coils with Quantified Dissociation Constants in the Micromolar to Sub-nanomolar Regime,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 13, pp. 5161–5166, Apr. 2013.
- [111] C. Aronsson, S. Danmark, F. Zhou, P. Öberg, K. Enander, H. Su, and D. Aili, “Self-sorting heterodimeric coiled coil peptides with defined and tuneable self-assembly properties,” *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, p. 14063, Nov. 2015.
- [112] C. Addi, F. Murschel, and G. De Crescenzo, “Design and Use of Chimeric Proteins Containing a Collagen-Binding Domain for Wound Healing and Bone Regeneration,” *Tissue Eng. Part B. Rev.*, vol. 23, no. 2, pp. 163–182, 2017.
- [113] N. Riahi, “Production de peptides synthétiques et mise au point d’échafaudages moléculaires pour le génie tissulaires,” 2017.
- [114] B. L. Nilsson, M. B. Soellner, and R. T. Raines, “Chemical Synthesis of Proteins,” *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 34, no. 1, pp. 91–118, Jun. 2005.
- [115] L. Raibaut, N. Ollivier, and O. Melnyk, “Sequential native peptide ligation strategies for

- total chemical protein synthesis,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 21, p. 7001, Oct. 2012.
- [116] N. Riahi, B. Liberelle, O. Henry, and G. De Crescenzo, “Impact of RGD amount in dextran-based hydrogels for cell delivery,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 161, pp. 219–227, Apr. 2017.
- [117] T. T. Nielsen, V. Wintgens, C. Amiel, R. Wimmer, and K. L. Larsen, “Facile synthesis of beta-cyclodextrin-dextran polymers by ‘click’ chemistry,” *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 7, pp. 1710–1715, 2010.
- [118] A. Purnama, R. Aid-Launais, O. Haddad, M. Maire, D. Mantovani, D. Letourneur, H. Hlawaty, and C. Le Visage, “Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice,” *Drug Deliv. Transl. Res.*, vol. 5, no. 2, pp. 187–197, 2015.
- [119] N. Riahi, L. Cappadocia, O. Henry, J. Omichinski, and G. De Crescenzo, “Soluble expression, purification and functional characterization of a coil peptide composed of a positively charged and hydrophobic motif,” *Amino Acids*, vol. 48, no. 2, pp. 567–577, Feb. 2016.

ANNEXE A – PROTOCOLE DE PREPARATION DU DEXTRANE-GPE

Ce protocole a été adapté de Nielsen et al. (2010, Biomacromolecules) [117]. La verrerie et les quantités de réactifs permettent de produire 1,5g de 500-kDa dextrane modifié avec du glycidyl-propargyl ether à 10%.

Équipement et réactifs

- T-500 Dextrane (poudre, technical grade, Pharmacosmos)
- Glycidyl propargyl ether (2–6°C à l'abri de la lumière, liquide, pureté >90%) (1.040 g/mL à 20°C)
- NaOH (pastilles) (40 g/mol)
- Eau Milli-Q
- Flacon 50 mL
- Eppendorfs 2 mL
- Sonicateur (ou bain à ultrasons)
- Membrane de dialyse de 10KDa
- Lyophilisateur
- Oxyde de deutérium (D₂O)

Méthode

Réaction

1. Préparer le tampon de réaction (NaOH 0.1 M, 10 mL)
2. Peser 1.5 g de dextrane en poudre et les dissoudre dans les 10mL de tampon de réaction (9.25 mmol d'unité glucosique). Le vortex et le bain à ultrasons facilitent la dissolution.
3. Ajouter à la solution de dextrane dissout, 3 mmol de glycidyl propargyl ether. Mélanger puis couvrir le tube d'aluminium pour le protéger de la lumière.
4. Le placer sous agitation à 35°C pendant 16h.

Purification et stockage du produit

1. Placer le mélange dans une membrane de dialyse 10kDa. Placer le tout dans de l'eau Milli-Q et changer régulièrement l'eau, en espaçant progressivement la durée. Attention, placer la dialyse sous la hotte chimique, car le GPE est volatile et très toxique (GHS07, GHS08). Jeter l'eau dans des contenants appropriés.
2. Après 48h de dialyse, collecter l'échantillon et le répartir dans des tubes de 2mL (la lyophilisation et le stockage sont facilités par l'utilisation de petits contenants).
3. Congeler les échantillons à -80°C.
4. Placer les échantillons congelés dans le lyophilisateur préalablement refroidi, puis laisser environ 24h.
5. Préparer un échantillon pour la caractérisation par ^1H -RMN dans du D_2O (dextrane-GPE 5 mg/mL, 1 mL) à 50°C (Sylvie Bilodeau, Laboratoire de RMN à haut champ, E-215 Pav. Gaudry, Université de Montréal,)

ANNEXE B – PROTOCOLE DE LA PRÉPARATION DU DEXTRANE- *KCOIL* PAR CYCLOADDITION AZIDE-ALCYNE

Protocole adapté de Nielsen et al. (2010, Biomacromolecules) [117]. La verrerie et les quantités de réactifs permettent de produire 50mg de Dextrane-AHA-*Kcoil* à partir de Dextrane-GPE 10% (voir Protocole Annexe A).

Matériel :

- Dextrane-GPE lyophilisé et stocké à 4°C
- Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine (THPTA)
- Sodium ascorbate (NaAsc)
- Sulfate de Cuivre (CuSO₄)
- Eau MilliQ dégazéifiée
- Sonicateur (ou bain à ultrasons)

Protocole :

1. Réaction

Dans 17,5mL d'eau MQ, ajouter :

- 50mg de dextrane-GPE (concentration finale d'alcyne 5mM)
- 8.65mg de *Kcoil*-AHA (0,125mM)
- 7.60mg de THPTA (1mM)
- 3,75 mg de CuSO₄.5H₂O (1mM)

Mettre au sonicateur jusqu'à ce que tout le dextrane soit dissous. Dégazer.

Ajouter 5,94 d'ascorbate de sodium (50mM) à la solution précédente. La couleur bleutée devrait devenir légèrement jaune.

Laisser incuber dans le noir, sous agitation à température ambiante pendant 48h.

Si au bout de 24h, la solution est redevenue bleutée, rajouter la même quantité de NaAsc et laisser réagir 24h supplémentaires.

2. Purification

Filtrer avec un amicon 10k avec de l'EDTA 100Mm afin d'enlever toute trace de cuivre (4 fois 45min à 4500g, le filtrat doit être parfaitement incolore), puis filtrer avec de l'eau MQ (5x).

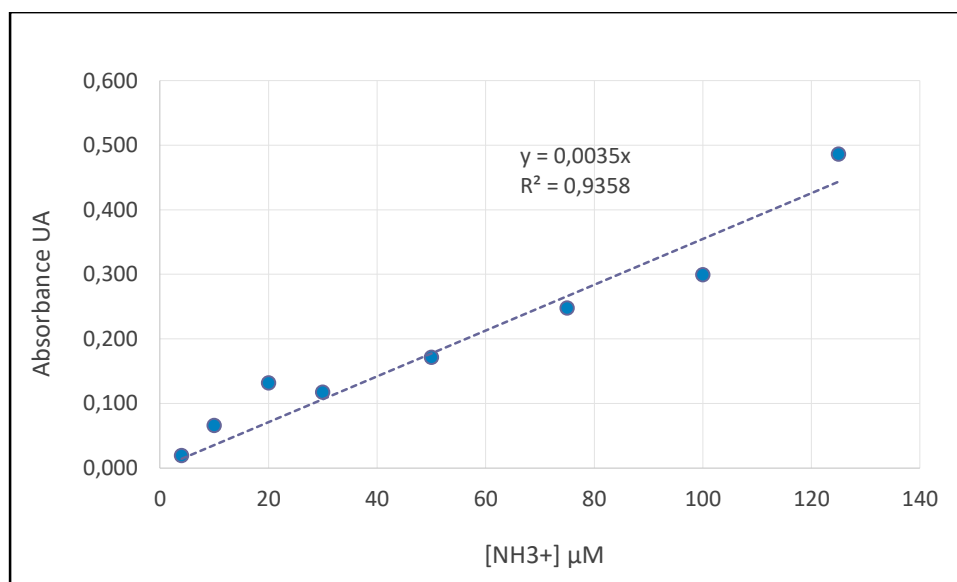
Lyophiliser et stocker sous forme de poudre ou aliquoter à -80°C .

3. Caractérisation

Faire un test de quantification des amines au TNBS (Absorbance 340nm, corrections à 630nm).

Attention : Ne pas ajouter de HCl en fin de réaction mais de l'eau MQ.

Courbe de calibration avec de la glycine (sans HCl) :



Attention : Coefficient d'extinction molaire de l'amine de la glycine $= 13400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et coefficient d'extinction molaire de l'amine de la lysine $= 18780 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La pente est à corriger avec le ratio.