

ÉCOLE DOCTORALE Physique et Chimie-Physique ED 182

Institut Charles Sadron UPR22

THÈSE présentée par :

Aymeric ONTANI

soutenue le : **16 décembre 2022**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

**AUTOASSEMBLAGE LOCALISÉ DE
PEPTIDES INDUIT PAR DES ENZYMES**

**Depuis la surface de vésicules phospholipidiques vers
l'élaboration d'un réacteur enzymatique en flux**

THÈSE dirigée par :

M. JIERRY Loïc

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme MASSIERA Gladys

Professeure, Université de Montpellier

M. LUPATTELLI Paolo

Professeur, Università degli Studi della Basilicata,
Potenza, Italie

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. MESINI Philippe

Directeur de Recherche au CNRS

Mme GUY Laure

Ingénierie de Recherche, École Normale Supérieure,
Lyon

MEMBRES INVITÉS :

M. SCHRODER André

Chargé de Recherche au CNRS, INSA Lyon

M. SCHMUTZ Marc

Ingénieur de Recherche au CNRS

Sommaire

Remerciements.....	5
Introduction Générale.....	11
Liste des abréviations.....	25
Chapitre I	31
État de l'art sur le mécanisme et les applications du concept de LEASA	
Chapitre II.....	69
Matériels et méthodes	
Chapitre III	121
Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes	
Chapitre IV	179
Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu	
Conclusion Générale	209

Remerciements

Remerciements

Voilà trois ans de thèse qui s'achèvent enfin, un faux départ à Nice, le Covid-19 (oui le), les confinements, tout ça tout ça, le tout compilé dans ces deux cents et quelques pages, que j'ai écrit corps et âme des mois durant, tout en mangeant à peu près toutes les sucreries que je pouvais trouver. Tant pis pour le diabète. Tant pis pour les finances.

Plus sérieusement.

Je souhaiterais d'abord remercier la personne sans qui cela n'aura pu être possible : Monsieur Loïc Jierry, qui m'a fait confiance pour ces différents projets. J'aimerais plus particulièrement le remercier pour son suivi et son encadrement pendant ces trois années (et trois mois) de thèse.

J'aimerais aussi remercier le Professeur Pierre Schaaf pour son investissement dans le suivi de mes différents projets, pour les discussions et les différents échanges.

Je remercie également Monsieur Philippe Mesini, qui accepté de présider mon jury de thèse et d'évaluer mon travail.

Je remercie aussi Madame Laure Guy, examinatrice, qui a accepté d'évaluer mon travail et qui a fait le déplacement depuis Lyon pour assister à ma soutenance.

Je remercie Madame Gladys Massiera, rapportrice, pour avoir accepté d'évaluer mon travail et qui, malgré un imprévu survenu avant ma soutenance, a pu se rendre disponible pour y assister en visioconférence.

Je remercie Monsieur Paolo Lupattelli, rapporteur, pour avoir accepté d'évaluer mon travail et qui, même s'il n'a jamais pu décoller de Rome la veille de ma soutenance, a pu y assister par visioconférence.

Je voudrais prendre le temps également de remercier Monsieur André Schroder, pour son implication et sa participation au projet GUVs ; pour m'avoir initié à la fabrication de ces dernières, à l'utilisation du microscope à contraste de phase et épifluorescence ; pour les diverses discussions et de nous avoir guidé sur certains aspects du projet.

Remerciements

Je remercie très chaleureusement Monsieur Marc Schmutz, qui a accepté de prendre part au projet SUVs et de m'avoir consacré du temps pour réaliser toutes les expériences en cryo-TEM, qui nous ont donné pas mal de fil à retordre. Nous vaincrons un jour cette scoumoune, j'y crois.

J'aimerais également prendre le temps de remercier Monsieur Pierre Muller pour sa disponibilité pour le microscope confocal de l'ICS.

J'aimerais remercier Monsieur Jean-Yves Runser qui m'a consacré des demi-journées entières sur son temps de travail pour les expériences au microscope confocal de l'INSERM.

J'aimerais remercier Madame Eulalie Lafarge qui m'a consacré plusieurs heures de son temps de travail pour m'enseigner la fabrication des SUVs et pour m'avoir initié à l'électroporation.

J'aimerais remercier Monsieur Alain Carvalho pour avoir réalisé les images en cryo-SEM.

J'aimerais aussi remercier Monsieur Shahaji More, qui a dégagé du temps, lorsque j'étais en rédaction, pour réaliser quelques expériences sur le projet du matériau catalytique. Résultats que j'ai pu intégrer dans mon manuscrit.

J'aimerais remercier tout particulièrement Madame Fouzia Boulmedais, pour sa présence, sa disponibilité, son écoute et sa bienveillance. Merci aussi d'avoir goûté à toutes les pâtisseries que j'ai amené au bureau. Mes excuses pour la prise de poids.

J'aimerais aussi remercier les trois stagiaires que j'ai encadré durant ma thèse, qui ont chacun apporté leur pierre à cet édifice, par ordre d'apparition : Cyprien Muller, Giuseppe Larotonda et Eva Thiry.

Maintenant j'aimerais prendre le temps de remercier un ensemble de personnes, sans qui je ne serais pas là où j'en suis aujourd'hui. Il s'agit de moi-même. Non je rigole je ne suis pas narcissique à ce point.

Je parlais bien évidemment de ma maman, Colette, de mon père, Thierry, et de mon beau-père, Guy. Je sais à quel point cela a été difficile pour vous de me suivre dans mon projet d'étude, de comprendre ce que je faisais, de me voir partir, plus ou moins loin de la maison. Merci pour votre amour, pour le toit sur la tête, le frigo plein, votre soutien (qu'il ne vous est pas toujours évident d'exprimer).

Remerciements

J'aimerais remercier ma sœur, Barbara, mes neveux, Tom & Loan ainsi que mon frère, Joël, pour leur présence et leur soutien.

Un petit grand merci pour ma tante, Pat, qui a bravé la météo et qui est venu depuis le centre de la France pour assister à ma soutenance.

J'aimerais aussi remercier les membres de la famille à quatre pattes, à savoir mon chat, Nobel, ainsi que les plus ancien, Chopin & Mozart, et bien entendu Laïka et Minimoys.

Laurie, *aka* Michel, tu sais très bien que je te déteste, je n'ai aucunement envie de te remercier. Faire un IUT de chimie restera, je pense la plus grosse erreur de ta vie. Peut être aurais tu dû faire le choix de devenir influenceuse Tik Tok, encore faudrait-il que Tik Tok soit disponible dans la région de Besançon. Pense aussi à t'inscrire comme demandeuse sur le registre nationale des dons d'organes, pour un cerveau. Je pense te l'avoir déjà dit, mais ne change pas, tu es la petite sœur que j'ai toujours voulu avoir. Même si je ne pense pas que tu m'aurais voulu comme grand frère, tyran que je suis.

Vous vous dites sans doute que ça fait déjà pas mal de personnes remerciées. Et vous avez raison. Mais ce n'est pas fini.

Un grand merci à Francis, Joëlle et Thierry. Je pense que sans votre présence, j'aurais fini en boule dans un coin à pleurer toutes les larmes de mon corps. Merci pour avoir écouté mes coups de gueule, mes coups de sang, mes coups de mou, mes coups de moins bien, mes coups de mieux. Merci d'avoir été là pour les jours avec et les jours sans.

Merci à toi Charles, d'avoir fait le déplacement pour assister à ma soutenance.

Merci à l'ensemble des membres de l'équipe, passés et présents : Quentin, Haseeb (sauf quand tu abuses du scotch), Miguel, Jennifer, Julien, Rémi, Mehdi. Merci pour les discussions, pour les pauses café, pour les pauses travail.

Un remerciement tout particulier pour Sarah, ma colocataire de bureau. Un grand merci pour toutes ses discussions, ton ouverture d'esprit, et ses discussions-café (oui je me répète), alors qu'on avait une journée chargée comme pas possible. C'était toujours un plaisir pour moi, et je t'assure que les journées étaient très longues quand tu n'étais pas là.

Remerciements

J'aimerais aussi prendre le temps de remercier un peu plus longtemps Laurie, *aka Platypus*. Je n'aurais jamais cru pouvoir un jour faire la rencontre d'une personne comme toi lorsque j'ai démarré ma thèse. Tu es devenue une meilleure amie, un peu comme une âme sœur. N'oublie pas, le jour de ton mariage je traverse l'allée centrale sur une musique entraînante en jetant des pétales de rose partout. De rien.

Je ne pouvais pas ne pas remercier ma meilleure amie de toujours, Lauriane. Cela fait maintenant plus de dix ans que nous nous connaissons, plus de dix ans où rien n'a changé entre nous. À chaque fois que l'on se revoit c'est comme si nous nous étions quittés la veille, alors qu'on a des mois de potins, d'histoire et d'anecdote à rattraper.

Un remerciement tout particulier à Monsieur Jean-François Buecher, vous n'imaginez pas à quel point votre intervention a été décisive dans ma vie et pour mes études.

J'aimerais remercier la société Ferrero pour m'avoir fourni en Nutella Biscuits tout au long de ma thèse. J'ignore si votre service consommateur lira ceci, néanmoins, il faudrait modifier soit le nombre de biscuits dans le paquet (il n'y en pas assez), soit ajouter un coupe-faim à l'intérieur, parce que je les mange par 4 et le paquet ne survit pas à la journée.

Une pensée émue pour la société Nestlé qui m'a fourni en capsule de café au lait Dolce Gusto.

J'aimerais aussi remercier la SNCF (sauf pour les jours de grèves) pour m'avoir permis de faire pendant trois ans le trajet Colmar-Strasbourg quotidiennement.

J'aimerais remercier la société World Of Wonder pour m'avoir permis de regarder toutes les franchises de RuPaul's Drag Race qui ont été diffusées lors de ma thèse, à savoir : RuPaul's Drag Race, RuPaul's Drag Race All Stars, RuPaul's Drag Race UK, RuPaul's Down Under, Drag Race España, Drag Race Holland, Drag Race Italia et bien entendu Drag Race France. J'aimerais remercier toutes ces fabuleuses Drag Queen qui ont tendu ces shows inoubliables et plus particulièrement : Denali, Ginger Minj, Crystal Methyd, Willow Pill, Lawrence Channey, Tayce, Danny Beard, Cheddar Gorgeous, Sharone, et encore plus particulièrement notre reine française Paloma. Merci à elles d'être qui elles sont, vous me donnez du rêve, de l'espoir, et suffisamment de sérotonine durant la thèse pour tenir le coup.

Introduction Générale

Introduction Générale

En 2002, G. M. Whitesides et B. Grzyboski définissent l'autoassemblage comme étant un processus au cours duquel un système chimique désordonné composé de « briques » en solution (rectangles verts sur la Figure 1) se reconnaissent et s'assemblent pour engendrer la formation d'une structure ou d'un motif organisé dans l'espace (rectangles bruns sur la Figure 1), sans contraintes externes.¹ La cohésion de ces autoassemblages est assurée par des interactions non covalentes qui peuvent exister entre lesdites « briques », à savoir des liaisons hydrogène, des interactions $\pi-\pi$, des interactions ion-ion, ion-dipôle et dipôle-dipôle (Figure 1).²

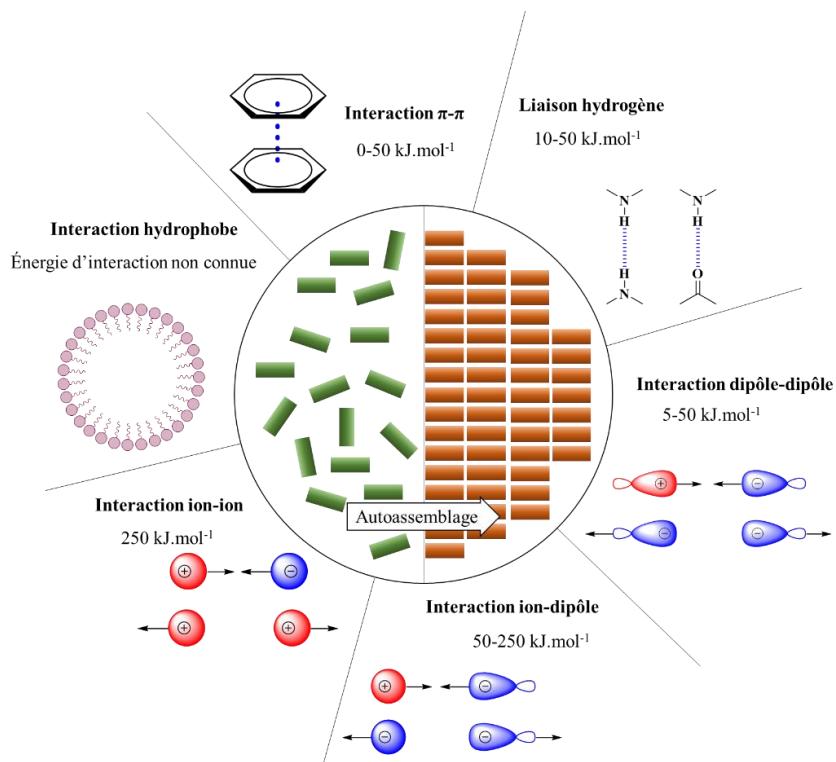


Figure 1. Représentation schématique des différentes interactions non covalentes qui peuvent être impliquées dans des édifices autoassemblés. Reproduit avec la permission de Wiley Periodicals depuis la référence [2]

L'exemple le plus simple d'autoassemblage est l'arrangement d'atomes, d'ions ou de molécules pour former des cristaux. Dans le vivant il existe également des systèmes autoassemblés dont nous pouvons citer quelques exemples de manière non exhaustive. La structure même de nos cellules résulte principalement d'autoassemblages, en effet, la membrane plasmique est constituée de phospholipides qui s'organisent spontanément dans un milieu physiologique de telle sorte que la partie hydrophile (groupement phosphate) de chaque phospholipide soit à l'interface avec le milieu extérieur de la cellule ou le cytosol (partie liquide du cytoplasme), alors que les chaines alkyles s'assemblent au sein des membranes par des interactions de type van der Waals, assurant ainsi la cohésion des membranes biologiques (Figure 2).

Introduction Générale

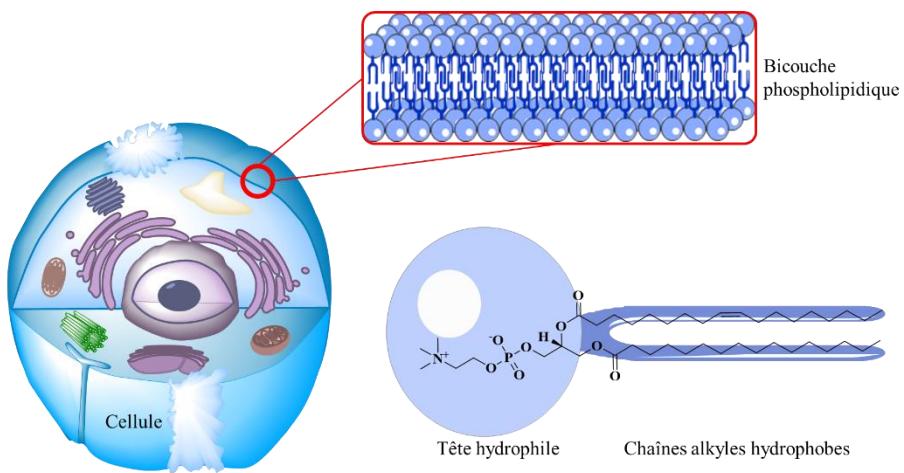


Figure 2. Représentation schématique d'une cellule avec un gros plan sur une section d'une membrane plasmique illustrant l'autoassemblage entre les molécules de phospholipides.

Au cœur de nos cellules, dans le noyau, se trouve notre code génétique enfoui au sein d'une double-hélice de chaînes de poly(phosphodiester), appelée acide désoxyribonucléique (ADN). L'interaction entre ces deux chaînes est assurée par un ensemble de liaisons hydrogènes qui engendrent l'appariement des nucléobases, adénine **A**-thymine **T** et cytosine **C**-guanine **G** (Figure 3).³

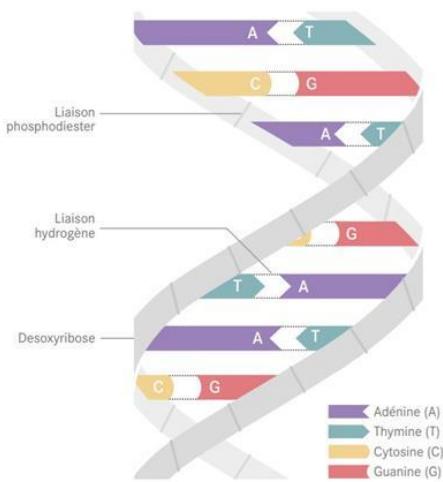


Figure 3. Schéma simplifié de la structure de l'ADN. Issu de [3]

Un dernier exemple de structure autoassemblée rencontrée dans le vivant sont les protéines. L'ARN messager est en mesure de traduire notre ADN pour permettre la synthèse d'une séquence de peptides (structure primaire) à l'aide de vingt acides aminés. Les liaisons hydrogène intramoléculaires entre les groupements -NH- et les carbonyles des fonctions amides permettent aux séquences peptidiques de prendre, entre autres, la forme d'une hélice α ou d'un feuillett β (structure secondaire). Les liaisons hydrogène, les interactions de van der Waals et ioniques permettent aux hélices α et aux feuillets β de se positionner dans

Introduction Générale

l'espace et ainsi de former les sous-unités des protéines donnant naissance au(x) site(s) actif(s) de celles-ci dans le cas des enzymes (structure tertiaire). Enfin les sous-unités interagissent entre elles pour conduire à la protéine (structure quaternaire). La structure de la phosphatase alcaline issue de *E. coli*^{4,5} est citée comme exemple dans la Figure 4.

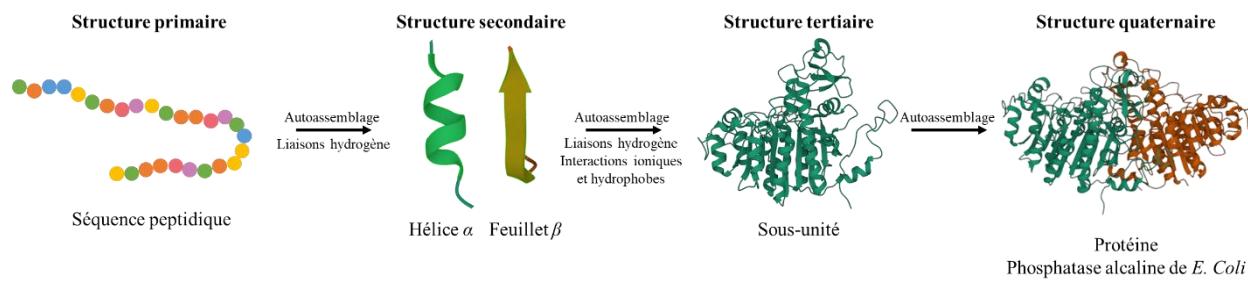


Figure 4. Différentes structures d'une protéine. Hélice α , feuillet β , sous-unité et structure de la phosphatase alcaline de *E. Coli*.

Il est possible de recenser les différentes briques et de les classer par type de structure moléculaire (polymères, lipides, saccharides, peptides, protéines, etc) qui elles-mêmes peuvent être issues d'une source synthétique ou biologique. Chacune de ces familles peut conduire à la formation d'assemblages supramoléculaires en milieu aqueux, qui trouveront des applications dans divers domaines. À titre d'exemple, le Tableau 1 répertorie un certain nombre d'applications de matériaux dits supramoléculaires dans le domaine biomédical.

Introduction Générale

Briques de base			Structure supramoléculaire	Applications
Source synthétique	Polymères	Linéaires (copolymères à block)	Micelles, vésicules, tubes (polymèresomes)	Nano-réacteurs, organelles artificielles, nano-transporteurs de principes actifs.
		Branchés (dendrimères)	Nanoparticules, nanofibres	Nano-transporteurs de principes actifs ou de gène.
	Surfactants	Anioniques, cationiques, neutres	Micelles, vésicules	Délivrance de médicament ou de gène, activité antimicrobienne et antifongique.
	Autres	Porphyrine, rotaxane, graphène	Nanotubes, toroïdes	Nanomédecine, délivrance de principes actifs, hydrogels.
Source biologique	Virus		Films, fibriles, particules	Biomatériaux, substrats pour culture cellulaire.
	Acides nucléiques (ARN, ADN)		Origamis d'ADN	Transporteur pour délivrance de principes actifs, biosenseurs.
	Lipides (phospholipides, acides gras, cholestérol)		Bicouches lipidiques, vésicules, films.	Nano-réacteurs, organelles artificielles, délivrance de principes actifs
	Saccharides		Double hélices, nanotubes, micelles sphériques	Délivrance de principes actifs, biosenseurs.
	Peptides		Pelotes aléatoires, hélices α , feuillets β	Biomatériaux hydrogels, délivrance de principes actifs, ingénierie tissulaire, culture cellulaire 3D.

Tableau 1. Briques de base, leurs structures supramoléculaires et les applications biomédicales potentielles. Reproduit avec la permission de Wiley Periodicals depuis la référence [2].

Certaines briques conduisant aux édifices supramoléculaires décrits dans le Tableau 1 nécessitent l'emploi d'un stimulus pour pouvoir déclencher le processus d'assemblage, comme par exemple un changement de pH, de température, de force ionique ou de la polarité du solvant. Ainsi l'introduction d'un élément extérieur au système peut initier le processus d'assemblage. C'est également le cas lors de l'ajout d'un réactif, d'un catalyseur ou l'exposition du système à un rayonnement adéquat, comme la lumière. Il est également possible de combiner plusieurs déclencheurs qui permettent à la fois d'initier puis de contrôler la formation de structures supramoléculaires, aboutissant à des propriétés spécifiques pour des applications non seulement dans le domaine du biomédical, mais aussi dans celui de l'ingénierie des procédés ou celui de la conception de matériaux innovants.^{2,6-8}

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé une enzyme comme élément déclencheur du processus d'autoassemblage de peptides dans l'eau. L'autoassemblage initié par enzyme, plus communément désigné

Introduction Générale

dans la littérature par « *Enzyme-Assisted Self-Assembly* » (EASA), correspond à la formation de (nano)structures autoassemblées à partir d'une action enzymatique. Dans ce cas, un **précurseur** hydrosoluble est transformé chimiquement par une enzyme en une brique de base, en l'occurrence un **hydrogélateur**, moins hydrophile et donc moins hydrosoluble que ne l'était le précurseur, engendrant ainsi le processus d'autoassemblage (Figure 5, *haut*). Lorsque l'assemblage résultant permet de soutenir le solvant présent, c'est-à-dire ici l'eau, ce processus enzymatique conduit à la formation d'un hydrogel dit supramoléculaire.⁹ La formation de ce matériau est ainsi permise grâce à l'assemblage spontané des hydrogélateurs sous la forme de nanostructures, plus généralement de nanofibres, qui forment un réseau tridimensionnel dans l'eau. Ces nano-objets de peptides autoassemblés présentent généralement un diamètre de quelques nanomètres (3 – 10 nm) et des longueurs pouvant atteindre celle du millimètre. À noter qu'en fonction de la concentration des précurseurs utilisés (et donc de celle d'hydrogélateurs générés *in situ*), ces nanofibres de peptides auto-assemblés peuvent s'assembler entre elles pour former des structures plus grandes semblables à des microfibrilles.¹⁰⁻¹²

Lorsque l'enzyme est spatialement localisée, autrement dit que lorsque l'élément déclencheur du processus d'EASA est localisé à un endroit bien défini de l'espace (par l'expérimentateur, ou non), son activité catalytique en présence de précurseurs conduit à l'accumulation d'hydrogélateurs au voisinage de la surface sur laquelle l'enzyme est déposée.¹³ Si cette concentration dépasse alors la concentration critique de géliation, la formation d'un hydrogel s'opère exclusivement depuis la surface du matériau, ce qui conduit à la formation d'un revêtement pouvant, suivant les cas, atteindre des épaisseurs micrométriques (Figure 5, *bas*). C'est ce qu'on appelle communément « *Localized Enzyme-Assisted Self-Assembly* » (LEASA). Il a été montré que les nanofibres de peptides auto-assemblés ainsi formées présentaient une orientation perpendiculaire à l'interface matériau-solution. D'autre part, un gradient de densité de nanofibres s'établit allant d'une densité plus importante à l'interface vers une densité plus faible en haut du gel.

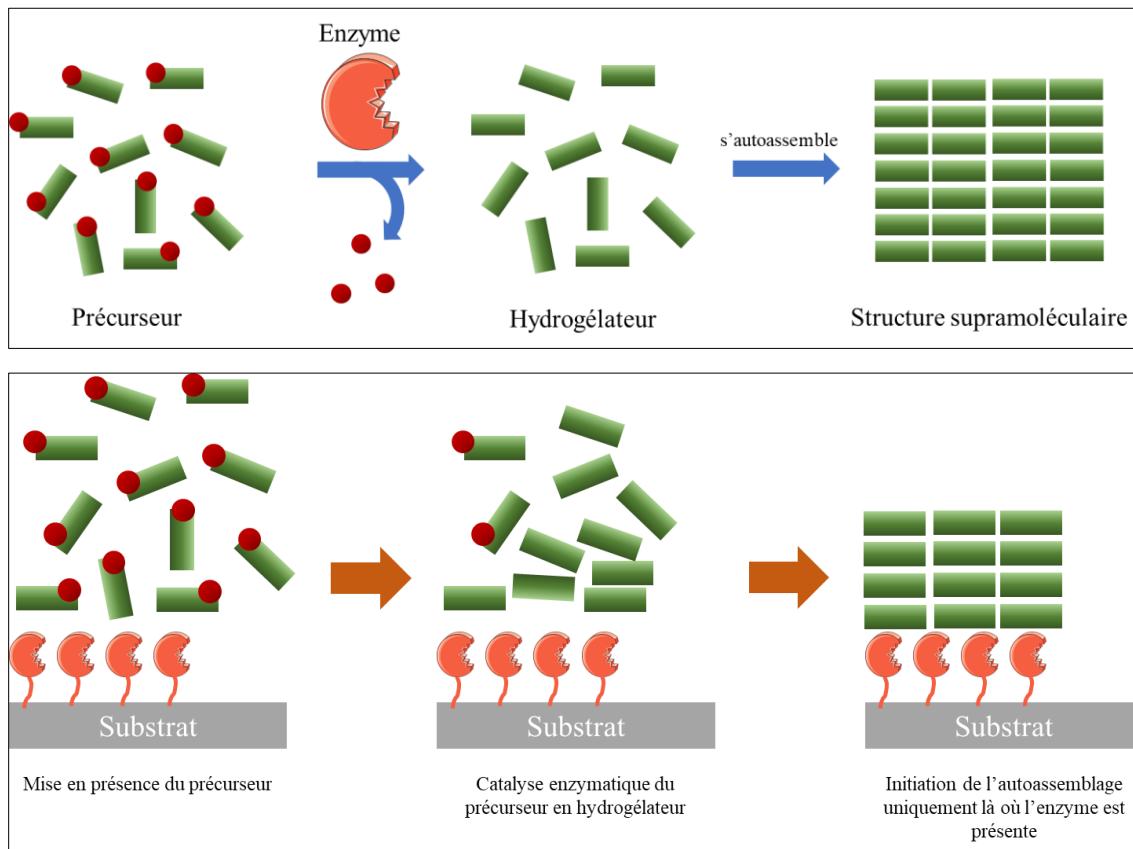


Figure 5. Représentation schématique des concepts d'EASA (*haut*) et de LEASA (*bas*).

Mon laboratoire d'accueil est pionnier dans l'étude et l'utilisation du concept de LEASA impliquant des enzymes adsorbées à la surface de matériaux. En effet, dès 2015, il a développé un couple « enzyme/précureur » qui a servi de système modèle dans plusieurs études antérieures au démarrage de mon projet de thèse.¹⁵ Ce système est constitué de l'alcaline phosphatase (AP) comme enzyme et du tripeptide précurseur **Fmoc-FFpY** (Fmoc : *N*-(fluorenylmethyloxycarbonyl), F : phénylalanine, pY : tyrosine phosphate). En présence d'AP, le précurseur **Fmoc-FFpY** est déphosphorylé et conduit ainsi à la formation de **Fmoc-FFY**, un hydrogélateur capable de s'autoassembler spontanément sous la forme de nanofibres (Figure 6).¹⁵⁻²¹ Ce système modèle sera utilisé au cours de l'intégralité de mon projet doctoral.

Introduction Générale

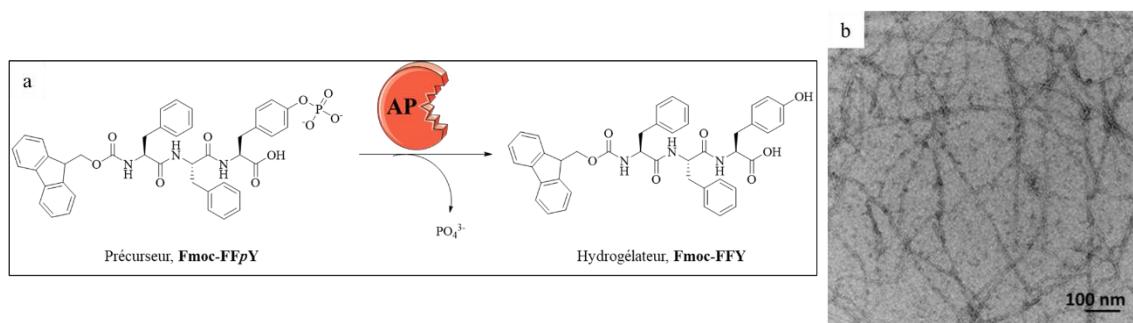


Figure 6. Système modèle enzyme/précureur utilisé au cours de mon projet doctoral. (a) Déphosphorylation du précurseur tripeptidique phosphorylé **Fmoc-FFpY** par l'**AP** pour former l'hydrogélateur tripeptidique (brique) **Fmoc-FFY**. (b) Nanofibres de **Fmoc-FFY** engendrées par l'action de l'**AP** en présence de **Fmoc-FFpY** (image cryo-TEM). Reproduit avec la permission de la Royal Chemical Society depuis la référence [21].

Le Chapitre I de ce manuscrit s'attache à décrire le concept d'EASA, les premiers travaux pionniers et son mécanisme à partir des données de la littérature. L'intérêt de localiser dans l'espace les processus d'assemblage de type EASA illustré dans ce premier chapitre à travers **un panel exhaustif des travaux visant des applications** est également présenté dans ce premier chapitre. Nombre de ces travaux ont été réalisé par mon laboratoire d'accueil ce qui permet de positionner mon projet doctoral non seulement par rapport aux autres groupes s'investissant dans ce domaine mais aussi par rapport à mon propre laboratoire.

L'ensemble des synthèses chimiques ou des modifications de protéines est décrit dans le Chapitre II. Celui-ci est dédié à la description de l'ensemble du matériel et des méthodes utilisées au cours de mon projet doctoral. En outre, le principe de fonctionnement des instruments d'analyse y sont décrits. L'objectif de ce chapitre est de permettre au lecteur de reproduire mes résultats, ce qui permettra à de futurs collaborateurs de mon groupe de poursuivre mes travaux.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse peuvent se diviser en deux parties, une première partie à visée fondamentale et une seconde partie plus applicative. Les travaux présentés dans le Chapitre III se focalisent sur l'étude de l'autoassemblage de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes (Figure 7). L'objectif est de montrer qu'il est **possible d'étudier ces assemblages formés depuis la surface de vésicules phospholipidiques et de comprendre l'impact et le mécanisme de la formation des nanofibres de peptides autoassemblés résultants**. Si ce sujet n'a jamais été traité dans la littérature, il convient de préciser qu'il existe de nombreux articles parus depuis un peu plus de dix ans qui décrivent l'utilisation et l'intérêt du concept de LEASA dans des systèmes vivants comme des cellules²²⁻²⁸ ou des bactéries.²⁹ Ces travaux mettent en lumière l'intérêt de cette approche pour des traitements anticancéreux et antimicrobiens principalement. Un bref état de l'art spécifique à ce

Introduction Générale

domaine est décrit au début du [Chapitre III](#). Nous avons utilisé une approche permettant d'obtenir des vésicules phospholipidiques présentant des enzymes, en l'occurrence de l'**AP**, sur la partie extérieure des membranes, et d'étudier le processus d'autoassemblage du peptide **Fmoc-FFY** généré à partir du précurseur **Fmoc-FFpY**. En utilisant des conditions de concentration en précurseurs non gélifiantes, nous avons étudié la formation localisée de nanofibres par microscopie optique à contraste de phase, par microscopie confocale à fluorescence, à épifluorescence et par microscopie électronique à transmission. Ce projet a pour objectifs (i) de montrer qu'il est possible de disposer d'un système modèle permettant d'étudier les processus d'autoassemblage depuis la surface de vésicules phospholipidiques ; (ii) de déterminer comment l'autoassemblage s'initie depuis cette surface et plus précisément de comprendre le mécanisme du LEASA depuis la surface des vésicules ; (iii) de déterminer quel(s) effet(s) l'autoassemblage aura sur les propriétés morphologiques et physico-chimiques des vésicules.

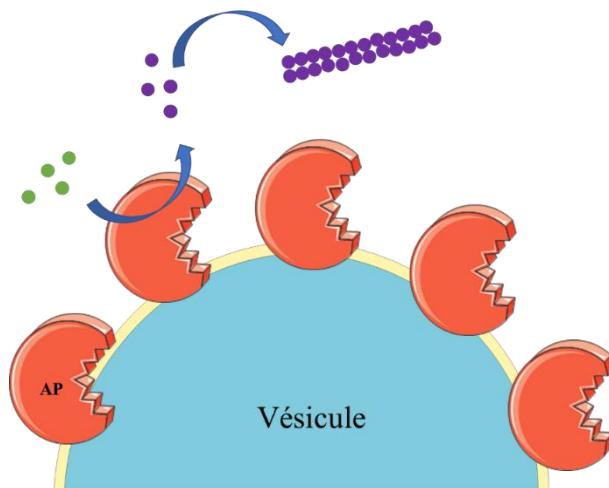


Figure 7. Représentation schématique d'une vésicule fonctionnalisée avec l'**AP** à la surface de laquelle a lieu la déphosphorylation du **Fmoc-FFpY** (ronds verts) en **Fmoc-FFY** (ronds violettes) qui s'autoassemble.

Dans une seconde partie de mes travaux, je me suis m'intéressé à un aspect plus appliqué en développant une approche permettant d'augmenter le nombre d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires formés par EASA, de les supporter sur des mousses polymère et d'utiliser ces matériaux dans des procédés biocatalytiques en flux (Figure 8). Ce projet est décrit dans le [Chapitre IV](#) de ce manuscrit et s'inscrit dans la continuité de précédents travaux effectués par une ancienne doctorante de mon groupe, la Dr. J. Rodon Fores (doctorat de 2016 à 2019).³⁰ En effet, en utilisant un film multicouche de polyélectrolytes permettant la localisation d'enzymes, à savoir l'**AP**, à la surface de mousses polymères. Elle a montré que le matériau résultant présentait une activité enzymatique stable au cours d'une trentaine de processus de transformations chimiques (déphosphorylation) dans un dispositif en flux, sur une plage de

Introduction Générale

temps s'étalant sur une année entière. Cette stabilité était attribuée à la particularité de l'immobilisation de l'enzyme piégée au sein d'un hydrogel supramoléculaire. Cette découverte a fait l'objet d'une protection de l'invention sous la forme d'un brevet.³¹ Cependant, l'activité enzymatique du matériau résultant reste globalement faible et limite les perspectives d'applications potentielles de cette technologie. L'objectif de ce second projet de ma thèse est **de concevoir une approche permettant de préparer un matériau biocatalytique pouvant immobiliser d'avantage d'enzymes au sein des hydrogels supportés à la surface de mousses polymères**. Cette approche s'appuie sur l'utilisation de la technique dite de couche-par-couche (ou *Layer-by-Layer*, LbL, en anglais) permettant de construire des films enzymatiques avec plusieurs couches d'enzymes.

Les objectifs de ce second projet sont de montrer (*i*) la possibilité d'accroître l'activité enzymatique des matériaux par le nombre de couches d'enzymes présent dans le film multicouche ; (*ii*) évaluer l'influence de la présence de l'hydrogel sur la robustesse et les propriétés catalytiques des matériaux, par rapport à des mousses sans hydrogels (mais présentant un film multicouche enzymatique).

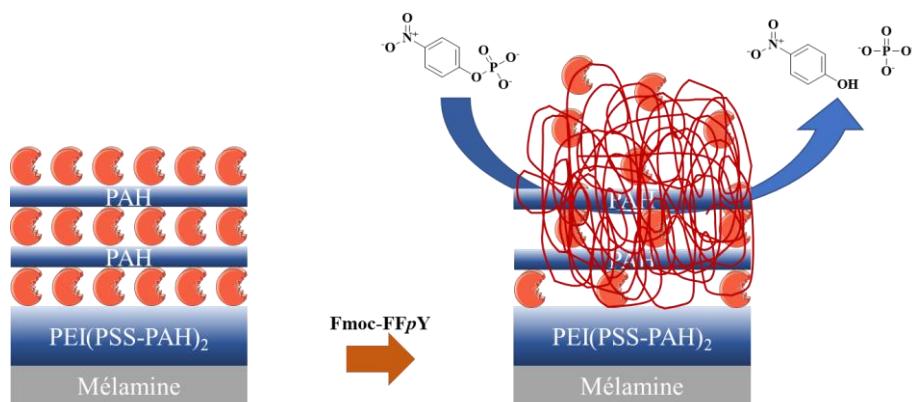


Figure 8. (gauche) Représentation schématique d'une mousse de mélamine à cellules ouvertes modifiée en surface par plusieurs couches d'**AP** enfouies au sein d'un film de polyélectrolytes. (droite) Autoassemblage (en rouge) après l'ajout du **Fmoc-FFpY** et catalyse enzymatique du 4-nitrophénylphosphate en 4-nitrophénol.

Comme annoncé précédemment, pour cette seconde partie de mon projet doctoral, j'ai utilisé le système modèle enzyme/précursseur suivant : **AP/Fmoc-FFpY**. L'**AP** joue ici un double rôle : celui d'assurer la formation de l'hydrogel de surface constitué de l'assemblage de **Fmoc-FFY**, mais aussi celui d'une enzyme modèle pour évaluer les performances catalytiques des différentes mousses ainsi préparées. La transformation chimique étudiée est donc une déphosphorylation, en l'occurrence l'hydrolyse du *para*-nitrophénylphosphate (**pNPP**) en *para*-nitrophénol (**pNP**). À noter que le travail présenté dans le Chapitre IV entre dans les taches attendues d'un projet de recherche nommée CASH (*Catalytically-Active*

Introduction Générale

Supramolecular Hydrogel, 2021-2025) soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche et porté par mon groupe.

La Conclusion Générale de cette thèse résumera les principaux résultats obtenus et présentera les perspectives possibles de mon travail. À noter que chaque chapitre possède son sommaire et ses références propres. De nombreuses abréviations sont utilisées et se trouvent listées en page 20 et au début du Chapitre II.

Références

- [1] G. M. Whitesides, B. Grzyboski, *Science*, **2002**, 295 (5564), 2418-2421. DOI : 10.1126/science.1070821.
- [2] A. C. Mendes, E. T. Baran, R. L. Reis, H. S. Azevedo, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **2013**, 5, 582-612. DOI : 10.1002/wnan.1238.
- [3] CEA, **2018**, L'ADN : déchiffrer pour mieux comprendre le vivant, <https://www.cea.fr/comprendre/Pages/sante-sciences-du-vivant/l-ADN-dechiffrer-pour-mieux-comprendre-le-vivant.aspx?Type=Chapitre&numero=1>, consulté le 28/09/2022.
- [4] E. E. Kim, W. Wyckoff, *Worldwide Protein Data Bank*, **1994**. DOI : 10.2210/pdb1alk/pdb.
- [5] E. E. Kim, W. Wyckoff, *J. Mol. Biol.* **1991**, 218, 449-464. DOI : 10.1016/0022-2836(91)90724-K.
- [6] B. J. Kim, *Chem. Asian J.* **2022**, 17, e202200094. DOI : 10.1002/asia.202200094.
- [7] J. Gao, J. Zhan, Z. Yang, *Adv. Mater.* **2019**, 1805798. DOI : 10.1002/adma.201805798.
- [8] Y. Gao, Z. Yang, Y. Kuang, M.-L. Ma, J. Li, F. Zhao, B. Xu, *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **2010**, 94, 19-31. DOI : 10.1002/bip.21321
- [9] Z. Yang, H. Gu, D. Fu, P. Gao, J. K. Lam, B. Xu, *Adv. Mater.* **2004**, 16, 1440-1444. DOI : 10.1002/adma.200400162.
- [10] R. J. Williams, R. J. Mart, R. V. Ulijn, *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **2010**, 94 (1), 107-117. DOI : 10.1002/bip.21346.
- [11] X. Du, J. Zhou, J. Shi, B. Xu, *Chem. Rev.* **2015**, 115, 13165-13307. DOI : 10.1021/acs.chemrev.5b00299.
- [12] B. Yang, D. J. Adams, M. Marlow, M. Zelzer, *Langmuir*, **2018**, 34 (50), 15109-15125. DOI : 10.1021/acs.langmuir.8b01165.
- [13] R. J. Williams, A. M. Smith, R. Collins, N. Hodson, A. K. Das, R. V. Ulijn, *Nature Nanotech.* **2009**, 4, 19-24. DOI: 10.1038/nnano.2008.378.
- [14] C. Vigier-Carrière, F. Boulmedais, P. Schaaf, L. Jierry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57 (6), 1448-1456. DOI : 10.1002/anie.201708629.
- [15] C. Vigier-Carriere, T. Garnier, D. Wagner, P. Lavalle, M. Rabineau, J. Hemmerlé, B. Senger, P. Schaaf, F. Boulmedais, L. Jierry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 10198-10201. DOI: 10.1002/anie.201504761.
- [16] C. Vigier-Carriere, D. Wagner, A. Chaumont, B. Durr, P. Lupattelli, C. Lambour, M. Schmutz, J. Hemmerlé, B. Senger, P. Schaaf, F. Boulmedais, L. Jierry, *Langmuir*, **2017**, 33, 8267-8276. DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b01532.
- [17] M. Criado-Gonzalez, J. Rodon Fores, D. Wagner, A. P. Schröder, A. Carvalho, M. Schmutz, E. Harth, P. Schaaf, L. Jierry, F. Boulmedais, *Chem. Commun.* **2019**, 55, 1156-1159. DOI : 10.1039/C8CC09437C.

Introduction Générale

- [18] M. Criado-Gonzalez, J. Rodon Fores, A. Carvalho, C. Blanck, M. Schmutz, L. Kocgozlu, P. Schaaf, L. Jierry, F. Boulmedais, *Langmuir*, **2019**, *35* (33), 10838-10845. DOI : 10.1021/acs.langmuir.9b01420.
- [19] M. Criado-Gonzalez, B. Loftin, J. Rodon Fores, D. Vautier, L. Kocgozlu, L. Jierry, P. Schaaf, F. Boulmedais, *J. Mater. Chem. B*, **2020**, *8*, 4419-4427. DOI : 10.1039/D0TB00456A.
- [20] J. Rodon Fores, A. Bigo-Simon, D. Wagner, M. Payrastre, C. Damestoy, L. Blandin, F. Boulmedais, J. Kelber, M. Schmutz, M. Rabineau, M. Criado-Gonzalez, P. Schaaf, L. Jierry, *Polymers*, **2021**, *13* (11), 1793. DOI : 10.3390/polym13111793.
- [21] M. Criado-Gonzalez, D. Wagner, J. Rodon Fores, C. Blanck, M. Schmutz, A. Chaumont, M. Rabineau, J. B. Schlenoff, G. Fleith, J. Combet, P. Schaaf, L. Jierry, F. Boulmedais, *Chem. Mater.* **2020**, *32* (5), 1946-1956. DOI : 10.1021/acs.chemmater.9b04823.
- [22] Y. Gao, J. Shi, D. Yuan, B. Xu, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1033. DOI : 10.1038/ncomms2040.
- [23] M. Hughes, S. Debnath, C. W. Knapp, R. V. Ulijn, *Biomater. Sci.* **2013**, *1*, 1138-1142. DOI : 10.1039/c3bm60135h.
- [24] J. Li, Y. Gao, Y. Kuang, J. Shi, X. Du, J. Zhou, H. Wang, Z. Yang, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9907-9914. DOI : 10.1021/ja404215g.
- [25] H. Wang, Z. Feng, D. Wu, K. J. Fritzsching, M. Rigney, J. Zhou, Y. Jiang, K. Schmidt-Rohr, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10758-10761.
- [26] J. Zhou, X. Du, C. Berciu, H. He, J. Shi, D. Nicastro, B. Xu, *Chem.* **2016**, *1*, 246-263. DOI : 10.1016/j.chempr.2016.07.003.
- [27] Z. Feng, X. Han, H. Wang, T. Tang, B. Xu, *Chem.* **2019**, *5* (9), 2442-2449. DOI : 10.1016/j.chempr.2019.06.020.
- [28] C. Wu, C. Wang, T. Zhang, G. Gao, M. Wei, Y. Chen, X. Li, F. Wang, G. Liang, *Adv. Healthcare Mater.* **2022**, *11*, 2101346. DOI : 10.1002/adhm.202101346.
- [29] Z. Yang, G. Liang, Z. Guo, Z. Guo, B. Xu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8216-8219. DOI : 10.1002/anie.200701697.
- [30] J. Rodon Fores, M. Criado-Gonzalez, A. Chaumont, A. Carvalho, C. Blanck, M. Schmutz, C. A. Serra, F. Boulmedais, P. Schaaf, L. Jierry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (52), 18817-18822. DOI : 10.1002/anie.201909424.
- [19] J. Rodon Fores, C. A. Serra, F. Boulmedais, P. Schaaf, L. Jierry, EP19306077, Sept. 9th **2019**.

Liste des abréviations

Liste des abréviations

L'ensemble des abréviations les plus récurrentes du manuscrit sont rappelées ici. Seules les abréviations du Chapitre I n'y figurent pas, car celles-ci y sont directement détaillées.

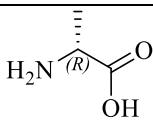
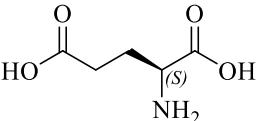
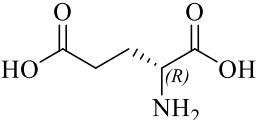
Concepts

CASH	<i>Catalytically-active supramolecular hydrogel</i> , hydrogel supramoléculaire catalytiquement actif
EASA	<i>Enzyme-assisted Self-Assembly</i> , autoassemblage induit par enzyme
LbL	<i>Layer by layer</i> , couche-par-couche
LEASA	<i>Localized Enzyme-Assisted Self-Assembly</i> , Autoassemblage localisé induit par enzyme

Techniques analytiques

cryo-SEM	<i>Scanning electron microscopy in cryo mode</i> Microscopie électronique à balayage en mode cryo
cryo-TEM	<i>Transmission electron microscopy in cryo mode</i> Microscopie électronique à transmission en mode cryo
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> Chromatographie liquide à haute performance
QCM-D	<i>Quartz cristal microbalance with dissipation measurement</i> Microbalance à cristal de quartz avec mesure de dissipation
RMN	Résonance magnétique nucléaire

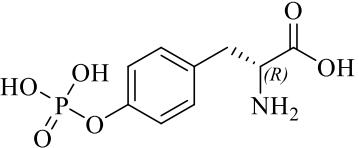
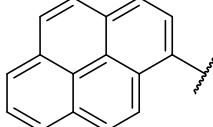
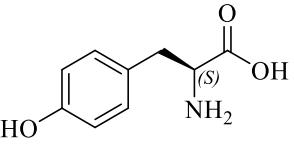
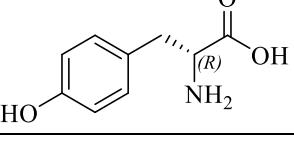
Acides aminés et peptides

a	D-alanine	
E	L-acide glutamique	
e	D-acide glutamique	

Liste des abréviations

F	<i>L</i> -phénylalanine	
f	<i>D</i> -phénylalanine	
Fmoc-	Fluorénylméthoxycarbonyl	
Fmoc-FFY	-	
G/g	glycine	
K	<i>L</i> -lysine	
k	<i>D</i> -lysine	
Nap	Naphthalényl	
NBD	4-nitro- 2,1,3-benzoxadiazole	
pY	<i>L</i> -tryosine phosphate	

Liste des abréviations

py	<i>D</i> -tryosine phosphate	
Py	Pyrényl	
Y	<i>L</i> -tryosine	
y	<i>D</i> -tryosine	

Composés chimiques utilisés durant la thèse

La liste des composés présentées dans en début de chapitre II fait office de liste d'abréviations pour les divers composés chimiques utilisés.

Chapitre I

État de l'art sur le mécanisme et les applications du concept de LEASA

Table des matières

Table des matières.....	33
Contexte	34
1 Introduction.....	35
2 Mechanism of Enzyme-Assisted Self-Assembly of LMWH	36
2.1 There exist four different types of Enzyme-Assisted Self-Assembly (<i>EASA</i>) processes.....	36
2.2 EASA kinetics present a lag time before self-assembly starts. Influence of the precursor's aggregation on the self-assembly process.....	37
2.3 Do molecular assemblies of LMWH present a long-range order?.....	39
2.4 Where does the EASA process start?.....	41
2.5 Do proteins or enzymes influence the 3D organization of the self-assembled structure?	43
2.6 Self-assembled structures are out-of-equilibrium structures.....	44
2.7 Enzymes seem to be incorporated in the peptide self-assembled network	45
2.8 Do self-assembled hydrogelators be in equilibrium with free hydrogelators in the hydrogel? ..	46
2.9 Mechanism of EASA: summary of what we know and do not know yet	47
3 Localized Enzyme-Assisted Self-Assembly.....	47
3.1 LEASA processes on macroscopic planar surfaces	47
3.2 Protein-assisted self-assembly localized on surfaces.....	50
3.3 Localized self-assemblies triggered by non-covalently attached enzymes can reach several micrometers thicknesses and are often oriented.....	51
3.4 LEASA processes on nanoparticles	52
3.5 LEASA processes in host gels	56
4 Applications of LEASA	56
4.1 Design of smart materials	56
4.2 LEASA for the design of catalytic systems	57
4.2.1 LEASA allows the design of supported-hydrogels in flow reactors.....	57
4.2.2 Design of localized supramolecular autocatalytic systems	58
4.3 Biomedical developments	59
5 Perspectives for LEASA	60
Positionnement de mon projet de thèse vis-à-vis de l'état de l'art portant sur le concept de LEASA	62
References.....	64

Contexte

Au cours de ma première année de doctorat, précisément à partir du mois de janvier 2020, j'ai assuré l'encadrement d'un étudiant stagiaire de niveau Master II, Mr. Cyprien Müller, pour une durée de 6 mois. Son projet avait pour objectif de déterminer s'il existe un équilibre entre un assemblage de peptides dont la formation est induite par une enzyme, selon le principe d'EASA, et des hydrogélateurs à l'état « libre », dans le sens non-assemblé. Autrement dit, il s'agissait de répondre à la question suivante : ces assemblages sont-ils dynamiques, comme on pourrait intuitivement le soupçonner alors que des expériences récentes réalisées *via* un procédé en flux dans notre équipe semblent démontrer le contraire ? Pour ce faire, nous nous sommes intéressés au système enzyme/précureur **AP/Fmoc-FF(p)Y**, connu et maîtrisé par notre groupe. Notre idée était de faire croître un hydrogel à base de **Fmoc-FFY** autoassemblé à partir de la surface d'une mousse polymère modifiée par l'**AP** et de faire passer un flux d'eau à travers cet hydrogel supporté. Ainsi nous aurions pu doser le relargage éventuel de **Fmoc-FFY** au cours du temps. Est-ce que ces hydrogélateurs peuvent subir un échange en présence d'un autre hydrogélateur, c'est-à-dire le **Fmoc-FFY**, de même structure moléculaire ? L'échange entre les différents hydrogélateurs impliqués dans l'assemblage est-il dynamique ? C'est pourquoi nous avons envisagé d'utiliser des précurseurs de structure **Fmoc-FF(p)Y** marqués avec un isotope froid, comme le ^{13}C , afin de doser par RMN la proportion de peptides marqués (dits « froids ») qui s'échange avec le réseau nanofibreux de peptides autoassemblés non marqués. Malheureusement à cause de la pandémie de Covid-19, le confinement mis en place au cours du printemps 2020 a rendu toute manipulation en laboratoire impossible à partir de mi-mars et pendant presque trois mois. Ce à quoi s'est ajouté un Programme de Retour d'Activité très contraignant, imposé par le CNRS, qui nous a ainsi empêchés de nous investir totalement dans ce projet.

Néanmoins, grâce à l'accès aux bases de données de l'Université, nous avons établi un programme de travail bibliographique pendant la période de confinement ayant pour but d'établir un état de l'art à la fois sur le mécanisme d'EASA ainsi que sur les récentes applications découlant de l'utilisation du concept de LEASA. L'objectif de ce travail bibliographique étant de positionner mon projet de thèse par rapport aux travaux existants dans la littérature.

Cette recherche bibliographique a permis de rédiger une revue dont le titre est : *Localized Enzyme-Assisted Self-Assembly of low molecular weight hydrogelators. Mechanism, applications and perspectives*, qui a été publié dans le journal *Advances in Colloid and Interface Science*. Les auteurs sont C. Müller, A. Ontani, A. Bigo-Simon, P. Schaaf et L. Jierry. Avec l'accord de l'Ecole Doctorale ED182, l'intégralité de cette revue est reproduite dans la langue de publication (anglais) dans ce [Chapitre I](#).

1 Introduction

Biological cells are chemical systems controlled by tremendous complex interplaying of chemical reactions and physico-chemical processes, conferring them an extraordinary capability to respond to external stimuli at various scales. Most of these reactions and processes are triggered and regulated by enzymes. Cells are also physico-chemical systems where self-assemblies play a major role. Actin filaments which are of primary importance in cell motility are a typical example of such self-assemblies. Their appearance, dynamics and localization are governed enzymatically. In 2004, in an effort to provide a new way to get hydrogels, Bing Xu introduced the concept of *enzyme-assisted self-assembly* (EASA) of low molecular weight hydrogelators (LMWH).¹ This concept mimics self-assembly processes taking place in cells. In this work, a short (non-self-assembling) Fmoc-tyrosine phosphate, **Fmoc-pY** (**Fmoc** = Fluorenylmethyloxycarbonyl; **p** = phosphate group; **Y** = tyrosine), precursor was dephosphorylated by alkaline phosphatase (**AP**) and the decrease in solubility of the resulting hydrogelator Fmoc-tyrosine (**Fmoc-Y**) drove the self-assembly which led to the formation of a gel (Figure 1.1). EASA is now an important tool used to develop both biocompatible hydrogels² and nanomaterials interacting with cells with potential applications in cancer therapy for example.³⁻⁶

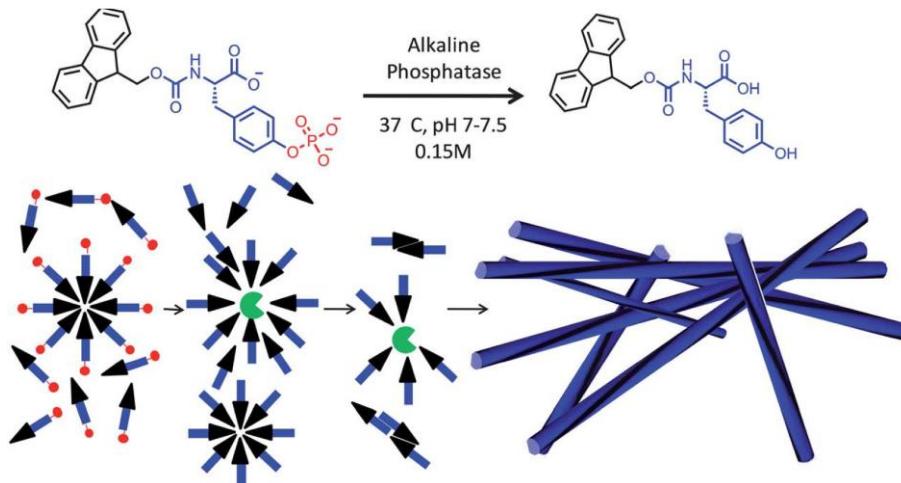


Figure 1.1. (Top) Enzymatic transformation of the precursor Fmoc-pY into the hydrogelator Fmoc-Y in presence of **AP**. (Bottom) Proposed mechanism of the biocatalytic supramolecular transformation triggered by **AP** (green disk) in presence of the precursors (red spots-linked to the blue arrows). Reproduced from reference [20] with permission from the Royal Chemical Society.

After the seminal work of Bing Xu, EASA was rapidly extended to other enzymes and hydrogelators, usually amphiphilic peptides.⁷ Because the hydrogelators are generated by enzymes, their production can be spatially controlled by localizing the enzymes. This step has been taken by Ulijn in 2009 by grafting covalently the enzymes on surfaces and showing that self-assembly occurred on the surface.⁸ Such

processes, where the enzymes are localized, were called *localized enzyme-assisted self-assembly* (LEASA).⁹ Localization can take place on a surface or in a 3D environment such as a host material (gel). LEASA processes were first described on cells in biological systems¹⁰ even before introduced by Ulijn on surfaces. Comparison between EASA and LEASA is illustrated in Figure 1.2. In this review we will focus on LEASA processes generated in synthetic systems and discard those described in biological systems which are widely covered by other reviews.¹¹⁻¹³ Because the description of LEASA processes requires a good understanding of the EASA's one, we will first critically discuss the main features of this latter and mention some of the issues still unanswered. We will base them on some illustrative examples without providing an extensive review of EASA. Then, an overview of the main developments based on LEASA will be outlined before discussing some of their recent applications.

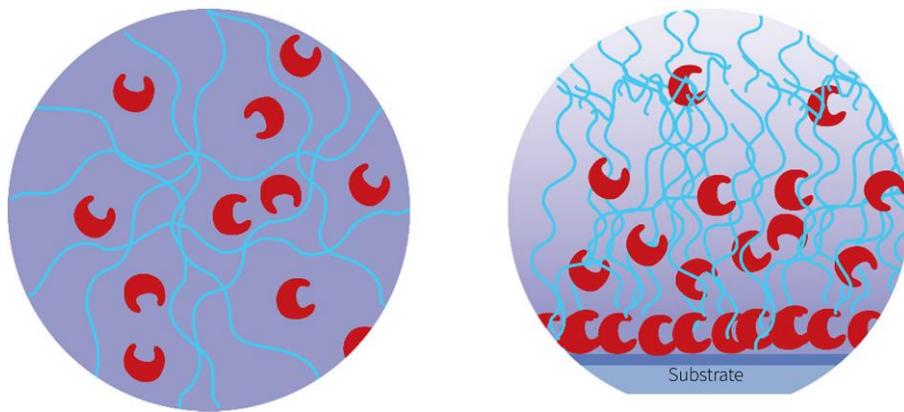


Figure 1.2. Illustrations of (*left*) hydrogel generated from EASA, showing enzymes (red croissant) encapsulated in the LMWH self-assembly network (blue lines), and (*right*) hydrogel which grew from enzyme-localized surface (LEASA), highlighting the self-assembled nanofibers built from a bottom-up approach resulting in a distribution of the enzymes in the gel.

2 Mechanism of Enzyme-Assisted Self-Assembly of LMWH

2.1 There exist four different types of Enzyme-Assisted Self-Assembly (*EASA*) processes

It can be distinguished four types of self-assemblies of LMWH induced by an enzymatic trigger. All of them are different by the way the enzyme generates the hydrogelator. The major part of papers in this field is based on the removal of a chemical group covalently linked to a precursor compound leading to the hydrogelator production. This is generally realized through the hydrolysis of ester, sugar or phosphate groups. This “catabolic” way has been introduced in 2004 by B. Xu in his pioneer work using a phosphatase to dephosphorylate a single tyrosine residue N-protected by a Fmoc group (Figure 1.3.1).¹ But EASA can also be involved in a tandem self-assembly process combining successively an enzymatic and then a chemical trigger. Indeed, Z. Yang and coll. reported a chemical system where AP transformed precursors

into hydrogelator peptides that self-assembled into nanoparticles followed by their self-assembly into nanofibers induced by the presence of glutathione.¹⁴ An “anabolic” way has also been reported: in this case, the enzyme catalyzes the formation of the hydrogelator through the covalent bonding between two or several entities (Figure 1.3.2). For instance, α -Chymotrypsin has been used to get an oligopeptide hydrogelator having an alternated sequence of polydipeptide (**KL**)_n from the **KL** ethyl ester precursor, **KL-OEt** (**K** = lysine; **L** = Leucine).¹⁵ In 2016, Ulijn and coworkers have illustrated another approach using thermolysin. This enzyme is able to catalyze the amides hydrolysis, their condensation and their exchange between various peptide sequences leading thus to a dynamic combinatorial peptide library (Figure 1.3.3).¹⁶ In this third case, it gives rise to selective amplification of the self-assembling peptide hydrogelators. Finally, the trigger of the LMWH self-assembly can also be realized through an indirect way, by switching the pH for instance. The addition of glucose to a mixture of glucose oxidase (**GOx**) and the dipeptide **Fmoc-AA** (**A** = alanine), results in a decrease of the pH which protonates the carboxylic group at the C-terminal position, leading to its self-assembly (Figure 1.3.4).¹⁷

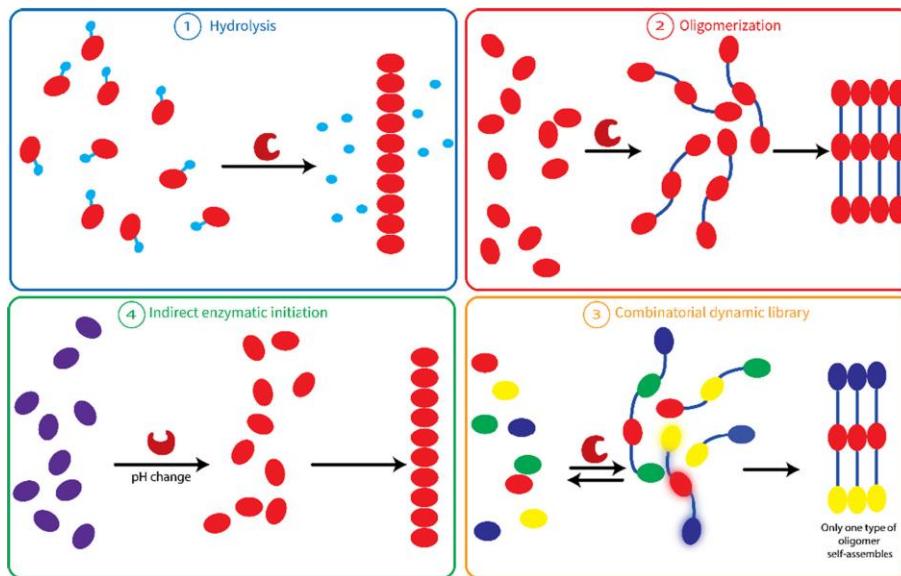


Figure 1.3. Classification of the different EASA approaches reported in the literature in four categories. (1) Precursor (red ovals and blue spots linked together) compounds undergo the hydrolysis of a specific chemical group (blue spot) from the enzyme (croissant) action, releasing the hydrogelators (red ovals) which are self-assembling. (2) The enzyme (croissant) catalyzes the formation of oligomer hydrogelators which are self-assembling. (3) When the enzyme (croissant) is able to both link and disrupt different monomers (multicolored ovals) it leads to a dynamic combinatorial library of oligomers. The self-assembly of one of them displaces the equilibrium towards its predominance. (4) The enzyme (croissant) changes the pH and thus switches the charged state of precursors (dark blue ovals) to neutral hydrogelators (red ovals) which then self-assemble.

2.2 EASA kinetics present a lag time before self-assembly starts. Influence of the precursor's aggregation on the self-assembly process

Using reverse hydrolysis of peptide precursors by a proteolytic enzyme (thermolysin) which produces peptide hydrogelators through reverse hydrolysis capable of self-assembling into nanofibrillar structures, Williams *et al.* examined the early stages of the EASA process of an Fmoc-trileucine (**Fmoc-L₃**) hydrogel from **Fmoc-L** and the dipeptide **LL**.¹⁸ At low enzyme concentrations, using circular dichroism (CD) to monitor the self-assembly kinetics, they observed a short lag time between the enzymatic action and the self-assembly, which is inversely proportional to the enzyme concentration present in the solution. After this lag time, the self-assembly took place resulting in the formation of thin nanofibers whose entanglement ultimately led to the formation of a supramolecular hydrogel. Through a rheological study, Bing Xu and coworkers have reported a lag time of 10 min to form a gel from a **Fmoc-pY** solution in presence of acid phosphatase used as enzyme. This period was attributed to the time necessary for the enzymes to produce enough hydrogelators (**Fmoc-Y** in this case) to initiate the self-assembly stage.¹⁹ Using also **Fmoc-pY** as precursor and **AP** as enzyme, Ulijn has established an EASA mechanism divided in three stages²⁰ first a rapid dephosphorylation of the precursor by **AP**, second the formation of aggregates of **Fmoc-Y** which then reorganize themselves in nanofibers and finally grow (Figure 1.1). The authors state that the aggregates are micelles characterized by their critical micellar concentration (cmc). Therefore, the kinetics of self-assembly through hydrolysis reactions present a lag time before self-assembly starts as well, highlighting thus a general feature of EASA, an observation also reported using enzymes generating the hydrogelators through oligomerization.^{9,15}

Peptide self-assembly should thus also be influenced by the enzyme kinetics. This is exemplified by phosphatase triggered self-assembly. Most of the precursor peptides used in presence of **AP** contain phosphorylated residues. Bing Xu showed recently that **AP** reacts even faster with phosphorylated naphthyl and biphenyl moieties, leading to a faster self-assembly process.²¹ The use of different motifs allows also the modulation of the morphology of the peptide self-assembly.

In most articles in the field, the description of the EASA mechanism assumes implicitly that the precursors are in a “free state” in solution before the enzymatic action, meaning fully hydrated. By using the peptide **Fmoc-GFFYE-NH-(CH₂)₂-SS-(CH₂)₂-NHCO-(CH₂)₂-CO-EE-OH** (SS = disulfide bridge) as precursor in presence of glutathione reductase, the hydrogelator **Fmoc-GFFYE-NH-(CH₂)₂-SH** is generated resulting in a supramolecular hydrogel.²² Despite the full solubility of the precursor in water, we observed the absence of some ¹H NMR signals (measured in heavy water) indicating that this peptide is not free in solution but is rather in the form of aggregates. Addition of deuterated DMSO reveals all ¹H NMR signals. Using β -galactosidase to induce hydrogelation, it was reported that glycosylated precursors are organized in nanofibers before the enzymatic action, as observed by electronic microscopy.²³ This precursor

organization was confirmed by contributions from Barthélémy and coll.²⁴ As expected, similar conclusions arose from investigations about hydrogelation induced by other stimuli than the biocatalytic action.²⁵ Recently Zhimou Yang and coll. studied the EASA of three *N*-Naphthalene (**Nap**) protected tripeptide precursors, **Nap-pYYY**, **Nap-YpYY** and **Nap-YYpY**, in the presence of **AP**.²⁶ After the enzymatic dephosphorylation, all three precursors led to the same tripeptide **Nap-YYY** that has the ability to form a hydrogel. They observed that mixing **Nap-YpYY** and **AP** at appropriate concentrations results in the formation of a hydrogel that is stable over time. On the other hand, mixing **AP** with the two other peptides, *i.e.* **Nap-pYYY** and **Nap-YYpY**, leads to a slower formation of a weaker hydrogel resulting finally in precipitates. TEM images reveal that the gel deriving from **Nap-YpYY** is constituted of thin micrometer-long nanofibers whereas with the other two peptides, the solutions contain a mixture of aggregates and small fibers. This different behavior cannot be charged to an assumed difference in the dephosphorylation kinetics since they are almost all three identical after dephosphorylation, and are dephosphorylated in more than 98 % after 1 h in all cases. They also mention that the three phosphorylated peptides form micelles in solution and their cmc are 3181, 98, 1794 μM , respectively. The authors claim that the different behavior with respect to the self-assembly is due to a preorganization of the precursor aggregates in their phosphorylated state which then plays the role of critical nucleus for the self-assembly. Even if there is no direct proof of this, the conclusion seems reasonable. This again gives credit to the fact that the precursor peptides might be present in the form of aggregates. How these precursors interact with the enzymes and how these aggregates reorganize themselves or dissolve in the presence of the enzymes remains unknown.

2.3 Do molecular assemblies of LMWH present a long-range order?

The question here is to know if the fibers or other structures that are often observed in small peptide self-assemblies present an order over long distance. Using the dipeptide **Fmoc-FF** as hydrogelator, Smith *et al.* have reported the formation of nanoribbons.²⁷ They observed Bragg peaks corresponding to the presence of flat ribbons formed by parallelly aligned single fibrils along their long axis. A single peak corresponding to a distance of 4.3 Å and attributed to the distance between two **Fmoc-FF** dipeptides was also measured. Finally, the presence of a small peak at 16 Å is assigned to the spacing between two Fmoc groups (Figure 1.4a, b). Hughes *et al.* investigated the hydrogelator **Fmoc-SF-OMe** which was generated *in situ* by mixing both **Fmoc-S** with **F-OMe** together in the presence of thermolysin.²⁸ This resulted in the formation of 2D nano-sheets. The authors proposed lateral self-assembly forming extended arrays of β -sheets interlocked through π -stacking between **Fmoc** groups. This model was in accordance with WAXS spectra which exhibited peaks at 4.8 and 3.7 Å that were attributed to β -sheet spacing and π -stack spacing between the **Fmoc** groups. A prominent peak at 16 Å with several higher order reflections was also present

which was attributed to repeating pattern along the peptide backbone. Yet these systems were all dried, which can eventually induce a long-range order. The question in the wet state is thus not answered.

Molecular dynamic simulation (MDS) is a tool also used to elucidate the molecular organization of LMWH in the resulting nanostructures. Based on infrared spectroscopy and MDS studies, the hydrogelator (**KL**)₇, generated from **KL-OEt** in presence of α -chymotrypsin, appears to self-assemble in α -helices and β -sheets in a ratio depending on the initial concentration of the precursor dipeptide.⁹ Furthermore, the esterase-like activity arising from the **Fmoc-GFFYGHY** peptide self-assembly, formed from the precursor **Fmoc-GFFpYGHpY** in presence of **AP**, was rationalized through MDS showing a catalytic pocket constituted of three to six histidine residues linked together through hydrogen bonds (Figure 1.4c).²⁹ This network enhanced the nucleophilicity of the imidazole groups involved in the catalytic activity.

Currently, the determination of 3D organizations almost at the atomic scale can be performed using the reconstruction images based on electronic microscopy technics with spectacular achievements of proteins structure.³⁰ Such developments appear highly suitable for the establishment of LMWH 3D structures in the future.

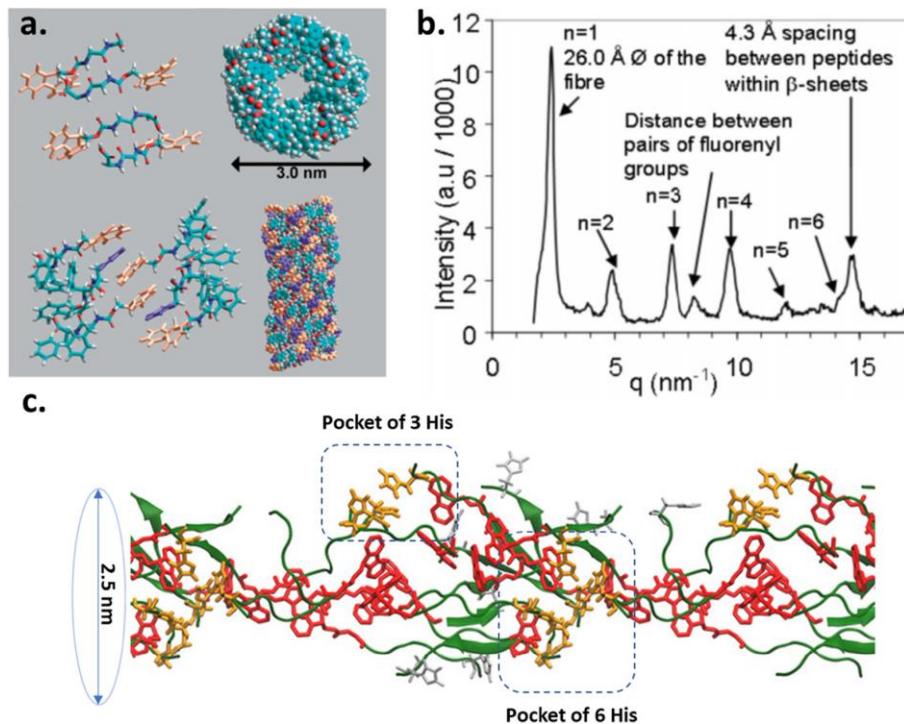


Figure 1.4. (a) Model structure of Fmoc-FF self-assembly arranged in an anti-parallel β -sheet pattern (Fmoc groups are colored in orange and phenyl groups of F residue in purple). (a) and (b) are reproduced from reference [27] with permission from Wiley-VCH. (c). Molecular dynamics of hydrogelators Fmoc-GFFYGHY showing a fiber-like spatial arrangement through 3D periodic

boundary conditions (β -sheet structures are represented in green arrows, Fmoc moieties are in red, histidine involved in a hydrogen network are colored in yellow, the others in grey). Reproduced from reference [29] with permission from Wiley-VCH.

2.4 Where does the EASA process start?

Williams and Ulijn were the first to show that peptide self-assembly, initiated by enzymatic formation of the hydrogelator, starts where the enzyme is covalently grafted.⁸ They immobilized covalently thermolysin on a surface and brought it in contact with a solution containing a mixture of **Fmoc-L** and **L₂**. Thermolysin catalyzed peptide bond formation and formation of **Fmoc-L₃** which self-assemble into nanofibrils. They observed, by TEM and AFM, that most of the fibers originated from small globules, typically 20–30 nm in width, which were attributed to enzyme clusters (Figure 1.5a, b). Yet one can also observe on their AFM image the formation of small fibrils that are not related to globules. Do these fibrils originate from single grafted enzymes not visible under AFM or do some fibrils form spontaneously from hydrogelators that are further away from the enzymes that produced them? Similar results were reported later using subtilisin which hydrolyzed *O*-methylated Fmoc-dipeptides, forming hydrogelators (Figure 1.5c).³¹ In this case too, the surface was covered by nanofibers and nanoclusters. Most of the fibers started from the clusters but there was also a large proportion of them that were not linked to nanofibers. Moreover, it is not yet clear what is the real nature of these nanoclusters: enzyme clusters or peptide clusters? This question should be further investigated. It should also be noticed that when the enzyme is adsorbed electrostatically on a surface and then brought in contact with an adequate precursor solution, globular and dense microstructures are formed quasi-spontaneously. Several microfibers appear few minutes later, connecting the microstructures in a fibrous network. This time-lapse of events has been shown through AFM investigations using **AP** adsorbed on a surface in presence of the tripeptide **Fmoc-FFpY** (Figure 1.5d).³² Aspects concerning surface-induced EASA will be discussed in the next part of this review.

Chapitre I
 État de l'art sur le mécanisme et les applications du concept de LEASA

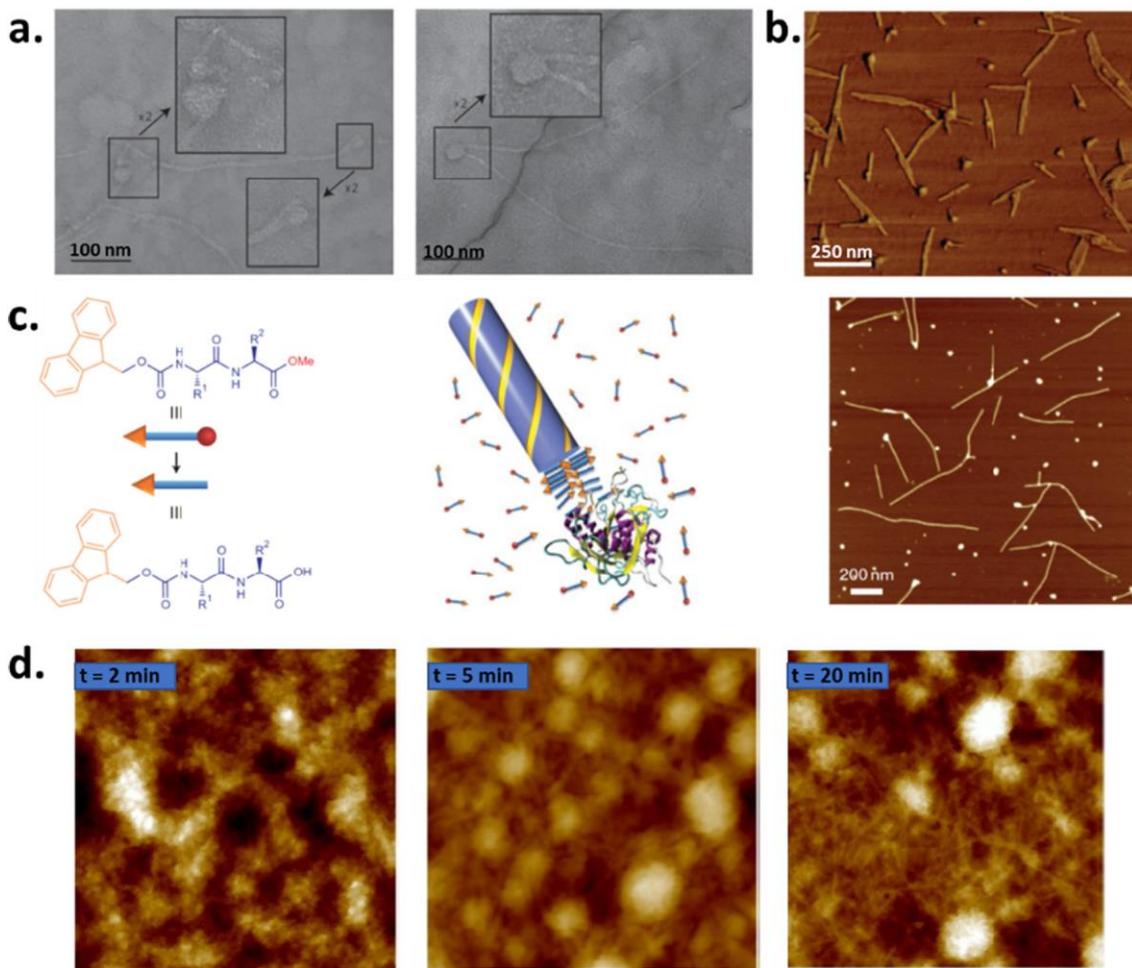


Figure 1.5. (a) TEM and (b) AFM images showing the peptide-self-assembled fiber growth from globular structures. Reproduced from reference [8] with permission from Springer Nature. (c) (*from left to right*) Chemical structure of Fmoc-dipeptide (**Fmoc** in orange, dipeptide sequence un blue and enzyme cleavable group in red), schematic of nucleation and growth in EASA and typical AFM image of the initial stage of self-assembly. Reproduced from reference [31] with permission from Springer Nature. (d) Typical AFM images ($1 \times 1 \mu\text{m}$) taken over time (2, 5 and 20 min from left to right) from the contact between **AP**-adsorbed and **Fmoc-FFpY** solution. Reproduced from reference [32] with permission from Wiley-VCH.

2.5 Do proteins or enzymes influence the 3D organization of the self-assembled structure?

The observations mentioned in the above section 2.2.1–2.2.4 seem to indicate that the answer to this question is “yes”. Li *et al.* used **Nap-GFFY-SS-EEE** peptides (**Nap** = naphtyl group; **SS** = disulfide bridge) which, in the presence of dithiothreitol or glutathione formed a hydrogel that was not stable over times of the order of an hour.³³ On the other hand, in the presence of bovine serum albumin (BSA) the gel became stable over days. Moreover G' and G" of these gels increased as the BSA concentration increased, passed through a maximum at around 20 wt% before decreasing again. TEM revealed that the fiber network of the self-assembly changes with the concentration of BSA. With other proteins the stabilization of the gel was smaller. This seems to indicate direct interactions between the peptide hydrogelator and BSA and that these interactions have a strong influence on the self-assembled structure.

Based on the thermodynamic equilibrium between a peptide hydrogelator and its precursor (from thiol/disulfide equilibrium), our group has reported that the introduction of proteins can induce the increase of the hydrogelator content up to 100 % resulting in gel formation.²² According to the protein involved, the resulting nanostructures can be different: nanofibrils are obtained in the presence of glutation reductase or **AP**, and platelets are obtained in the presence of albumin. The origin of these differences is not yet understood.

Jain *et al.* studied the self-assembly of carboxybenzyl N-protected dipeptides **Cbz-FL** (**Cbz** = carboxybenzyl) which is a non-gelling peptide at room temperature.³⁴ They brought **Cbz-FY** precursors in contact with different enzymes: a lipase (*Candida rugosa*), thermolysin and chymotrypsin. They observed an almost instantaneous gel formation in the presence of lipase, a slower gel formation (5 min) with thermolysin and no gel formation in the presence of chymotrypsin. Whereas with lipase, the self-assembly resulted in the formation of long thin fibers, fibers were much shorter in the presence of thermolysin and the presence of chymotrypsin resulted in the formation of aggregates observed by AFM. Using native and denatured enzymes they showed that the self-assembly initiation does not depend on a specific interaction with proteins. This shows that the interaction between peptides and proteins can play a crucial role in the self-assembly initiation, certainly in the formation of the critical nucleation cluster for the self-assembly process. Are the fibers physically bound to the enzymes within the self-assembled gel remains an open question.

2.6 Self-assembled structures are out-of-equilibrium structures

LMWH self-assemblies can be obtained not only by an enzymatic trigger on a precursor but also by varying conditions such as the nature of the solvent or the temperature. In this case numerous studies reveal that for a given peptide, self-assembly depends upon the history of the sample.^{35,36} Indeed, in the case of short peptides N-capped by an aromatic group, their self-assembly relies on the interplay of hydrogen bonds, hydrophobic and hydrophilic balance. All these interactions are temperature dependent.^{28,29} For example, Debnath *et al.* obtained different **Fmoc-YL** self-assembly organization by changing the thermal history of the sample.³⁷ They heated a pre-formed self-assembled gel at various temperatures for 10 min before letting the sample cool back to room temperature. When heated above a temperature that corresponds to the melting temperature of β -sheet arrangements,³⁸ they observed an inversion of the CD signal corresponding to the chiral supramolecular arrangement of the **Fmoc** moieties. Using NMR, they also found an overall greater amount of hydrogelators incorporated into the gel fibers when the temperature was raised. It must be reminded that all measurements were performed at room temperature and thus the samples kept the memory of the heating step. The influence of the thermal history of a gel on its structure and mechanical properties is extremely general and not restricted to hydrogelators containing **Fmoc** moieties. Using **NBD-GFFpY** (**NBD**: nitrobenzoxadiazole) as precursor, Z. Yang *and coll.* found that contact with alkaline phosphatase at 37 °C leads to the formation of nanoparticles whereas fibers form at 4 °C. These structures are then observed at 20 °C. Moreover, the peptides in the fibers adopted an α -helix conformation whereas in the nanoparticles they showed a random coil conformation. These structural difference of the self-assembled **NBD-GFFY** peptides are attributed to both the influence of the temperature on the enzyme activity and on the diffusion processes in the system (Figure 1.6).³⁹

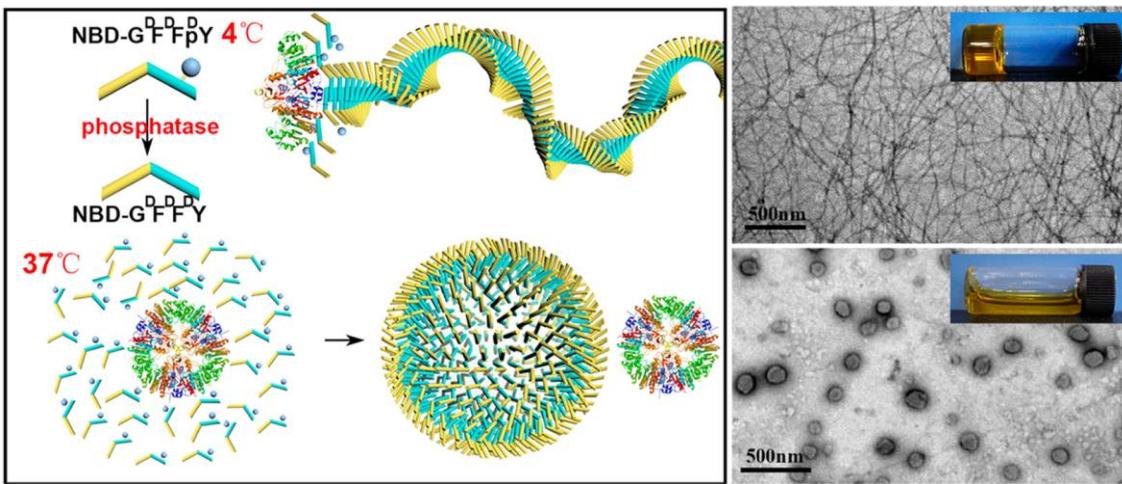


Figure 1.6. (left) Suggested model of molecular self-assembly of **NBD-GFFFY** (with non-natural chirality of the amino acids) from **NBD-GFFpY** and **AP** at 4 °C or 37 °C leading to (right) nanofibrous network (gel) or to peptide self-assembled nanoparticles (solution). Reprinted with permission from reference [39]. Copyrights 2022 from American Chemical Society.

Wang *et al.* observed that gels prepared from a mixture of 1,2,4,5- benzene tetracarboxylic acid and 4-hydroxypyridine by cooling the hydrogelator solution were constituted of fibers whose size decreased as a cooling speed was increased and the dynamic moduli G' and G'' increased.⁴⁰ Using **Fmoc-FRGDF** peptides, Li *et al.* tuned the mechanical properties of the self-assembled hydrogels by changing the rate of change of the pH of the solution.⁴¹ The gels were composed of long nanofibers. A rapid change of the pH resulted in a network of smaller highly entangled fibers whereas a slow pH change led to a weaker gel composed nanofibrils that were aligned with few entanglements. On the other hand, the pH change did not affect the anti-parallel β -sheet structure of the fibers.

2.7 Enzymes seem to be incorporated in the peptide self-assembled network

The question of the incorporation of enzymes in self-assembled hydrogels could be critical for practical applications. Li *et al.* self-assembled **Nap-GFFY-OMe** hydrogelator from **Nap-GFFpY-OMe** precursor in presence of **AP**.³³ The resulting self-assembled hydrogel was washed with a phosphate buffer solution several times until no **AP** was detected in the washing solutions. The authors observed that the hydrogel remained enzymatically active which seems to indicate that **AP** is incorporated in the self-assembled network. Wang *et al.* built gels using **Fmoc-pY** or **Nap-FFpY** and acid phosphatase.⁴² After gel formation they freeze-dried the gel and brought it in contact with organic solvents. The gel was highly catalytic and when in contact with water, only 12% of the enzymes were released. They did not specify if, for the experiments performed in water, the gel was first freeze-dried. On the other hand, when the hydrogel was formed starting directly from the hydrogelator **Fmoc-Y** through heating and cooling steps, and then brought in contact with an enzyme solution, the content of enzymes adsorbed in the gel corresponded to

only 8% of the amount found in the hydrogel built enzymatically. They concluded that the enzymes inducing the self-assembly are incorporated in or strongly adsorbed on the fibers during the self-assembly process. On the other hand, enzymes that were brought in contact with the fibers after their buildup only weakly bound to them.

2.8 Do self-assembled hydrogelators be in equilibrium with free hydrogelators in the hydrogel?

The question of the equilibrium between free and assembled peptides was very seldom addressed. To our knowledge only two studies try to get an answer to this question. First, experiments performed by Roy and Ulijn determined the concentration of free peptide hydrogelators present in a self-assembled hydrogel.⁴³ This was done by first determining the partition coefficient of these peptides between an aqueous solution and diethyl ether under small peptide concentrations. Once the coefficient was determined, they brought a self-assembled gel in contact with diethyl ether, let equilibrium between the two phases take place and then measured the concentration of peptides in the organic phase. Using the hydrogelator peptide **Fmoc-YL** in the presence of different ions, they found that between 5 and 8 % of the peptides present in the self-assembled gel are free peptides, depending on the place of the ion in the Hofmeister series. This seems to indicate that there exists an equilibrium between the peptides in the self-assemblies and free peptides. Yet it could also be that during the self-assembly buildup some peptides did not enter the self-assemblies due to self-assembly kinetics. Experiments were not performed by increasing, for example the volume of the organic phase, which could lead to a reduction of the self-assembly kinetics. Another experiment realized by the group of Bing Xu seems to indicate that there exists, indeed, an equilibrium between peptides in the self-assembled state and free peptides.⁴⁴ In these experiments, peptides were designed to be able to interact reversibly with a small ligand (vancomycin). The peptides that are associated with the ligands could not self-assemble in the form of nanofibers and the ligands could not associate with the peptides inserted in the self-assembled fibers. Now, when the fibers were first self-assembled in the absence of ligands and then ligands were added in a large amount (1:4 ligand:peptide molar ratio) the fibers disassembled, and the gel became a cloudy solution. This proves that peptides involved in self-assembled fibers can leave the fibers and thus are in equilibrium with free peptides. These then interact with ligands, displacing the equilibrium towards disassembly of the fibers. The question is to know if this conclusion can be extended to all peptide self-assembled hydrogels? Indeed, as will be discussed later, **Fmoc-GFFYGHY** hydrogels constructed on the walls of a porous material are stable under flow of aqueous solutions through the material for long time (several days).⁴⁵ This seems to contradict the existence of an equilibrium between free and self-assembled peptides.

2.9 Mechanism of EASA: summary of what we know and do not know yet

Taking into account all the points discussed above, a general mechanism of the EASA process is proposed in Figure 1.7. This mechanism is based on a precursor undergoing a chemical hydrolysis (phosphate group hydrolysis, ester hydrolysis, etc), in presence of the suitable enzyme, resulting in the generation of hydrogelators. Three main stages can be distinguished: the pre-aggregation state, the nucleation step and finally the hydrogelator self-assembly. The complexity of the EASA process and remaining questions are highlighted.

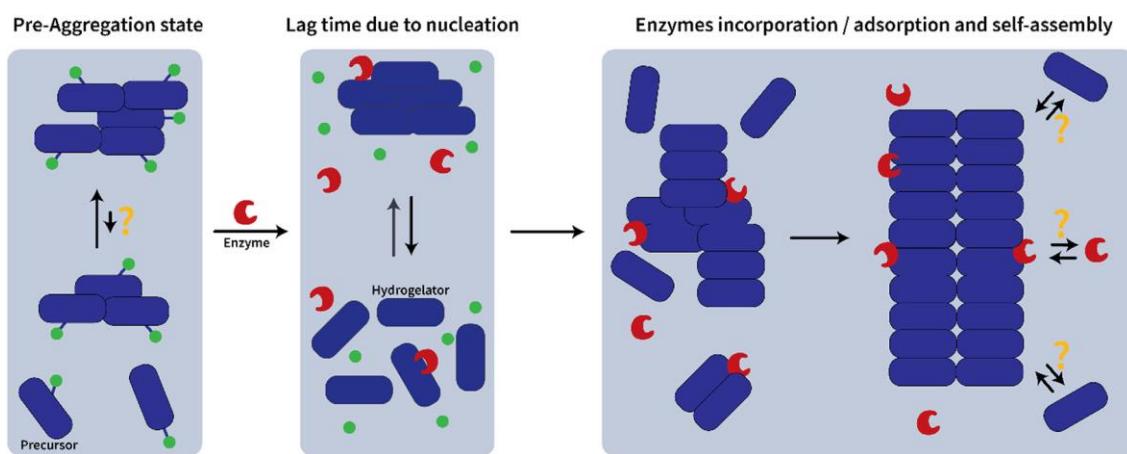


Figure 1.7. General mechanism pathway of EASA using precursor compounds (blue rectangle) including a chemical group (green spot) which is cleavable through the action of suitable enzymes (red croissants). This leads to the formation of the hydrogelators (blue rectangles). Question marks indicate open questions.

3 Localized Enzyme-Assisted Self-Assembly

3.1 LEASA processes on macroscopic planar surfaces

As already mentioned before, the first example of LEASA was reported by Ulijn in 2009, introducing so the concept.⁸ Amide bond formation between Fmoc-protected amino acid precursors and nucleophilic dipeptides leads to a combinatorial constitution of hydrogelators. First, the study proved the reaction to be catalyzed by the presence of thermolysin in solution. When the enzyme was covalently attached to an adequately substituted glass substrate, which was then dipped into a solution containing the precursors, formation of self-assembled structures was observed on the thermolysin-modified surface thus proving that the immobilization of enzymes on a surface results in localization of self-assembly near the enzymes, as observed by transmission electron microscopy (TEM) and atomic force microscopy (AFM) (Figure 1.5a, b). The resulting fibers nucleate and grow from spheres of approximately 20–30 nm in diameter. As the

nucleation process is mostly thought to occur around enzyme molecules, these spherical objects were attributed to enzyme aggregates but, as already discussed, these particles could also be small peptide aggregates.

Anchoring enzymes on a surface can easily be performed using polyelectrolyte multilayers⁴⁶ corresponding to a coating obtained by the alternate deposition of polyanions and polycations. Along this line we have introduced the concept of seed-layer to provide a LEASA system with controlled nucleation sites.³² The surface was initially modified with an alkaline-phosphatase (**AP**)-containing polyelectrolyte multilayer onto which a peptide seed-layer was adsorbed (Figure 1.8). It was constituted of poly(acrylic acid) (**PAA**) modified by grafting 5 % of the peptide sequence **Fmoc-FF**. Upon contact with this surface, the **Fmoc-FFpY** precursor peptides in solution can be dephosphorylated, thereby resulting in self-assembly starting from the seed-layer in about 10 min. Remarkable dependence was shown, as seed-layer led to much more deposition than the bare enzyme surface (*i.e.* **AP**) while sequence **Fmoc-GGG** grafted on **PAA** led to no self-assembly event. Accordingly, varying the surface density of seed-layer allowed tuning the fiber density at the surface. When high content of seed-layer was present on the surface, large ribbons were observed by atomic force microscopy (AFM) while lowering this content resulted in their disappearance. The thickness of the hydrogel reached, unexpectedly, up to ten microns. Such a large value of the thickness was explained by Ulijn's group by the non-covalent character of the enzyme deposition. Comparing LEASA processes initiated by thermolysin adsorbed or covalently linked on a glass substrate, they found that the latter led to much thicker films than the former.⁴⁷ This may be due to displacement of the non-covalently fixed enzymes during the self-assembly from the substrate into the self-assembled film where they can further induce self-assembly. From these observations, the authors developed a system where varying the ratio of bound (irreversibly immobilized) and unbound (reversibly immobilized) thermolysin on the glass surface allowed controlling the thickness of the gel from bulk to localized gelation of a **Fmoc-TF** dipeptide. Noteworthily, in the example of the seed layer, the amount of enzyme embedded in the seed-layer was quasi-linearly correlated to the kinetics of the self-assembly process, as expected from an earlier study on EASA.¹⁸

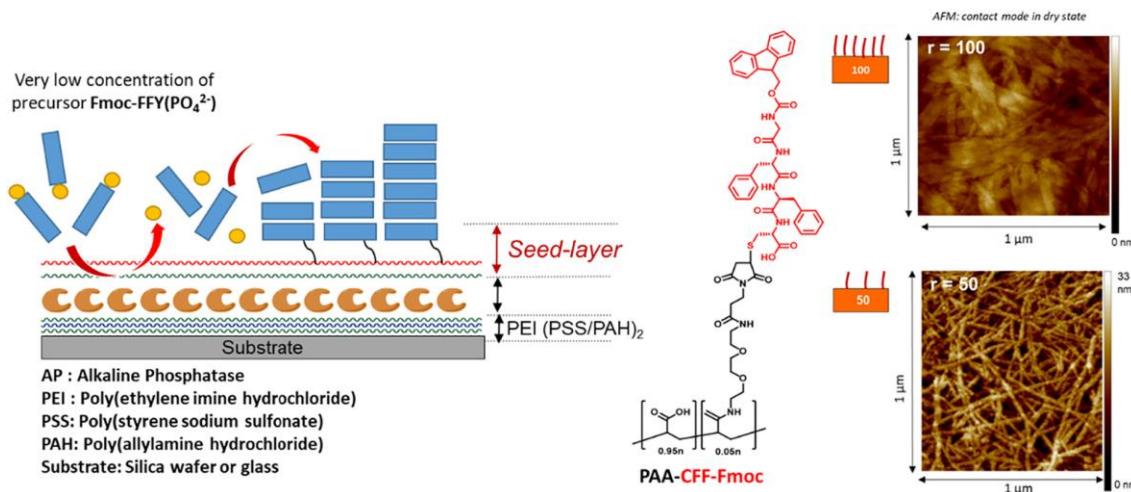


Figure 1.8. (Left) Schematic of AP adsorbed in a polyelectrolyte multilayer film and dephosphorylation of Fmoc-FFpY leading to Fmoc-FFY self-assembly induced by the seed-layer. This latter is created through the adsorption on the top of the film of a modified PAA with the Fmoc-FF sequence. (Right) The relative density “r” (100 % or 50 %) of the seeding polymer on the surface impacts the resulting nanoarchitecture of the supramolecular hydrogel. Reproduced from reference [32] with permission from Wiley-VCH.

Polyelectrolyte multilayers were also used to deposit α -chymotrypsin onto a surface. The enzyme then catalyzed the oligomerization of $(KL)_n$ -OEt from dipeptide ethyl ester **KL-OEt** present in solution (**K** = lysine).⁹ The reaction was observed until a critical concentration of oligomer hydrogelators was reached, at which point self-assembly occurred. In this system, the self-assembly was ensured by a distribution of oligomers of different polymerization degrees **n** (up to **n** = 14) that undergo self-assembly to yield nanofibers. By quartz crystal microbalance (QCM) monitoring, the systematic presence of a lag-time (typically a few minutes) before the start of the LEASA process was noticed. Interestingly, the kinetics could be tuned in two ways (*i*) by increasing the concentration in **KL-OEt** precursor and (*ii*) by lowering enzyme surface density, respectively decreasing and increasing the lag time. Such a result is well in agreement with the hypothesis that the lag time is proportional to the rate at which the LMWH may accumulate, as stated in a study discussed earlier.¹⁸ These examples show that LEASA is a viable strategy to obtain time-control over self-assembly processes even if temporal-control of the self-assembly process remains a challenge.

A more typical approach for the spatiotemporal control of self-assembly events at a surface is the use of electrodes through the electro-generation of protons.⁴⁸ In 2017, this approach was mimicked *via* LEASA with the intention to extend such a strategy to non-conductive surfaces (and therefore beyond electrode material).¹⁷ In this work, the use of glucose oxidase deposited on a polyelectrolyte multilayer allowed to generate enzymatically a proton gradient emanating from the surface in the presence of oxygen (Figure 1.9). As expected, the localized decrease of pH enabled the protonation of the carboxylic acid at

C-term position of the **Fmoc-AA** dipeptide precursor (**A** = alanine), resulting in self-assembly near the surface by rendering the peptide less charged and polar. Interestingly, this strategy was also extended to deoxygenated solutions by addition of a horseradish peroxidase (**HRP**) layer that could catalyze the transformation of hydrogen peroxide into oxygen, thereby fueling the system. These results are highly important because they show the wider variety of surfaces that can be used in LEASA. Moreover, this strategy differs from all other LEASA studies as the enzymatic activity acts to create a morphogen (by only controlling local conditions) and is therefore indirectly responsible for the self-assembly.

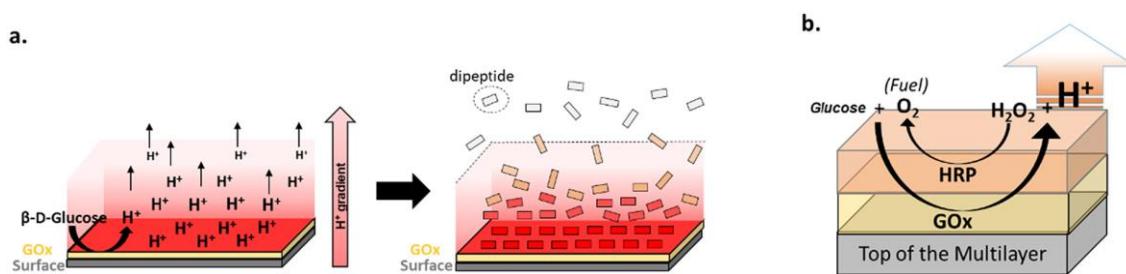


Figure 1.9. (a) Schematic of LEASA based on the enzymatic production of a protons gradient due to the oxidation of glucose by GOx. This protons gradient directs the self-assembly of the dipeptide **Fmoc-AA**. (b) To ensure a continuous supply in dioxygen (O_2) required by GOx, an additional layer of HRP is adsorbed. This enzyme transforms the second product H_2O_2 generated GOx, into O_2 in a sustainable way. Reproduced from reference [17] with permission from Wiley-VCH.

We thus see that each of the three EASA processes, namely hydrolysis reactions, reverse hydrolysis reactions and activation of the hydrogelators through morphogens (*i.e.* protons), can efficiently be translated into a LEASA process.

3.2 Protein-assisted self-assembly localized on surfaces

Up to now we have discussed self-assembly processes where the hydrogelator was produced enzymatically from a non-self-assembling small molecule precursor. As already mentioned, non-catalytic proteins can also, in special cases, induce local self-assembly.²² The reversible cleavage of a disulfide bridge (**SS**) protecting a pentapeptide **Fmoc-GFFYE-SS-EE** (precursor) into **Fmoc-GFFYE-SH** (hydrogelator) and **HS-EE** was first investigated, in solution, in the presence of bovine serum albumin (**BSA**) and catalytically active proteins, such as **AP**, which do not play their role of enzymes towards the precursor. To further study the self-assembly mechanism, the different proteins were immobilized on gold substrates using polyelectrolyte multilayer films. The protein deposition and the self-assembled hydrogel growth on surfaces were monitored by QCM. Interestingly, when no enzyme was immobilized and the surface of the polyelectrolyte was charged positively by using **poly-L-lysine** as an external layer, similar self-assembly was observed than with proteins. This indicates that the main driving force for this self-assembly event is

the electrostatic interaction. Such a structuring effect from a protein onto the self-assembled network was also observed in earlier works by Williams: addition of a non-catalytic protein, laminin, caused a sharp increase in the level of conversion to a tripeptide hydrogelator.⁴⁹ This result is expected to arise from electrostatic interactions between hydrogelators and laminin that would promote the amide bond formation, a hypothesis further supported by the increased supramolecular order in the presence of the protein. Indeed, CD showed an increase in chirality while rheology revealed storage moduli stronger by one order of magnitude and TEM showed bundles formation (Figure 1.10).

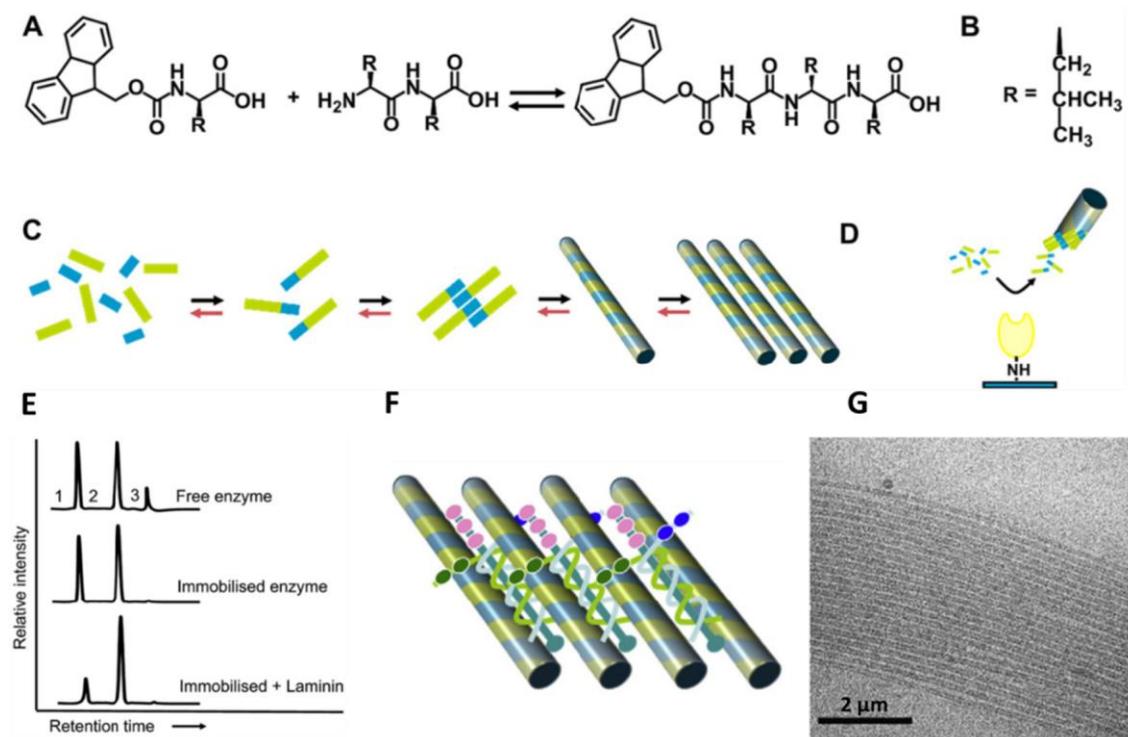


Figure 1.10. (a,b) Equilibrium between the precursors **Fmoc-L** and the dipeptide **LL** ensured by thermolysin, leading to the formation of the hydrogelator **Fmoc-L₃** (among other peptides). (c) Schematic of the formation of the hydrogelator **Fmoc-LLL** from **Fmoc-L** (blue) and dipeptide **LL** (green) resulting in longitudinal nanofibers. (d) When thermolysin is immobilized, the hydrogelator Fmoc-L₃ hydrogelator self-assembles near the surface. (e) HPLC chromatogram: 1 corresponds to **Fmoc-L**, 2 to **Fmoc-L₃** and 3 to **Fmoc-L₅**. (f) Schematic of **Fmoc-L₃** nanofibers interacting with laminin. (g) Bundles of nanofibers observed by cryo-TEM. Reproduced from reference [49] with permission from Elsevier.

3.3 Localized self-assemblies triggered by non-covalently attached enzymes can reach several micrometers thicknesses and are often oriented

In all cases where the enzyme or proteins were deposited on the surface through a polyelectrolyte multilayer, the self-assembled layers reached up to several tens of micrometers. In some cases, a density gradient of nanofibers showed up. This was evidenced by cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM, Figure 1.11).²⁹ It also appeared that fiber growth occurs mostly perpendicularly to the substrate. A similar

observation was made for non-biocatalytic triggers as well.⁵⁰ Up to now there is no clear explanation for this orientation. In addition, a higher density of fibers is present near the substrate-hydrogel interface than on the top of the hydrogel.

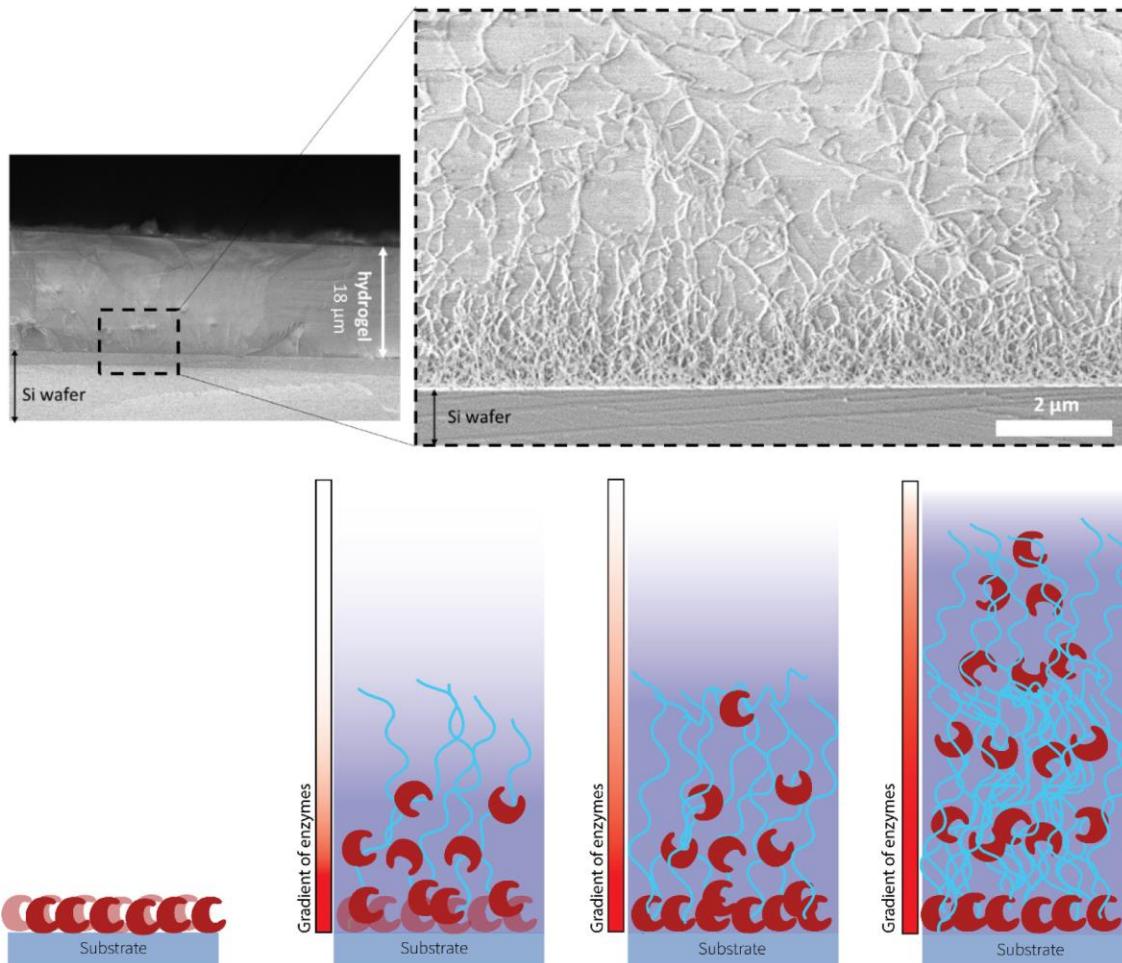


Figure 1.11. (Top) Typical cryo-SEM image of supramolecular hydrogel grew up from the **Fmoc-GFFYGHY** self-assembly. This hydrogelator is produced in close vicinity of the surface modified with **AP**, brought in contact with the dephosphorylated peptide **Fmoc-GFFYpGHYp**. Reproduced from reference [29] with permission from Wiley-VCH. (Bottom) Schematic of the successive steps going from the enzymes (red croissant) adsorption to the localized self-assembly of LMWH enzymatically produced. The self-assembled fibers are perpendicularly oriented to the surface and the enzymes are expected to be distributed in a gradient manner from the bottom to the top of the gel.

3.4 LEASA processes on nanoparticles

When using **AP**-decorated silica nanoparticles (**NPs@AP**) and the precursor tripeptide **Fmoc-FFpY** a homogeneous hydrogel is obtained where self-assembled peptide fibers allow the bridging of nanoparticles, as observed by cryo-SEM.⁵¹ Surprisingly, changes in the gel morphology could be observed macroscopically after the sample was rested for a few weeks, leading to phase separation between an opaque

gel (phase A, Figure 1.12) and a translucent gel (phase B, Figure 1.12). Composition study of these gels showed the presence of nanoparticles and peptides nanofibers in both phases, but cryo-SEM imaging revealed important morphological changes between the two-phase structures, with one displaying a high density in fibrous network while the other showed much smaller density. Such an evolution over time is believed to arise both from the attraction between the nanoparticles and from the affinity of the nanofibers for the enzymes present at the surface of the particles.

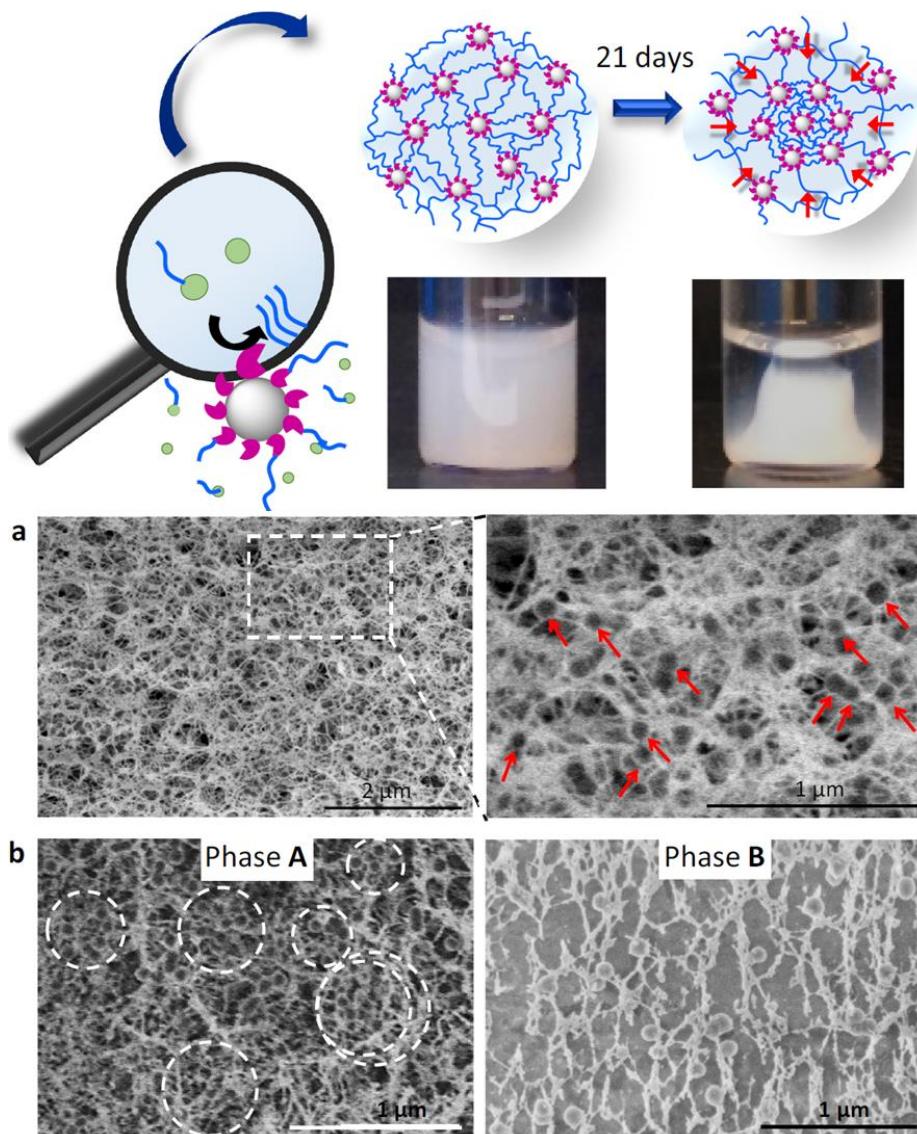


Figure 1.12. (Top) Fmoc-FFY nanofibers (in blue) self-assembled from AP-modified silica nanoparticles (NPs@AP) by dephosphorylation of Fmoc-FFpY precursor leading to a hybrid supramolecular hydrogel (*left picture*) undergoing a phase separation over time (*right picture*). The red arrows show the contraction direction of the gel. (Bottom) Cryo-SEM images of the Fmoc-FFY hydrogel, obtained from a mixture of 1.25 % *w/v* NPs@AP and 1 mg.mL⁻¹ Fmoc-FFpY, observed after (a) 24 h (*left*) and zoom-in highlighting single NPs with red arrows (*right*) and (b) 2 days with the phase A (*left*) and phase B (*right*) of the transparent gel phase over time. Reproduced from reference [51] with permission from the American Chemical Society.

Chapitre I

État de l'art sur le mécanisme et les applications du concept de LEASA

Similarly, to the previous example, enzymes were also grafted onto magnetic nanoparticles.⁴⁷ Two such systems were elaborated, the first one using thermolysin (system 1) which yielded stable hydrogels and the second one based on chymotrypsin (system 2), similar to the one described earlier (Figure 1.13). Upon self-assembly, a hub-and-spoke morphology was observed, with nanofibers connecting the nanoparticles together, in both cases. In the first system, only 6 % of the initial precursor was converted, which is way less than in examples using thermolysin in solution (ca 70 %) but was surprisingly still enough to yield a hydrogel of increased strength. This result is likely to emerge from the high number of enzymes potentially immobilized on each nanoparticle. On the other hand, the second system also displayed an increase in the strength of the hydrogel, but most importantly, a 30-fold increase in the lifetime of the resulting hydrogel. It is proposed that the hub-and-spoke morphology renders peptides less accessible for subsequent hydrolysis, resulting in a higher lifetime. These results show the high importance of the microscopic arrangement for the macroscopic properties of the hydrogels. Moreover, they underline the important versatility of LEASA due to the variety of enzymes that can be used.

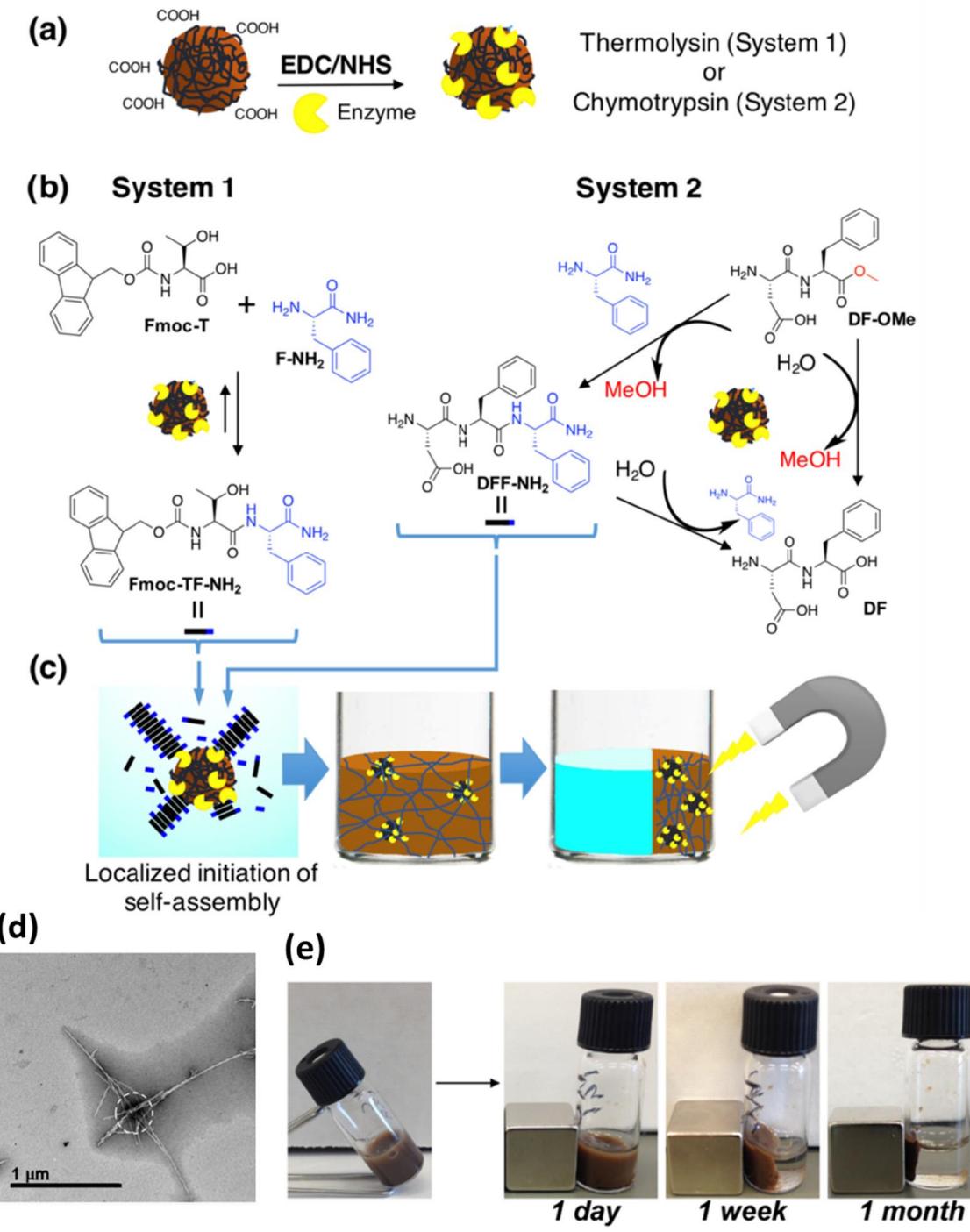


Figure 1.13. (a) Grafting of enzymes on magnetic nanoparticles using carbodiimide chemistry. (b) Systems 1 and 2 involving thermolysin and chymotrypsin respectively providing the hydrogelator peptide. (c) Schematic of the LEASA process occurring from the magnetic nanoparticles, creating so a peptide self-assembled nanoarchitecture underpinning a supramolecular hydrogel. (d) Hub-and-spoke morphology of nanoparticles decorated by peptide nanofibers around. (e) Picture of the resulting magnetic supramolecular hydrogel and the magnetic field effect overtime. Reproduced from reference [47] with permission from the American Chemical Society.

3.5 LEASA processes in host gels

Hydrogels are soft materials and their manipulation (and thus application) can often be tedious. Consequently, the possibility to embed self-assembled LMWH within a pre-existing, more robust, host materials using LEASA was investigated. In two studies in 2019⁵² and 2020,⁵³ the formation of an interpenetrated network upon diffusion of adequate peptides into a host hydrogel containing an enzyme was observed. In both reported works, **AP** was used as the enzyme and **Fmoc-FFpY** as precursor peptide. Such embedment leads to changes in the hydrogel chemical composition, morphology and in some cases mechanical properties. In the former study, diffusion of a low peptide **Fmoc-FFpY** concentration solution led to storage moduli lower than the host hydrogel alone. In contrast, higher concentrations of peptides led to an increase of the storage modulus. Similar results could therefore be expected for the latter contribution based on another hydrogel. However, no significant change in mechanical properties was shown in that case. This is the indication that the possibility to tune the mechanical properties rises from the nature of the host hydrogel. However, importantly, the newly generated peptide hydrogel gave rise to cell-adhesion properties at the surface of the hydrogel, thereby proving that embedment of a secondary network into a host hydrogel using LEASA is an insightful and promising approach towards the tuning of the hydrogel properties. A similar approach was also reported by Mezzenga *and coll.* in 2019, in which benzaldehyde lyase was used to catalyze the transformation of benzaldehyde into **(R)-benzoin** inside lipidic cubic mesophases (LCMs).⁵⁴ As expected from previous observations, the resulting **(R)-benzoin** underwent self-assembly to form a secondary network inside the primary network. Interestingly, circular dichroism assays revealed significant chiral amplification at high enough concentrations inside of the LCMs as compared to a similar system in solution. Subsequent crystallization was also observed inside the LCMs by polarized optical microscopy (POM). This implies that the self-assembly is merely a kinetically trapped system, slowly evolving towards crystals, which are known to be the most stable state thermodynamically. These results constitute the proof that confined environments can lead to assemblies of higher organization, and consequently that LEASA is a promising strategy for the design of functional systems.

4 Applications of LEASA

4.1 Design of smart materials

Ulijn *et al.* designed a magneto-responsive material using LEASA with enzymes immobilized on the surface of magnetic nanoparticles.⁴⁷ After the formation of a self-assembled peptide network between the iron oxide nanoparticles, they investigated the possibility to manipulate the hydrogel by applying an external magnetic field (Figure 1.13). Remarkably, a resulting contraction of more than 6-fold was observed

in the hydrogel volume. Such a contraction resulted in sol-phase exclusion (syneresis). Finally, the magnetic field allowed to “switch off” hydrogel formation when applied in the earliest stage of the LEASA process. Such a macroscopic change in hydrogel structure is reminiscent of the results presented earlier using silica nanoparticles.⁵¹ In that case however, the evolution of the system is time-related, which is of high interest for the emergence of transient and so-called “living” materials. Combining the abilities to tune the mechanical properties of supramolecular hydrogel using LEASA, gives rise to emergent properties (cell adhesion, crystallization...) and controlling the behavior of the material with stimuli or the evolution over time is the key to the design of applicable smart materials. Being involved in all parts of the process, LEASA is therefore a very promising strategy for that purpose.

4.2 LEASA for the design of catalytic systems

4.2.1 LEASA allows the design of supported-hydrogels in flow reactors

Depending on the peptide sequence of the hydrogelator and its resulting self-assembly, it may give rise to enzyme-like supramolecular hydrogels. Thus, catalytically-active supramolecular hydrogels (CASH) displaying catalytic activity have been investigated and reported.⁵⁵⁻⁵⁹ However, these CASH have several disadvantages. Namely, they are often single use, the extraction of the product can be tedious and they often display mechanical strengths too weak for their use in a chemical reactor. In 2019, the possibility to use LEASA on the walls of a porous substrate to grow a CASH that would circumvent these issues was investigated.⁴⁵ In this case, the hydrogel was built inside of a cell containing an enzyme-coated polymer foam. Remarkably, the resulting hydrogel displayed esterase-like activity towards a range of different non-activated esters, resulting in very high yields in just a few minutes by simple diffusion of the ester solution through the cell. Moreover, enantioselectivity was also shown using this supported-CASH, thus resulting in an enantiopure product from a racemic mixture as observed though chiral HPLC analysis. Finally, the CASH was connected to a flow reactor (Figure 1.14) and could be reused and stored for several months without any loss in efficiency. This example is the proof that using LEASA, typical problems encountered in the use of CASH can be avoided. Indeed, the presented CASH displayed increased robustness, which allowed its introduction in a chain-reactor allowing for multiple use. Furthermore, this CASH showed high reliability, being stable over months. All together, these properties show the remarkable applicability of LEASA for the bottom-up design of chain-reactors. It must be noted that, because LEASA leads to enzymes strongly immobilized in the resulting hydrogel, supported-CASH exploiting their inherent enzymatic activity in continuous flow applications has never been reported. Very recently, it has been shown that peptide hydrogels enhance the lifetime of oxidases allowing a recyclability of this enzymatically-active

materials.⁶⁰ Moreover, multiple catalysis including both the enzymatic and catalytic activity rising from the self-assembled network would be interesting as well.

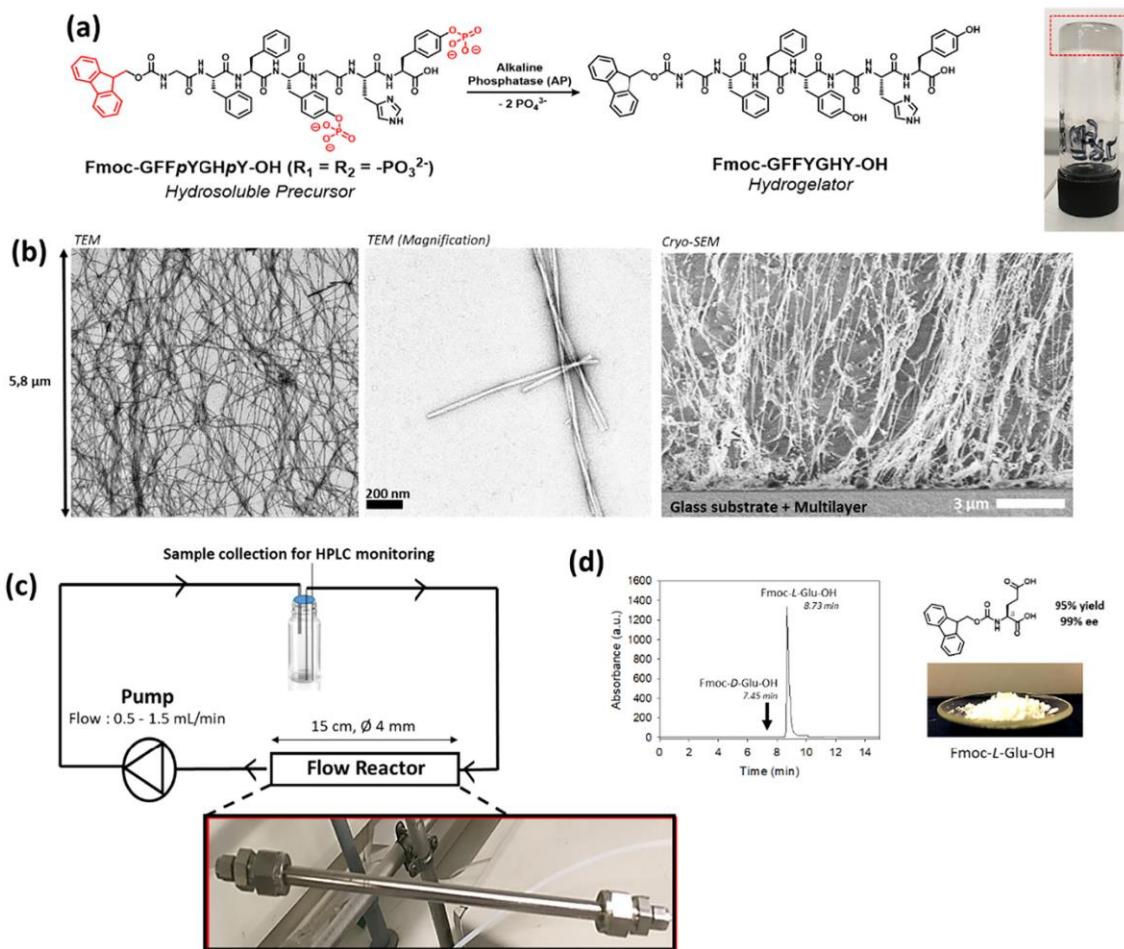


Figure 1.14. (a) Precursor peptide transformed by AP in hydrogelator. (right) Picture of the corresponding hydrogel. (b) Electronic microscopy images: (left and center) TEM image of the peptide self-assembled nanofibers, (right) z-section cryo-SEM image of a hydrogel grew from a glass substrate initially modified with AP using a multilayer film. (c) Schematic of the flow reaction containing a CASH-supported polymer foam within a metallic tube (picture). (d) Kinetic resolution of the racemic substrate **Fmoc-Glu-OtBu** resulting in 95 % yield (≈ 100 mg) of **Fmoc-L-Glu** 99 % of enantiomeric excess (ee). Reproduced from reference [45] with permission from the Wiley-VCH.

4.2.2 Design of localized supramolecular autocatalytic systems

We have seen that LEASA processes are initiated by enzymes present on a surface. We have also seen that one can design peptide self-assemblies with catalytic properties. These two approaches have been combined to design localized self-assemblies that grow in an autonomous way.²⁹ Based on two precursors **Fmoc-GFFYpGHYp** (precursor phosphorylated **HP²**) and diester homologue having the same peptide sequence but with ester groups instead of the phosphorylated ones (precursor esterified) **HE²**, the system was able to undergo hydrogelation of **Fmoc-GFFYGHY** (**H**) in the presence of only attomolar quantities

of **AP**. Dephosphorylation of **HP²** into **H** by **AP** gave rise directly to **H** self-assembly that displayed esterase properties and was thus, in turn, able to catalyze the transformation of **HE²** into **H**, thereby generating an autocatalytic ability. By immobilizing **AP** onto substrates, subsequent hydrogelation was observed at LMWH concentrations ten times lower than the critical gelation concentration (CGC) as a result of the out-of-equilibrium localized accumulation of LMWH. Examples of such autocatalytic supramolecular systems being scarce, these results are of high importance for the design of new life-like materials.

4.3 Biomedical developments

In vitro design using LEASA for *in vivo* injection and biomedical applications was investigated. First, in 2011 by Williams et al. in a study already mentioned previously where the self-assembly was initiated by the presence of laminin.⁴⁹ The hydrogel obtained could be microinjected locally into a dystrophic zebrafish model organism in order to deliver the guest protein in laminin-deficient parts of the extra cellular matrix. Importantly, the biomaterial remained stable and confined in space over several days. In this case, the importance of LEASA is that the injected hydrogel is enzyme-free, as the enzymes remained attached to the glass surface upon aspiration of the hydrogel with the syringe, thus avoiding orthogonal processes.

One of the current axes of research for cancer therapy is the use of reactive oxygen species (ROS), bioinspired by neutrophils. ROS, in particular singlet oxygen, have high reactivity and therefore display cytotoxicity. With that strategy in mind, Wu et al. developed in 2019 a hybrid self-assembled nanogel mimicking neutrophil lysosomes.⁶¹ To build such a nanogel, **AP**-coated iron oxide nanoparticles were put in contact with **N-Fmoc-protected Tyr-phosphate**, *i.e.* **Fmoc-pY**. Similarly, to earlier examples, subsequent self-assembly was obtained around the nanoparticles. To catalyze the formation of singlet oxygen, the nanogel was loaded with superoxide dismutase (**SOD**) and chloroperoxidase (**CPO**) enzymes which are well known to result in cascade reaction from superoxide radicals -present in tumor cells- to hypochlorous acid and most importantly, singlet oxygen. As a result of injection of this nanogel into animals, remarkable cytotoxicity was observed for cancer cells, whereas healthy cells mostly remained unaffected.

The presence of hyaluronic acid (**HA**) during the self-assembly process of peptides impacts strongly the mechanical properties of the resulting hydrogel.⁶² This was explained by the interaction of **HA** with the self-assembled **Fmoc-FFY** nanofibers resulting in micrometer-scale helical fibrils.⁶³ Localizing **AP** on glass substrate in presence of **Fmoc-FFpY**, a several micrometer thick hydrogels were formed for

2D cell culture. It was shown that the presence of **HA** in the supramolecular material enhances the cell adhesion and cell spreading. When **AP** is localized on stellate mesoporous silica nanoparticles, a supramolecular hydrogel layer based on **Fmoc-FFY** was generated all around. This soft coating allows the loading of an anticancer agent that can be released through a thermal control.⁶⁴

LEASA systems applied *in vivo* for biomedical applications have been reported previously.^{65,66} Taking advantage of the natural expression of an enzyme in a biological environment, this insightful approach allows for promising properties regarding extracellular matrix treatment and cancer therapy. Already being the topic of an existing review by Bing Xu and collaborators,⁶⁷ it will not further be described here. However, the examples described earlier in this review are the proof that LEASA can serve as an effective approach for the *in vitro* build-up of biomedical solutions and as an alternative to the use of biologically expressed enzymes. We have no doubt that, considering LEASA's versatility, many more insightful treatments are yet to be developed and result in significant progress in various fields of medicine.

5 Perspectives for LEASA

The rate of scientific publications on the study or application of supramolecular hydrogels has increased considerably over the last ten years. Because of the inherent properties of the hydrogels formed, *i.e.* highly hydrated, very soft and generally self-healing, a significant part of these scientific contributions concerns the field of life sciences and bio-medecine.⁶¹⁻⁶⁷ Among the different stimuli to trigger the LMWH self-assembly processes leading to hydrogel formation, the use of enzymes lies on a special place for two reasons: (*i*) the biocatalytic action takes place very rapidly at room temperature and (*ii*) the localization of the enzyme allows controlling where the self-assembled nanofibrous network will form and grow. The application of the LEASA concept thus leads to the formation of a micrometric thick hydrogel coating. In addition, by controlling the enzyme surface density or by using localized seeding nucleation sites of self-assembly, it is also possible to control when the hydrogel will form and its growth rate over time. Finally, the morphology of the resulting nanostructures and their density can also be modulated, changing so the mechanical properties of the materials.

Despites many investigations, several fundamental questions concerning the formation and properties of these supramolecular hydrogels remain unaddressed (Figure 1.7): this is the case about the localization of enzymes within these materials and their robust anchoring. Since they induce the assembly of LMWH, they seem to remain within the material formed. Are these enzymes really part of the self-

assembled nanostructures, as expected? If so, why has their presence never been demonstrated on these self-assemblies? On the other hand, it has been shown that the nature of the enzyme itself influences the morphology (fiber, ribbon, helix, *etc.*) of the self-assembled edifice: what are the interactions between the enzymes and the hydrogenators? How does the precursor compound play a role in the initiation of the assembly process? Are the enzymes able to move in or on the self-assembled architecture? The growth of supramolecular hydrogels from a solid-liquid interface results in the formation of a micrometer-thick film only if the enzymes are adsorbed through weak interactions and not covalently bound to the surface. The internal structure of these gels shows a gradient of nanofibers oriented perpendicularly from the interface to the top of the gel. How can this spatial organization be explained? How are the enzymes distributed in this organization? Even if the answers to these questions do not prevent the use of these localized supramolecular hydrogels in applications, they should nevertheless allow the refinement of their properties.

As mentioned earlier, works on supramolecular hydrogel coatings for applications in the field of controlled release of bioactive compounds, biomaterial design and tissue engineering are already well underway. Undoubtedly, the understanding of the influence of (bio)polymers, proteins, or other compounds (several hydrogenators, growth factors, adhesion ligands) in the formation of the hydrogel will allow to further optimize the performance of these materials, both in their interaction with living organisms and in their chemical and physical stability over long time scales. More recently, it has been shown that these supramolecular hydrogels are particularly suitable for cellular studies in 3D environments.⁶⁸ It is likely that the number of investigations in this field will considerably increase in the coming years. Although this aspect is outside the scope of this review, it is worth mentioning here that the localization of self-assembly processes within living systems using endogenous enzymes is a potential therapeutic avenue for the treatment of cancers,^{11,13} which will certainly see strong development in the future.

The generation of a secondary network of self-assembled LMWHs has recently been illustrated by the diffusion of precursors within host chemical hydrogels encapsulating enzymes.^{51,52} The continuation of these reaction-diffusion investigations should lead to the autonomous microstructuration of materials from purely organic compounds and LEASA processes in host-gels constitute one possible way to achieve such microstructuration.

Last but not least, another field of application of these hydrogels that will probably develop considerably concerns catalysis and more generally the development of chemical reactors using catalytically active supramolecular hydrogel. Indeed, Escuder and van Esch have demonstrated the potential of these hydrogels for efficient and selective chemical transformations.^{55,56,58} The ability to support these

catalytic hydrogels using LEASA concept highlights that these materials can be used in continuous flow devices.⁴⁵ Indeed, the encapsulation of enzymes within supramolecular hydrogels stabilizes these biocatalysts allowing for prolonged use.⁶⁰

Positionnement de mon projet de thèse vis-à-vis de l'état de l'art portant sur le concept de LEASA

Comme présenté en Introduction Générale, mon projet de thèse s'articule autour de deux axes de recherche impliquant le concept de LEASA en utilisant le système modèle enzyme/précurseur **AP/Fmoc-FF(*p*)Y**. Le premier consiste en la mise en place et l'étude dudit LEASA depuis la surface de vésicules phospholipidiques. La recherche bibliographique que nous avons effectuée nous montre **qu'aucun travail de ce type n'a été réalisé**. En revanche, l'autoassemblage de peptides initié depuis la surface de cellule a été largement reporté (partie 4.3) : rappelons que les vésicules sont des autoassemblages de phospholipides parfois utilisés pour mimer des membranes et représentent ainsi des cellules artificielles. Ces études portant sur les autoassemblages de peptides induits au sein de systèmes vivants font l'objet d'un état de l'art spécifique décrit dans le Chapitre III. Elles se focalisent sur les conséquences biologiques de ces autoassemblages pour l'imagerie cellulaire, grâce à l'utilisation de fluorophores permettant de visualiser des organites au sein du cytoplasme. D'autres études démontrent clairement le déclenchement de l'apoptose (mort cellulaire) après l'autoassemblage de peptides à la fois à l'extérieur et à l'intérieur de cellules. Les cellules cancéreuses surexprimant l'**AP**, l'application du concept de LEASA trouve donc toute sa place en thérapie anticancéreuse. D'autre part, cette faculté à engendrer la mort cellulaire a également été observée sur des bactéries démontrant ainsi un potentiel d'application dans le domaine des traitements antimicrobiens. Pour autant, le mécanisme de formation des nanofibres de peptides autoassemblés autour ou au sein des cellules n'a pas été reporté. Et pour cause, ce genre d'étude est difficile du fait de la complexité de la composition des milieux cellulaires. Ainsi le développement d'un modèle simple de vésicules phospholipidiques exhibant des **AP** à leurs surfaces, pouvant ainsi engendrer l'autoassemblage de peptides, pourrait se révéler particulièrement intéressant.

Le second projet de ma thèse a pour but d'élaborer un matériau catalytique en immobilisant l'**AP** au sein d'un hydrogel supramoléculaire supporté à la surface d'une mousse polymère à cellules ouvertes. Au sein de notre équipe, la Dr. J. Rodon Fores a élaboré en 2019 un tel matériau. Cependant, les propriétés catalytiques étudiées résultait de l'autoassemblage d'un heptapeptide particulier.⁴⁵ L'utilisation d'hydrogels supramoléculaires piégeant des enzymes pour des applications en biocatalyse a déjà été

Chapitre I

État de l'art sur le mécanisme et les applications du concept de LEASA

rapportée par d'autres équipes, comme décrit dans ce premier chapitre.⁵⁵⁻⁵⁹ Toutefois, l'utilisation de ce type de gel dans un procédé en flux compte qu'une seule contribution qui est celle du Dr. J. Rodon Fores évoquée précédemment. Dans des travaux non publiés, notre groupe a montré que l'enzyme à l'origine de la croissance du gel depuis la surface d'une mousse était toujours active, et cela pendant plus de 12 mois, sans perte d'activité. Cette stabilité des enzymes au sein d'hydrogel supramoléculaire a été reporté dans la littérature.^{33,42} Pouvoir disposer d'un levier permettant de contrôler la quantité d'enzymes piégée au sein d'hydrogels biocatalytiques supportés constitue le cœur du Chapitre IV de ce manuscrit.

References

- [1] Z. Yang, H. Gu, D. Fu, P. Gao, J. K. Lam, B. Xu, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1440-1444. DOI: 10.1002/adma.200400340.
- [2] A. N. Shy, J. Li, J. Shi, N. Zhou, B. Xu. *J. Drug Target*, **2020**, *28*, 760-765. DOI: 10.1080/1061186X.2020.1797048.
- [3] C. Liang, X. Yan, R. Zhang, T. Xu, D. Zheng, Z. Tan, Y. Chen, Z. Gao, L. Wang, X. Li, Z. Yang, *J. Control. Release*, **2020**, *317*, 109-117. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.11.028.
- [4] C. Liang, D. Zheng, F. Shi, T. Xu, C. Yang, J. Liu, L. Wang, Z. Yang, *Nanoscale*, **2017**, *9*, 11987-11993. DOI: 10.1039/C7NR04370H.
- [5] B. J. Kim, Y. Fang, H. He, B. Xu, *Adv. Healthcare Mater.* **2021**, *10*, 2000416. DOI: 10.1002/adhm.202000416.
- [6] S. Liu, B. Xu, *ACS Omega*, **2020**, *5* (26), 15771-15776. DOI: 10.1021/acsomega.0c02019.
- [7] X. Du, J. Zhou, J. Shi, B. Xu, *Chem. Rev.* **2015**, *115* (24), 13165-13307. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00299.
- [8] R. J. Williams, A. M. Smith, R. Collins, N. Hodson, A. K. Das, R. V. Ulijn, *Nature. Nanotech.* **2009**, *4*, 19-24. DOI: 10.1038/nano.2008.378.
- [9] C. Vigier-Carriere, D. Wagner, A. Chaumont, B. Durr, P. Lupattelli, C. Lambour, M. Schmutz, J. Hemmerlé, B. Senger, P. Schaaf, F. Boulmedais, L. Jierry, *Langmuir*, **2017**, *33*, 8267-8276. DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b01532.
- [10] Z. M. Yang, G. Liang, M. Ma, Y. Gao, B. Xu, *Small*, **2007**, *3*, 558-562. DOI: 10.1002/smll.200700015. DOI: 10.1002/smll.200700015.
- [11] J. Y. Wang, H. Li, B. Xu, *RSC Chem. Biol.* **2021**, *2*, 289-305. DOI: 10.1039/D0CB00219D.
- [12] B. J. Kim, B. Xu, *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31* (3), 492-500. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00025.
- [13] J. F. Shi, B. Xu, *Nano Today*, **2015**, *10* (5), 615-630. DOI: 10.1016/j.nantod.2015.09.001.
- [14] J. Zhan, Y. Cai, S. He, L. Wang, Z. Yang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *130*, 1831-1834. DOI: 10.1002/ange.201710237.
- [15] X. Qin, W. Xie, S. Tian, J. Cai, H. Yuan, Z. Yu, G. L. Butterfoss, A. C. Khuong, R. A. Gross, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4839-4841. DOI: 10.1039/C3CC41794H.
- [16] C. G. Pappas, R. Shafi, I. R. Sasselli, H. Siccardi, T. Wang, V. Narang, R. Abzalimov, N. Wijerathne, R. V. Ulijn, *Nature Nanotech.* **2016**, *11*, 960-968. DOI: 10.1038/nano.2016.169
- [17] J. Rodon Fores, M. L. Martinez Mendez, X. Mao, D. Wagner, M. Schmutz, M. Rabineau, P. Lavalle, P. Schaaf, F. Boulmedais, L. Jierry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 15984-15988. DOI: 10.1002/anie.201709029.

Chapitre I
État de l'art sur le mécanisme et les applications du concept de LEASA

- [18] R. J. Williams, J. Gardiner, A. B. Sorensen, S. Marchesan, R. J. Mulder, K. M. McLean, P. G. Hartley *Aust. J. Chem.* **2013**, *66*, 572-578. DOI: 10.1071/CH12557.
- [19] Z. Yang, B. Xu, *Chem. Commun.* **2004**, *21*, 2424-2425. DOI: 10.1039/B408897B.
- [20] K. Thornton, Y. M. Abul-Haija, N. Hodson, R. V. Ulijn, *Soft Matter*, **2013**, *9*, 9430-9439. DOI: 10.1039/C3SM51177D.
- [21] M. Yi, J. Guo, H. He, W. Tan, N. Harmon, K. Ghebreyessus, B. Xu, *Soft Matter*, **2021**, *17*, 8590-8594. DOI: 10.1039/D1SM01221E.
- [22] J. Rodon Fores, M. Criado-Gonzalez, M. Schmutz, C. Blanck, P. Schaaf, F. Boulmedais, L. Jierry, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 4761-4766. DOI: 10.1039/C9SC00312F.
- [23] J. Zhou, X. Du, J. Li, N. Yamagata, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 10040-10043. DOI: 10.1021/jacs.5b06181.
- [24] J. Baillet, A. Gaubert, J. Verget, L. Latxague, P. Barthélémy, *Soft Matter*, **2020**, *16*, 7648-7651. DOI: 10.1039/D0SM01055C.
- [25] A. D. Martin, J. P. Wojciechowski, A. B. Robinson, C. Heu, C. J. Garvey, J. Ratcliffe, L. J. Waddington, J. Gardiner, P. Thordarson, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 43947. DOI: 10.1038/srep43947.
- [26] Z. Wang, C. Liang, Y. Shang, S. He, L. Wang, Z. Yang, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 2751-2754. DOI: 10.1039/C8CC01082J.
- [27] A. M. Smith, R. J. Williams, C. Tang, P. Coppo, R. F. Collins, M. L. Turner, A. Saiani, R. V. Ulijn, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 37-41. DOI: 10.1002/adma.200701221.
- [28] M. Hughes, H. X. Xu, P. Frederix, A. M. Smith, N. T. Hunt, T. Tuttle, I. A. Kinloch, R. V. Ulijn, *Soft Matter*, **2011**, *7*, 10032-10038. DOI: 10.1039/C1SM05981E.
- [29] J. Rodon Fores, M. Criado-Gonzalez, A. Chaumont, A. Carvalho, C. Blanck, M. Schmutz, F. Boulmedais, P. Schaaf, L. Jierry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (34), 14558-14563. DOI: 10.1002/anie.202005377.
- [30] X. Deng, A. G. Llamazares, J. M. Wagstaff, V. L. Hale, G. Cannone, S. H. McLaughlin, D. Kureisaite-Ciziene, *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 2357-2368. DOI: 10.1038/s41564-019-0544-0.
- [31] A. R. Hirst, S. Roy, M. Arora, A. K. Das, N. Hodson, P. Murray, S. Marshall, N. Javid, J. Sefcik, J. Boekhoven, J. H. van Esch, S. Santabarbara, N. T. Hunt, R. V. Ulijn, *Nature Chem.* **2010**, *2*, 1089-1094. DOI: 10.1038/nchem.861.
- [32] C. Vigier-Carriere, T. Garnier, D. Wagner, P. Lavalle, M. Rabineau, J. Hemmerlé, B. Senger, P. Schaaf, F. Boulmedais, L. Jierry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10198-10201. DOI: 10.1002/anie.201504761.
- [33] D. Li, H. Wang, D. Kong, Z. Yang, *Nanoscale*, **2012**, *4*, 3047-3049. DOI: 10.1039/C2NR12117D.

Chapitre I
État de l'art sur le mécanisme et les applications du concept de LEASA

- [34] R. Jain, V. K. Pal, S. Roy, *Biomacromolecules*, **2020**, *21*, 4180-4193. DOI: 10.1021/acs.biomac.0c00984.
- [35] E. R. Draper, D. J. Adams, *Langmuir*, **2019**, *35* (20), 6506-6521. DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b00716.
- [36] O. El Hamoui, K. Gaudin, S. Battu, P. Barthélémy, G. Lespes, B. Alies, *Langmuir*, **2021**, *37*, 297-310. DOI: 10.1021/acs.langmuir.0c02894.
- [37] S. Debnath, S. Roy, Y. M. Abul-Haija, P. W. J. M. Frederix, S. M. Ramalhete, A. R. Hirst, N. Javid, N. T. Hunt, S. M. Kelly, J. Angulo, Y. Z. Khimyak, R. V. Ulijn, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 7881-7887. DOI: 10.1002/chem.201806281.
- [38] P. W. J. M. Frederix, R. Kania, J. A. Wright, D. A. Lamprou, R. V. Ulijn, C. J. Pickett, N. T. Hunt, *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 13112-13119. DOI : 10.1039/C2DT30307H.
- [39] J. Zhan, Y. Cai, S. Ji, S. He, Y. Cao, D. Ding, L. Wang, Z. Yang, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, *9* (11), 10012–10018. DOI : 10.1021/acsami.7b00784.
- [40] Y. Wang, L. Tang, J. Yu, *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *319* (1), 357-364. DOI : 10.1016/j.jcis.2007.11.017.
- [41] R. Li, C. C. Horgan, B. Long, A. L. Rodriguez, L. Mather, C. J. Barrow, D. R. Nisbet, R. J. Williams, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 301-307. DOI : 10.1039/C4RA13266A.
- [42] Q. Wang, Z. Yang, Y. Gao, W. Ge, L. Wang, B. Xu, *Soft Matter*, **2008**, *4*, 550-553. DOI : 10.1039/B715439A.
- [43] S. Roy, N. Javid, P. W. J. M. Frederix, D. A. Lamprou, A. J. Urquhart, N. T. Hunt, P. J. Halling, R. V. Ulijn, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18* (37), 11723-11731. DOI : 10.1002/chem.201201217.
- [44] R. Haburcak, J. Shi, X. Du, D. Yuan, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (47), 15397–15404. DOI : 10.1021/jacs.6b07677.
- [45] J. Rodon Fores, M. Criado-Gonzalez, A. Chaumont, A. Carvalho, C. Blanck, M. Schmutz, C. A. Serra, F. Boulmedais, P. Schaaf, L. Jierry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (52), 18817-18822. DOI : 10.1002/anie.201909424.
- [46] C. Vogt, V. Ball, J. Mutterer, P. Schaaf, J.-C. Voegel, B. Senger, P. Lavalle, *J. Phys. Chem. B*, **2012**, *116* (17), 5269–5278. DOI : 10.1021/jp300028v.
- [47] M. P. Conte, J. K. Sahoo, Y. M. Abul-Haija, K. H. A. Lau, R. V. Ulijn, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, *10* (3), 3069–3075. DOI : 10.1021/acsami.7b15456.
- [48] E. K. Johnson, D. J. Adams, P. J. Cameron, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (14), 5130–5136. DOI : 10.1021/ja909579p.
- [49] R. J. Williams, T. E. Hall, V. Glattauer, J. White, P. J. Pasic, A. B. Sorensen, L. Waddington, K. M. McLean, P. D. Currie, P. G. Hartley, *Biomaterials*, **2011**, *32* (22), 5304-5310. DOI : 10.1016/j.biomaterials.2011.03.078.

Chapitre I
État de l'art sur le mécanisme et les applications du concept de LEASA

- [50] A. G. L. Olive, N. H. Abdullah, I. Ziemecka, E. Mendes, R. Eelkema, J. H. van Esch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (16), 4132–4136. DOI : 10.1002/anie.201310776.
- [51] M. Criado-Gonzalez, J. Rodon Fores, A. Carvalho, C. Blanck, M. Schmutz, L. Kocgozlu, P. Schaaf, L. Jierry, F. Boulmedais, *Langmuir*, **2019**, *35* (33), 10838–10845. DOI : 10.1021/acs.langmuir.9b01420.
- [52] M. Criado-Gonzalez, J. Rodon Fores, D. Wagner, A. P. Schröder, A. Carvalho, M. Schmutz, E. Harth, P. Schaaf, L. Jierry, F. Boulmedais, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 1156–1159. DOI : 10.1039/C8CC09437C.
- [53] M. Criado-Gonzalez, B. Loftin, J. Rodon Fores, D. Vautier, L. Kocgozlu, L. Jierry, P. Schaaf, F. Boulmedais, E. Harth, *J. Mater. Chem. B*, **2020**, *8*, 4419–4427. DOI : 10.1039/D0TB00456A.
- [54] T. Zhou, J. J. Vallooran, R. Mezzenga, *Nanoscale*, **2019**, *11*, 5891–5895. DOI : 10.1039/C8NR09671F.
- [55] F. Rodríguez-Llansola, B. Escuder, J. F. Miravet, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (32), 11478–11484. DOI : 10.1021/ja902589f.
- [56] F. Rodríguez-Llansola, J. F. Miravet, B. Escuder, *Chem. Commun.* **2009**, 7303–7305. DOI : 10.1039/B916250J.
- [57] Y. Gao, F. Zhao, Q. Wang, Y. Zhang, B. Xu, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3425–3433. DOI : 10.1039/B919450A.
- [58] N. Singh, K. Zhang, C. A. Angulo-Pachón, E. Mendes, J. H. van Esch, B. Escuder, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 5568–5572. DOI : 10.1039/C6SC01268J.
- [59] O. Zozulia, M. A. Dolan, I. V. Korendovych, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 3621–3639. DOI : 10.1039/C8CS00080H.
- [60] O. Ben-Zvi, I. Grinberg, A. A. Orr, D. Noy, P. Tamamis, I. Yacoby, L. Adler-Abramovich, *ACS Nano*, **2021**, *15* (4), 6530–6539. DOI : 10.1021/acsnano.0c09512.
- [61] Q. Wu, Z. He, X. Wang, Q. Zhang, Q. Wei, S. Ma, C. Ma, J. Li, Q. Wang, *Nat. Commun.* **2019**, *10* (240). DOI : 10.1038/s41467-018-08234-2.
- [62] M. Aviv, M. Halperin-Sternfeld, I. Grigoriants, L. Buzhansky, I. Mironi-Harpaz, D. Seliktar, S. Einav, Z. Nevo, L. Adler-Abramovich, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, *10* (49), 41883–41891. DOI : 10.1021/acsami.8b08423.
- [63] J. Rodon Fores, A. Bigo-Simon, D. Wagner, M. Payrastre, C. Damestoy, L. Blandin, F. Boulmedais, J. Kelber, M. Schmutz, M. Rabineau, M. Criado-Gonzalez, P. Schaaf, L. Jierry, *Polymers*, **2021**, *13*, 1793. DOI : 10.3390/polym13111793.
- [64] B. Li, M. Criado-Gonzalez, A. Adam, J. Bizeau, C. Mélart, A. Carvalho, S. Bégin, D. Bégin, L. Jierry, D. Mertz, *ACS Appl. Nano Mater.* **2022**, *5* (1), 120–125. DOI : 10.1021/acsanm.1c03959.
- [65] R. A. Pires, Y. M. Abul-Haija, D. S. Costa, R. Novoa-Carballal, R. L. Reis, R. V. Ulijn, I. Pashkuleva, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (2), 576–579. DOI : 10.1021/ja5111893.

Chapitre I

État de l'art sur le mécanisme et les applications du concept de LEASA

- [66] J. Zhang, J. Gao, M. Chen, Z. Yang, *Antioxid. Redox Signal.*, **2014**, *20* (14), 2179-2190. DOI : 10.1089/ars.2013.5701.
- [67] A. N. Shy, B. Jin Kim, B. Xu, *Matter*, **2019**, *1* (5), 1127-1147. DOI : 10.1016/j.matt.2019.09.015.
- [68] T. Saydé, O. El Hamoui, B. Alies, K. Gaudin, G. Lespes, S. Battu, *Nanomaterials*, **2021**, *11*, 481. DOI : 10.3390/nano11020481.

Chapitre II

Matériels et méthodes

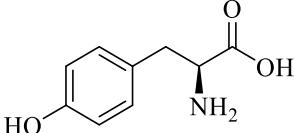
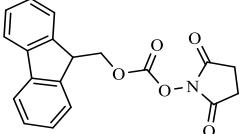
Table des matières

Table des matières.....	71
Liste des composés utilisés durant la thèse	73
1 Synthèse, purification et caractérisation.....	77
1.1 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	77
1.2 Purification automatisée.....	77
1.3 Résonance magnétique nucléaire (RMN)	78
1.4 Spectroscopie UV	79
1.5 Spectroscopie de masse.....	79
1.6 Synthèse des composés	79
1.6.1 Synthèse et caractérisation de la tyrosine phosphate (pY).....	79
1.6.2 Synthèse et caractérisation de la <i>N</i> -Fmoc tyrosine phosphate (Fmoc-pY).....	80
1.6.3 Synthèse du Fmoc-FFpY	83
1.6.4 Synthèse de la RhodB-strep	87
1.7 Fabrication des GUVs.....	89
1.7.1 Solutions utilisées pour la préparation des GUVs.....	89
1.7.2 Fabrication des GUVs par la méthode d'hydratation de film	90
1.8 Fabrication des SUVs par sonication-extrusion.....	91
1.8.1 Équipement	91
1.8.2 SUVs avec 1 % de biotine (SUVs-biot₁)	93
1.8.3 SUVs avec 10 % de biotine (SUVs-biot₁₀).....	93
1.8.4 SUVs avec n % d'AP (SUVs-AP_n) et colonne de Sépharose CL-4B	93
2 Microscopie.....	96
2.1 Microscopie à contraste de phase et épifluorescence.....	96
2.1.1 Principe	96
2.1.2 Équipement	99
2.1.3 Préparation des échantillons.....	99
2.2 Microscopie confocale	100
2.2.1 Principe	100
2.2.2 Équipement	101
2.2.3 Préparation des échantillons.....	101
2.3 Microscopie électronique à transmission en mode cryo (cryo-TEM).....	102
2.3.1 Principe	102
2.3.2 Équipement	103

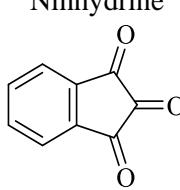
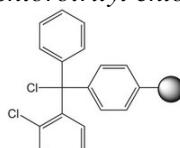
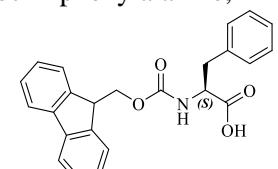
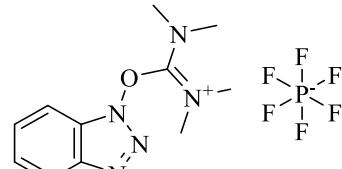
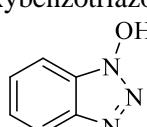
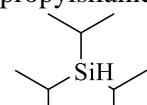
Chapitre II
Matériels et méthodes

2.3.3	Préparation des échantillons.....	104
2.4	Microscopie électronique à balayage en mode cryo (cryo-SEM)	104
2.4.1	Principe	104
2.4.2	Équipement	106
2.4.3	Préparation des échantillons.....	106
3	Diffusion dynamique de la lumière.....	107
3.1	Principe	107
3.2	Équipement	111
3.3	Préparation des échantillons.....	111
4	Microbalance à cristal de quartz.....	111
4.1	Principe	111
4.2	Équipement	113
4.3	Suivi par QCM-D des LbL avec plusieurs couches d'enzyme	114
5	Construction des LbL.....	115
5.1	Préparation des solutions	115
5.2	Sur les mousses de mélamines	115
5.2.1	Construction des LbL par trempage.....	115
5.2.2	Lavage des mousses	116
5.3	Sur les <i>wafers</i> de silicium et lamelles de verre	117
Références.....		118

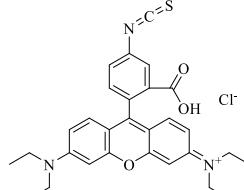
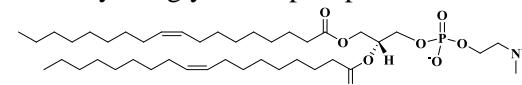
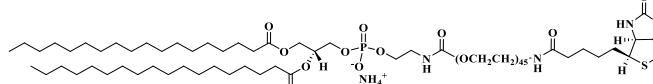
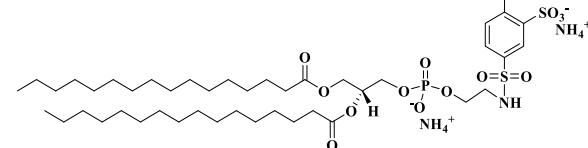
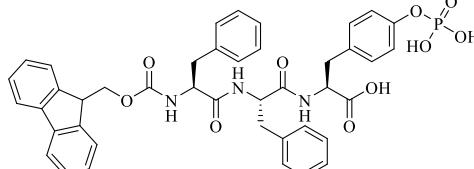
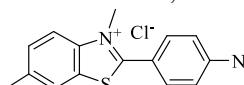
Liste des composés utilisés durant la thèse

Nom, abréviation, structure	M (g.mol ⁻¹)	Fournisseur	Numéro CAS
L-tyrosine 	181.19	Sigma-Aldrich	60-18-4
Acide phosphorique concentré, 85 % en masse dans H ₂ O, H₃PO₄	98	Sigma-Aldrich	7664-38-2
Pentoxide de phosphore, P₄O₁₀	283.9	Sigma-Aldrich	1314-56-3
Eau milli-Q, mQ-H₂O	Marque déposée par Merck Millipore. Eau ultra-purifiée obtenue par un système de filtres/résines/membranes.		
Acétonitrile grade HPLC, ACN	41.05	Fischer Scientific	75-05-8
Ammoniaque concentrée à 35 % dans H ₂ O, NH₄OH	35.05	Fischer Scientific	1336-21-6
Éthanol absolu, EtOH	46.07	Carlo Erba	64-17-5
Éther diéthylique, Et₂O	74.12	Carlo Erba	60-29-7
Diméthylsulfoxyde deutéré, DMSO-d6	84.17	Euroisotop	2206-27-1
Acétate d'éthyle, AcOEt	88.11	Carlo Erba	141-78-6
Acide trifluoroacétique, TFA	114.02	Thermo Scientific	76-05-1
Acide chlorhydrique concentré à 37 % en masse, HCl	36.46	Fischer Scientific	7647-01-0
Sulfate de magnésium, MgSO₄	120.37	VWR Chemicals	7487-88-9
Ester de Fmoc N-hydroxysuccinimide, Fmoc-OSu 	337.33	Iris Biotech	82911-69-1
Triéthylamine, NEt₃	101.19	Sigma-Aldrich	121-44-8
Chlorure de sodium, NaCl	58.44	Fischer Scientific	7647-14-5
Cyanure de potassium, KCN	65.12	Sigma-Aldrich	151-50-8
Pyridine	79.1	Acros Organics	110-86-1

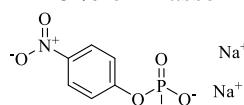
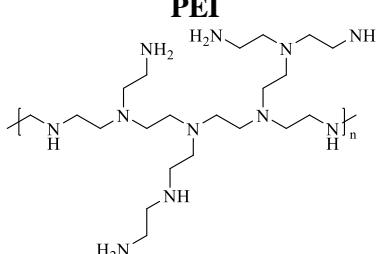
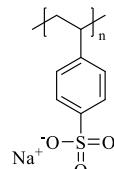
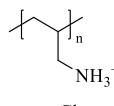
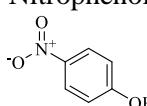
Chapitre II
Matériaux et méthodes

Ninhydrine 	178.14	Sigma-Aldrich	485-47-2
<i>n</i> -butanol	74.12	Fischer Scientific	71-36-3
Phénol	94.11	Sigma-Aldrich	108-95-2
Résine 2-chlorotrityl chloride, CTC 	-	Iris Biotech	-
Dichlorométhane, DCM	84.9	Carlo Erba	75-09-2
Diisopropyléthylamine, DIPEA	129.25	Sigma-Aldrich	7087-68-5
Diméthylformamide, DMF	73.09	Carlo Erba	68-12-2
Pipéridine	85.15	Acros Organics	110-89-4
Méthanol, MeOH	32.04	Carlo Erba	67-56-1
Fmoc-L-phenylalanine, Fmoc-F 	387.43	Sigma-Aldrich	35661-40-6
O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium, HBTU 	379.25	Sigma-Aldrich	94790-37-1
1-hydroxybenzotriazole, HOBT 	135.12	Fluorochem	123333-53-9
Triisopropylsilaine, TIPS 	158.36	Sigma-Aldrich	6485-79-6
Chloroforme	119.38	VWR Chemicals	200-663-8

Chapitre II
Matériaux et méthodes

Rhodamine B isothiocyanate, RhodB-isothiocyanate			
	536.06	Sigma Aldrich	36877-69-7
<i>Streptavidin from Streptomyces avidinii</i> , Streptavidine, strep	~58 kDa	TCI Chemicals	9013-20-1
Carbonate de sodium, Na₂CO₃	105.99	Alfa Aesar	497-19-8
Diméthylsulfoxyde, DMSO	78.13	Fischer Scientific	67-68-5
Membrane de dialyse	3 500	ROTH	-
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DOPC	786.113	Avanti Polar Lipids	4235-95-4
			
1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[biotinyl(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt), DSPE-PEG-Biotin	3014.867	Avanti Polar Lipids	385437-57-0
			
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt), 16:0 Liss Rhod PE	1248.681	Avanti Polar Lipids	384833-01-6
			
Alcool polyvinylique, PVA	11000 - 31000	Alfa Aesar	9002-89-5
Tétraborate de sodium, borax	201.22	Sigma Aldrich	1330-43-4
Fmoc-Phe-Phe-Tyr(PO ₃ H ₂)-OH, FmocFFpY	777.54	pepMic	-
			
Thioflavin T, ThT	318.86	Sigma Aldrich	2390-54-7
			
<i>Phosphatase, Alkaline from bovine intestinal mucosa</i> , phosphatase alcaline, AP	~ 160 kDa	Sigma Aldrich	9001-78-9

Chapitre II
Matériels et méthodes

<i>Streptavidin-Alkaline Phosphatase from Streptomyces avidinii, AP-strep</i> 1 mg solubilisé dans le borax et utilisé tel quel	~ 218 kDa	Sigma Aldrich	-
Sepharose® CL-4B	-	Sigma Aldrich	61970-08-9
Bleu dextran	-	Sigma Aldrich	87915-38-6
<i>Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) Liquid Substrate System for ELISA</i> , solution de pNPP commercial à env. 10 % en masse	-	Sigma Aldrich	-
			
Poly(ethyleneimine) ramifié 30 % en masse dans l'eau, PEI	50 000 – 100 000	Alfa Aesar	9002-98-6
			
Poly(styrène sulfonate), PSS	70 000	Alfa Aesar	28704-18-1
			
Poly(hydrochlorure d'allylamine), PAH	120 000 – 200 00	Alfa Aesar	71550-12-4
			
<i>para</i> -Nitrophénol, pNP	139.11	Thermo Scientific	100-02-7
			
Chlorure de magnésium héxahydrate, MgCl2·6H2O	203.3	Sigma-Aldrich	7791-18-6
Sulfate de zinc heptahydrate, ZnSO4·7H2O	287.54	Honeywell Fluka	7446-20-0

1 Synthèse, purification et caractérisation

1.1 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie en phase liquide à haute performance (*high performance liquid chromatography*, HPLC) dont nous disposons est un appareil d'Agilent équipé d'une colonne Interchim avec la technologie *Uptisphere* mesurant 100 mm x 4.56 µm avec des particules de silice de 5 µm greffées C18. Le détecteur à barrettes de diodes (DAD) est programmé sur les longueurs d'onde de 200, 210, 254, 260 et/ou 280 nm en fonction des besoins. La phase mobile est un mélange d'acétonitrile (**ACN**) et d'eau milli Q (**mQ-H₂O**) contenant 0.1 % d'acide trifluoroacétique (**TFA**) en volume. Il est possible d'utiliser un mélange **ACN/mQ-H₂O** avec un ratio constant (mode isocratique) ou variable (mode gradient), ce choix sera précisé pour chaque analyse effectuée. La phase mobile est injectée à l'aide d'une pompe en passant à travers un mélangeur vers la colonne (phase stationnaire), qui est précédé d'une pré-colonne (Figure 2.1). Le débit est toujours de 1 mL·min⁻¹. L'acquisition des données brutes est faite avec le logiciel Agilent, et les chromatogrammes sont tracés à l'aide du logiciel SigmaPlot.

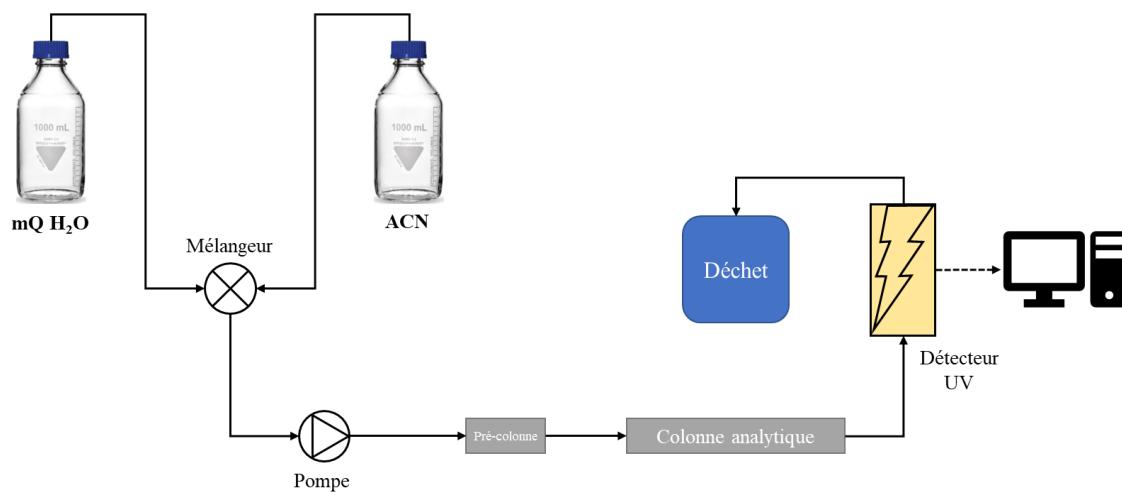


Figure 2.1. Représentation schématique d'une HPLC.

1.2 Purification automatisée

L'appareil utilisé pour les purifications automatisées est un Puriflash 5.250P d'Interchim. Le système est similaire à celui de l'HPLC. Il est possible d'utiliser des colonnes de silice (phase stationnaire) en phase normale (silice nue polaire), utilisée avec des solvants organiques, ou en phase inverse (silice greffée C18 apolaire) utilisée uniquement avec **ACN/mQ-H₂O**, le choix est fait en fonction du mélange et de l'affinité du composé d'intérêt avec les différentes phases. La méthode appliquée (isocratique ou gradient) dépend

des mêmes critères. La phase mobile est injectée à l'aide d'une pompe vers la colonne en passant dans la zone de dépôt de l'échantillon (injection liquide, pré-colonne avec dépôt solide ou boucle d'injection). En sortie de colonne la phase mobile passe au travers d'un filtre puis du détecteur UV (longueur d'onde pouvant aller de 200 à 400 nm). Ensuite, en fonction des indications fournies par l'utilisateur et du signal UV mesuré par le détecteur (chromatogramme en temps réel affiché sur l'écran de contrôle), un séparateur envoie la phase mobile vers le bidon de déchet ou vers le collecteur qui est équipé d'un bras mécanique et de trois racks, contenant chacun 44 tubes de 25 mL, ce qui permet de récolter les différentes fractions du mélange à purifier. Le suivi de la purification et le traitement des données peut se faire directement sur l'ordinateur intégré à l'appareil (Figure 2.2).

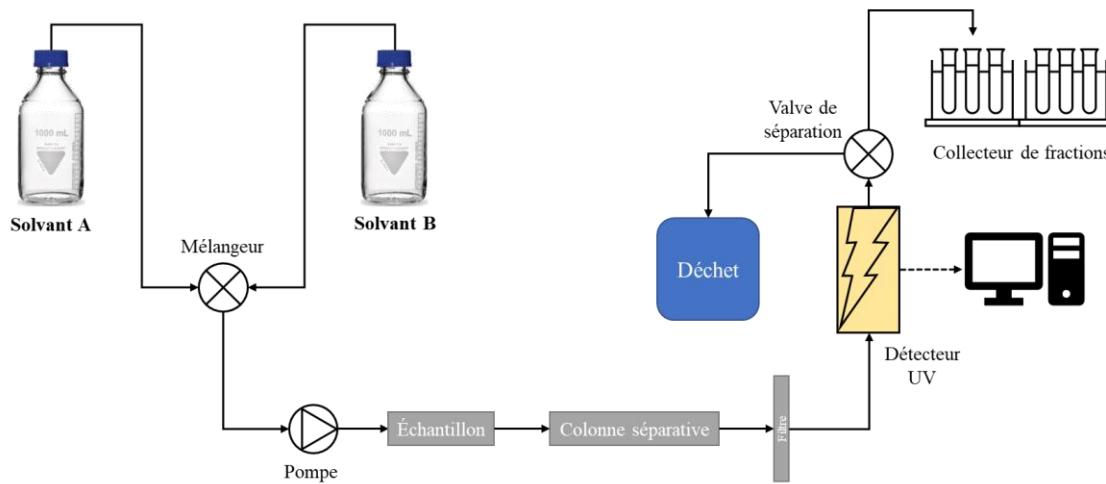


Figure 2.2. Représentation schématique d'un Puriflash.

1.3 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Toutes les analyses ^1H -RMN et ^{31}P -RMN ont été réalisées avec un spectromètre Bruker Avance 400 avec une fréquence de 400 MHz pour la RMN du proton (^1H) et de 164 MHz pour la RMN du phosphore 31 (^{31}P). Les composés/mélanges à analyser sont solubilisés dans un solvant deutéré approprié, qui sera précisé pour chaque analyse. La référence interne pour chaque spectre est le signal résiduel dudit solvant. Les déplacements chimiques seront donnés en ppm, les signaux seront décrits de la façon suivante : singulet (s), doublet (d), triplet (t), multiplet ou autre signal (m). Les spectres RMN sont traités à l'aide du logiciel MestReNova (mesures des déplacements chimiques, intégrales et constantes de couplages).

1.4 Spectroscopie UV

Toutes les analyses en spectroscopie UV ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de microplaques SAFAS Xenius XMA à monochromateur. Les paramètres des mesures effectuées (notamment longueur d'onde) seront précisés pour chaque expérience. L'acquisition des données est faite avec le logiciel SAFAS SP2000V7. Les graphes sont tracés à l'aide du logiciel SigmaPlot.

1.5 Spectrométrie de masse

Toutes les analyses de spectroscopie de masse ont été réalisées par la plateforme du Laboratoire de spectrométrie de masse Bio-organique (Département des sciences analytiques, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178 (CNRS-Université de Strasbourg), ECPM, 25, rue Becquerel F670787-Strasbourg Cedex 2). Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse AutoflexTM MALDI-TOF (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).

1.6 Synthèse des composés

1.6.1 Synthèse et caractérisation de la tyrosine phosphate (*p*Y)

Les étapes de phosphorylation et de protection ainsi que la purification ont été réalisées et optimisées par E. Thiry, stagiaire en deuxième année d'IUT que j'ai encadré pour une durée de deux mois et demi.

L'acide phosphorique concentré (H_3PO_4 conc.) (27 mL) et le P_4O_{10} (42 g) sont introduits dans un ballon tricol équipé d'un réfrigérant à ailettes. L'ensemble est mis sous vide puis rempli d'argon à trois reprises. Le mélange est ensuite chauffé à 80 °C sous agitation jusqu'à solubilisation complète du P_4O_{10} , puis la *L*-tyrosine (10 g, 55.2 mmol) est ajoutée en une fois. Puis le mélange est agité à 80 °C pendant 48 h.^{1,2} Un suivi HPLC est réalisé en prélevant 50 µL du milieu réactionnel qui est dilué dans 200 µL de **mQ-H₂O**. L'échantillon est analysé à l'aide d'une méthode isocratique **ACN/H₂O + 0.1 % TFA** (10/90) de 25 min. Du P_4O_{10} (11 g, 0.7 eq.) est ajoutée et la réaction est poursuivie 24 h. **mQ-H₂O** (22 mL) est ajoutée au milieu réactionnel et la solution est agitée 30 min supplémentaires à 80 °C. La réaction est ensuite refroidie à 0 °C et de l'ammonium concentré (19 mL) et **mQ-H₂O** (100 mL) y sont ajoutés. La suspension obtenue est ensuite agitée à 0 °C pendant 30 min (Figure 2.3). Le solide est ensuite filtré puis lavé successivement avec EtOH, H₂O à 4 °C et Et₂O. Le solide blanc obtenu est ensuite sécher à l'aide d'un vide

poussé. La **pY** a été obtenue avec un rendement de 69 % et a été utilisée pour l'étape suivante sans purification intermédiaire.

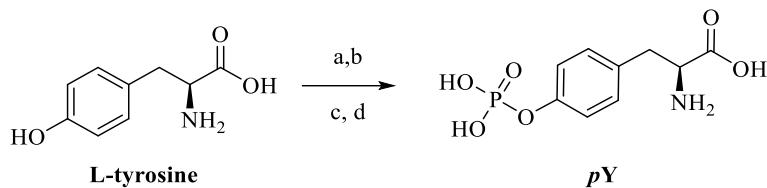


Figure 2.3. Phosphorylation de la *L*-tyrosine adaptée de [2]. a) P_4O_{10} , H_3PO_4 conc. 80°C , 48 h, b) P_4O_{10} (0.7 éq.), 80°C , 24 h, c) H_2O , 80°C , 30 min d) NH_4OH conc. H_2O , 0°C , 30 min.

1.6.2 Synthèse et caractérisation de la *N*-Fmoc tyrosine phosphate (**Fmoc-pY**)

La **pY** (500 mg, 1.9 mmol) et l'ester de Fmoc *N*-hydroxysuccinimide (**Fmoc-OSu**) (775 mg, 2.3 mol, 1.2 éq.) sont mis en suspension dans un mélange d'**ACN** (5 mL) et **mQ-H₂O** (5 mL). La triéthylamine (NEt₃) (1.5 mL, 1.9 mmol) est ajoutée au mélange, et la réaction est agitée à température ambiante. Le pH de la suspension est ajusté vers 8-9 par ajout de petit volume de NEt₃, la suspension devient progressivement une solution. La réaction est poursuivie jusqu'à conversion complète de la **pY**, soit 16 h (Figure 2.7). Un suivi par HPLC a été mis en place en utilisant une méthode isocratique **ACN/H₂O + 0.1 % TFA** (40/60) de 40 min. L'**ACN** est ensuite évaporé à l'évaporateur rotatif. La suspension obtenue est acidifiée avec de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) jusqu'à un pH ≤ 2. La phase aqueuse est ensuite extraite avec de l'acétate d'éthyle (AcOEt) (2 x 50 mL). La phase organique est ensuite lavée avec HCl 1 M (2 x 40 mL), **mQ-H₂O** (2 x 40 mL) et une solution de NaCl saturé (2 x 40 mL). La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium (MgSO₄) avant d'être évaporée à l'évaporateur rotatif.³ Le brut obtenu est ensuite purifié par chromatographie séparative automatisée. Une colonne de silice greffée C18, avec des particules de 15 µm, est conditionnée et équilibrée avec **ACN/H₂O + 0.1 % TFA** (40/60). Le brut est mis en suspension dans un mélange **ACN/H₂O + 0.1 % TFA** (40/60) d'un volume maximum de 4 mL pour une masse de brut de 800 mg maximum. La suspension est filtrée avant d'être directement injectée sur la colonne équilibrée. Les différentes fractions contenant la **Fmoc-pY** sont rassemblées puis l'**ACN** est évaporé. La suspension obtenue est alors lyophilisée. Le lyophilisat est ensuite mis en suspension dans Et₂O pendant 16 h. La suspension est ensuite filtrée puis séchée sous vide poussé. Ceci nous a permis d'obtenir la **Fmoc-pY** sous forme d'un solide blanc avec une légère teinte rose avec un rendement de 47 %.

Chapitre II
Matériels et méthodes

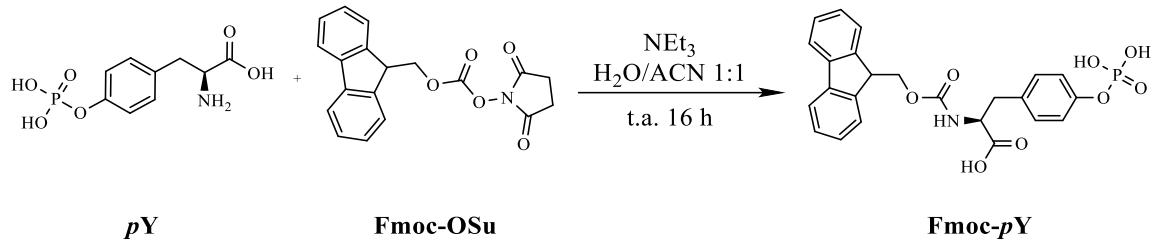


Figure 2.7. Étape de protection de la **pY**. Adapté de [3].

La **Fmoc-*p*Y** (Figure 2.8) a ensuite été caractérisée.

¹H-RMN (DMSO-d6, 400MHz) : δ 7.89 (d, 2 H, **Fmoc-**, H^{2,10}), 7.75 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, **NH** : H¹⁵), 7.67 (t, $J = 8, 4$ Hz, 2H, H^{6,12}), 7.71 (m, 2 H, H^{1,11}), 7.32 (m, 2 H, H^{5,13}), 4.21 (m, 4 H, H^{9,16,34}), 3.05 (dd, $J = 13.9, 4.4$ Hz, 1 H, H^{17'}), 2.85 (dd, $J = 13.9, 4.4$ Hz, 1 H, H^{17''}) ppm (Figure 2.9).

³¹P-RMN (DMSO-d6, 162 MHz) : δ = -6.16 ppm (-PO₃H₂) (Figure 2.10).

La **Fmoc-*p*Y** a été caractérisée par HPLC avec une méthode isocratique de 25 min avec **ACN/H₂O + 0.1 % TFA** (40/60) (Figure 2.11), elle a été obtenue avec une pureté > 98 %.

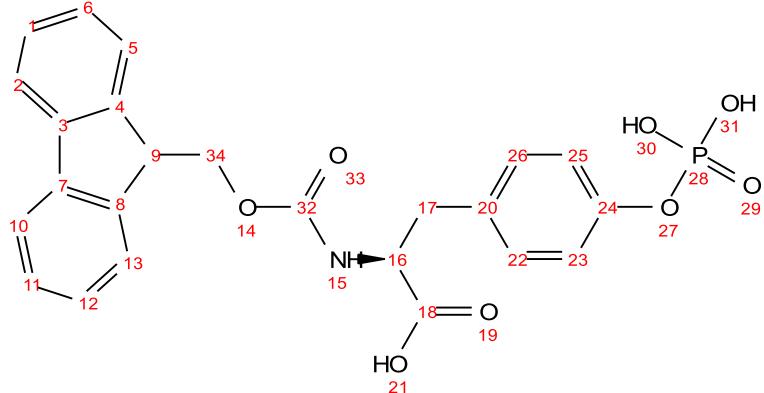


Figure 2.8. Structure de la **Fmoc-*p*Y**.

Chapitre II
Matériaux et méthodes

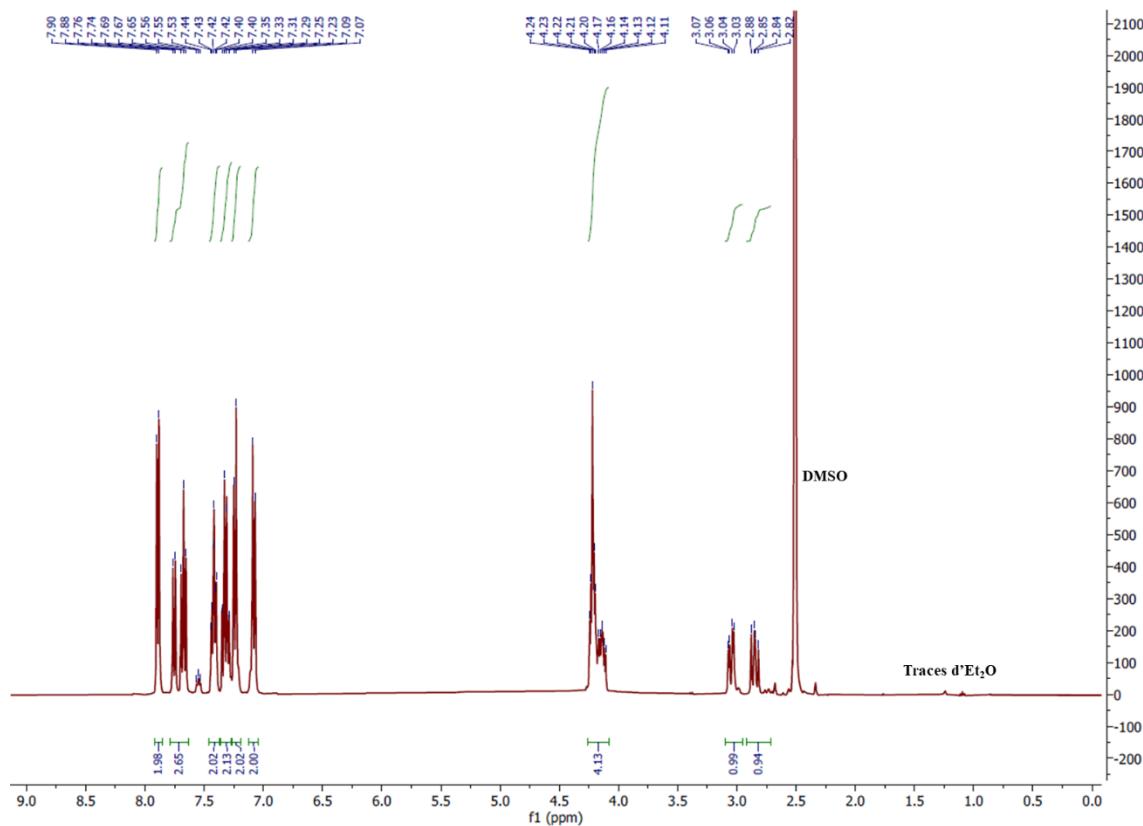


Figure 2.9. Spectre ^1H -RMN de la Fmoc-*p*Y.

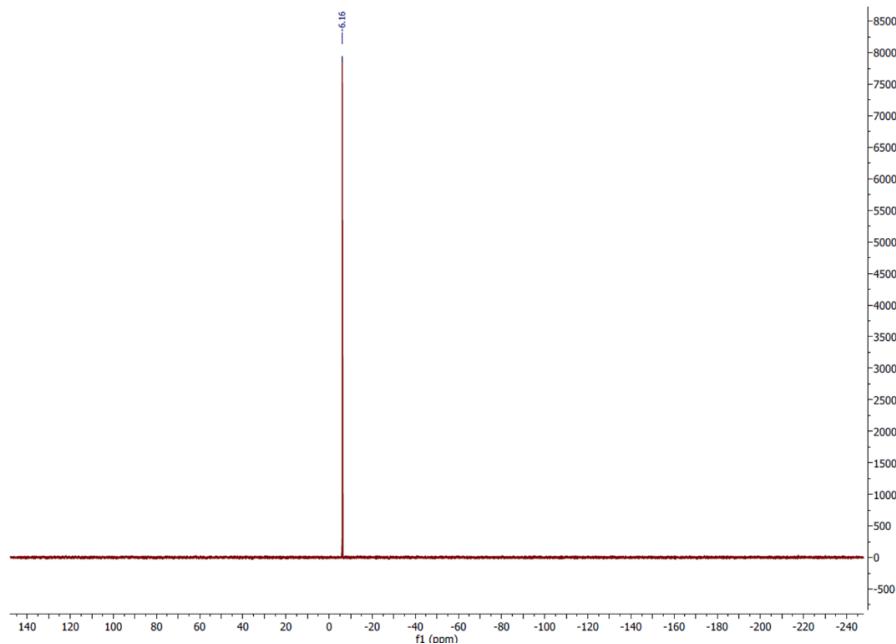


Figure 2.10. Spectre ^{31}P -RMN de la Fmoc-*p*Y.

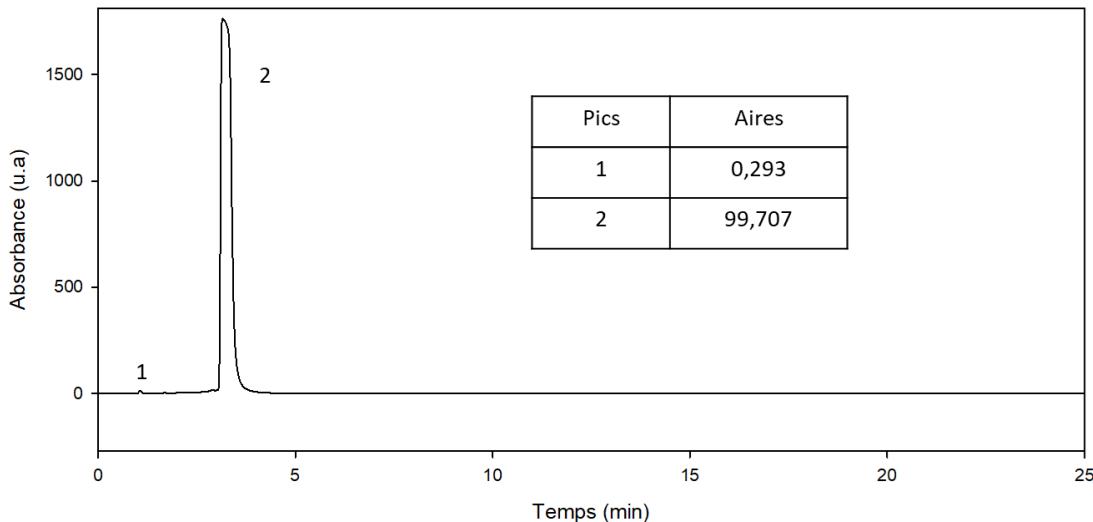


Figure 2.11. Chromatogramme HPLC de la **Fmoc-pY**.

1.6.3 Synthèse du **Fmoc-FFpY**

1.6.3.1 *Test de Kaiser*

Le test de Kaiser est un test colorimétrique qui permet de vérifier si les réactions de couplage menées en synthèse de peptides sur support solide sont complètes, dans ce cas les billes de résines restent jaune. Ce test permet aussi de vérifier si les réactions de déprotection ont bien eu lieu, dans ce cas l'amine libre réagit avec la ninhydrine et produit une couleur bleue intense.⁴ Pour réaliser le test quelques billes de résine sont prélevés et mises en contact avec quelques gouttes de trois solutions qui sont préparées de la manière suivante⁴⁻⁶:

- (1) KCN (16.5 mg) est solubilisé dans **mQ-H₂O** (25 mL). La solution de KCN (1 mL) est diluée dans de la pyridine (49 mL). Solution A.
- (2) Ninhydrine (1 g) est solubilisée dans *n*-butanol (20 mL). Solution B.
- (3) Phénol (40 g) est solubilisé dans *n*-butanol (20 mL). Solution C.

Le mélange des billes de résine et des trois solutions précédentes est ensuite chauffé avec un décapeur thermique quelques secondes.

1.6.3.2 Synthèse sur support solide

La résine *chlorotrityl chloride CTC* (1.2 g, capacité 1.6 mmol.g⁻¹, 1.92 mmol) et **Fmoc-*pY*** (1.38 g, 2.88 mmol) sont introduites dans un tube SPE bouché avec un septum. Le tout est ensuite mis sous vide puis rempli d'argon à trois reprises. Du dichlorométhane (**DCM**) anhydre (12 mL) et de la diisopropyléthylamine (**DIPEA**) (2 mL, 11.52 mmol) sont ajoutés, puis le tube est mis sous agitation orbitalaire à température ambiante (ce sera le cas pour toutes les étapes de la synthèse) pendant 3 h. À l'aide d'une fiole à vide équipée d'un joint conique, le tube SPE est vidé de son contenu puis est lavé avec du diméthylformamide (**DMF**) (6 x 12 mL) puis du **DCM** (6 x 12 mL), le tube SPE est laissé quelques instants sur la fiole pour sécher la résine. Un mélange **DCM/MeOH/DIPEA** (80/15/5, 12 mL) est ajouté à la résine, qui est ensuite mise sous agitation orbitalaire pendant 10 min. La résine est ensuite filtrée, et la même opération est répétée une fois supplémentaire. La résine est à nouveau filtrée puis lavée avec du **DMF** (6 x 12 mL). Une solution de pipéridine (12 mL, 20 % dans **DMF**) est ajoutée à la résine et le tout est agité pendant 15 min (a). La résine est filtrée puis lavée avec du **DMF** (6 x 12 mL) puis du **DCM** (6 x 12 mL). Un test de Kaiser est réalisé, les billes produisent une couleur bleue intense. La résine est ensuite mise sous vide poussé pendant 48 à 72 h. La résine séchée est ensuite pesée pour déterminer quelle quantité d'acide aminé **pY** s'y est insérée. Cette valeur sera la base de calcul des équivalents (eq.) pour le reste de la synthèse. La Fmoc-*L*-phenylalanine (**Fmoc-F**) (3 eq.), le hexafluorophosphate d'*O*-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium (**HBTU**) (3 eq.), le 1-hydroxybenzotriazole (**HOBr**) (3 eq.), **DIPEA** (6 eq.) et **DMF** anhydre (12 mL) sont ajoutés dans le tube qui est ensuite mis sous agitation orbitalaire pendant 3 h (b). La résine est filtrée puis lavée avec du **DMF** (6 x 12 mL) puis du **DCM** (6 x 12 mL). Un test de Kaiser est réalisé, les billes demeurent jaunes. Une solution de pipéridine (6 mL, 20 % dans **DMF**) est ajoutée à la résine et le tout est agité à pendant 15 min. Un test de Kaiser est conduit, les billes produisent une couleur bleue intense. Un dernier couplage est mis en place avec les mêmes conditions (b). La résine est filtrée puis lavée avec du **DMF** (6 x 12 mL) puis du **DCM** (6 x 12 mL). Un test de Kaiser est conduit, les billes demeurent jaunes. La résine est transférée dans un ballon à fond rond auquel est ajouté un mélange **TFA/H₂O/TIPS** (**TIPS** : triisopropylsilane) (95/5/5, 10 mL) (Figure 2.12),⁶ l'ensemble est mis sous agitation orbitalaire pendant 3 h, la solution est rouge foncé. La suspension de billes de résine est ensuite transférée dans un autre ballon au travers d'un entonnoir en verre équipé avec du coton. La solution de clivage est récupérée avec du **TFA**, le coton est rincé autant de fois que possible avec du **TFA** et un minimum de **mQ-H₂O**. La solution est ensuite concentrée à l'évaporateur rotatif. **Et₂O** est ajouté pour faire précipiter le peptide pendant une nuit à 4 °C. Le solide est ensuite filtré puis sécher 24 h sous vide poussé. Le **Fmoc-FFpY** a été obtenu avec un rendement de 28 % (350 mg).

Chapitre II
Matériaux et méthodes

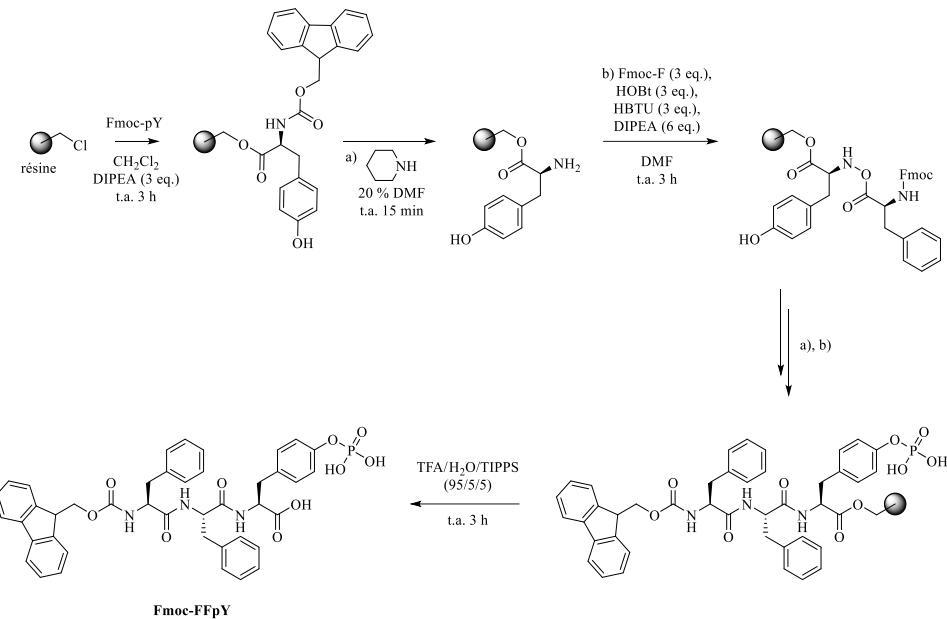


Figure 2.12. Synthèse sur support solide du **Fmoc-FFpY**. Adapté de [6].

Les caractérisations du **Fmoc-FFpY** (Figure 2.13) ont été réalisées en étroite collaboration avec le Dr. S. More, post-doctorant au sein de notre équipe.

¹H-RMN (DMSO-d6, 400MHz) : δ 8.31 (d, $J = 7.6$ Hz, 1 H, **NH** : H¹¹), 8.13 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, **NH** : H¹⁵), 7.86 (d, $J = 7.6$ Hz, 2 H, **H_{ar} Fmoc**, H^{48,49}), 7.59 (m, $J = 8.0$ Hz, 2 H, **H_{ar} Fmoc** : H^{46,50}), 7.38 (td, $J = 8.0, 4.0$ Hz 2 H, **H_{ar} Fmoc** : H^{47,50}), 7.31-7.10 (br. m, 14 H, **H_{ar}** : H^{45,52}, H⁶⁻¹⁰, H¹⁸⁻²², H^{28,32}), 7.09 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, **H_{ar} pY** : H^{29,31}), 4.59 (td, $J = 8.7, 4.2$ Hz 1 H, H²⁴), 4.40 (m, 1 H, H²), 4.19 (m, 1 H, H¹³), 4.08 (m, 3 H, **CH₂+CH Fmoc-** : H⁵³, H⁴³), 3.01 (m, 2 H, **CH₂** : H^{4,16,26}), 2.89 (m, 2 H, **CH₂** : H^{4,16,26}), 2.71 (m, 2 H, **CH₂** : H^{4,16,26}), ppm (Figure 2.14).

³¹P-RMN (DMSO-d6, 162 MHz) : δ = -5.37 ppm (s, -PO₃H₂) (Figure 2.15).

Le **Fmoc-FFpY** a été caractérisée par HPLC avec une méthode isocratique de 20 min avec **ACN/H₂O + 0.1 % TFA (45/55)** indiquant une pureté > 98 % (Figure 2.16).

Spectrométrie de masse, MALDI-TOF : masse calculée pour **C₄₂H₄₀N₃O₁₀P + Na** : 800.23, masse trouvée [M + Na] = 800.11.

L'ensemble de ces données sont en accord avec celles décrites par C. Vigier-Carrière *et al.*⁷

Chapitre II
Matériaux et méthodes

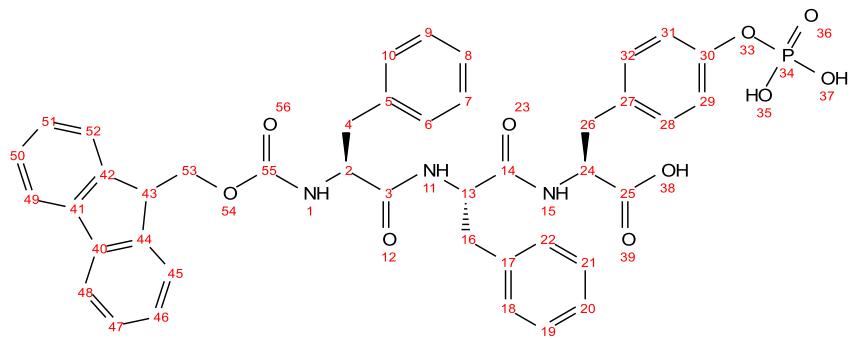


Figure 2.13. Structure du Fmoc-FFpY.

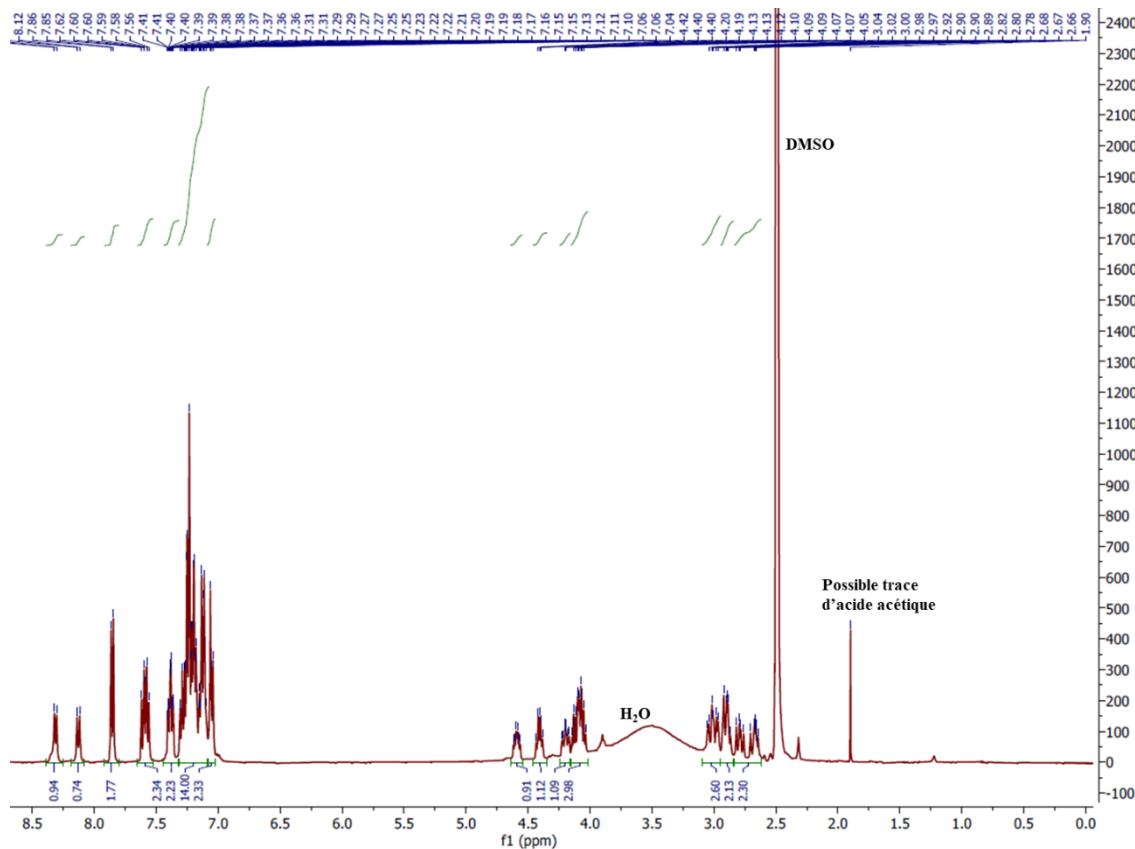


Figure 2.14. Spectre ^1H -RMN du Fmoc-FFpY.

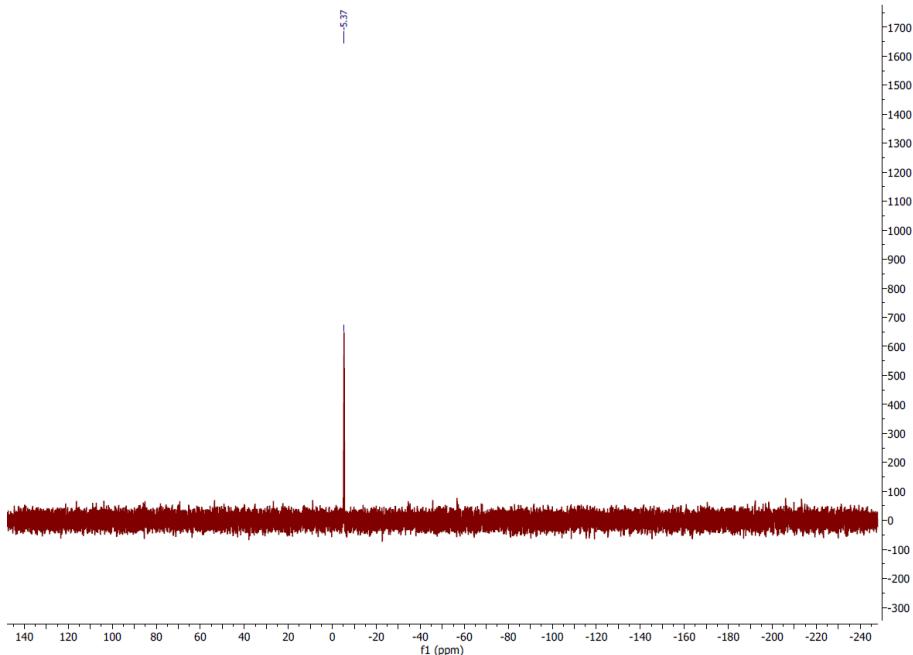


Figure 2.15. Spectre ^{31}P -RMN du Fmoc-FFpY.

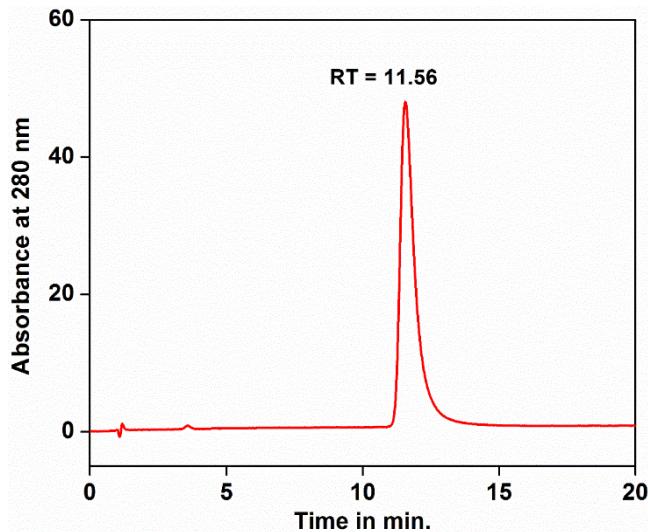


Figure 2.16. Chromatogramme HPLC du Fmoc-FFpY.

1.6.4 Synthèse de la RhodB-strep

La streptavidine (0.36 mg) est ajoutée à une solution de Na_2CO_3 (400 μL , 0.1 M). Ensuite une solution de rhodamine B isothiocyanate (5 mg) dans le diméthylsulfoxyde (**DMSO**) (2.5 mL) est ajouté au mélange précédent, puis la réaction est agitée à 4 °C pendant 4 h (Figure 2.14). Le milieu réactionnel est ensuite dialysé à l'aide d'une membrane de 3500 g. mol^{-1} à 4 °C pendant 2 h dans **mQ-H₂O** (2 L), puis 16 h dans une solution de **NaCl** (2 L, 1 M), puis une nouvelle fois dans une solution de **NaCl** (2 L, 1 M) pendant

Chapitre II
Matériels et méthodes

7 h et une dernière fois dans **mQ-H₂O** (2 L) pendant 16 h. La solution dyalisée est ensuite lyophilisée.⁸ Le lyophilisat n'a pas été caractérisé et a été utilisé ainsi pour les expériences de microscopie à épifluorescence.

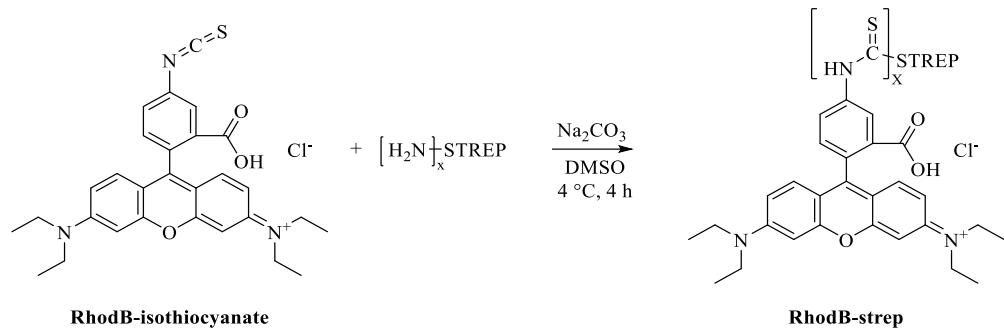


Figure 2.14. Synthèse de la **RhodB-strep**. Adapté de [8]

1.7 Fabrication des GUVs

1.7.1 Solutions utilisées pour la préparation des GUVs

Les différentes solutions de phospholipides ont été préparées comme indiqué dans le tableau ci-dessous. Les solutions sont stockées à -18 °C pendant 4 à 6 semaines.

Solution	Nom/Structure du phospholipide	Masse	Solvent (volume)
PA	DOPC 	1 mg	CHCl₃ (1 mL)
PB	DSPE-PEG-Biotin 		
PC	16:0 Liss Rhod PE 	0.1 mg	

Tableau 2.1. Préparation des solutions phospholipidiques pour la fabrication des GUVs.

Une solution stock d'acétalcool polyvinylique (*polyvinyl alcohol*, **PVA**) à 5 % en masse est préparée pour l'ensemble des expériences. Du **PVA** (0.5 g) est mélangé à **mQ-H₂O** (9.5 mL), l'ensemble est chauffé à 90 °C sous agitation jusqu'à dissolution complète du **PVA**. La solution est ensuite refroidie à température ambiante et conservée à 4 °C pendant plusieurs semaines.

Le tampon Borax à 25 mM (pH 9.5) est préparé en solubilisant du tétraborate de sodium (2.5 g) dans **mQ-H₂O** (500 mL). La solution de sucre à 100 mM est préparée en solubilisant du sucre (0.270 g) dans **mQ-H₂O** (8 mL). La solution de glucose à 100 mM est préparée en solubilisant du glucose anhydre (0.274 g) dans du tampon borax (15 mL).

1.7.2 Fabrication des GUVs par la méthode d'hydratation de film

Ce paragraphe présente la méthode générale employée pour la formation des GUVs. Une solution de **PVA** ($20\ \mu\text{L}$) est déposée sur une lamelle de verre ($24 \times 60 \times 0.16\text{mm}$) qui est ensuite placée à l'étuve à $80\ ^\circ\text{C}$ pendant 1 h. Une fois sortie de l'étuve la lamelle est ramenée à température ambiante puis la solution de phospholipides ($10\ \mu\text{L}$, $1\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ dans **CHCl₃**) est déposée sur le gel de PVA à l'aide d'une micro seringue de $10\ \mu\text{L}$. Le tout est ensuite placé sous vide pendant 30 min pour évaporer le chloroforme et créer un film de phospholipides sur le gel de **PVA**. Un puits est formé autour de la zone de dépôt avec du **VITREX** (pâte de scellement pour tubes à hématocrite, voir partie 2.1) et une solution de sucre y est déposé ($200\ \mu\text{L}$, $100\ \text{mM}$) et les GUVs peuvent gonfler pendant au moins 3 h. La solution de GUVs est ensuite prélevée ($100\ \mu\text{L}$) à l'aide d'une micropipette et est transférée dans une solution de glucose ($100\ \mu\text{L}$, $100\ \text{mM}$ dans Borax) (Figure 2.15).⁹ Les GUVs sédimentent pendant 30 min environ avant d'être observées en microscopie.

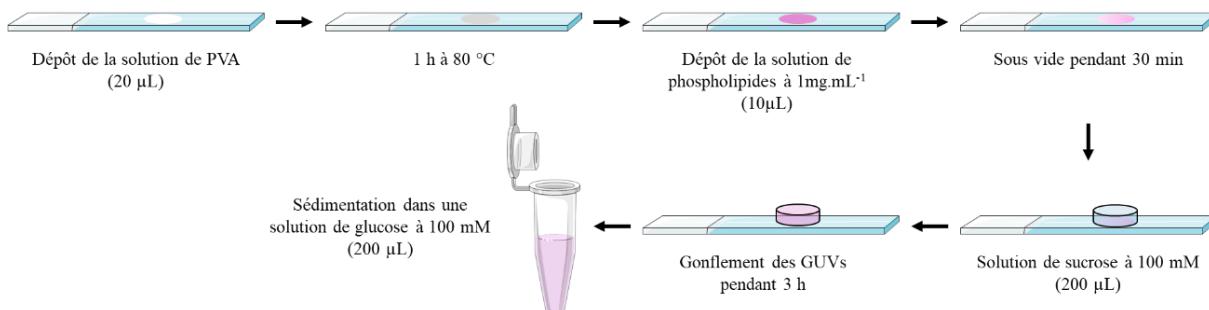


Figure 2.15. Représentation schématique de la préparation des GUVs par la méthode de *film hydration*.

1.7.2.1 **GUVs-biot**

La solution de phospholipide, avant dépôt sur le gel de **PVA**, a été préparée en mélangeant la solution PA ($9.99\ \mu\text{L}$) et la solution PB ($0.01\ \mu\text{L}$) à l'aide de la micro-seringue de $10\ \mu\text{L}$. Celle-ci a été rincée trois fois au chloroforme entre chaque prélèvement et une dernière fois avant de réaliser le dépôt sur le gel de **PVA**.

1.7.2.2 **GUVs-AP**

La solution de phospholipide, avant dépôt sur le gel de **PVA**, a été préparée en mélangeant la solution PA ($9.99\ \mu\text{L}$) et la solution PB ($0.01\ \mu\text{L}$) à l'aide de la micro-seringue de $10\ \mu\text{L}$. Celle-ci a été

rincée trois fois au chloroforme entre chaque prélèvement et une dernière fois avant de réaliser le dépôt sur le gel de PVA. La solution de bioconjugué **AP/streptavidine (AP-strep)** ($2 \mu\text{L}$, 1 mg.mL^{-1} , dans le borax) est ajoutée lors de l'étape de sédimentation.

1.7.2.3 GUVs-AP marquée à la rhodamine B

La solution de phospholipide, avant dépôt sur le gel de **PVA**, a été préparée en mélangeant la solution PA ($9.98 \mu\text{L}$), la solution PB ($0.01 \mu\text{L}$) et la solution C ($0.01 \mu\text{L}$) à l'aide de la micro-seringue de $10 \mu\text{L}$. Celle-ci a été rincée trois fois au chloroforme entre chaque prélèvement et une dernière fois avant de réaliser le dépôt sur le gel de **PVA**. La solution d'**AP-strep** ($2 \mu\text{L}$, 1 mg.mL^{-1} , dans le borax) est ajoutée à l'étape de sédimentation.

1.8 Fabrication des SUVs par sonication-extrusion

La technique de préparation des SUVs par sonication extrusion m'a été présentée par E. Lafarge (doctorante) et développée la Dr. T. Schmatko (maître de conférences), membres de l'équipe MCube de l'ICS. Cette technique n'a pas pour l'instant pas fait l'objet d'une publication, c'est pourquoi aucune référence ne sera citée.

1.8.1 Équipement

1.8.1.1 Sonde à ultrasons

La sonde utilisée est un modèle CV26 de Sonics d'un diamètre de 2.54 cm , équipée d'un générateur Cole Parmer CPX-600 (600 W). L'amplitude est réglée à 0.3% .

1.8.1.2 Extrusion

L'extrusion des vésicules est réalisée à l'aide de deux seringues en faisant passer la solution à travers une membrane. Un système filtre-membrane-filtre est installé entre les deux supports en téflon. La membrane est en polycarbonate, mesure 19 mm de diamètre et possède des pores de $800 \mu\text{m}$. Les filtres sont en polyéthylène et mesure 10 mm de diamètre. Ces deux éléments sont fournis par Whatman. Un premier filtre est légèrement humidifié et est déposé sur un des supports en téflon, muni du joint. Ce dernier est inséré dans le support métallique mâle. La membrane est ensuite déposée sur l'ensemble. Le second filtre est aussi humidifié et déposé sur le second support en téflon muni de son joint. Le tout est disposé sur

le précédent montage. Un anneau en téflon est mis dans le support métallique femelle, qui est visé avec le support mâle (Figure 2.16). L'ensemble est clipsé sur le support à extrusion. La solution de SUVs est prélevée avec l'une des deux seringues, qui est ensuite insérée dans l'une des deux entrées du support. La seconde est installée vide à l'opposé. La solution circule ensuite à travers la membrane en appuyant successivement sur les pistons des seringues. 21 passages sont réalisés, afin de récupérer la solution de SUVs extrudée dans la seringue initialement vide (Figure 2.17).

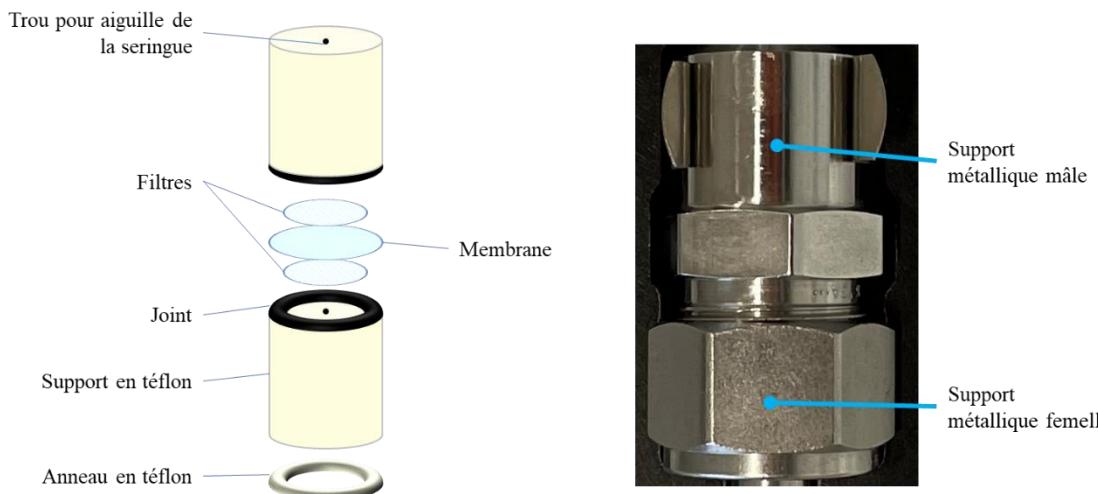


Figure 2.16. (gauche) Système filtre-membrane-filtre entre les supports téflon. (droite) Supports métalliques qui accueillent le système présenté à gauche.

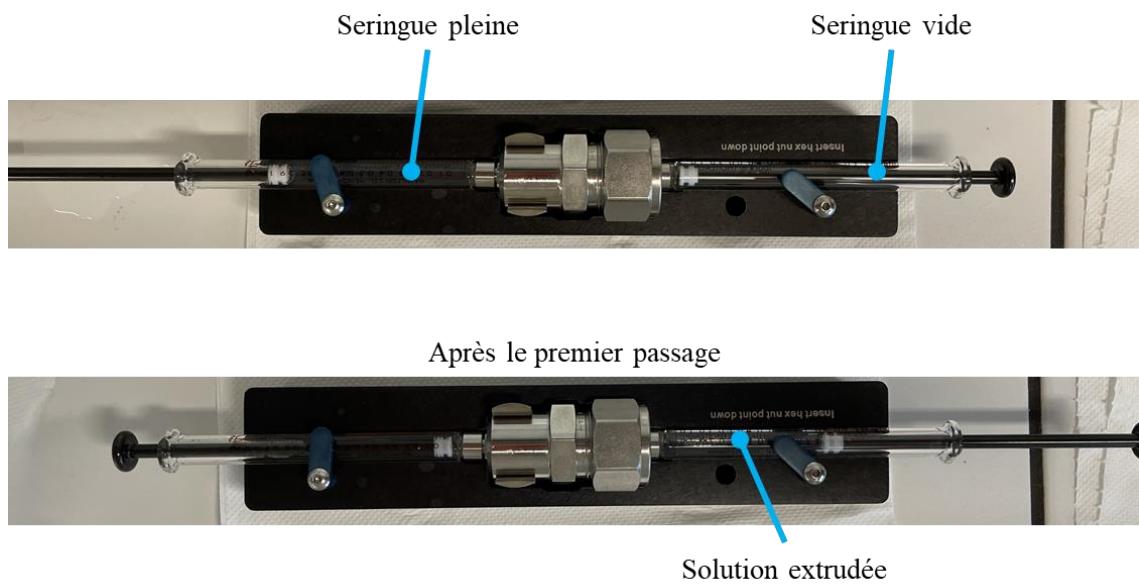


Figure 2.17. (haut) Montage complet de l'extrusion. (bas) Montage après un premier passage de la solution au travers de la membrane.

1.8.2 SUVs avec 1 % de biotine (**SUVs-biot₁**)

Le **DOPC** solide (4.95 mg) est ajouté à un ballon monocol de 5 mL, auquel est ajouté une solution commerciale de **DSPE-PEG-Biotin** (5 µL, 10 mg.mL⁻¹, dans le CHCl₃). Un petit volume de chloroforme est ajouté pour solubiliser tout le **DOPC**. La solution est ensuite évaporée à l'évaporateur rotatif jusqu'à l'obtention d'un film phospholipidique sur la paroi du ballon. **mQ-H₂O** (1 mL) est ajoutée dans la ballon, puis la suspension est soumises aux ultrasons à l'aide s'une sonotrode pendant 3 min. La suspension est ensuite extrudée. La solution extrudée est transférée dans le ballon de 5 mL nettoyé, puis est de nouveau soumise aux ultrasons pour 3 min. La suspension de SUVs-biot₁ est conservée pendant plusieurs mois à 4 °C.

1.8.3 SUVs avec 10 % de biotine (**SUVs-biot₁₀**)

Le **DOPC** solide (4.5 mg) est ajouté à un ballon monocol de 5 mL, auquel est ajouté une solution commerciale de **DSPE-PEG-Biotin** (50 µL, 10 mg.mL⁻¹, dans le CHCl₃). Un petit volume de chloroforme est ajouté pour solubiliser tout le **DOPC**. La solution est ensuite évaporée à l'évaporateur rotatif jusqu'à l'obtention d'un film phospholipidique sur la paroi du ballon. **mQ-H₂O** (1 mL) est ajoutée dans la ballon, puis la suspension est soumises aux ultrasons à l'aide s'une sonotrode pendant 3 min. La suspension est ensuite extrudée. La solution extrudée est transférée dans le ballon de 5 mL nettoyé, puis est de nouveau soumise aux ultrasons pour 3 min. La suspension de SUVs-biot₁₀ est conservée pendant plusieurs mois à 4 °C.

1.8.4 SUVs avec n % d'AP (**SUVs-AP_n**) et colonne de Sépharose CL-4B

Les **SUVs-AP_n** (avec n = 1 ou 10) sont préparées en mélangeant la solution de **SUVs-biot_n** (200 µL) avec la solution d'**AP-strep** (5 µL, 1 mg.mL⁻¹, dans le borax). La colonne de Sépharose a été mise en place pour séparer les **SUVs-AP_n** de l'**AP-strep** encore libre.¹⁰ La Spéharose CL-4B est transvasée dans une colonne de diamètre interne de 0.7 cm jusqu'à atteindre une hauteur de 8 cm, le volume de la colonne était de 3 mL. La colonne a été équilibrée en faisant passer 5 volumes de colonne de tampon borax à l'aide d'une pompe péristaltique avec un débit de 1.25 mL.min⁻¹ (Figure 2.18).

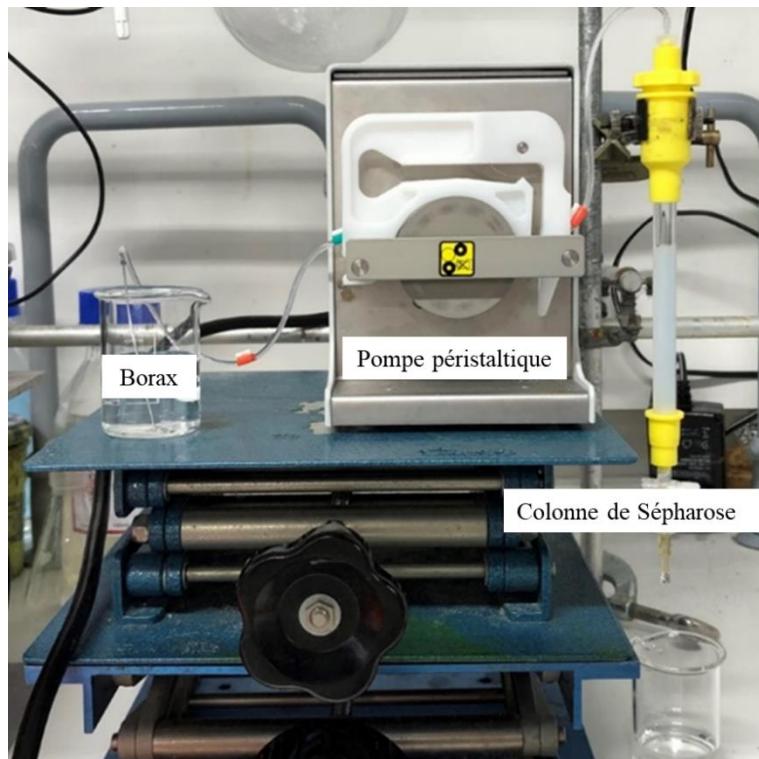


Figure 2.18. Installation de la colonne de Sépharose CL-4B avec la pompe péristaltique.

Une solution de bleu dextran ($200 \mu\text{L}$, 1 mg.mL^{-1}) est déposée sur le haut de la colonne, puis un débit de 1 mL.min^{-1} est appliqué. En sortie de colonne les fractions (5 gouttes, env. $250 \mu\text{L}$) sont collectées dans des tubes de type Eppendorf. Ceci permet de déterminer, par contrôle visuelle de la couleur des fractions, dans lesquelles se trouveront les SUVs purifiées. Le tableau 2.2 renseigne les fractions collectées avec le bleu dextran.

Fraction	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Volume collecté (μL)	500	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Bleu dextran	Non	Non	Non	Clair	Oui	Clair	Non	Non	Non	Non	Non

Tableau 2.2. Fractions de bleu dextran collectées en sortie de la colonne de Spéharose.

Ceci nous indique que les SUVs purifiées seront collectées dans les fractions 4 à 6 avec. Le mélange **SUVs-AP_n + AP-strep** est déposé sur la colonne et du tampon borax circule à travers la colonne avec un débit de 1 mL.min^{-1} . Les différentes fractions sont collectées comme précédemment. Un premier contrôle

Chapitre II

Matériaux et méthodes

visuel peut être effectué en sortie de colonne, car les fractions contenant les **SUVs-AP_n** présentent un ménisque, alors que celles qui n'en contiennent pas n'ont pas de ménisque (Figure 2.19).

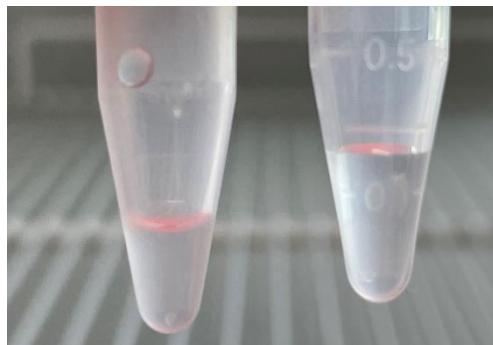


Figure 2.19. Photographie d'une fraction avec SUVs et ménisque (*gauche*) et d'une fraction sans SUVs et sans ménisque (*droite*).

Néanmoins, l'activité enzymatique de chaque fraction a été mesurée par absorbance. Dans une plaque multi-puits un échantillon de fraction (50 µL) est mélangé à une solution diluée de 4-nitrophénylphosphate (**pNPP**) commerciale (150 µL, env. 1 % en masse, Borax). L'évolution de l'absorbance est mesurée toutes les 10 s pendant 20 min à l'aide du lecteur de microplaques à 405 nm. Ceci a permis de tracer les graphes présentés sur la Figure 2.19.

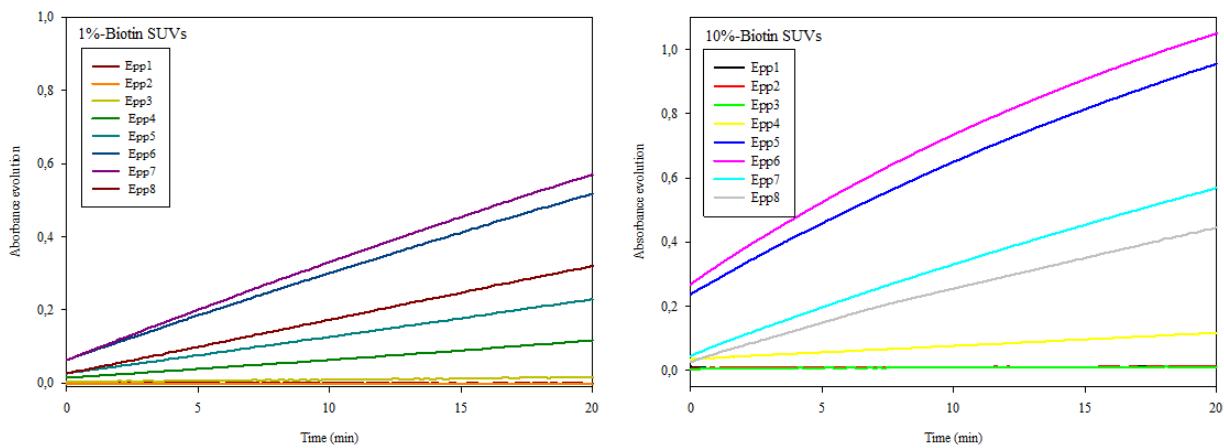


Figure 2.19. Évolution de l'absorbance des fractions 1 à 8 de SUVs-AP_n après passage sur la colonne de Sépharose.

Pour les deux types de SUVs, ces graphes nous indiquent quelles sont fractions qui en contiennent le plus, et donc lesquelles seront utilisées en premier pour les expériences en cryo-TEM. Pour les **SUVs-AP₁** et **SUVs-AP₁₀** il s'agit des fractions 5 et 6.

2 Microscopie

2.1 Microscopie à contraste de phase et épifluorescence

2.1.1 Principe

2.1.1.1 *Microscopie à contraste de phase*

La microscopie à contraste de phase a été introduite pour la première fois en 1934 par le physicien néerlandais Frits Zernike. C'est une technique de microscopie optique qui repose sur l'augmentation du contraste et qui rend possible l'observation d'échantillons transparents, tels que des cellules, des microorganismes, des tissus fins, ou des vésicules. C'est pendant la seconde guerre mondiale que le constructeur allemand Zeiss est le premier à incorporer des outils de contraste de phase dans ses microscopes. Dès lors la technique s'est répandue.¹¹

Lorsqu'un faisceau de lumière passe au travers d'un échantillon, celui-ci est divisé en deux composantes :

- (1) Une partie de la lumière n'est pas déviée, il s'agit de l'onde périphérique (*surround wave*) **S**.
- (2) Une onde diffractée **D** est aussi produite.
- (3) Les deux ondes produites par l'échantillon passent ensuite à travers une série d'objectifs, et sont ensuite réunies pour donner l'onde de particule **P**.

La relation mathématique reliant les trois ondes est :

$$\mathbf{P} = \mathbf{D} + \mathbf{S}.$$

Une différence relative importante en amplitude entre l'onde **P** et l'onde **S**, c'est-à-dire un déphasage, permet à l'échantillon de générer du contraste et ainsi de pouvoir être facilement visualiser. Ce déphasage est induit lorsque l'onde lumineuse traverse dans l'échantillon des milieux d'épaisseur **t** et d'indice de réfraction **n** différents. En effet, lors de son passage dans un milieu avec un indice de réfraction plus élevé, la vitesse de l'onde est ralentie. Le déphasage **δ** se traduit mathématiquement de la manière suivante :

$$\delta = \frac{2\pi\Delta}{\lambda}; \Delta = (\mathbf{n}_2 - \mathbf{n}_1) \times \mathbf{t}$$

où **n₂** est l'indice de réfraction de l'échantillon (dans notre cas l'intérieur des GUVs riche en sucre) et **n₁** l'indice de réfraction du milieu (la solution riche en glucose). Le déphasage peut être illustré de manière graphique comme sur la Figure 2.20.¹¹

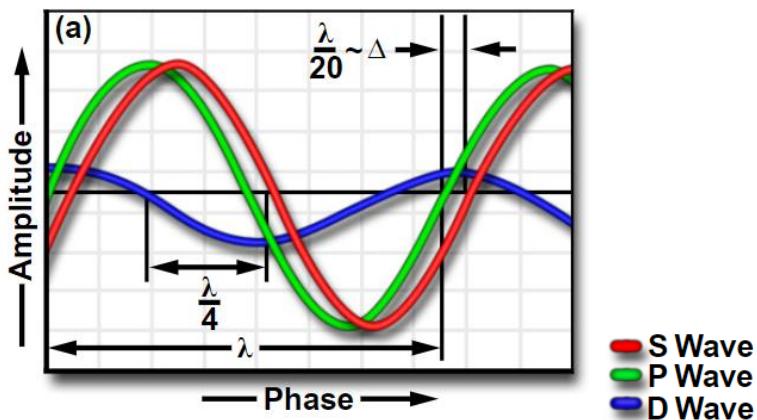


Figure 2.20. Représentation graphique des ondes **S**, **D** et **P**, ainsi que du déphasage d'un quart de longueur d'onde entre **S** et **D**.
Issu de [11]

Ce déphasage tel quel ne peut pas fournir d'image observable, les ondes envoyées sur l'échantillon ainsi que les ondes **D** et **S** émanant de ce dernier doivent passer à travers certains éléments. Le premier est un diaphragme annulaire (*condenser annulus*), qui est un objet plat opaque avec un anneau transparent. Il est positionné après la source lumineuse entre deux lentilles avant l'échantillon, éclairant celui-ci avec un cône de lumière. Les ondes réémises par l'échantillon passent ensuite à travers une autre lentille puis une lame de phase (*phase plate*), déphasant ainsi sélectivement l'onde périphérique **S** d'un quart de longueur d'onde et de réduire son amplitude de 60 à 90 %. Ceci est rendu possible respectivement grâce à une gravure circulaire dans le verre de la lame de phase et à un revêtement métallique. L'onde de particule **P** ainsi produite a une amplitude plus importante que l'onde **S** en arrivant sur le plan image. Cette différence est perçue par l'œil comme une différence de contraste. L'objet étudié est maintenant observable (Figure 2.21).¹¹

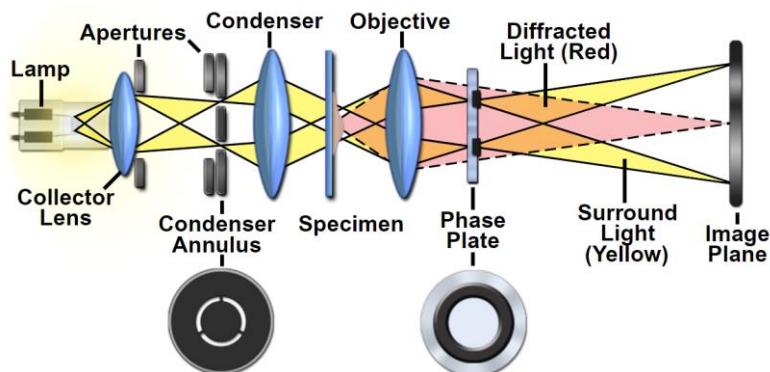


Figure 2.21. Représentation schématique d'un montage de microscope à contraste de phase et du chemin optique des ondes **S** (tracé jaune) et **D** (tracé rouge). Issu de [11].

De manière générale les objets avec un indice de réfraction plus élevé que leur environnement apparaissent sombre dans un fond gris, ce qui est le cas des GUVs que j'ai préparées (Figure 2.22).

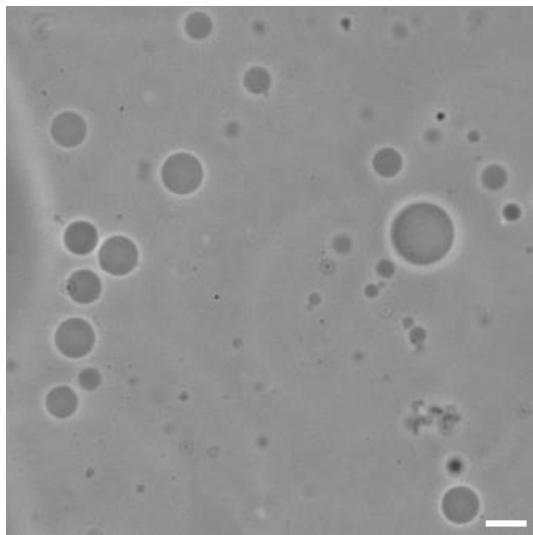


Figure 2.22. GUVs observées en microscopie à contraste de phase. Barre d'échelle = 10 µm.

2.1.1.2 Microscopie à épifluorescence

Le montage d'un microscope à épifluorescence est relativement simple. Une source lumineuse (*light source*) émet un faisceau qui passe d'abord dans un filtre d'excitation (*excitation filter*), laissant passer une longueur d'onde choisie en fonction du fluorophore utilisé. Cette onde d'excitation est ensuite réfléchie par un miroir dichroïque (*dichroic mirror*), passe par une série d'objectifs (*objective*) avant d'atteindre l'échantillon (*sample*). Ce dernier est donc excité à une longueur d'onde donnée, et réemet une lumière à une autre longueur d'onde. Celle-ci emprunte le même chemin que l'onde d'excitation, puis passe à travers le miroir dichroïque avant d'atteindre un filtre d'émission (*emission filter*), qui laisse uniquement passer la lumière émise par l'échantillon et retient la lumière transmise par le filtre d'excitation. Enfin la lumière atteint le détecteur, en général une caméra, qui permet de produire une image observable. Le suffixe « épi » provient du grec et signifie « même », et fait référence au fait que les lumières incidente et émise empruntent le même chemin optique.¹²

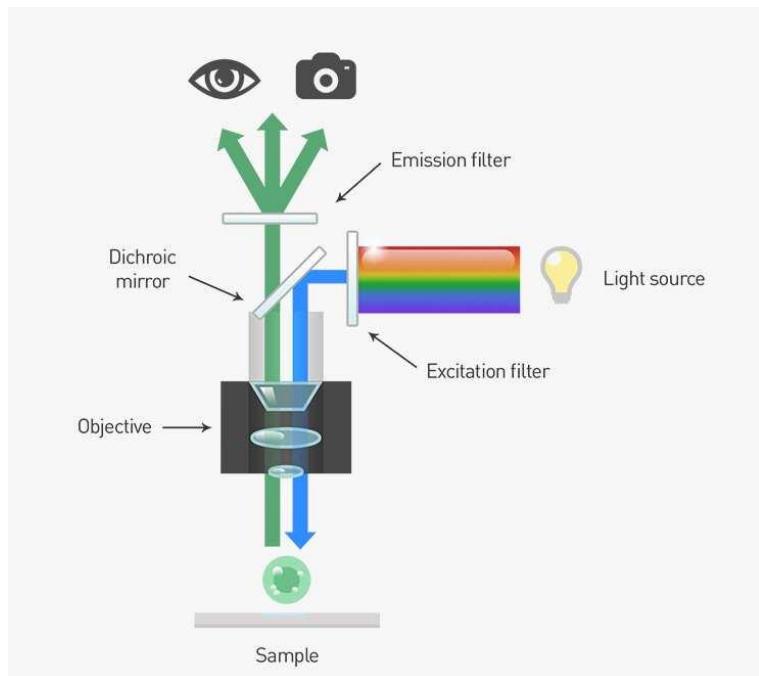


Figure 2.23. Représentations schématiques du trajet optique d'un microscope à épifluorescence. Issu de [12]

2.1.2 Équipement

Les observations en microscopie à contraste de phase et épifluorescence ont été réalisées à l'aide d'un appareil Nikon ECLIPSE TE200 à travers un objectif optique x40 (sauf mention contraire). Les images ont été prises avec une caméra BFI Optilas de DIGANOSTICS Instrument. La rhodamine est excitée avec un filtre d'excitation à 543 nm, et à 450 nm pour la **ThT**. Les images sont acquises en nuances de gris et sont retravaillées avec le logiciel ImageJ, la fluorescence de la rhodamine est colorée en rouge et celle de la **ThT** en vert. Le passage du mode contraste de phase à épifluorescence se faisait par simple manipulation de leviers, qui permettait d'ajouter un filtre d'excitation et de retirer le diaphragme annulaire du chemin optique.

2.1.3 Préparation des échantillons

L'ensemble des échantillons ont été préparés en ajoutant une solution de GUVs ($150 \mu\text{L}$) dans un espaceur en latex ou fait en Vitrex sur une lamelle de verre ($24 \times 60 \times 0.16 \text{ mm}$) (Figure 2.24), une autre lamelle de verre ($20 \times 20 \times 0.16 \text{ mm}$) est déposée sur le dessus de l'espaceur pour minimiser les effets de l'évaporation, puis la lamelle est laissée au repos pour au moins 30 min pour permettre aux GUVs de sédimentier. Lorsque l'autoassemblage est étudié, le **Fmoc-FFpY** (2 mg.mL^{-1} , Borax), la **ThT** ($7.5 \mu\text{L}$,

2 mg.mL⁻¹, Borax) et le Borax (pour compléter le volume de l'échantillon à 200 µL) sont ajoutés. Le volume de solution de peptide est ajusté en fonction de la concentration finale souhaitée dans l'échantillon.



Figure 2.24. Vue de côté et du dessus d'un puits en Vitrex sur une lamelle de verre.

2.2 Microscopie confocale

2.2.1 Principe

Le principe de microscopie confocale a été développé par le scientifique américain Marvin Minsky dans les années 1950. Les microscopes confocaux modernes suivent encore aujourd'hui les premières ébauches de Minsky. Un faisceau laser est envoyé sur un miroir dichromatique (*dichromatic mirror*), réfléchissant ainsi la lumière en direction d'un objectif optique (*objectuve lens*) qui focalise le laser sur l'échantillon. La lumière réémise emprunte le même chemin optique jusqu'au miroir dichromatique (montage à épifluorescence) et est transmise à travers un sténopé (*pinhole*), puis jusqu'au détecteur photomultiplicateur (*photomulptlier detector*) ou à une caméra à haute sensibilité, ce qui permet d'obtenir immédiatement une image numérique. L'élément principal du microscope confocal est le sténopé, qui est placé juste avant le détecteur et se situe sur le plan image conjugué confondu avec le plan focal, dont le nom « confocal ». Ainsi, ce composant laisse passer la lumière du plan focal (*in-focus plane*) et rejette toute la lumière provenant des autres plans focaux (Figure 2.25A). Ceci permet d'observer l'échantillon par tranches de quelques centaines de nanomètres d'épaisseur. Le microscope confocal que j'ai utilisé est un microscope à balayage laser (LSCM). De tels appareils sont équipés d'un miroir à balayage (*scanning mirror*). Celui-ci réfléchit le faisceau laser tout en lui faisant parcourir le champ d'observation en *x* et *y* (Figure 2.25B). Si ce procédé est répété sur chaque tranche de l'échantillon, en déplaçant sur l'axe *z* le plan focal, il est possible de produire une image 3D de l'objet observé.¹³

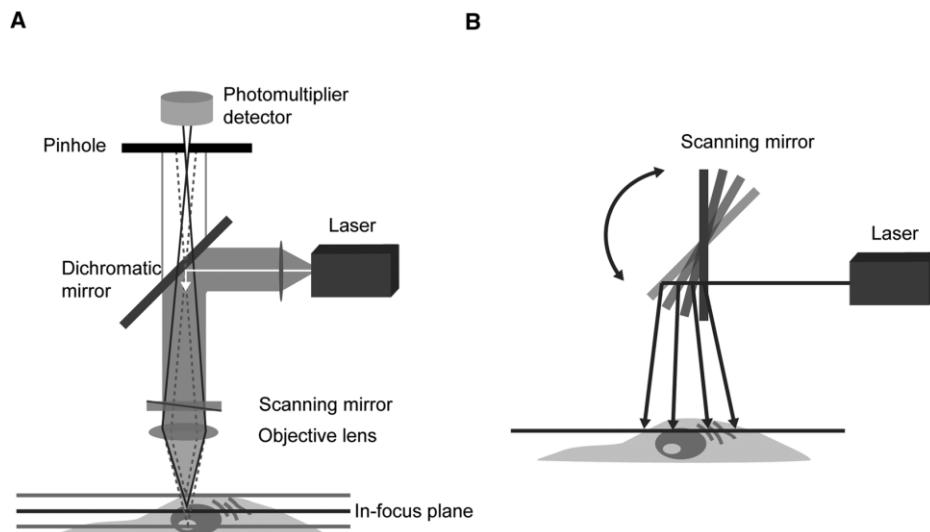


Figure 2.25. Représentation schématique (A) des composants d'un microscope confocal, du chemin optique et (B) du système de balayage laser. Issu de [13]

2.2.2 Équipement

Les observations en microscopie à contraste de phase et épifluorescence ont été réalisées à l'aide d'un appareil Nikon ECLIPSE TE2000-E à travers un objectif optique x40 (sauf mention contraire), et équipé d'un laser Mg-Ar de Melles Griot. Les images ont été prises avec une caméra Nikon D-ECLIPSE C1 Si. La rhodamine est excitée avec le laser réglé à 10 % de sa puissance sur 542 nm et l'échantillon observé sur le canal de 650 nm. La **ThT** est excitée avec le laser réglé à 10 % de sa puissance sur 478 nm et l'échantillon observé sur le canal de 550-590 nm. Les images sont acquises en nuances de gris et sont retravaillées avec le logiciel ImageJ, la fluorescence de la rhodamine est colorée en rouge et celle de la **ThT** en vert.

2.2.3 Préparation des échantillons

2.2.3.1 *Suivi cinétique de l'autoassemblage en présence des GUVs-AP*

L'ensemble des échantillons ont été préparés en ajoutant une solution de GUVs (150 µL) dans un espaceur en latex ou fait en Vitrex sur une lamelle de verre (24 x 60 x 0.16 mm), une autre lamelle de verre (20 x 20 x 0.16 mm) est déposée sur le dessus de l'espaceur pour minimiser les effets de l'évaporation, puis la lamelle est laissée au repos pour au moins 30 min pour permettre aux GUVs de sédimenter. Lorsque l'autoassemblage est étudié, le **Fmoc-FFpY** (2 mg.mL⁻¹, Borax), le Borax (pour compléter le volume de l'échantillon à 200 µL) sont ajoutés. La **ThT** (7.5 µL, 2 mg.mL⁻¹, Borax) est ajoutée au moins 1 h après

l'ajout du peptide. Le volume de solution de **Fmoc-FFpY** est ajusté en fonction de la concentration finale souhaitée dans l'échantillon.

2.2.3.2 *Observation des mousses*

La préparation des différents films multicouche sera présentée en partie 5.2 de ce chapitre. L'ensemble des mousses avec 1, 2 et 3 couche d'enzyme avec hydrogel et les mousses de contrôle (mousse dépourvue de LbL et mousse avec une couche d'enzyme sans hydrogel) sont mélangées à du tampon borax (25 mM, 250 µL) et à une solution de **ThT** (1 mg.mL⁻¹, 250 µL, borax). Les mousses sont ensuite déposées sur une lamelle de verre (24 x 60 x 0.16 mm) puis observées au microscope confocal au travers d'un objectif x10.

2.3 Microscopie électronique à transmission en mode cryo (cryo-TEM)

2.3.1 Principe

2.3.1.1 *Microscopie électronique à transmission (TEM)*

Le TEM a été inventé en 1931 par un ingénieur et un physicien allemand Max Knoll et Ernst Ruka. Les premiers TEM étaient une succession de lentilles installées horizontalement. Ce type d'installation ne permettait pas d'obtenir une bonne résolution. C'est pourquoi ils ont ensuite été produits commercialement à la verticale à partir de 1938 par le constructeur allemand Siemens. Ces appareils offraient une résolution de 10 nm avec un voltage de 80 kV. Au sommet de l'appareil se trouve un canon à électrons qui génère un faisceau d'électrons à haut voltage. Ce faisceau traverse ensuite la colonne qui est sous vide, un condenseur pourvu de lentilles électromagnétiques permet d'aligner le faisceau et de le concentrer. Les électrons sont ensuite dirigés vers l'échantillon, dont la composition impacte la transmission des électrons. En effet plus les atomes constitutifs du matériau ont un numéro atomique élevé, plus les électrons seront déviés. Les électrons transmis et/ou légèrement déviés par l'échantillon sont refocalisés et amplifiés par un système de lentilles électromagnétiques avant d'être projetés sur un écran de phosphore ou un détecteur couplé à une caméra (Figure 2.26).¹⁴

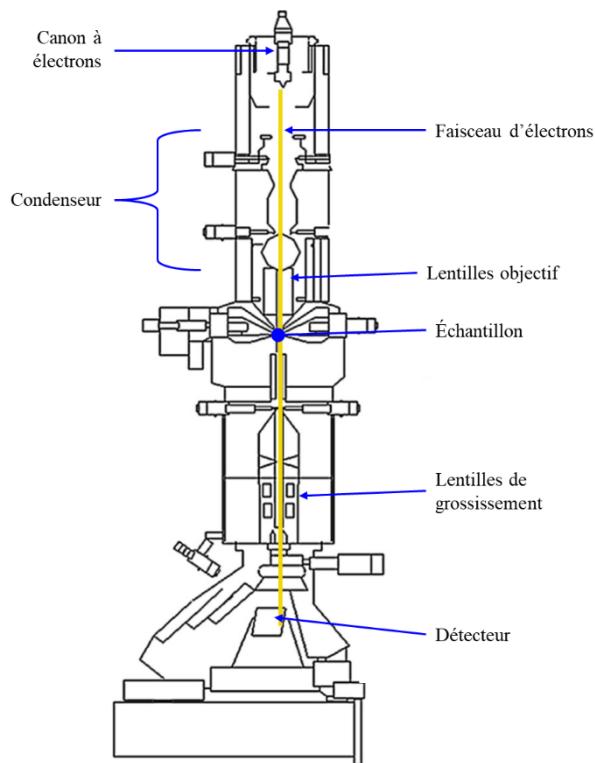


Figure 2.26. Représentation schématique d'un TEM. Adapté de [14]

2.3.1.2 Méthode de préparation des échantillons

La technique de préparation employée sur l'ensemble des échantillons est la vitrification, ceci permet de préserver l'échantillon dans son milieu natif, qui est solvaté. L'échantillon est déposée sur une grille (plus de détails en partie 2.3.3). La grille est ensuite plongée rapidement dans un liquide cryogénique, dans notre cas de l'éthane liquide juste au-dessus de son point de fusion (-183.3 °C), refroidit par de l'azote liquide, ce qui conduit à la formation d'un film d'eau amorphe. Cette vitrification permet de conserver l'échantillon dans son état natif en empêchant la formation de cristaux d'eau.¹⁵

2.3.2 Équipement

Les observations en cryo-TEM sont réalisées à l'aide d'un microscope Technai G2 (FEI) à 200 kV. Les images ont été prises avec une caméra Eagle 2k (FEI) ssCD en mode *low dose*. Les images sont retravaillées avec le logiciel ImageJ.

2.3.3 Préparation des échantillons

La vitrification des échantillons a été réalisée à l'aide d'un système fabriqué au sein de l'institut. La température de la chambre est maintenue à 22 °C et l'humidité relative à 80 %. 5 µL d'une solution **SUVs-AP_n/Fmoc-FFpY** est déposée sur une grille (Ted Pella), pourvue de trous (300 mesh), en cuivre recouverte d'un film de carbone. Celle-ci avait été rendue hydrophile à l'aide d'un générateur de plasma ELMO (Corduan Technologies). Un mince film est formé sur la grille, c'est l'étape de *blotting*, puis est plongée dans l'éthane liquide. La grille est ensuite montée sur un support échantillon (*cryo holder*, Gatan 626) puis observée dans des conditions *low dose* (10 e.Å⁻²).

2.4 Microscopie électronique à balayage en mode cryo (cryo-SEM)

2.4.1 Principe

2.4.1.1 Microscopie électronique à balayage

Comme pour la microscopie électronique à transmission, un faisceau d'électrons est bombardé sur l'échantillon. Lorsqu'un tel faisceau interagit avec la matière, différents signaux sont réémis (Figure 2.27), et chacun porte une information différente sur l'échantillon. Les électrons rétrodiffusés (*backscattered electrons*, BSE) sont émis par les atomes se trouvant en profondeur dans l'échantillon, quelques microns sous la surface. Ils apportent des informations sur la composition et permettent de produire des images. Les électrons secondaires (*secondary electrons*, SE) proviennent de quelques nanomètres sous la surface de l'échantillon et apportent des informations sur la structure de surface (topographie). Les rayons X, quant à eux, apportent des informations sur la composition de l'échantillon. Enfin des électrons Auger (e⁻ Auger) et de la cathodoluminescence (lumière visible) peuvent être émis par l'échantillon, mais ces éléments ne sont pas discutés dans ce manuscrit. Ce sont les BSE et les SE qui sont les électrons d'intérêt pour la microscopie électronique à balayage (*scanning electron microscopy*, SEM).¹⁶

Au sommet de la colonne, sous vide, les électrons primaires sont produits à l'aide d'un canon à électrons. Ceux-ci passent ensuite au travers d'une succession de lentilles pour produire un faisceau focalisé. Des bobines de balayage se situent avant le dernier jeu de lentilles (lentilles objectif) et devient le faisceau en *x* et *y*, balayant ainsi l'échantillon et permettant d'obtenir des informations point par point. Dans notre cas, seul le détecteur à électrons secondaires a été utilisé. L'échantillon est disposé dans une chambre de congélation, ce qui permet de contrôler à la fois la température et l'humidité. La température de l'échantillon est d'ailleurs maintenue aux alentours de -170 °C à l'aide d'azote liquide. (Figure 2.28).¹⁷

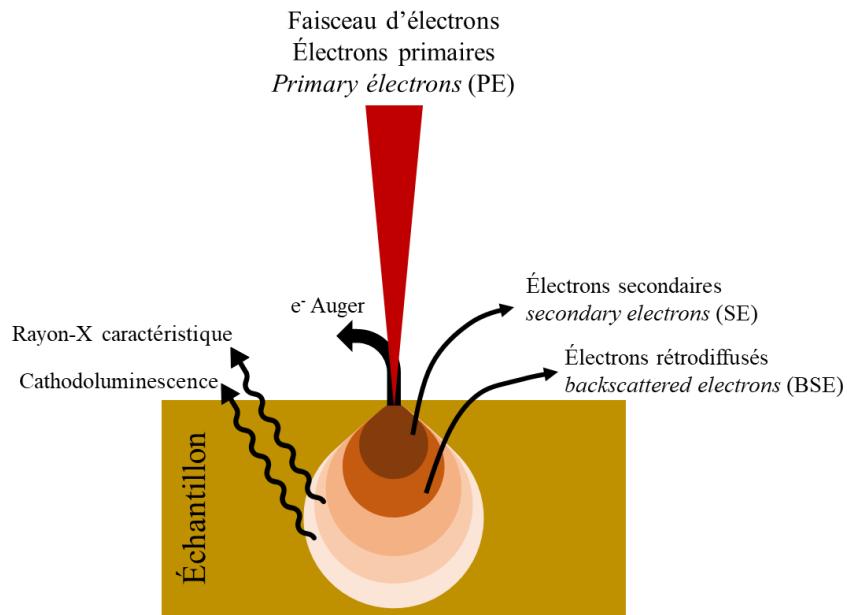


Figure 2.27. Interactions matière-électrons. Adapté de [16]

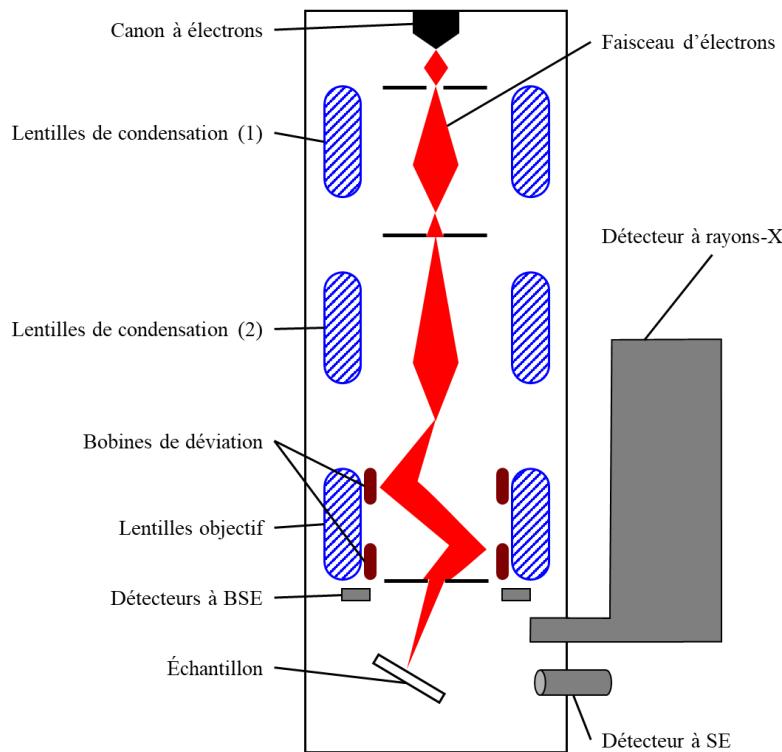


Figure 2.28. Représentation d'une installation d'un SEM. Adapté de [17]

2.4.1.2 Méthode de préparation de l'échantillon

La microscopie électronique à balayage s'opère sous-vide pour éviter la diffusion des électrons par les molécules de gaz. De ce fait, il est nécessaire que l'échantillon ne doive pas dégazer ni altérer le vide, et sa structure ne doit pas être modifiée par le vide. La vitrification dans l'azote liquide permet de limiter l'évaporation de composés volatiles et préserve la structure native de l'échantillon. Sa température est maintenue à l'aide d'azote liquide. La température peut être ajustée vers -90 °C afin de sublimer la première couche d'eau, révélant des détails structuraux.¹⁸

2.4.2 Équipement

L'échantillon cryogénisé est placé sur un support à mâchoires (Figure 2.29) et est rapidement introduit dans la chambre d'échantillon Quorum PT 3010. Celle-ci est reliée à un microscope FEG SEM Hitachi SU8010. La source d'électrons primaires est de 1 kV. Tous les échantillons ont été observés à -150 °C avec le détecteur de SE.

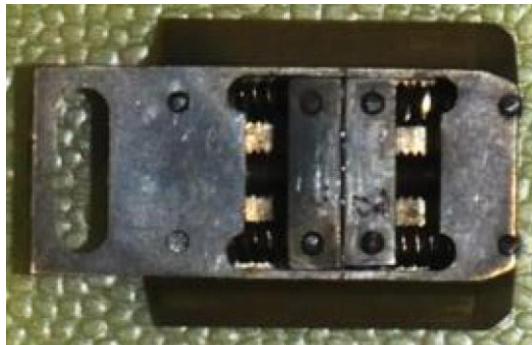


Figure 2.29. Support à mâchoires pour les échantillons en cryo-SEM.

2.4.3 Préparation des échantillons

La préparation des différents films multicouches (LbL) des *wafers* de silicium de sera présentée en partie 5.3 de ce chapitre. Chaque *wafer* est rapidement plongé dans de l'azote liquide avant d'être inséré dans le support présenté en figure 2.29. Une fois dans la chambre d'échantillon le *wafer* est sectionné à l'aide d'une lame de rasoir puis la température de la chambre est placée à -90 °C pendant 2 min.

3 Diffusion dynamique de la lumière

3.1 Principe

La diffusion dynamique de la lumière (*dynamic light scattering*, DLS) mesure le mouvement brownien des particules et le relie à leur taille. Il s'agit d'un mouvement aléatoire induit par les molécules de solvant aux particules. Plus une particule est grosse plus son mouvement brownien sera lent. À l'inverse, plus une particule sera petite, plus son mouvement brownien sera rapide. Il est important de travailler à température constante, car des variations de température modifieraient et induiraient des mouvements de convection dans l'échantillon. La vitesse du mouvement brownien est définie par le coefficient de diffusion D . La taille d'une particule est calculée avec D par le biais de l'équation de Stokes-Einstein :

$$d(\mathbf{H}) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

où $d(\mathbf{H})$ est le diamètre hydrodynamique, k la constante de Boltzmann, T la température, η la viscosité. Finalement grâce à la DLS nous mesurons le diamètre hydrodynamique d'une particule sphérique qui diffuse dans un fluide. La structure de surface des particules, leur concentration et les ions présents dans le solvant influent aussi le coefficient de diffusion. Les ions peuvent modifier la longueur de Debye (ou double couche électrique de la particule en K^{-1}). Ainsi un solvant avec une faible conductivité aura pour effet d'agrandir la longueur de Debye de la particule, diminuant sa vitesse de diffusion. La valeur du diamètre hydrodynamique sera donc plus grande, et inversement pour un solvant avec une forte conductivité.¹⁹

L'approximation de Rayleigh nous indique que l'intensité I de la lumière diffusée par une particule est proportionnelle à d^6 , mais aussi à $\frac{1}{\lambda^4}$ (avec d le diamètre de la particule et λ la longueur d'onde du laser), ce qui signifie qu'une particule de 50 nm diffusera 10^6 fois plus qu'une particule de 5 nm. Il existe un risque que la lumière diffusée par des grosses particules « écrase » celle diffusée par les plus petites. Le terme $\frac{1}{\lambda^4}$ indique que la diffusion est plus importante lorsque la longueur d'onde du laser diminue.¹⁹

La théorie de Mie explique que lorsque la taille d'une particule se rapproche de la longueur d'onde de la lumière incidente, alors il est possible de tracer l'intensité diffusée comme une fonction d'angle avec des maxima et minima. On peut représenter de manière théorique le logarithme de l'intensité diffusée relative en fonction de la taille des particules pour une valeur d'angle donnée, avec $\lambda_{\text{laser}} = 633$ nm (Figure 2.30.). Cette théorie est utilisée pour convertir la distribution en intensité en distribution en nombre.¹⁹

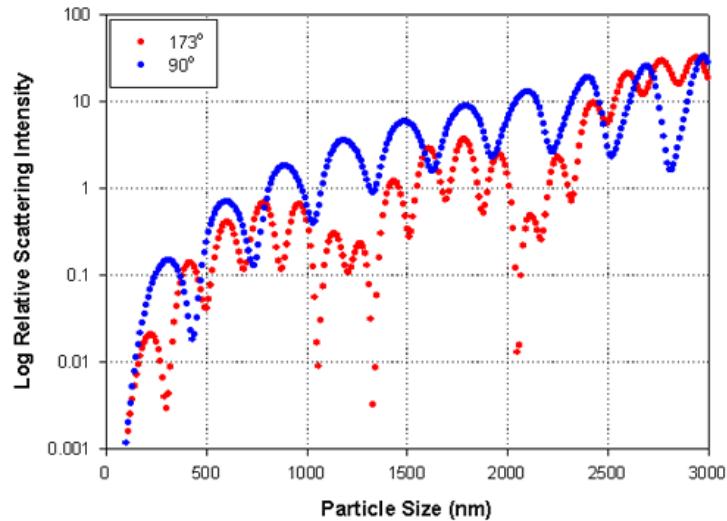


Figure 2.x. Représentation graphique de la théorie de Mie pour les angles à 90 et 173°. Issu de [19].

La vitesse du mouvement Brownien est déterminée en mesurant la vitesse à laquelle l'intensité de la lumière diffusée fluctue. Ce phénomène dépend de la taille des particules : de petites particules vont induire des vitesses de fluctuation plus rapide que des grandes particules (Figure 2.31)

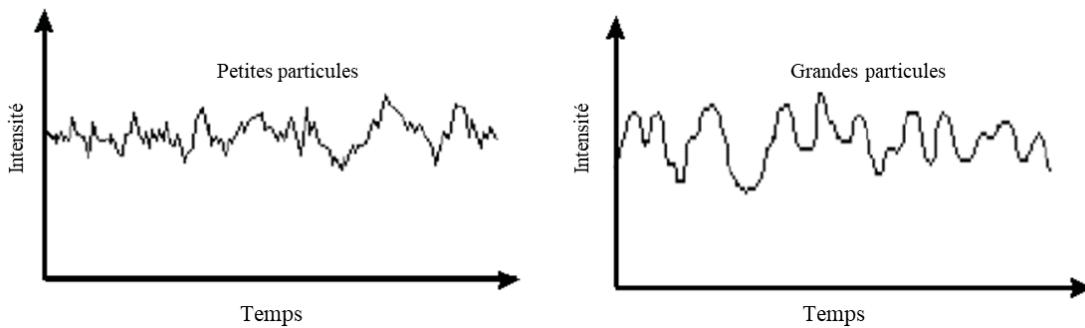


Figure 2.31. Fluctuations typiques en intensité au cours du temps pour des petites ou grandes particules. Issu de [19].

L'autocorrélation permet d'exploiter ces variations d'intensité. Pour ce faire, le signal mesuré sur un certain laps de temps est comparé à l'ensemble du signal mesuré quelques nano ou microsecondes avant. Ceci est répété sur tous les intervalles de temps, ce qui permet de tracer le coefficient de corrélation en fonction des intervalles de temps (échelle log). Plus les particules sont grandes plus le signal va fluctuer lentement (Figure 2.32a) et plus la corrélation va persister, inversement pour les petites particules (Figure 2.32b).¹⁹

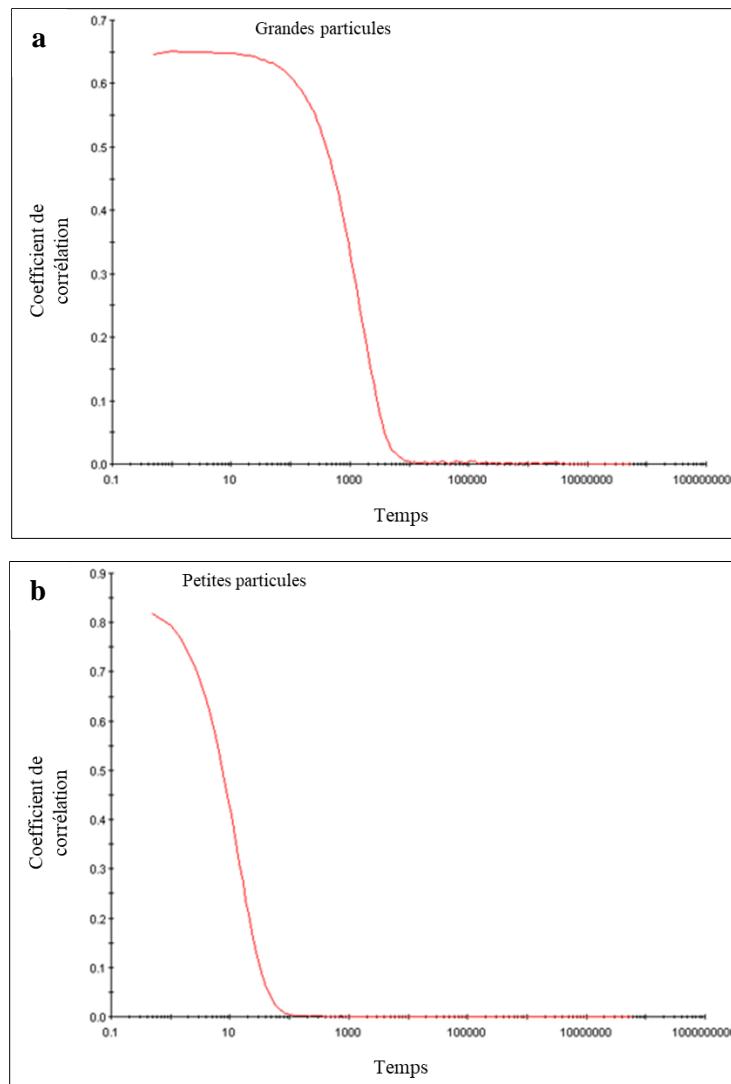


Figure 2.x. Corrélogrammes typiques obtenus pour (a) des grandes ou (b) des petites particules. Issus de [19].

La fonction de corrélation ainsi obtenue permet de remonter jusqu'à la taille moyenne des particules et leur distribution. Il est alors possible de tracer la distribution en taille des particules en intensité, et grâce à la théorie de Mie, en nombre. Il est important de représenter les deux distributions, car, pour rappel, la théorie de Rayleigh nous indique qu'une particule de 50 nm va avoir une intensité de diffusion 10^6 plus grande qu'une particule de 5 nm. Le diagramme en intensité permet de rendre compte de la contribution de chaque population dans la lumière totale diffusée et le diagramme en nombre permet d'évaluer le nombre de particules d'une population par rapport à une autre (Figure 2.33).¹⁹

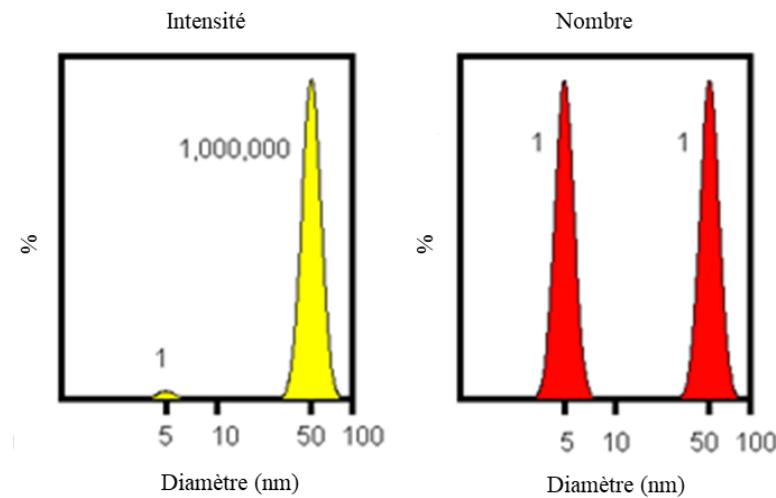


Figure 2.33. Comparaison des diagrammes en intensité et en nombre d'un mélange d'une population de particules de 5 et 50 nm.
Issu de [19].

Dans un système de DLS un laser (1) émet un faisceau qui passe à travers un atténuateur (4) qui est ensuite transmis à l'échantillon, les particules diffusent la lumière dans toutes les directions. Des détecteurs (3) placés à des angles précis (173° ou 90° par exemple) transmettent le signal perçu au corrélateur (5) qui est intégré à un logiciel sur ordinateur (6) (Figure 3.34).¹⁹

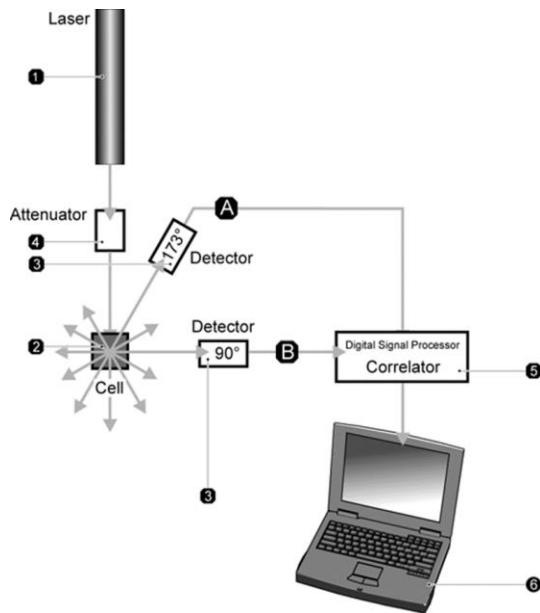


Figure 2.34. Installation d'un système DLS. Issu de [19]

3.2 Équipement

Les mesures de DLS sont effectuées avec un Malvern Zetasizer Nano ZS, avec un laser à une longueur d'onde de 633 nm et un détecteur placé à 173°. L'acquisition et le traitement des données sont réalisés avec le logiciel Zetasizer Software.

3.3 Préparation des échantillons

Chaque échantillon a été préparé en diluant la solution de SUVs (200 µL) avec du tampon borax (800 µL) dans une cuvette en polystyrène. Une fois le programme d'analyse démarré, une stabilisation est nécessaire, puis l'appareil cherche les paramètres optimaux pour la mesure. Au total trois mesures seront effectuées par échantillon, chacune avec 12 à 17 répétitions.

4 Microbalance à cristal de quartz

4.1 Principe

La microbalance à cristal de quartz (*quartz crystal microbalance*, QCM) a été introduite par le physicien allemand G. H. Sauerbrey dans les années 1950.²⁰ Le principe de la QCM repose sur les propriétés piézoélectriques du quartz, utilisé comme substrat de mesure. Ce terme est dérivé du grec *piezein*, qui signifie « presser », et de l'électricité qui est produite par le matériau suite à une contrainte mécanique ou l'application d'une pression. Un tel matériau peut également se déformer s'il est soumis à un potentiel électrique. Les cristaux de quartz sont recouverts sur chaque face d'un film d'or, qui servent d'électrodes (Figure 2.35).²¹ Lors de l'application d'un potentiel électrique, le cristal de quartz vibre à sa fréquence de résonance fondamentale f_r , autour de 5 MHz et les harmoniques, de 15, 25 et 35 MHz dans notre cas. Ces fréquences de résonance sont reliées à la masse du quartz.



Figure 2.35. (a) vue du dessus et (b) du dessous d'un cristal de quartz (gris) avec revêtement en or (jaune). Issu de [21]

Les variations de fréquences Δf , de l'ordre de quelques Hz en général, sont mesurées lors de la variation de masse Δm du cristal de quartz. Dans le cas de films rigides, l'équation de Sauerbrey permet de relier les deux termes comme suit :

$$\Delta m = \frac{-C}{n} \times \Delta f_n = \frac{-C}{n} \times (f_n - f_r)$$

où C est la constante de Sauerbrey du cristal de quartz (elle dépend de son épaisseur et vaut 17.7 ng.cm⁻².Hz⁻¹) ; n est le numéro de l'harmonique (*overtone number*) et f_n est la fréquence mesurée. Cette équation permet de considérer la variation de masse comme une variation de masse du cristal si les conditions suivantes sont respectées : la masse ajoutée (*i*) est faible par rapport à la masse du cristal ; (*ii*) est adsorbée de manière rigide au cristal ; (*iii*) est distribuée de manière homogène sur le cristal.²¹

Dans les années 1980, les chimistes japonais T. Nomura et O. Hattori ont démontré que les mesures de QCM peuvent être réalisées en solution. Ils ont en effet montré qu'un cristal de quartz entièrement immergé pouvait osciller à des fréquences stables permettant de généraliser la méthode dans divers domaines comme la biologie, les polymères, les lipides, les protéines, les nanoparticules etc. Cependant, de tels systèmes moléculaires génèrent un film mou ou viscoélastique à la surface du cristal, ce qui a pour conséquence de ne pas respecter la règle (*ii*) pour la validité de l'équation de Sauerbrey. Ces films présentent une forte dissipation D de l'énergie d'oscillation. La dissipation D est exprimée comme suit :

$$D = \frac{E_{dissipation}}{2\pi \times E_{stockee}}$$

où $E_{dissipation}$ est l'énergie dissipée ; $E_{stockee}$ est l'énergie stockée dans le système. Plus le matériau déposé sur le cristal sera rigide, plus le temps de relaxation sera court et les valeurs de dissipation faibles. Inversement, plus le matériau déposé a des propriétés viscoélastiques, plus le temps de relaxation sera long et les valeurs de dissipation élevées (Figure 2.36a et b). Avec la mesure de la dissipation, il est possible de mesurer la perte d'énergie en enregistrant le temps de relaxation de la courbe d'oscillation après avoir brièvement excité le cristal à sa fréquence de résonance et sur plusieurs harmoniques simultanément. La QCM-D permet de mesurer au cours du temps les variations de fréquence du cristal induites par le film adsorbé à sa surface ainsi que ses propriétés viscoélastiques (densité et viscosité) (Figure 2.36c).²¹

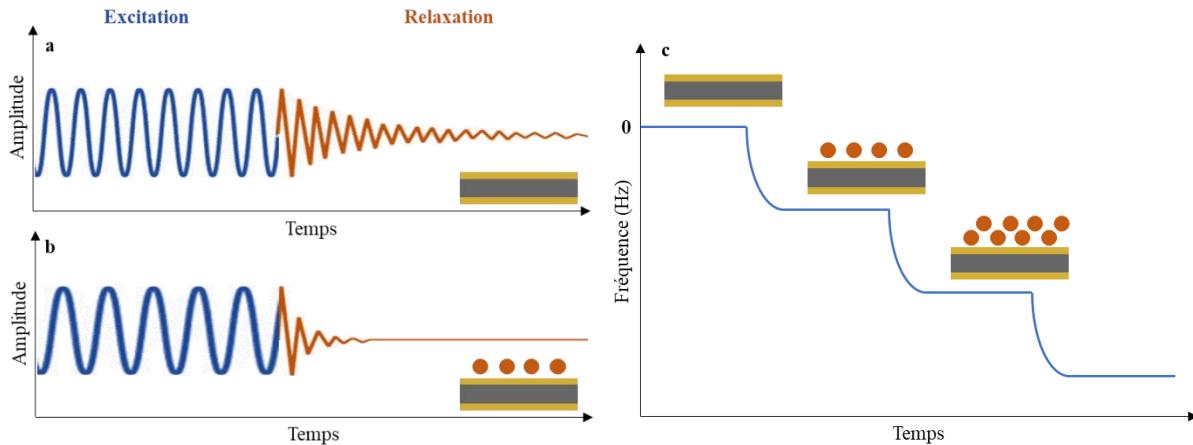


Figure 2.36. Profil d'oscillation d'un cristal de QCM-D (gris : cristal de quartz ; jaune : électrodes) (a) nu et (b) avec adsorption d'un film viscoélastique (ronds marrons). (c) Évolution des variations de fréquences d'un cristal de QCM-D en fonction du temps après ajout d'une, puis deux couches d'un film viscoélastique. Adapté de [21]

Dans une installation de QCM-D, le cristal est installé dans une cellule conçue pour une utilisation en flux, elle-même installée dans une chambre de mesure. Une pompe permet de faire circuler les différents composés dans la cellule fermée, une fois le dépôt fait sur le cristal, les solutions sont récupérées en sortie. Des unités électroniques permettent la mise sous tension du cristal ainsi que le recueil des données, qui sont ensuite acquises sur un ordinateur (Figure 2.37).²¹

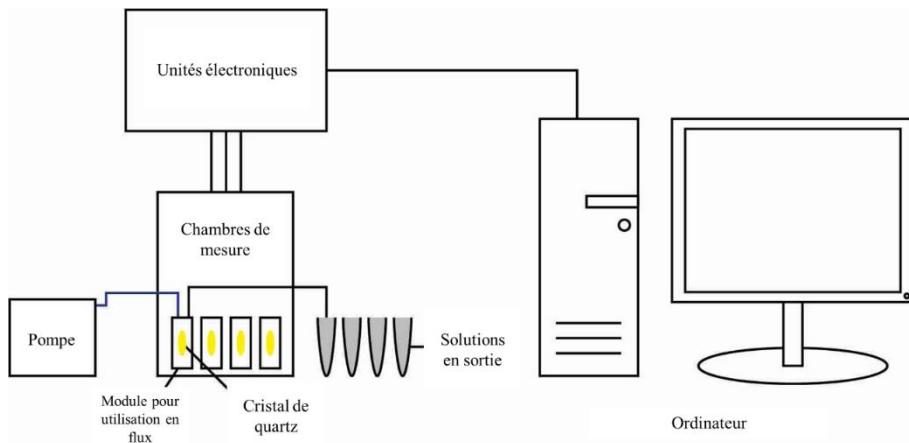


Figure 2.37. Installation d'une QCM-D. Adapté de [20]

4.2 Équipement

Les expériences de QCM-D sont réalisées à l'aide d'un appareil Q-Sense E4 de Q-Sense AB. Les dépôts sont réalisés sur des cristaux de quartz avec revêtement en Ti/Au de 14 mm de diamètre avec une fréquence de résonnance de 5 MHz (QCM5140TiAu120-050-Q) de QuartzPRO. La cellule fait un volume

d'environ 100 μL , et est thermostatée à 22 °C. Le logiciel Qsoft401 permet l'acquisition des variations de fréquences mesurées sur la fréquence fondamentale f_1 à 5 MHz et aux harmoniques f_3 , f_5 , et f_7 respectivement à 15, 25 et 35 MHz. Les données brutes sont ensuite exportées à l'aide du logiciel Qtools, puis $\Delta f_n/n$ est tracé en fonction du temps avec SigmaPlot.

4.3 Suivi par QCM-D des LbL avec plusieurs couches d'enzyme

L'ensemble des solutions utilisées pour les expériences de QCM-D sont rassemblées dans le tableau ci-dessous. La pompe péristaltique injecte 502 μL à un débit de 250 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ dans la cellule de QCM. Avant d'injecter le premier polyélectrolyte, du tampon Borax est déposé sur le cristal jusqu'à stabilisation complète, cette étape peut prendre quelques heures, pour une stabilisation optimale, le cristal est laissé toute la nuit. Le film multicouche **PEI-(PSS-PAH)-PSS-(PAH-AP)_n** (avec n = 1, 2 ou 3) est construit sur le cristal. Pour chaque dépôt de polyélectrolytes, on compte un temps de stabilisation de 5 min, ce temps est de 20 min pour l'**AP**. Chaque dépôt de polyélectrolytes ou d'enzyme est suivi d'une étape de rinçage : du tampon Borax est injecté, ce qui est suivi d'un temps de stabilisation de 5 min. Un exemple de procédure est schématisé sur la Figure 2.38. Lors des rinçages il est important que la valeur en Hz du signal ne dépasse pas la valeur du plateau précédent, cela signifierait que le ou les composés précédemment injectés ont été emportés par le flux, indiquant que le LbL en cours de construction n'est pas viable.

Composé	Concentration	Solvant
PEI		
PSS	10 mg.mL ⁻¹	
PAH		Tampon borax 25 mM
AP		
Fmoc-FFpY	5 mg.mL ⁻¹	

Tableau 2.3. Solutions pour les expériences de QCM-D.

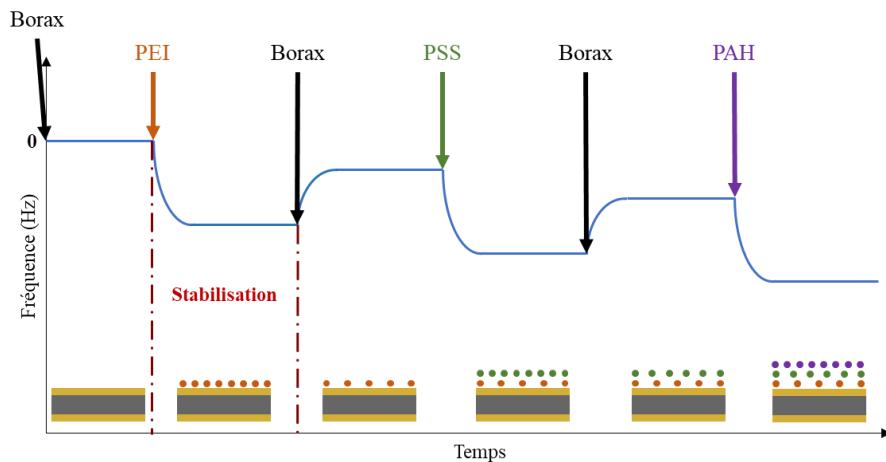


Figure 2.38. Exemple de construction (non complète) d'un film multicouche avec suivi par QCM-D.

5 Construction des LbL

5.1 Préparation des solutions

Les solutions préparées pour la construction des LbL sur les mousses, les *wafers* de silicium ou les lamelles de verre sont les mêmes que pour les expériences de QCM-D (tableau 2.3).

5.2 Sur les mousses de mélamines

5.2.1 Construction des LbL par trempage

Les mousses de mélamine sont découpées à l'aide d'un emporte-pièce de 14 mm de diamètre. L'épaisseur des tranches de mousse est ajustée avec un scalpel pour faire 3.5 mm ou 3 cm en fonction des besoins. Les mousses sont ensuite agitées 1 h dans **mQ-H₂O**, puis 1 h dans **EtOH**, elles sont ensuite séchées 1 h à 80 °C. Les mousses sont ensuite déposées dans un *ozone-cleaner* de BioForce Nanosciences pendant 30 min. Les mousses sont ensuite imprégnées de tampon Borax, puis les LbL sont construits par trempage (*dipping*) dans les différentes solutions de polyélectrolytes, d'enzymes et de peptide (Figure 2.39). En fonction des besoins, les mousses sont ou ne sont pas trempées dans la solution de **Fmoc-FFpY**. Les mousses sont conservées dans du tampon Borax.

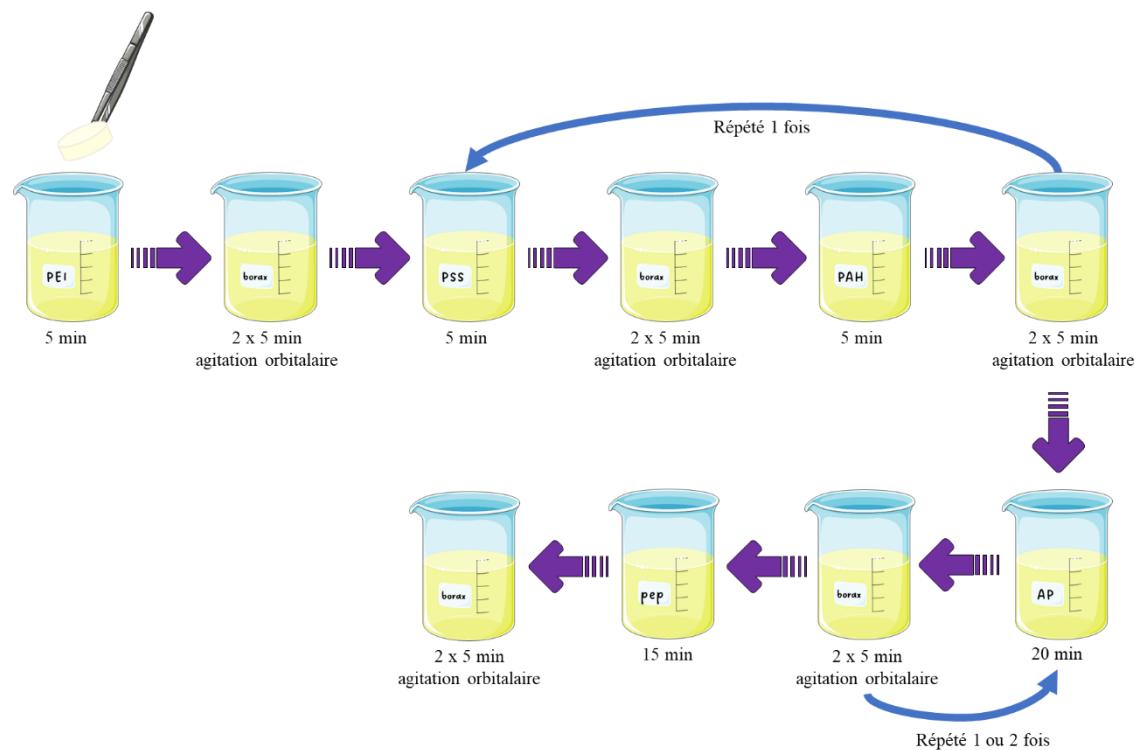


Figure 2.39. Construction des LbL sur les disques de mousse.

5.2.2 Lavage des mousses

Le [Chapitre IV](#) détaille les différentes expériences qui ont été menées avec les mousses catalytiques. Avant de pouvoir les utiliser, celles-ci doivent être lavées avec du tampon Borax (pH 9.5) pour éliminer **AP** non adsorbée sur le matériau ou dans l’hydrogel, le même employé pour la construction des LbL et de l’hydrogel. Les mousses sont disposées dans une cartouche de chromatographie, l’espace restant est comblé par une mousse de mélamine « nue ». Un volume minimum de 200 mL est passé à travers les mousses catalytiques à un débit de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (Figure 2.40). 50 μL de la solution en sortie est récoltée, puis diluée dans un puits d’une microplaquette dans une solution de **pNPP** (env. 1 % en masse, 100 μL , Borax), l’évolution de l’absorbance de cette solution est suivie par spectroscopie UV à 405 nm toutes les minutes pendant 30 min. Si aucune évolution d’absorbance n’est constatée, les mousses sont considérées comme débarrassées de toute enzyme non adsorbée. Si une évolution d’absorbance est constatée, le lavage est répété autant de fois que nécessaire.

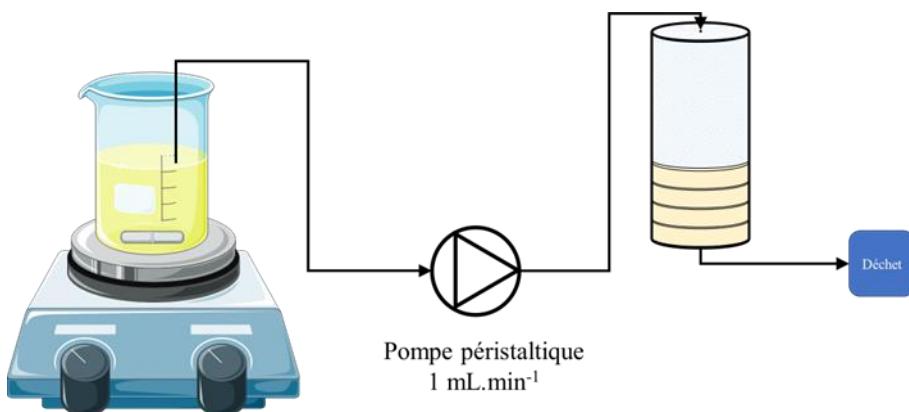


Figure 2.40. Installation pour le lavage des mousses.

5.3 Sur les *wafers* de silicium et lamelles de verre

Les morceaux de silicium sur lesquels sont construits les différents LbL sont obtenus à partir d'un *waffer* de silicium de cristallinité <100>, ils sont dimensionnés afin de pouvoir rentrer dans un puits d'une microplaqué de 24 puits. Les morceaux de silicium sont rayés à l'aide d'une pointe diamant dans le sens de la largeur afin de faciliter la fracture avec la lame de rasoir pour les observations en cryo-SEM (partie 2.4.3). Les lamelles de verres ont un diamètre de 12 mm et ont une épaisseur de 0.16 mm.

La construction des LbL **PEI-(PSS-PAH)-PSS-(PAH-AP)_n** ($n = 1, 2$ ou 3) avec ou sans **Fmoc-FFpY**, est conduite de la même manière. Les supports sont placés à l'*ozone-cleaner* pendant 30 min, puis sont disposés dans une microplaqué de 24 puits (1 puits par support). Les solutions de polyélectrolytes, de tampon, d'enzyme ou de peptide (500 μ L) sont introduites dans les puits à l'aide d'une pipette de 1000 μ L. Les solutions sont retirées avec la même pipette. Les solutions de polyélectrolytes sont laissées 5 min, 20 pour l'**AP**, et le cas échéant 15 min pour le peptide. Les étapes de rinçage sont réalisées en immergeant le support dans du tampon à deux reprises pendant 5 min. Les lamelles de silicium et de verre sont conservées dans du tampon borax avant utilisation.

Références

- [1] P. F. Alewood, R. B. Johns, R. M. Valerio, *Synthesis*, **1983**, 30-31.
- [2] S. Changqing, 2018-12-21, Modified synthesis method of oxidative phosphorylation-L-tyrosine (CN109053797A), Chengdu Baishixing Science and Tech Industry CO Ltd.
- [3] E. A. Ottinger, L. L. Shekels, D. A. Bernlohr, G. Barany, *Biochemistry*, **1993**, 32 (16), 4354-4361. DOI : 10.1021/bi00067a027.
- [4] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, 34 (2), 595-598.
- [5] APPTec, Monitoring of Peptide Coupling and Capping, <https://www.peptide.com/resources/solid-phase-peptide-synthesis/monitoring-of-peptide-coupling-and-capping/>, consulté le 15/10/2022.
- [6] J. Rodon Fores, **2019**, Auto-assemblages localisés assistés par des protéines : du mécanisme aux applications, Thèse, Université de Strasbourg, Strasbourg.
- [7] C. Vigier-Carriere, T. Garnier, D. Wagner, P. Lavalle, M. Rabineau, J. Hemmerlé, B. Senger, P. Schaaf, F. Boulmedais, L. Jierry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 10198-10201. DOI: 10.1002/anie.201504761.
- [8] D. Mertz, **2008**, Films multicoches de polyélectrolytes répondant aux stimuli mécaniques : applications à la libération de molécules et à la biocatalyse contrôlées, Thèse, Université de Strasbourg, Strasbourg.
- [9] A. Weinberger, F.-C. Tsai, G. H. Koenderink, T. F. Schmidt, R. Itri ; W. Meier, T. Schmatko, A. Schröder, C. Marques, *Biophys. J.* **2013**, 105, 154-164. DOI : 10.1016/j.bpj.2013.05.024.
- [10] M. Schmutz, D. Kling, S. Tzartos, A. Brisson, *J. Histochem. Cytochem.* **1994**, 42 (3), 315-327. DOI : 10.1177/42.3.7508471.
- [11] D. B. Murphy, R. Oldfield, S. Schwartz, M.W. Davidson, **2022**, Introduction to Phase Contrast Microscopy, Nikon Instruments Inc. <https://www.microscopyu.com/techniques/phase-contrast/introduction-to-phase-contrast-microscopy>, consulté le 15/10/2022.
- [12] Thermo Fischer Scientific, **2022**, Epifluorescence Microscope Basics, <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/imaging-basics/fundamentals-of-fluorescence-microscopy/epifluorescence-microscope-basics.html>, consulté le 15/10/2022.
- [13] A. D. Elliott, *Curr. Protoc. Cytom.* **2020**, 92 (1), e68. DOI : 10.1002/cpcy.68.
- [14] C. Y. Tang, Z. Yang, Chapter 8 - Transmission Electron Microscopy (TEM), in Membrane Characterization, N. Hilal, A. F. Ismail, T. Matsuura, D. Oatley-Radcliffe, Elsevier, **2017**, 145-159. DOI : 10.1016/B978-0-444-63776-5.00008-5.
- [15] J. Dubochet, M. Adrian, J.-J. Chang, J.-C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowall, P. Schultz, *Q. Rev. Biophys.* **1988**, 21 (2), 129-228. DOI : 10.1017/S0033583500004297.

Chapitre II
Matériels et méthodes

- [16] Thermo Fischer Scientific, **2022**, Principles of Scanning Electron Microscopy, <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/materials-science/learning-center/applications/scanning-electron-microscope-sem-electron-column.html>, consulté le 16/10/2022.
- [17] Nanoscience Instrument, **2022**, Scanning Electron Microscopy , <https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electron-microscopy/>, consulté le 16/10/2022.
- [18] J. Greiser, **2009**, Advances in Cryo-SEM: From Micrometers to Nanometers, CompareNetworks, <https://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/577-Advances-in-Cryo-SEM-From-Micrometers-to-Nanometers/>, consulté le 16/10/2022.
- [19] Malvern Analytical, **2010**, Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes, <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/technical-notes/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction>, consulté le 16/10/2022.
- [20] G. Sauerbrey, *Z. Physik*, **1959**, 155, 206-22. DOI : 10.1007/BF01337937.
- [21] Nanoscience Instrument, **2022**, Quartz Crystal Microbalance (QCM), <https://www.nanoscience.com/techniques/quartz-crystal-microbalance/>, consulté le 16/10/2022.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

Table des matières

Table des matières.....	123
1 Introduction.....	125
1.1 État de l'art concernant l'application du concept de LEASA à des organismes vivants utilisant le système AP/peptides amphiphiles phosphorylés.....	126
1.2 Définition des objectifs et description du plan du Chapitre III	134
2 Synthèse	136
2.1 Synthèse du Fmoc-pY	136
2.2 Synthèse du Fmoc-FF _p Y	137
2.3 Synthèse de la rhodamine-streptavidine	139
3 Processus d'autoassemblage à partir des GUVs, étude par microscopie optique	140
3.1 Modification de la surface des GUVs par l' AP	140
3.1.1 Préparation et caractérisation des GUVs-biot	140
3.1.2 Marquage à la RhodB-strep	141
3.1.3 Préparation et caractérisation des GUVs-AP	142
3.2 Observation de l'autoassemblage de Fmoc-FFY à la surface des GUVs-AP	143
3.2.1 Optimisation de la concentration en précurseur Fmoc-FFpY	143
3.2.2 Suivi de l'autoassemblage au cours du temps par microscopie à contraste de phase et épifluorescence	144
3.2.3 Suivi de l'autoassemblage au cours du temps par microscopie confocale à fluorescence	149
3.2.4 Expériences de contrôle	151
3.3 Expérience d'électroporation : mise en évidence d'une perméabilité transitoire induite par l'autoassemblage de Fmoc-FFY	154
4 Processus d'autoassemblage à partir des SUVs. Étude par cryo-TEM	156
4.1 Choix de la microscopie électronique à transmission en mode cryo	156
4.2 Modification de la surface des SUVs par l' AP	157
4.2.1 Préparation et caractérisation des SUVs constituées de 1 % de phospholipide biotinylé, SUVs-biot₁	157
4.2.2 Préparation et caractérisation des SUVs constituées de 1 % d' AP , SUVs-AP₁	158
4.2.3 Préparation et caractérisation de SUVs constituées de 10 % de phospholipide biotinylé, SUVs-biot₁₀	159
4.3 Suivi de l'autoassemblage de Fmoc-FFY au cours du temps par cryo-TEM	162
4.3.1 Investigations à partir de SUVs-AP₁	162
4.3.2 Approche exploratoire du suivi de la formation de nanofibres au cours du temps	163

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

4.3.3	Vers la mise en évidence des premiers instants de la formation des nanofibres de peptides autoassemblés de Fmoc-FFY	167
5	Conclusions du Chapitre III.....	171
5.1	Porosité induite et localisation de l'autoassemblage à la surface des GUVs	171
5.2	Formation des nanofibres depuis la surface des SUVs et mécanisme du LEASA	171
5.2.1	Nucléation et croissance des nanofibres et leurs interactions avec les SUVs	171
5.2.2	Mécanisme du LEASA depuis la surface de vésicules	172
6	Références.....	175

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

1 Introduction

Comme présenté dans le Chapitre I, le concept de LEASA a fait l'objet de diverses études à la fois fondamentales et applicatives au cours des vingt dernières années.¹ Le contrôle de la localisation spatiale d'une enzyme choisie a permis à mon laboratoire d'accueillir de mettre à profit le concept de LEASA pour la réalisation, entre autres, de substrat d'intérêt pour la culture cellulaire, pour le développement de d'hydrogel thérapeutiques présentant un relargage contrôlé de composés bioactifs ou pour la conception de nouveaux réacteurs chimiques en flux. Dans tous les cas, cela a été rendu possible grâce à la formation d'un hydrogel supramoléculaire à la surface de différents matériaux comme des lamelles de verre, des nanotubes de carbone ou des mousses polymères.

Parmi les activités de recherche s'appuyant sur le concept de LEASA, un domaine a connu un essor très important au cours de la dernière décennie, principalement à cause des possibilités d'applications qu'il laissait entrevoir dans le cadre de traitements antimicrobiens ou anticancéreux. Il s'agit des processus d'autoassemblage de petites molécules induit par des enzymes depuis la surface de cellules, de bactéries, depuis une membrane plasmique ou nucléaire, ou encore depuis la surface d'autres organites cellulaires. En effet, ces interfaces présentent des enzymes transmembranaires pouvant initier des processus d'autoassemblages localisés au sein de systèmes vivants avec des conséquences directes sur le devenir de ces cellules

L'objectif du projet décrit dans ce Chapitre III est double : (i) étudier l'impact de l'autoassemblage de peptides lorsque l'enzyme est ancrée à la surface de vésicules phospholipidiques ; (ii) déterminer le mécanisme de formation des nanofibres de peptides depuis la surface des vésicules. Comme indiqué précédemment, la littérature dans ce domaine peut apparaître déjà abondante et on peut se poser la question de la pertinence de ce projet. Pour répondre à cela, ce chapitre est construit de la façon suivante : tout d'abord, un état de l'art exhaustif dans le domaine du LEASA appliqué à ces systèmes vivants sera décrit et un bilan en sera tiré. Cela permettra de positionner ce projet et d'établir les questions auxquelles nous souhaitons répondre. Puis, les synthèses des outils nécessaires à ce projet seront présentés : (i) le système modèle enzyme/peptide précurseur l'alcaline phosphatase (**AP**)/tripeptide **Fmoc-FFpY** ; (ii) les vésicules phospholipidiques utilisées et la stratégie permettant de les modifier par des enzymes. Enfin l'impact de l'autoassemblage localisé de **Fmoc-FFY** à la surface des vésicules phospholipidiques et son mécanisme constituent le cœur de ce Chapitre III.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

À noter que l'ensemble des travaux concernant les GUVs ont été réalisés en étroite collaboration avec le Dr. André Schröder de mon laboratoire (Équipe M³).

1.1 État de l'art concernant l'application du concept de LEASA à des organismes vivants utilisant le système AP/peptides amphiphiles phosphorylés

Comme présenté dans le Chapitre I, l'application du concept de LEASA a déjà fait l'objet de plusieurs travaux. Il est ainsi possible d'utiliser différentes enzymes immobilisées à la surface de matériaux et d'y initier l'autoassemblage de peptides, ou d'autres molécules, à partir de précurseurs sensibles à l'enzyme choisie.¹

Mon projet de thèse s'appuie sur l'utilisation de l'alcaline phosphatase (AP) et du peptide **Fmoc-FFpY** comme précurseur d'autoassemblage. Ce système modèle a déjà été utilisé par mon groupe pour démontrer l'intérêt du concept de LEASA au sein de matériaux hôtes,² depuis la surface de nanoparticules³ ou d'autres surfaces planes.⁴ Même si il n'existe aucun travail reporté décrivant l'utilisation de ce système pour générer l'autoassemblage depuis la surface de vésicules phospholipidiques, il existe néanmoins des travaux mettant à profit la présence de phosphatases transmembranaires dans des cellules ou des bactéries en présence de peptides précurseurs phosphorylés.⁵ Dans le Chapitre I, cette partie n'a pas été traitée. Un état de l'art de l'ensemble des travaux impliquant une phosphatase comme initiateur d'autoassemblage, présente en surface ou localisée à l'intérieur de cellules, est décrit en dans la suite de cette partie 1.1.

De tels travaux ont été reportés pour la première fois en 2007 par Yang *et al.* Des bactéries modifiées afin de surexprimer l'**AP** ont été incubées en présence du peptide **Nap-ffpy** (**Nap** = naphtalène), composé d'acides aminés *D* (les lettres correspondantes aux acides aminés sont écrites en minuscule pour les différencier des acides aminés *L*). Ils ont mis en évidence que la déphosphorylation de **Nap-ffpy** en **Nap-ffy** a lieu à l'intérieur de la bactérie où se produit donc l'autoassemblage du dipeptide (Figure 3.1a). L'autoassemblage au sein des bactéries est révélé par microscopie à fluorescence en présence de Rouge Congo (Figure 3.1b). L'utilisation du *D*-peptide **Nap-ffpy** présente des propriétés antibactériennes puisque son IC₅₀ a été évaluée à 2.77 µM contre *E. coli* surexprimant l'**AP**.⁶

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

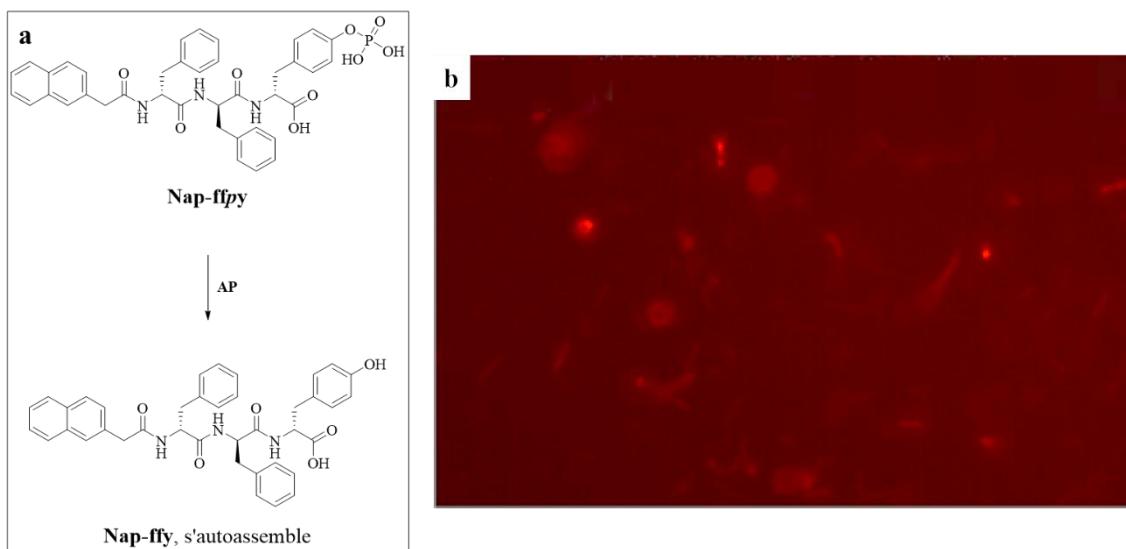


Figure 3.1. (a) *D*-peptide **Nap-ffpy** déphosphorylé par l'**AP** en **Nap-ffy** qui s'autoassemble. (b) *E. coli* surexprimant l'**AP** observées après incubation de **Nap-ffpy** et de Rouge Congo, observé par microscopie à fluorescence, aucune échelle ou dimension d'image n'a été précisée par les auteurs. Reproduit avec la permission de WILEY-VCH depuis la référence [6].

En 2013, M. Hughes et *al.* se sont également intéressés aux propriétés antibactériennes d'autoassemblages de plusieurs dipeptides aromatiques amphiphiles. Tous les peptides étudiés possèdent un groupement **Fmoc** en position N-terminale et une tyrosine phosphate qui rend le peptide sensible à l'**AP** (**Fmoc-FpY** et **Fmoc-pYX**, Figure 3.2a avec **X = T, S, N et Q**). Une fois déphosphorylés, les dipeptides obtenus (**Fmoc-FY** et **Fmoc-YX** respectivement) s'autoassemblent sous la forme de nanofibres. Ces dipeptides ont été testés sur des bactéries *E. coli* modifiée pour surexprimer l'**AP** à leur surface, rendant possible l'autoassemblage des peptides localement. Le test de viabilité bactérienne montre que tous les peptides ont une activité antimicrobienne car une diminution de 15 à 35 % de bactéries vivantes est observée pour l'ensemble des précurseurs utilisés (Figure 3.2b).⁷

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

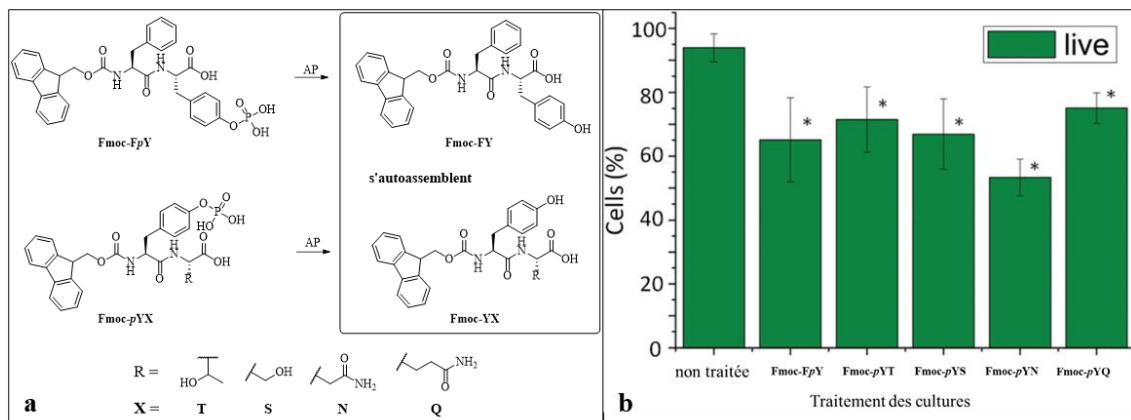


Figure 3.2. (a) Peptides aromatiques amphiphiles phosphorylés étudiés par Hugues et al. et leurs dérivés déphosphorylés après action de l’AP. (b) Résultats des tests de viabilité cellulaire avec les peptides **Fmoc-FpY** et **Fmoc-pYX**. Reproduit avec la permission de la Royal Society of Chemistry depuis la référence [7].

En 2012 Gao *et al.* ont développé un peptide amphiphile phosphorylé incluant dans sa structure un groupement fluorescent, le 4-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (**NBD**). Celui-ci confère au peptide **Nap-FFK(NBD)pY** la particularité de fluorescer intensément lorsqu'il s'autoassemble⁸ sous la forme **Nap-FFK(NBD)Y**, après déphosphorylation par l’AP (Figure 3.3a). Ce peptide a été utilisé en présence de cellules cancéreuses de type HeLa pour déterminer dans quelle(s) partie(s) des cellules se trouvent les phosphatases, qui sont naturellement surexprimées dans les cellules tumorales. Pour ce faire, les cellules HeLa sont incubées avec le peptide **Nap-FFK(NBD)pY** puis observées par microscopie confocale sur une période de 5 minutes. La fluorescence du **Nap-FFK(NBD)Y** se concentre dans le cytoplasme des cellules et au niveau de leur membrane, ceci met en évidence les zones des cellules dans lesquelles l'autoassemblage est localisé et donc par extension où les phosphatases sont majoritairement présentes (Figure 3.3b). Par ailleurs, des tests de viabilité cellulaire ont été effectués sur la même souche de cellules cancéreuses en présence de concentrations croissantes en **Nap-FFK(NBD)pY** allant jusqu'à 500 µM. Pour toutes les concentrations de **Nap-FFK(NBD)pY** plus de 80 % des cellules survivent après trois jours, ce qui fait de ce peptide un mauvais candidat anticancéreux, mais un marqueur d'intérêt pour étudier l'organisation interne de ce type de cellules (Figure 3.3c).⁹

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

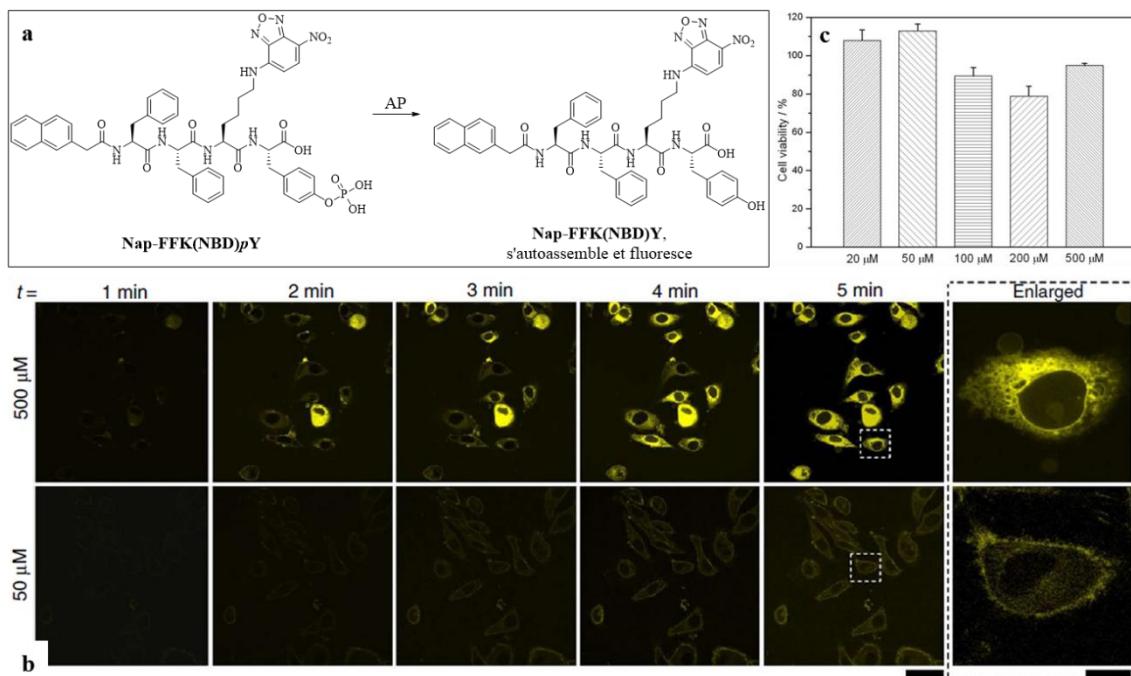


Figure 3.3. (a) Précurseur **Nap-FFK(NBD)*p*Y** développé par Y. Gao *et al.* déphosphorylé par l'**AP** pour conduire au composé **Nap-FFK(NBD)Y**. (b) Clichés de cellules cancéreuses HeLa pris par microscopie confocale 1, 2, 3, 4 et 5 min après ajout du **Nap-FFK(NBD)*p*Y** à 50 et 500 μ M. Fluorescence du **NBD** colorisée en jaune ($\lambda_{\text{em}} = 539 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ex}} = 466 \text{ nm}$). Barres d'échelle = 50 μ m pour le zoom sur la cellule et 10 μ m sur le plan large. (c) Test de viabilité cellulaire du **Nap-FFK(NBD)*p*Y** (à 20, 50, 100, 200 et 500 μ M) sur des cellules HeLa après trois jours d'incubation. Issu de [9].

En 2013, Li *et al.* ont confirmé la possibilité d'imager l'intérieur de cellules et de suivre leurs évolutions au cours du temps. De plus, en utilisant un peptide de structure moléculaire adéquate, ils ont démontré les propriétés anticancéreuses sur des cellules HeLa. Le *D*-peptide précurseur utilisé comporte un motif Taxol, qui est le principe actif anticancéreux positionné, sur la chaîne latérale d'une *D*-lysine. Ce peptide, le **Nap-ffk(Taxol)py** (Figure 3.4a), s'autoassemble une fois déphosphorylé par l'**AP**, présente dans les cellules HeLa, en un hydrogélateur **Nap-ffk(Taxol)y** (Figure 3.4a). L' IC_{50} de ce peptide, 61.9 nM, a été comparée à celle du Taxol, 45.8 nM, et de l'homologue *L*-peptide, 105.9 nM (Figure 3.4b).¹⁰

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

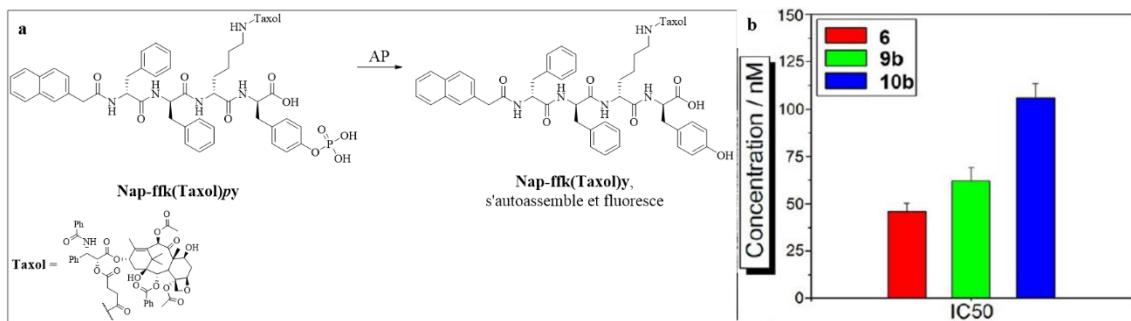


Figure 3.4. (a) Précurseur **Nap-ffk(Taxol)py** développé par J. Li *et al.* déphosphorylé par l'**AP** pour conduire au composé **Nap-ffk(Taxol)y**. (b) Comparaison des différentes **IC₅₀** mesurées, **6** = Taxol, **9b** = **Nap-ffk(Taxol)py**, **10b** = **Nap-FFK(Taxol)py**. Reproduit avec la permission de l'American Chemical Society depuis la référence [10].

L'engouement pour ce type d'approche dans le cadre de thérapie anticancéreuse s'est alors accentué. En 2016, Wang *et al.* ont synthétisé une tyrosine phosphate conjuguée à un motif cholestérol **pY-chol**, qui a la capacité de s'autoassembler une fois déphosphorylé en **Y-chol** (Figure 3.5 haut). Le composé **pY-chol** a ensuite été testé sur cellules cancéreuses ovariennes résistantes au platine (A2780cis) pour démontrer ses propriétés anticancéreuses. Les cellules A2780cis surexpriment l'**AP** sur leur membrane. En les incubant avec **pY-chol**, celui-ci va être déphosphorylé en **Y-chol**, puis va ensuite s'autoassembler. C'est cet autoassemblage initié depuis la membrane des cellules cancéreuses qui va provoquer leur nécrose. Les tests de viabilité cellulaire montrent que la quasi-totalité des cellules sont mortes après 1 jour d'incubation avec **pY-chol** à des concentrations de 25, 50 et 100 µM (Figure 3.5 bas).¹¹

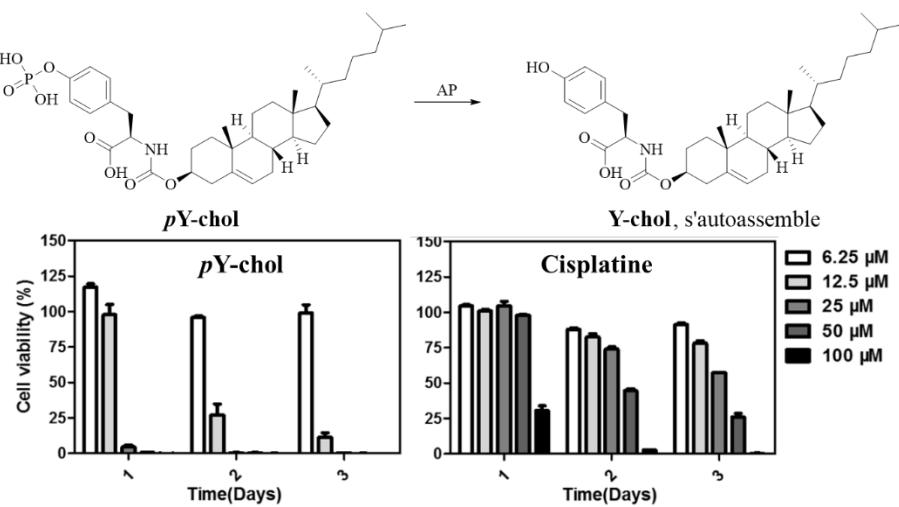


Figure 3.5. (haut) Déphosphorylation par l'**AP** du **pY-chol** en **Y-chol** développée par Wang *et al.* (bas) Tests de viabilité sur les cellules cancéreuses A2780cis traitées par **pY-chol** et par le cisplatine à 24, 48 et 72 h. Reproduit avec la permission de l'American Chemical Society depuis la référence [11].

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

Un *D*-peptide contenant le fluorophore **NBD** et un motif naphtalène, **NBD-a(Nap)-ffpy** (Figure 3.6a), a été élaboré en 2016 par Zhou *et al.* puis évalué sur des cellules cancéreuses HeLa et HS-5. Ces expériences ont permis de localiser les zones où se concentre l'autoassemblage (Figure 3.6b) de **NBD-a(Nap)-ffy** après déphosphorylation par l'**AP** (Figure 3.6a) présente dans les cellules cancéreuses. Ceci fait de ce peptide un outil d'intérêt pour le marquage cellulaire.¹²

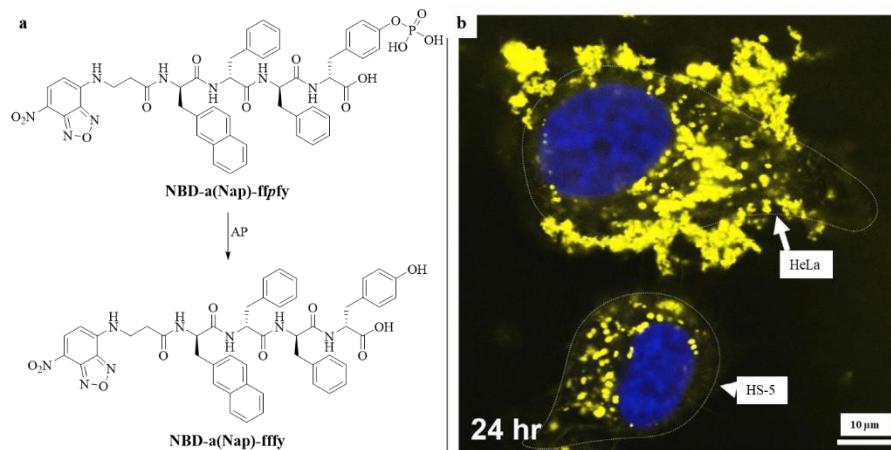


Figure 3.6. (a) *D*-peptide **NBD-a(Nap)-ffpy** développé par Zhou *et al.* déphosphorylé par l'**AP** en **NBD-a(Nap)-ffy**. (b) Cellules HeLa et HS-5 observées en fluorescence après 24 h d'incubation avec **NBD-a(Nap)-ffpy**. Reproduit avec la permission de Elsevier depuis la référence [12].

Feng *et al.* ont rapporté en 2019 l'utilisation d'un tétrapeptide phosphorylé porteur d'un motif naphtalène en position N-terminale **Nap-FFpYE(OMe)₂**, qui, une fois déphosphorylé par l'**AP**, conduit au composé **Nap-FFYE(OMe)₂** (Figure 3.7a). Ce peptide a été mis en contact avec des cellules cancéreuses d'ostéosarcome (Saos-2), qui surexpriment l'**AP** à l'intérieur et à l'extérieur de leur membrane. Plus de 60 % des cellules meurent en 30 min avec une concentration en peptide précurseur de 100 μM (Figure 3.7b). Des cellules métastatiques Saos2-luc et Saos2-lung ont été injectées dans des souris, puis les tumeurs sont traitées pendant 4 semaines avec le **Nap-FFpYE(OMe)₂**, ou une solution saline pour les expériences de contrôle. L'évolution du volume des tumeurs est ensuite suivi sur cette même période. Les tumeurs Saos2-luc et Saos2-lung des souris traitées avec le peptide phosphorylé sont respectivement 8 et 25 fois moins volumineuses que celles traitées avec la solution saline (Figure 3.7c). Ceci démontre les propriétés anticancéreuses du peptide **Nap-FFpYE(OMe)₂**.¹³

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

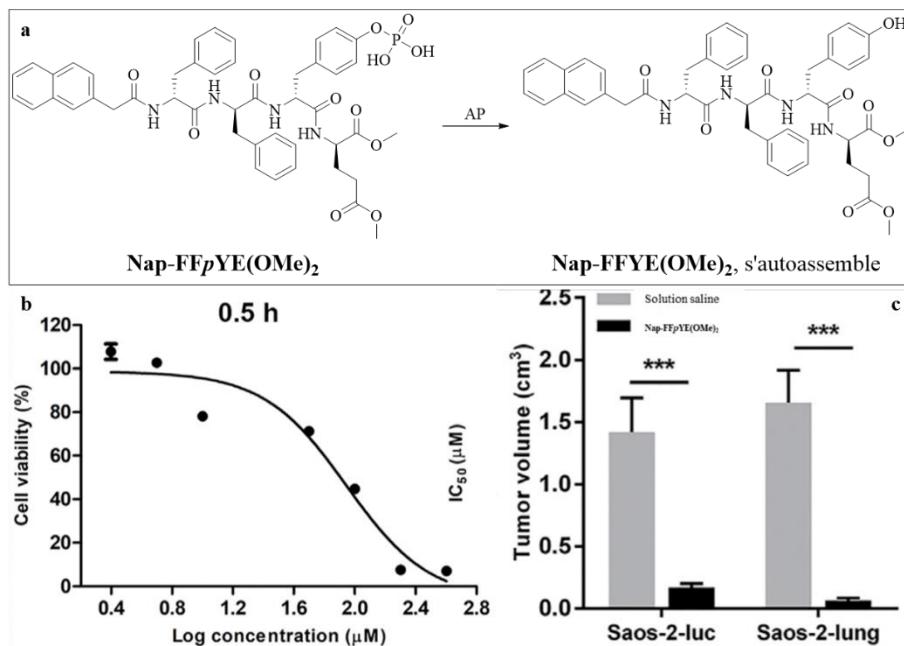


Figure 3.7. (a) Structure du Nap-FFpYE(OMe)₂ déphosphorylé par l'AP formant le Nap-FFEYE(OMe)₂ qui s'autoassemble. (b) Test de viabilité cellulaire du Nap-FFpYE(OMe)₂ à différente concentration sur des cellules Saos-2 pendant 30 min (c) Comparaison des volumes des tumeurs de Saos2-luc et Saos2-lung traitées pendant 4 semaines avec une solution saline et Nap-FFpYE(OMe)₂. *** : $p < 10^{-3}$. Reproduit avec la permission de Elsevier depuis la référence [13].

Il est à noter que l'utilisation d'une glucosamine phosphorylée s'est également révélée d'intérêt dans le cadre de traitements anticancéreux utilisant le concept de LEASA.¹⁴ D'autre part, il a également été rapporté que ce concept pouvait être mis à profit dans des traitements antitumoraux utilisant un autre type d'enzyme que des phosphatases, en l'occurrence des métalloprotéases, également surexprimées par des cellules cancéreuses.¹⁵

Plus récemment, en 2022, C. Wu *et al.* ont mis au point un *D*-peptide original. Il se compose d'un motif pyrène (**Py**) en position *N*-terminale qui garantit une émission de fluorescence au peptide lorsqu'il s'autoassemble dû à la formation de l'excimère du **Py**. Le peptide **Py-ffeyg-Lyso** (**e** = *D*-acide glutamique, **g** = glycine) se termine en position *C*-terminale par un motif morpholine (**Lyso**), qui est connu pour pénétrer aisément les lysosomes et ainsi engendrer leur dégradation (Figure 3.8a). Si ces lysosomes sont chargés en agents thérapeutiques, leur dégradation conduit au relargage de ces agents et à leurs actions. Les auteurs proposent d'utiliser des lysosomes qui pénètrent toutes les cellules. Cependant, puisque les cellules cancéreuses surexpriment l'**AP** sur leur membrane plasmique, l'enzyme déphosphoryle le peptide pour former **Py-ffeyg-Lyso**. Les nanofibres de **Py-ffeyg-Lyso** vont alors pénétrer la cellule cancéreuse puis les lysosomes grâce au motif morpholine présent. Ceci va engendrer la destruction des lysosomes, puis la mort des cellules. L' IC_{50} du peptide a été évaluée à $80.1 \pm 6.6 \mu\text{M}$ après trois jours d'incubation avec des cellules

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

HeLa (Figure 3.8b). Le **Py-ffeyg-Lys**o est efficace sur des tumeurs de souris, en effet les tumeurs traitées sont environ trois fois moins volumineuses comparées aux tumeurs que l'expérience de contrôle (Figure 3.8c et d).¹⁶

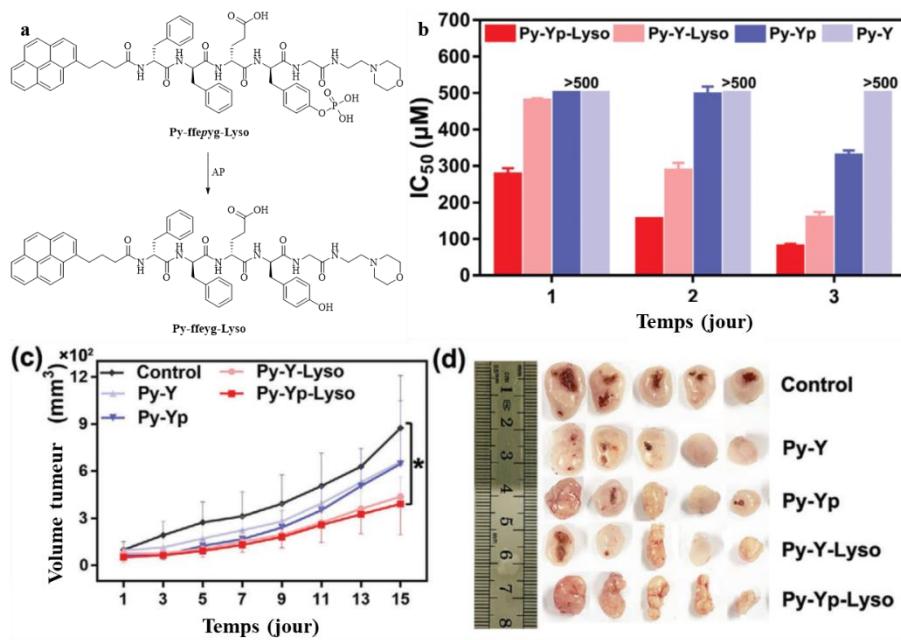


Figure 3.8. (a) D-peptide Py-ffeyg-Lys^o conçu par C. Wu *et al.* déphosphorylé par l'AP en Py-ffeyg-Lys^o hydrogélateur. (b) IC₅₀ vis-à-vis des cellules HeLa de Py-ffeyg-Lys^o (Py-Yp-Lys^o), Py-ffeyg-Lys^o (Py-Y-Lys^o), Py-ffeyg (Py-Yp) et Py-ffeyg (Py-Y) après un, deux et trois jours. (c) Évolution du volume des tumeurs de souris traitées avec Py-Yp-Lys^o, Py-Y-Lys^o, Py-Yp, Py-Y comparé au contrôle pendant quinze jours et (d) photographies des mêmes tumeurs à différents stade de l'expérience. Reproduit avec la permission de Wiley-VCH depuis la référence [16].

On dénombre quatorze articles utilisant le concept de LEASA dans des systèmes vivants, publiés principalement par un seul groupe, celui du Pr. Bing Xu de Brandeis University aux États-Unis. Ces différents travaux montrent que le concept de LEASA s'applique particulièrement bien dans des systèmes vivants. Plus précisément, grâce à la présence de l'AP et l'utilisation de précurseurs phosphorylés de nature peptidique, il est possible d'imager l'intérieur de cellules au cours du temps, de provoquer la mort de bactérie ou de cellules cancéreuses. En dehors du dernier article cité ci-dessus,¹⁶ aucun des travaux mentionnés ne discutent des effets de l'autoassemblage sur les propriétés morphologiques et physico-chimiques de la membrane cellulaire et de son mécanisme de formation. S'intéresser à ces aspects est particulièrement important pour la conception d'approches biomédicales plus performantes mais cela est très difficile car les cellules ou les bactéries sont des systèmes très complexes. Si bien que l'ensemble de ces études décrivent d'une part, un peptide conçu puis mis en présence de cellules ou de bactéries et d'autre part, observent les conséquences sur le devenir cellulaire. Il y a un ensemble de suppositions qui permettent de schématiser un mécanisme sans avoir été vérifiées ou étudiées.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

Dans le cadre de ma thèse, nous avons choisi de mettre en place le LEASA à partir de structures modèles mimant les membranes cellulaires : des vésicules unilamellaires géantes et petites (GUVs et SUVs) fabriquées à partir de phospholipides.¹⁷ L'idée est d'étudier les événements entre le moment de la mise en contact avec le peptide précurseur et le devenir des vésicules. La définition plus précise des objectifs de ce projet est décrite en partie 1.2.

1.2 Définition des objectifs et description du plan du Chapitre III

Avant de procéder à l'étude de l'autoassemblage du peptide **Fmoc-FFY** il a été nécessaire de synthétiser son précurseur **Fmoc-FFpY** en quantité suffisante pour pouvoir travailler avec un seul lot. Celui-ci a été obtenu *via* une approche synthétique sur support solide utilisant la tyrosine phosphate protégée par un groupement **Fmoc** sur l'amine terminale, **Fmoc-pY**. Ce composé est très onéreux. Son prix pour 1 kg varie de 140 à 250 k€, en fonction du fournisseur et de sa pureté.¹⁸⁻²¹ Comme le **Fmoc-pY** entre également dans la préparation d'autres peptides phosphorylés utilisés dans mon groupe, il a été proposé (*i*) d'établir un protocole de synthèse reproductible, (*ii*) de générer au moins 10 g de ce composé pouvant être stockés dans notre laboratoire, et (*iii*) présentant une pureté supérieure à 98 %. Cette mission a fait l'objet d'un sujet de stage proposé à une étudiante en IUT que j'ai encadrée. Les résultats de ces investigations seront présentés dans ce Chapitre III ainsi que la synthèse du **Fmoc-FFpY**.

D'autre part, il est essentiel de disposer de vésicules présentant l'AP sur la surface extérieure de leur membrane. J'ai donc préparé (*i*) des GUVs en suivant la méthode de *gel-assisted film hydration*²² à partir du 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (**DOPC**), et (*ii*) des SUVs avec la méthode de sonication-extrusion à partir du même phospholipide. Pour permettre l'ancre de l'AP à la surface des vésicules, nous avons établis une stratégie basée sur l'interaction biotine-streptavidine²³ : j'ai introduit des groupements biotines par le biais du 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[biotinyl(polyethylene glycol)-2000] (**DSPE-PEG-Biotin**), commercialement disponible. La présence de motifs biotine à la surface des vésicules rend possible l'interaction avec la streptavidine conjugué à l'**AP** (**AP-strep**), un composé commercialement disponible. Pour rendre les GUVs observables en microscopie confocale j'y ai ajouté un phospholipide fluorescent porteur d'un motif rhodamine, le 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) nommé **16:0 Liss Rhod PE**. La stratégie ainsi mise en place pour générer des nanofibres de **Fmoc-FFY** à la surface des vésicules modifiées par des motifs biotine est représentée sur la Figure 3.9.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

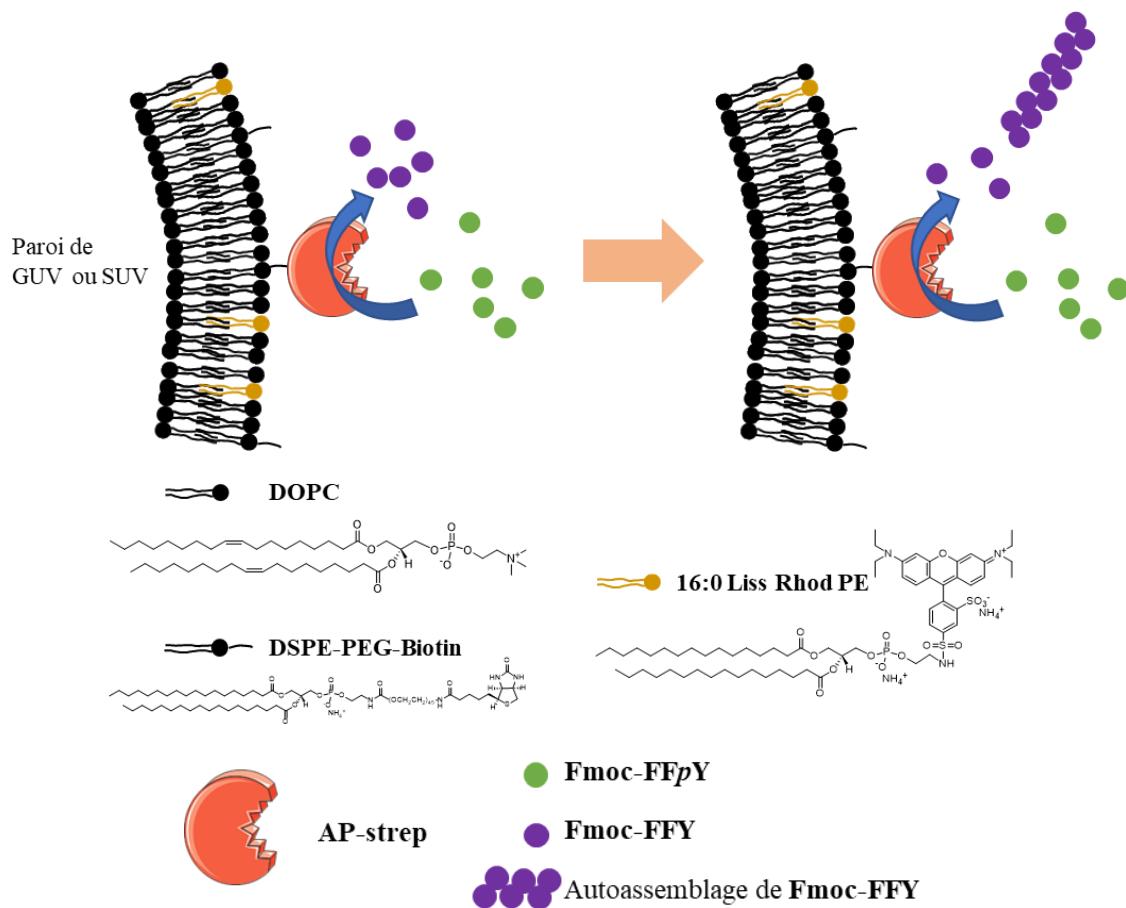


Figure 3.9. Représentation schématique de l'autoassemblage de **Fmoc-FFY** formée grâce à l'**AP** ancrée sur la membrane extérieure d'une GUV ou d'une SUV (à noter que ces dernières ne contiennent pas de **16:0 Liss Rhod PE**). Structures chimiques des différents phospholipides utilisés.

Ce projet de thèse a pour objectif de mettre en place un LEASA original **AP/Fmoc-FFpY** à partir de la surface de membranes de vésicules phospholipidiques et d'observer l'autoassemblage de **Fmoc-FFY** et d'en étudier les effets sur les différents types de vésicules. En partie 2 je décrirai la synthèse des différents composés d'intérêt pour le projet. Je montrerai la faisabilité et l'efficacité de la fonctionnalisation des GUVs avec l'**AP** via l'introduction du groupement biotine en partie 3.1. La partie 3.2 sera consacrée aux différentes expériences de microscopie à contraste de phase, à épifluorescence et confocale mises en place pour observer l'autoassemblage et ses effets sur les GUVs. La fabrication et la fonctionnalisation des SUVs ainsi que les expériences menées en cryo-TEM pour observer les nanofibres en présence des vésicules seront traitées dans les parties 4.1 à 4.4. Finalement ce projet a pour but d'apporter des réponses aux questions suivantes :

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

- (1) Est-il possible de mettre en place le LEASA **AP/Fmoc-FFpY** à partir de la membrane de vésicules phospholipidiques ?
- (2) Sous quelle forme l'autoassemblage de **Fmoc-FFY** sera-t-il observable depuis la surface des GUVs et des SUVs ?
- (3) Quel impact l'autoassemblage de **Fmoc-FFY** peut-il avoir sur les propriétés morphologiques et physico-chimiques des vésicules ?
- (4) Quel est le mécanisme du LEASA à partir de tels objets ?

2 Synthèse

2.1 Synthèse du **Fmoc-pY**

L'établissement d'une voie d'accès à la **Fmoc-pY**, a été le sujet de stage d'une élève de DUT que j'ai encadrée pendant un peu plus de deux mois. L'acide aminé est obtenu en deux étapes, la première étant une réaction de phosphorylation et la seconde une protection de la fonction amine (Figure 3.10).

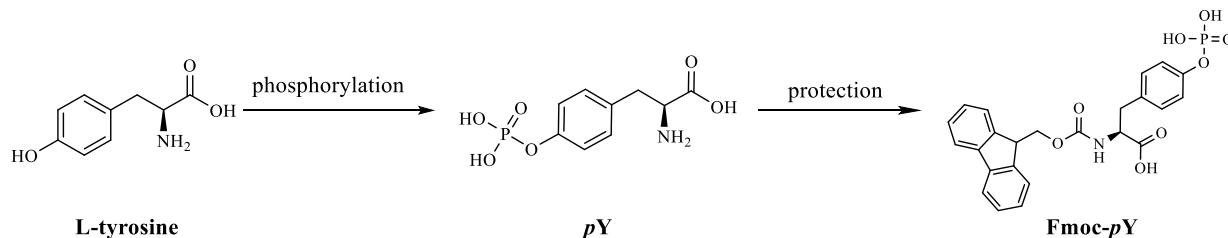


Figure 3.10. Voie d'accès à la Fmoc-pY en deux étapes à partir de la L-tyrosine.

Nous avons dans un premier temps tenté de reproduire le mode opératoire de la phosphorylation décrit par P. F. Alewood *et al.*²⁴ Malheureusement, il ne nous a pas été possible d'isoler la tyrosine phosphate (**pY**) par précipitation comme décrit. La mise en place d'un suivi par HPLC nous a permis de mettre en évidence une conversion incomplète de la *L*-tyrosine en **pY**. Nous avons donc décidé d'adapter et d'optimiser les conditions décrites dans un brevet déposé par S. Changqinq,²⁵ comme présenté dans la Figure 3.11. L'étape de phosphorylation de la *L*-tyrosine est alors réalisée sous atmosphère inerte en présence d'hémipent oxyde de phosphore (P₄O₁₀) et d'acide phosphorique concentré (H₃PO₄ conc.) à 80 °C pendant 48 h. Un premier suivi HPLC montre une conversion incomplète, 0.7 eq. de P₄O₁₀ sont alors

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

ajoutés. Le suivi par HPLC atteste d'une conversion complète 24 h plus tard. Le mélange réactionnel est alors d'abord traité par ajout d'eau à 80 °C puis par l'ajout d'ammoniaque concentré (NH₄OH conc.) à 0°C conduisant à la précipitation de **pY**. La suspension obtenue est filtrée et lavée successivement avec de l'eau glacée, de l'éthanol et de l'éther diéthylique. Le solide blanc est ensuite séché sous vide, ce qui nous a permis d'obtenir la **pY** avec un rendement de 69 %.

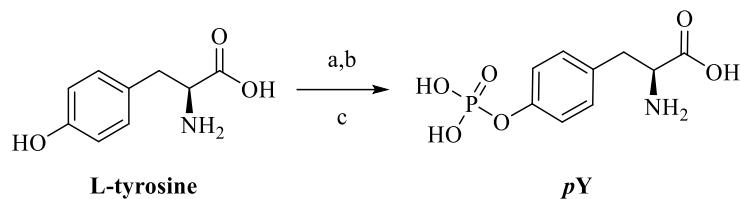


Figure 3.11. Phosphorylation de la *L*-tyrosine adaptée de [25]. a) P₂O₁₀, H₃PO₄ conc. 80 °C, 48 h, b) P₂O₁₀ (0.7 eq.), 80 °C, 24 h, c) NH₄OH conc. H₂O, 0 °C, 30 min.

L'étape de protection de la fonction amine est ensuite réalisée en adaptant les conditions décrites par E. A. Ottinger *et al.*²⁶ Cela consiste à ajouter à la **pY** de l'ester de Fmoc *N*-hydroxysuccinimide (**Fmoc-OSu**) en présence de triéthylamine dans un mélange eau/acetonitrile, à température ambiante pendant 24 h (Figure 3.12). Le brut obtenu est ensuite purifié par chromatographie automatisée en phase inverse, ce qui nous a permis d'isoler la **Fmoc-pY** avec un rendement global de 32 % en deux étapes.

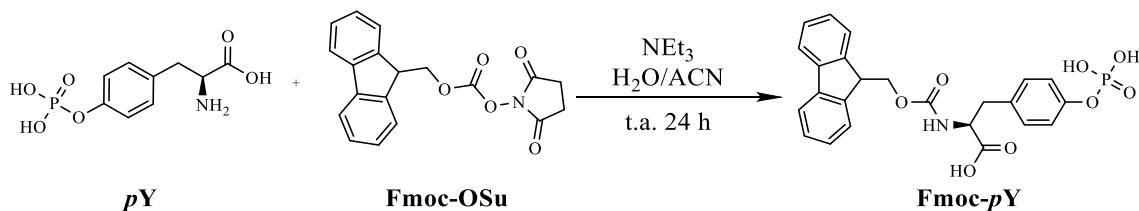


Figure 3.12. Étape de protection de la **pY**. Adapté de [26].

La **Fmoc-pY** ainsi obtenue a été caractérisée par RMN du proton (¹H-RMN) et du phosphore (³¹P-RMN). L'analyse HPLC a mis en évidence une pureté du produit synthétisé supérieure à 98 % (Chapitre II).

2.2 Synthèse du Fmoc-FFpY

La synthèse du précurseur d'autoassemblage **Fmoc-FFpY** est réalisée *via* une synthèse sur support solide (Figure 3.13).²⁷ La première étape est l'insertion de la **Fmoc-pY** sur la résine 2-chlorotrityl chloride

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

(CTC) en présence de diisopropyléthylamine (DIPEA) dans le dichlorométhane (DCM), à température ambiante pendant 3 h. Après des lavages, l'acide aminé phosphorylé inséré sur la résine est déprotégé avec de la pipéridine à 20 % dans le diméthylformamide (DMF). Un test de Kaiser est réalisé sur quelques billes de résine pour s'assurer de l'efficacité de la déprotection, un passage du jaune vers le bleu est observé. Le couplage suivant est ensuite mis en place avec de la *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*L*-phenylalanine (Fmoc-F) ; du hexafluorophosphate de benzotriazole tétraméthyluronium (HBTU) et du hydroxybenzotriazole (HOBr) comme agents de couplage ; de la DIPEA comme base ; dans le DMF à température ambiante pendant 3 h. Après lavage successifs au DMF et DCM, un nouveau test de Kayser est réalisé, les billes de résines restent jaune, ce qui indique que le couplage est complet. Ce premier couplage peptidique est suivi par une nouvelle étape de déprotection, dans les mêmes conditions, puis d'un dernier couplage avec du Fmoc-F. La séquence peptidique est ensuite clivée de la résine en utilisant un mélange acide trifluoroacétique/eau/triisopropylsilane (TFA/H₂O/TIPPS) (95/5/5) à température ambiante pendant 3 h. La suspension est ensuite filtrée afin de retirer les billes de résine, le filtrat obtenu est concentré à l'évaporateur rotatif, et le résidu précipité avec de l'éther diéthylique. Le solide est filtré puis séché sous vide. Ceci nous a permis d'obtenir le peptide **Fmoc-FFpY** avec un rendement de 28 %.

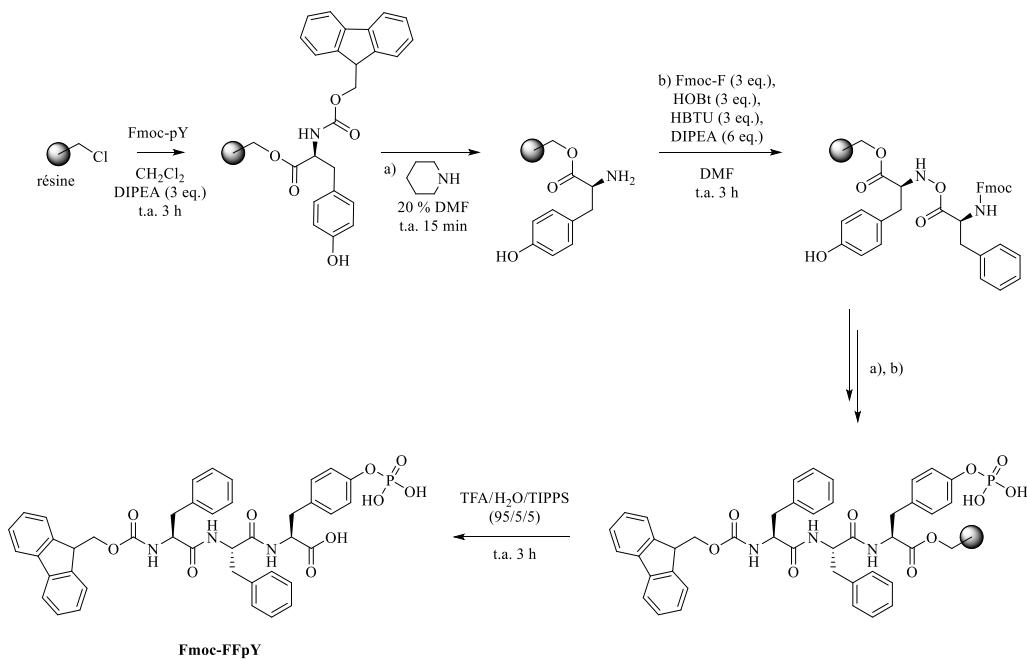


Figure 3.13. Synthèse du **Fmoc-FFpY** via la synthèse sur support solide avec de la résine CTC.

Le **Fmoc-FFpY** ainsi obtenu a été caractérisé par ¹H-RMN / ³¹P-RMN, en spectrométrie de masse ainsi qu'en HPLC pour s'assurer de sa pureté (Chapitre II).

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

2.3 Synthèse de la rhodamine-streptavidine

La streptavidine marquée à la rhodamine B (**RhodB-strep**) est obtenue par réaction de la streptavidine sur la rhodamine B isothiocyanate en présence de carbonate de sodium (Na_2CO_3) dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), à 4 °C pendant 4 h (Figure 3.14). Le milieu réactionnel est ensuite dialysé pendant plusieurs heures dans des bains successifs d'eau et de solution de NaCl puis encore une fois pour plusieurs jours dans l'eau. La solution dialysée est ensuite lyophilisée.²⁸ Le lyophilisat a été utilisé pour les expériences de microscopie à épifluorescence.

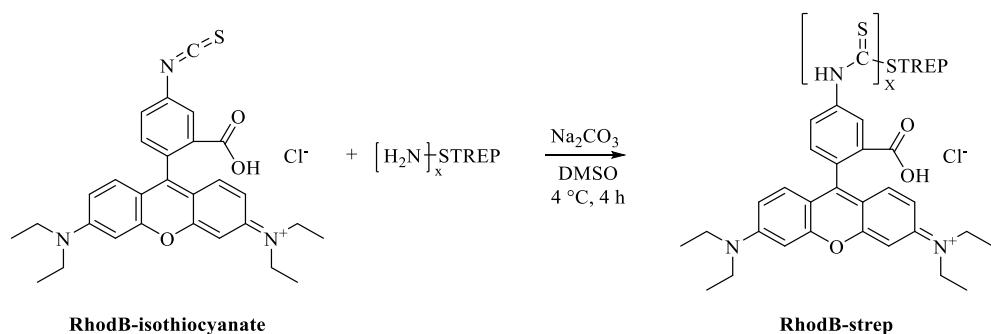


Figure 3.14. Synthèse de la RhodB-strep. Adapté de [28]

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

3 Processus d'autoassemblage à partir des GUVs, étude par microscopie optique

3.1 Modification de la surface des GUVs par l'AP

3.1.1 Préparation et caractérisation des GUVs-biot

Les GUVs constituées à 100 % de **DOPC** sont préparées en suivant la méthode décrite dans le Chapitre II. Une film de **DOPC** est formé sur un gel d'alcool polyvinyle (PVA) supporté sur une lamelle de verre. Un puits est construit autour de la zone de dépôt afin d'immerger le film phospholipidique dans une solution de sucre pendant 3 h. Cette solution est ensuite prélevée et transférée dans une solution de glucose dans lesquelles les GUVs vont sédimer. Celles-ci ont été ensuite observées en microscopie à contraste de phase (Figure 3.15 *gauche*). Les GUVs sont de forme sphérique et apparaissent plus foncées que le milieu de l'échantillon : c'est le contraste de phase. Ceci est dû à la différence de composition, qui induit une différence d'indice de réfraction entre le milieu dans les vésicules riche en sucre et celui de l'échantillon qui est riche en glucose.^{22,29} On obtient un diamètre moyen des GUVs de $12 \pm 4 \mu\text{m}$ (Figure 3.15 *droite*). La valeur élevée de l'écart-type témoigne de la grande polydispersité obtenue. En effet, on observe également des GUVs ayant plus de $30 \mu\text{m}$ de diamètre. Les GUVs ainsi obtenues présentent des dimensions attendues.¹⁷

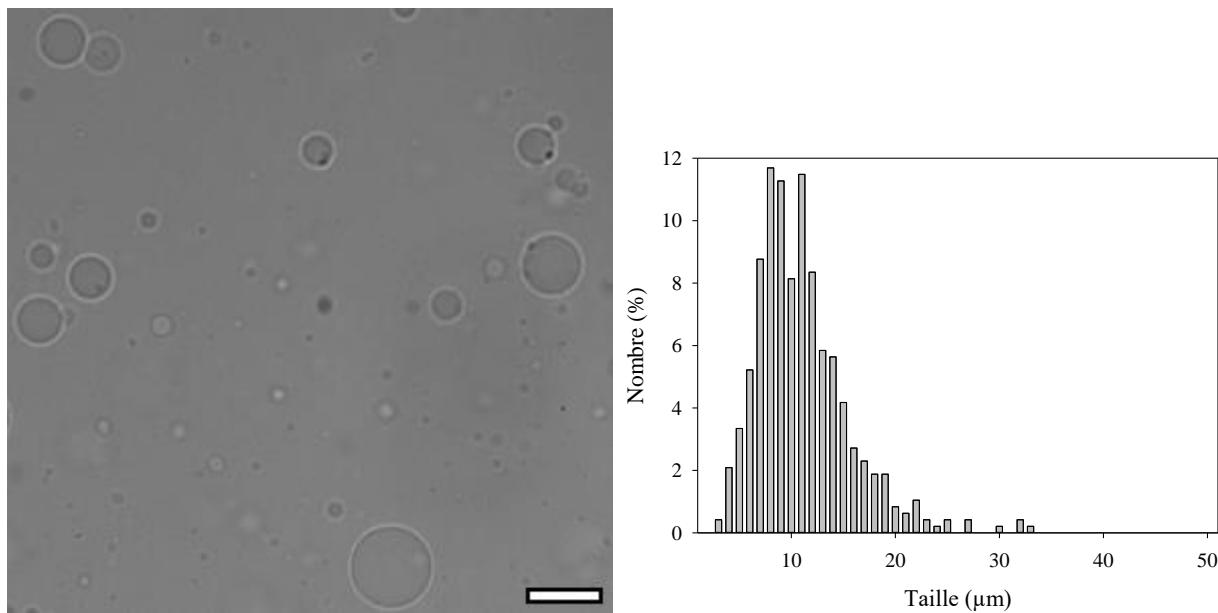


Figure 3.15. (*gauche*) Image typique de GUVs constituée de 100% de **DOPC** observée par microscopie à contraste de phase. Barre d'échelle = $20 \mu\text{m}$. (*droite*) . Distribution en nombre du diamètre d'un ensemble de 470 GUVs constituées de 100% de **DOPC**.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

Les **GUVs-biot** sont préparées en suivant la même méthode mais en utilisant un mélange de phospholipides **DOPC/DSPE-PEG-Biotin** (99/1). Celles-ci ont été également observées par microscopie à contraste de phase (Figure 3.16 *gauche*). Les **GUVs-biot** semble avoir le même aspect que celles formées à partir de 100% de DOPC. Le diamètre moyen des **GUVs-biot** est de $11.6 \pm 6 \mu\text{m}$ (Figure 3.16 *droite*) confirme que l'utilisation de 1% **DSPE-PEG-Biotin** n'affecte ni la formation, ni la morphologie des vésicules.

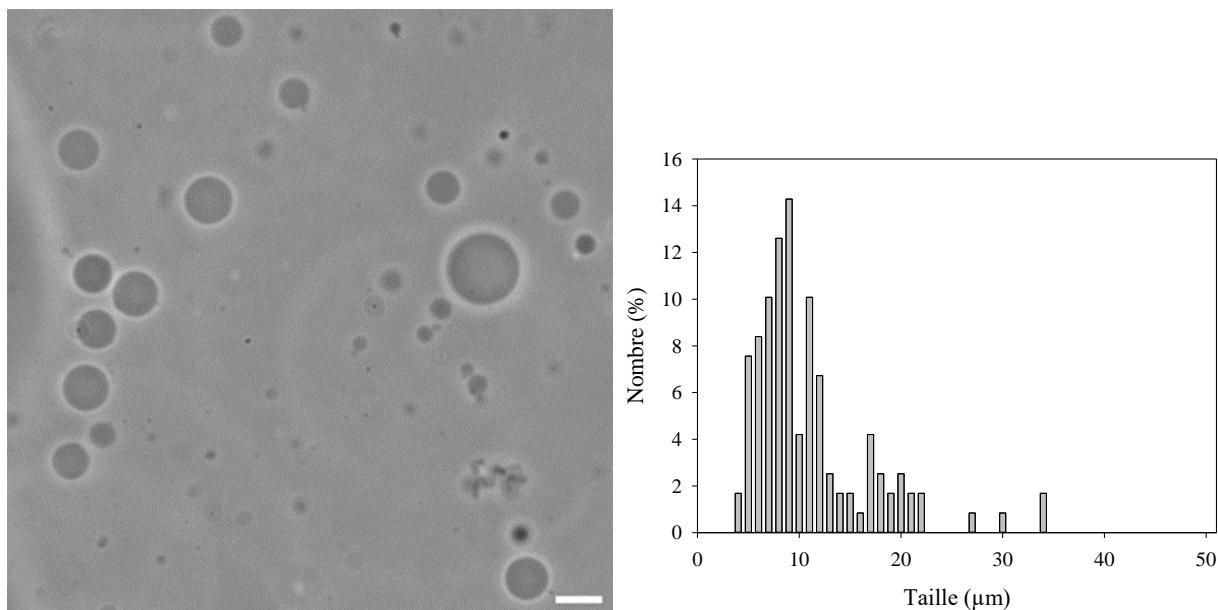


Figure 3.16. (*gauche*) Image typique de **GUVs-biot** observées par microscopie à contraste de phase. Nuances de gris. Barre d'échelle = 10 μm . (*droite*) Distribution en nombre du diamètre d'un ensemble de 119 **GUVs-biot**.

3.1.2 Marquage à la **RhodB-strep**

Les motifs biotine, introduits *via* phospholipide **DSPE-PEG-Biotin**, garantissent la possibilité d'utiliser le principe du LEASA à partir de la surface des GUVs. L'addition de streptavidine marquée dans l'échantillon de **GUVs-biot** permet de révéler en microscopie à épifluorescence la présence des motifs biotine à leur surface, comme le montre la Figure 3.17. Ceci nous prouve que des groupements biotine sont bien exposés à la surface de toutes les **GUVs-biot** observées. De plus, on notera que la distribution de la streptavidine marquée **RhodB-strep** semble parfaitement homogène.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

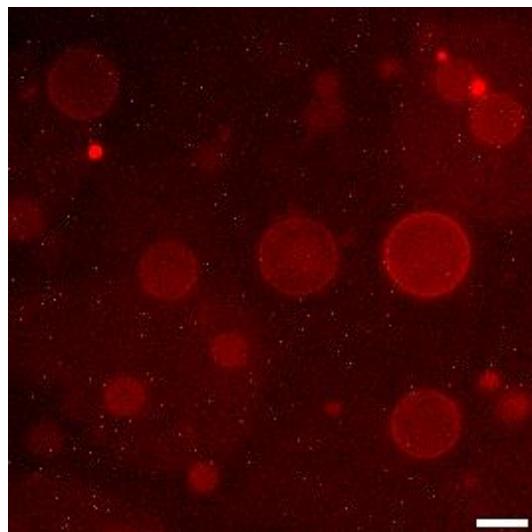


Figure 3.17. GUVs-biot marquée à la **RhodB-strep** vues en microscopie à épifluorescence. Fluorescence de la **RhodB** colorisée en rouge ($\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ex}} = 543 \text{ nm}$). Barre d'échelle = 10 μm .

3.1.3 Préparation et caractérisation des **GUVs-AP**

L'introduction d'**AP-strep** est réalisée au cours de la préparation des GUVs lors de l'étape de sémentation pour permettre à un maximum d'enzyme de se fixer à la surface des **GUVs-biot**. Les **GUVs-AP** sont observées par microscopie à contraste de phase et présentent les mêmes caractéristiques que les **GUVs-biot** (Figure 3.18). L'ajout seul de l'enzyme à la surface des vésicules ne modifie pas leur aspect et n'altère pas la morphologie de la membrane. Le diamètre moyen des GUVs-AP est quasi-similaire à celui obtenu avec les **GUVs-biot**, à savoir $11 \pm 4 \mu\text{m}$ (Figure 3.18).

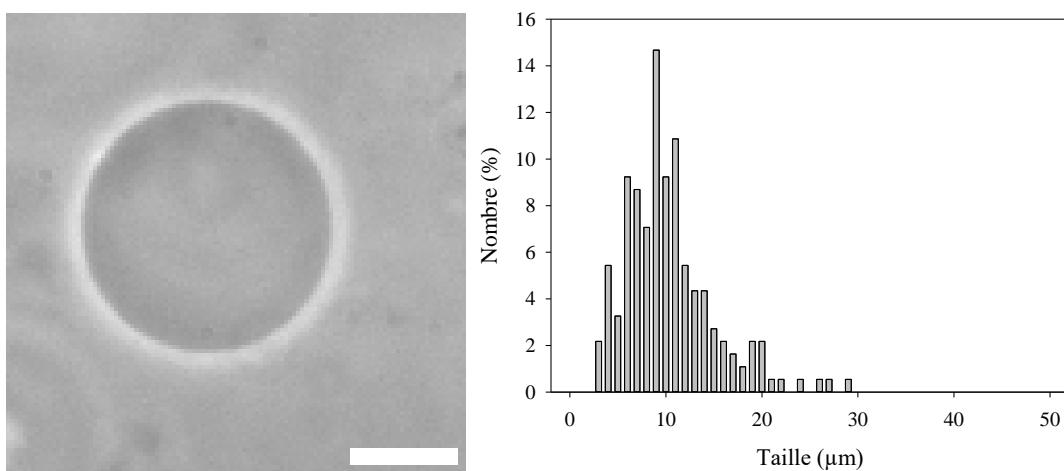


Figure 3.18. (gauche) Image de **GUVs-AP** typique observée par microscopie à contraste de phase. Nuances de gris. Barre d'échelle = 10 μm . (droite) Distribution en nombre du diamètre d'un ensemble de 184 **GUVs-AP**.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

3.2 Observation de l'autoassemblage de **Fmoc-FFY** à la surface des **GUVs-AP**

3.2.1 Optimisation de la concentration en précurseur **Fmoc-FFpY**

Les **GUVs-AP** ont été mis au contact d'une solution du peptide précurseur **Fmoc-FFpY** à une concentration de 1 mg.mL^{-1} et observées par microscopie à contraste de phase. Après 25 minutes, les **GUVs-AP** commencent à perdre graduellement leur contraste de phase (Figure 3.19b).

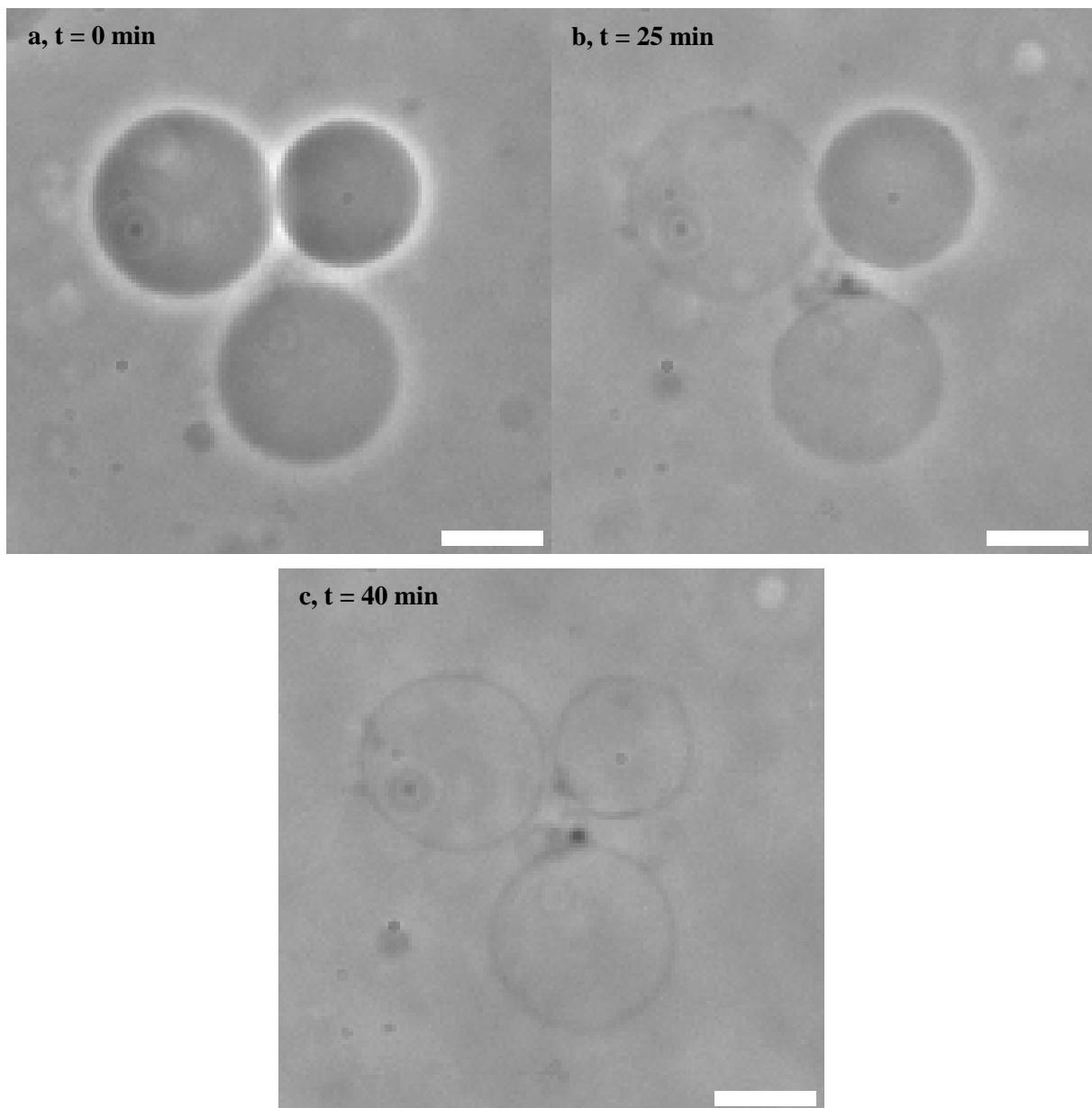


Figure 3.19. GUVs-AP observées par microscopie à contraste de phase après l'ajout du **Fmoc-FFpY** à 1 mg.mL^{-1} au cours du temps : a) après 1 min ; b) 25 min après, perte graduelle du contraste de phase ; c) après 40 min, perte totale du contraste de phase. Nuances de gris. Barres d'échelle = $10 \mu\text{m}$.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

Au-delà de 40 min de contact avec le peptide précurseur **Fmoc-FFpY**, la perte de contraste de phase est encore plus frappante. Cependant, on distingue toujours les membranes des **GUVs-AP**. Curieusement, il apparaît qu'environ 2/3 des vésicules perdent leur forme caractéristique parfaitement sphérique. Sur la figure 3.20a, les contours des **GUVs-AP** après 25 min de contact sont mis en évidence par la superposition de cercles en pointillés rouges. En conservant l'échelle, ces mêmes cercles sont reproduits sur la figure 3.20b, ce qui nous permet de rendre compte que les vésicules en question sont déformées et ne sont plus sphériques après 40 min de contact avec le peptide.

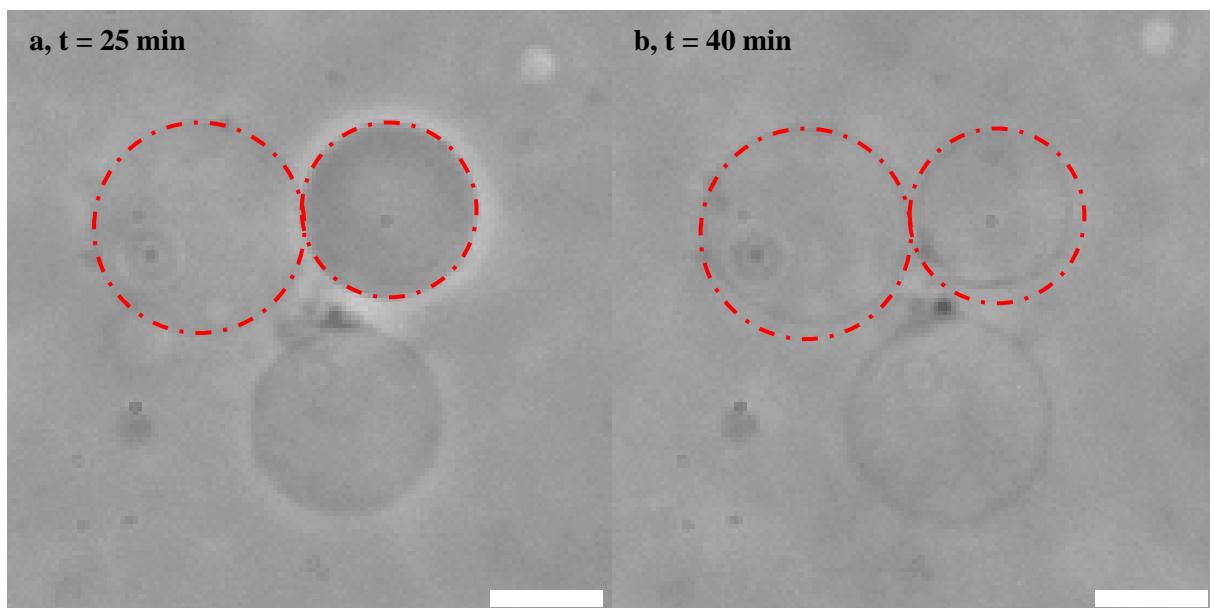


Figure 3.20. Comparaison des formes des **GUVs-AP** (cercles en pointillés rouges) a) après 25 min et b) 40 min de contact avec le peptide précurseur **Fmoc-FFpY**. Nuances de gris. Barre d'échelle = 10 µm.

Comme ces phénomènes ont été observés en moins d'une heure, la concentration en précurseur sera diluée 10 fois pour la suite des expériences en microscopie optique. Ceci a pour but de ralentir la formation de l'autoassemblage et de rendre possible l'observation de son évolution sur plusieurs heures. D'éventuelles étapes intermédiaires de l'autoassemblage pourraient être observées.

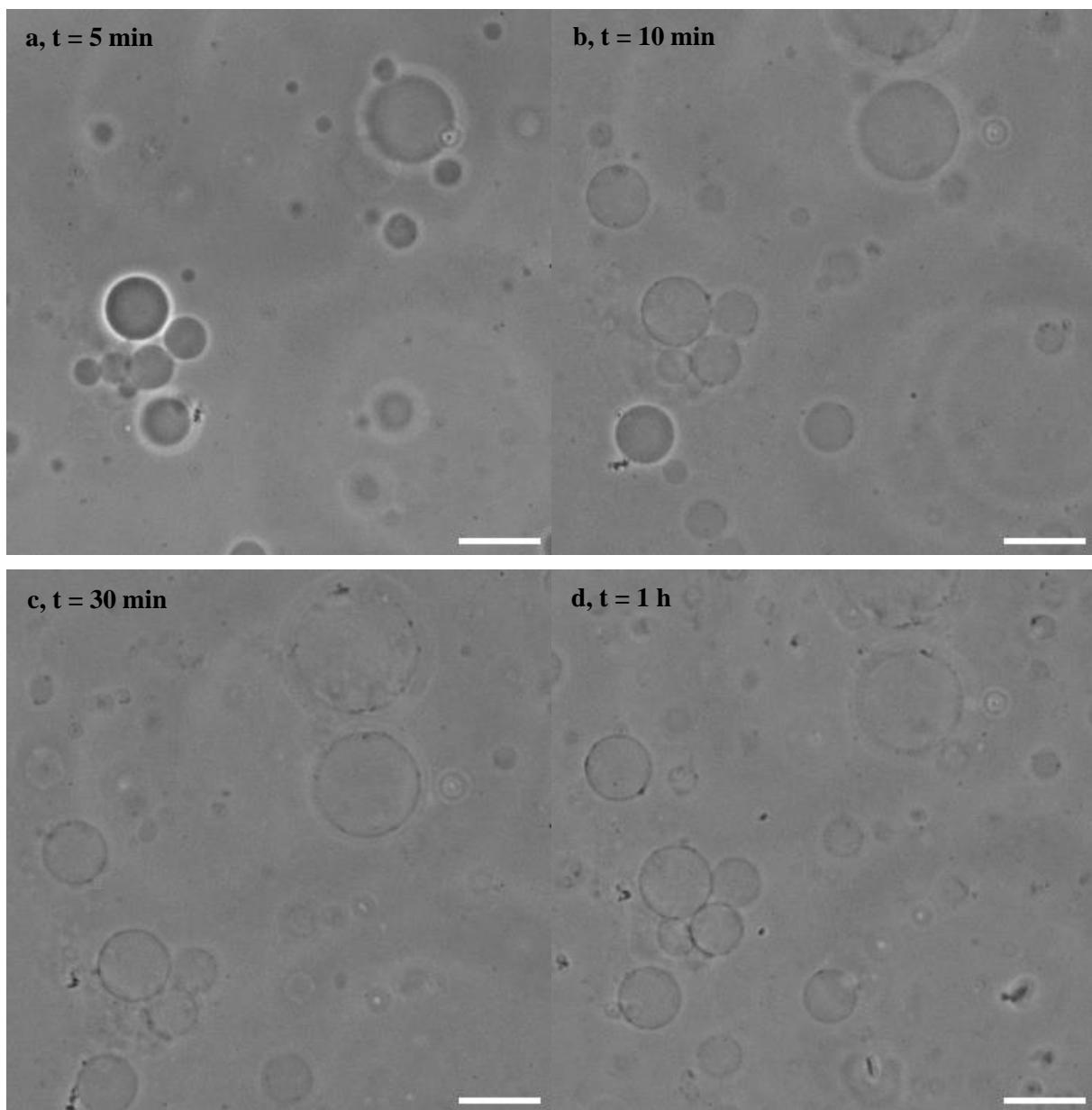
3.2.2 Suivi de l'autoassemblage au cours du temps par microscopie à contraste de phase et épifluorescence

Les **GUVs-AP** ont été mises en contact avec le peptide précurseur **Fmoc-FFpY** à une concentration de 0.1 mg.mL^{-1} et en présence de thioflavin T (**ThT**) comme révélateur fluorescent de l'autoassemblage.³⁰ Cinq minutes après l'ajout du peptide aux **GUVs-AP**, celles-ci demeurent intactes, leur morphologie n'est pas modifiée et elles conservent un fort contraste de phase (Figure 3.21a). Après dix minutes, certaines

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

vésicules perdent légèrement leur contraste de phase, et des agrégats noirs, d'une centaine de nanomètres environ commencent à apparaître à la surface des **GUVs-AP** (Figure 3.21b). Trente minutes après l'addition du **Fmoc-FFpY**, la perte de contraste de phase s'est accentuée, pour certaines vésicules seul le contour est encore visible, les agrégats noirs, qui ont commencé à se former vingt minutes auparavant, s'étendent (Figure 3.21c). Après une, puis deux heures de contact avec le peptide précurseur, l'ensemble des vésicules n'a plus de contraste de phase, des agrégats noirs de plus grande taille sont visibles sur l'ensemble des vésicules, dont certaines ne plus sont parfaitement sphériques (Figures 3.21d et 3.21e).



Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

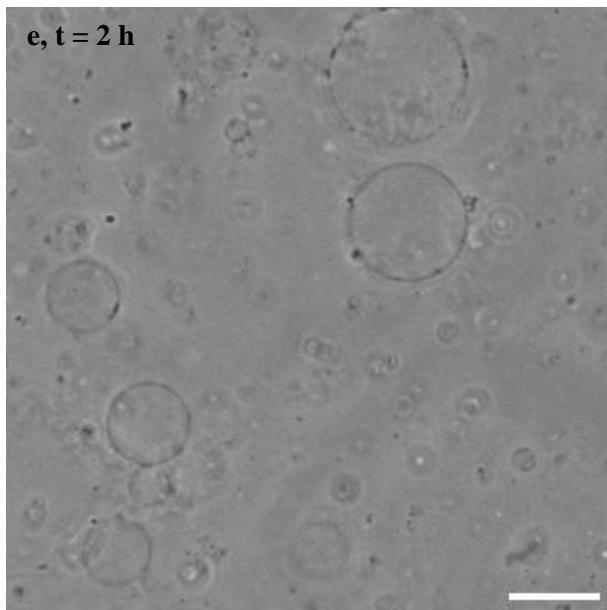
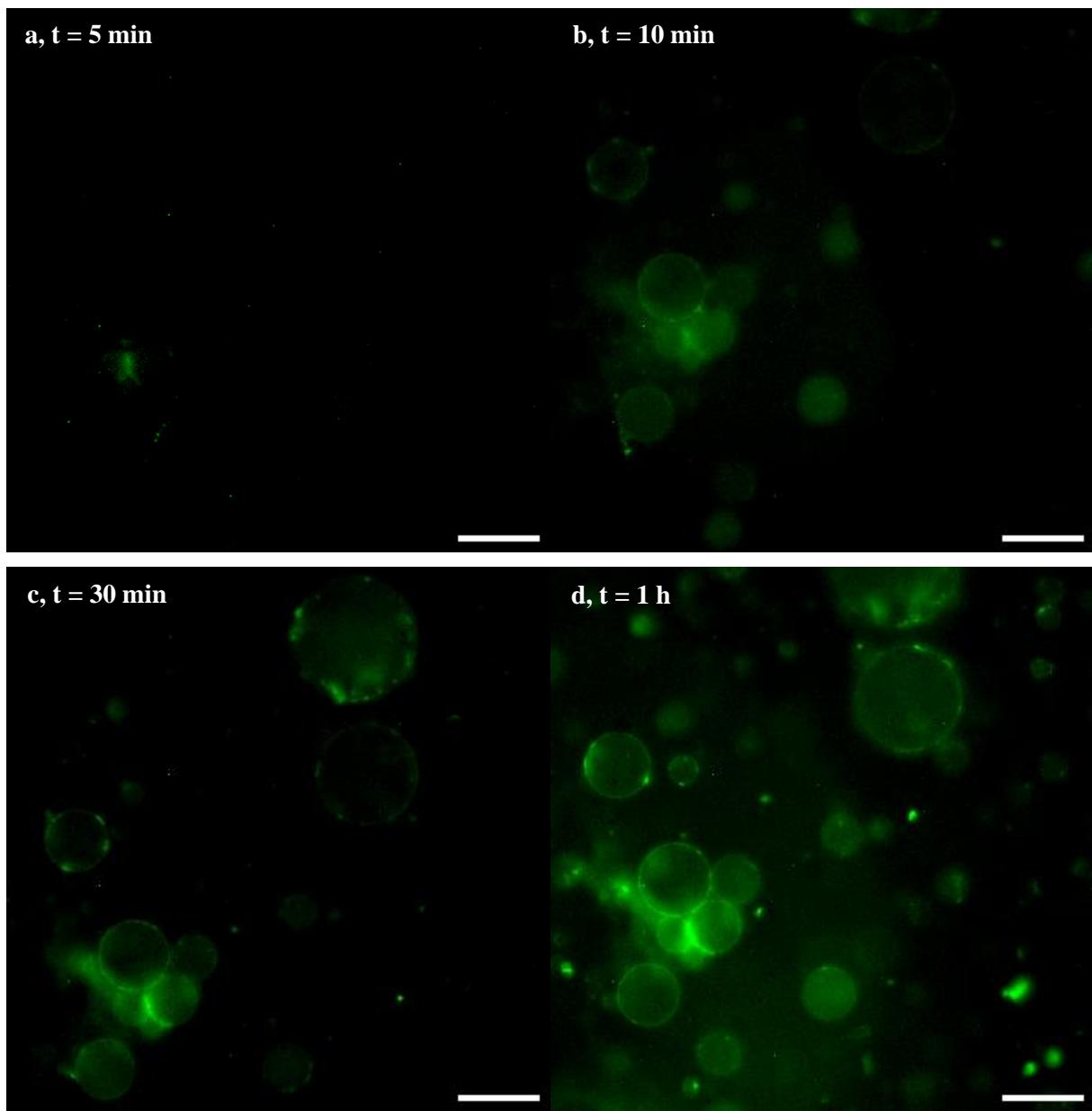


Figure 3.21. Évolution au cours du temps de l'autoassemblage de **Fmoc-FFY** observé par microscopie à contraste de phase après ajout du **Fmoc-FFpY** dans une solution de **GUVs-AP** : a) après moins de 5 minutes ; b) après 10 min ; c) après 30 min ; d) après 1 h ; e) après 2 h. Barre d'échelle = 10 µm.

Le même suivi a été réalisé par microscopie à épifluorescence. Cette technique d'observation permet de mettre en évidence la fluorescence de la **ThT** caractéristique de la présence d'édifices autoassemblés de **Fmoc-FFY**.^{31,32} Ainsi, cinq minutes après l'ajout du peptide précurseur **Fmoc-FFpY** il est possible d'observer une tâche fluorescente d'une taille de 5 µm (Figure 3.22a), elle mesure 8 µm après 10 min de contact, et épouse le contour d'une **GUV-AP** (Figure 3.22b). Après 30 min cette même tâche s'est agrandie, 10 µm (Figure 3.22c) ; d'autres agrégats fluorescents sont apparus, ils se situent tous à la surface d'une GUV (Figure 3.22c). Enfin après 1 et 2 h de contact avec le **Fmoc-FFpY** l'ensemble des agrégats ont gagné en intensité de fluorescence, ont augmenté en nombre et le contour des **GUVs-AP** est fluorescent (Figure 3.22d et 3.22e).

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes



Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

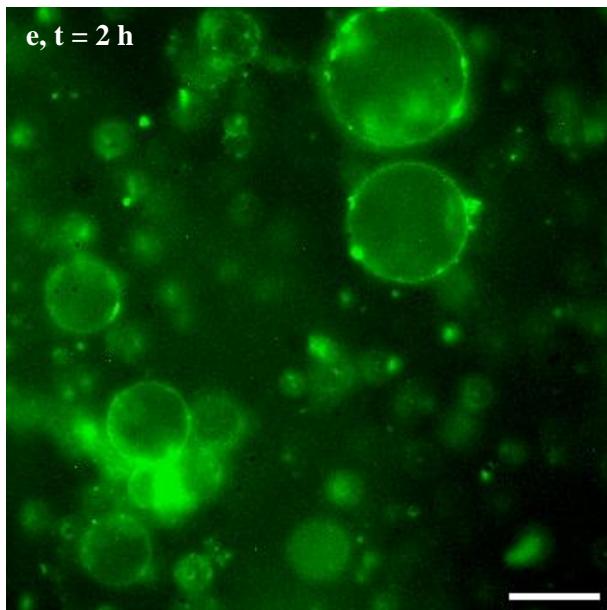


Figure 3.22. Évolution de l'autoassemblage de **Fmoc-FFY** observée par microscopie à épifluorescence grâce à l'addition de **ThT** après le mélange de **Fmoc-FFpY** dans une solution de **GUVs-AP**, a) après 5 minutes ; b) après 10 min ; c) après 30 min ; d) après 1 h ; e) après 2 h. Colorisation de la fluorescence de la **ThT** en vert ($\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$).

Le suivi réalisé par microscopie à épifluorescence a permis de mettre en évidence une concordance entre les tâches fluorescentes très intenses et les agrégats noirs à la surface des **GUVs-AP**, indiquant qu'ils sont bien constitués de **Fmoc-FFY** autoassemblé. De plus, le contour des **GUVs-AP** est aussi fluorescent, et l'intensité de l'émission de fluorescence est croissante entre 5 min et 2 h. L'ensemble de ces observations montrent que l'autoassemblage a lieu majoritairement à la surface des vésicules. De la fluorescence est également observable dans le milieu et se matérialise par un léger voile vert visible à partir de 10 min, ceci peut être dû à une diffusion d'agrégats de peptides **Fmoc-FFY** autoassemblés depuis la surface des **GUVs-AP** ou de l'autoassemblage induit par de l'**AP-strep** libre en solution. Enfin, dans certains cas (illustré par les Figures 3.22c, d et e) l'espace entre deux **GUVs-AP** proches l'un de l'autre est le lieu où l'intensité de fluorescence est la plus importante, donc l'endroit où le **Fmoc-FFY** autoassemblé est le plus concentré. Ceci est certainement dû à une concentration locale plus importante en AP induite par la proximité entre de deux vésicules enzymatiques qui pourraient, *in fine*, se trouver liées l'une à l'autre par un réseau de fibres de peptides **Fmoc-FFY** autoassemblés.

Il est à noter que d'observer l'autoassemblage sous la forme d'agrégats ou de voile fluorescents mais sous la forme de nanofibres qui le constituent. Ceci est dû à l'échelle d'observation permise par le microscope à contraste de phase et à épifluorescence.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

3.2.3 Suivi de l'autoassemblage au cours du temps par microscopie confocale à fluorescence

Pour rendre les **GUVs-AP** visualisables dès l'introduction du peptide précurseur **Fmoc-FFpY**, un phospholipide fluorescent porteur d'un motif **RhodB (16:0 Liss Rhod PE)** est ajouté à hauteur de 1 % en masse au mélange **DOPC/DSPE-PEG-Biotin**. Les **GUVs-AP** sont obtenues de la même manière, et ont ensuite été observées par microscopie confocale : elles sont parfaitement sphériques (cercle en pointillé sur la Figure 3.23). Sur l'ensemble des GUVs on observe une fluorescence moins intense aux pôles, ceci est un effet d'optique et non un effet de distribution des phospholipides. Les autres tâches fluorescentes sont des GUVs de plus petite taille.

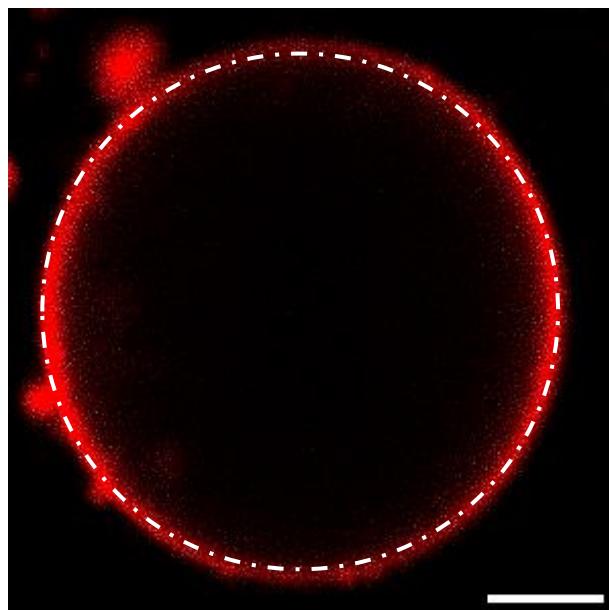


Figure 3.23. GUV-biot typique contenant 1% de **Liss Rhod PE** observée par microscopie confocale. Colorisation de la rhodamine B en rouge. Barre d'échelle = 10 µm ($\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ex}} = 514 \text{ nm}$).

Les conditions établies pour l'observation de l'autoassemblage par microscopie à contraste de phase ont été conservées. L'utilisation de la microscopie confocale à fluorescence est motivée par le souhait de visualiser plus nettement la formation des édifices autoassemblés de **Fmoc-FFY** au cours du temps. La résolution de cet instrument étant meilleure que du microscope utilisé précédemment. Les **GUVs-AP** sont donc mises en contact avec le peptide précurseur **Fmoc-FFpY** à une concentration de 0.1 mg.mL^{-1} pendant 1 h, puis la **ThT** est ajoutée à une concentration de 0.15 mg.mL^{-1} (à noter que la **ThT** peut également être introduite en même temps que le **Fmoc-FFpY** sans que cela n'influence l'autoassemblage). Comme pour le suivi par microscopie à épifluorescence, l'ajout de **ThT** permet de révéler la présence de l'autoassemblage.^{31,32} Après 1 h il semble difficile de déterminer si la fluorescence observée est causée par

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

la présence de l'autoassemblage ou si elle relève du bruit de fond. Il est néanmoins possible de distinguer la forme parfaitement sphérique des **GUVs-AP** (Figure 3.24a). En revanche, après 2h, la fluorescence est plus intense sur le contour des **GUVs-AP**, ceci qui indique la présence de **Fmoc-FFY** autoassemblé sur toute la surface des vésicules (Figure 3.24b). De légères inhomogénéités locales dans la fluorescence semblent visibles (flèches rouges sur la Figure 3.24b), suggérant que l'autoassemblage de **Fmoc-FFY** se distribue de manière inégale sur la surface des vésicules.

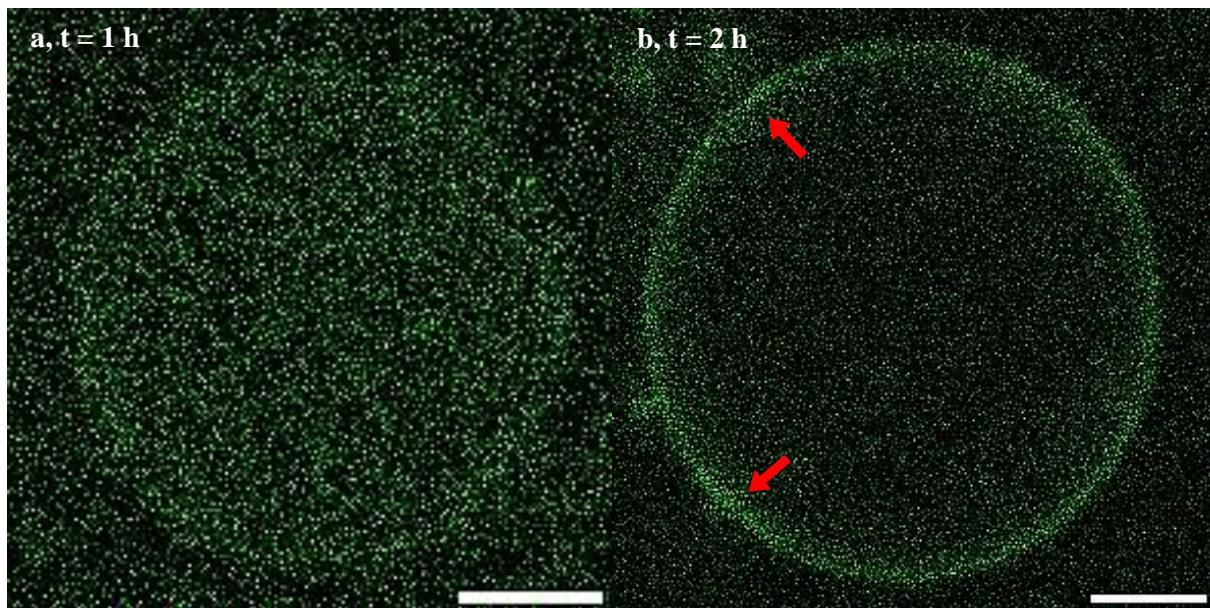


Figure 3.24. Images typiques de **GUV-AP** observées par microscopie confocale à fluorescence après l'introduction de **Fmoc-FFpY** a) après 1 h et b) après 2 h. Colorisation de la fluorescence de la ThT en vert ($\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$).

Ce même échantillon a également été observée 72 h après l'ajout du **Fmoc-FFpY**. Les **GUVs-AP** observées présentent toujours un contour avec une intensité de fluorescence plus importante que le reste de l'échantillon (Figures 3.25). De plus, les vésicules observées n'ont plus un contour sphérique, mais sont déformées (cercles en pointillés sur la Figure 3.26). Certaines présentent également un contour avec un aspect « peau d'orange » qui est associé à la présence d'agrégats de fluorescence plus intense, ce qui rappelle les inhomogénéités observées après 2 h (Figure 3.24b).

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

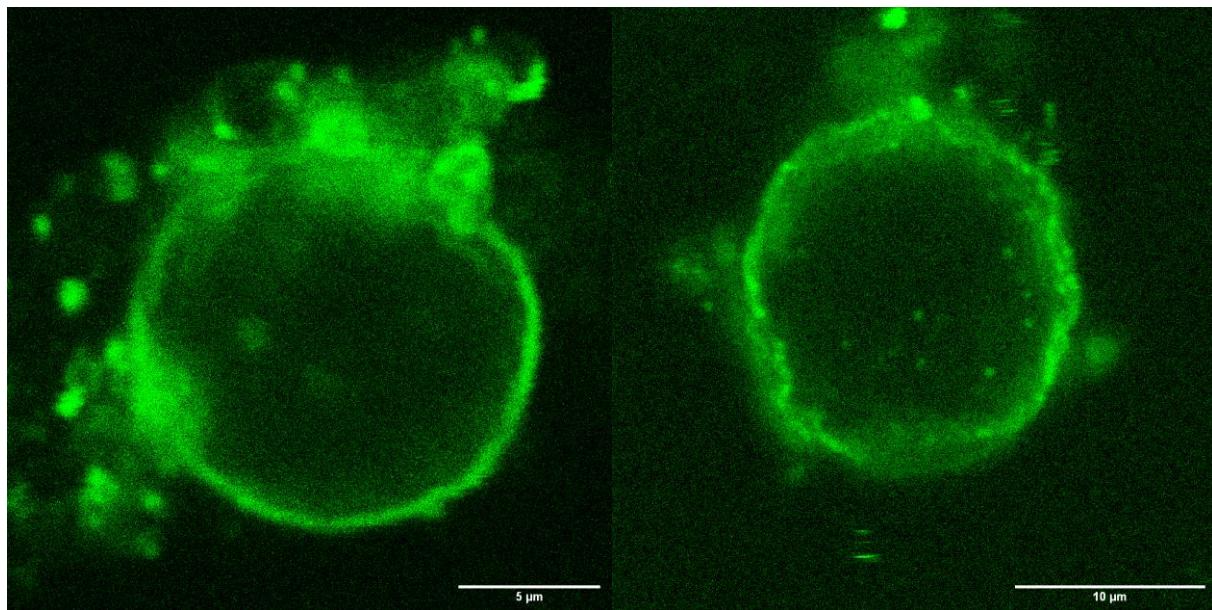


Figure 3.25. Deux images typiques de GUVs-AP observées après 72 h de contact avec le peptide **Fmoc-FFpY** par microscopie confocale. (*gauche*) vésicule déformée ; (*droite*) vésicule présentant une membrane ayant un aspect « peau d'orange ». Colorisation de la fluorescence de la ThT en vert ($\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$).

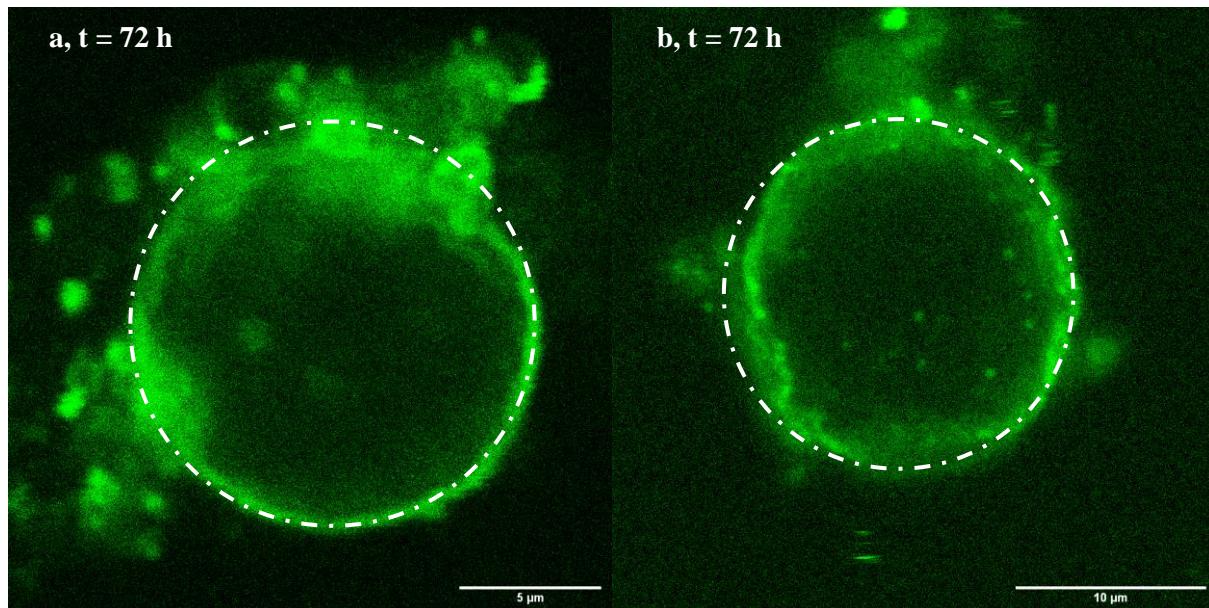


Figure 3.26. Idem à la Figure 3.36 mais avec un cercle blanc en pointillés qui souligne la perte de la morphologie parfaitement sphérique des GUVs-AP avant la mise en contact avec le peptide précurseur **Fmoc-FFpY**. Colorisation de la fluorescence de la ThT en vert ($\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$).

3.2.4 Expériences de contrôle

Un ensemble d'expériences de contrôle a été réalisé par microscopie à contraste de phase afin de s'assurer que les phénomènes de perte de contraste de phase et l'apparition d'agrégats formés au niveau de

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

la membrane se produisent uniquement en présence de l'enzyme à la surface des GUVs et du précurseur **Fmoc-FFpY**. Trois expériences ont été réalisées : (1) des **GUVs-AP** ont été préparées puis observées pendant 24h afin de suivre l'évolution de leur morphologie en l'absence de peptides précurseurs **Fmoc-FFpY** ; (2) des **GUVs-biot** ont été mises en contact avec le peptide précurseur **Fmoc-FFpY** puis observées pendant 24 h pour s'assurer que la formation *in situ* de **Fmoc-FFY** est à l'origine des observations réalisées précédemment ; (3) des **GUVs-biot** sont mises en contact avec l'**AP** (non conjugué à la streptavidine) libre en solution et du peptide précurseur **Fmoc-FFpY** afin d'évaluer l'importance de la localisation de l'enzyme dans les processus d'autoassemblage. L'observation est réalisée sur une échelle de deux heures.

- (1) Après 2 h, les **GUVs-AP** possèdent encore toutes un fort contraste de phase et conservent leur forme parfaitement sphérique. Elles sont dépourvues d'agrégats noirs nanométriques (Figure 3.27a). 24 h plus tard, les **GUVs-AP** ont conservées le même aspect (Figure 3.27b).

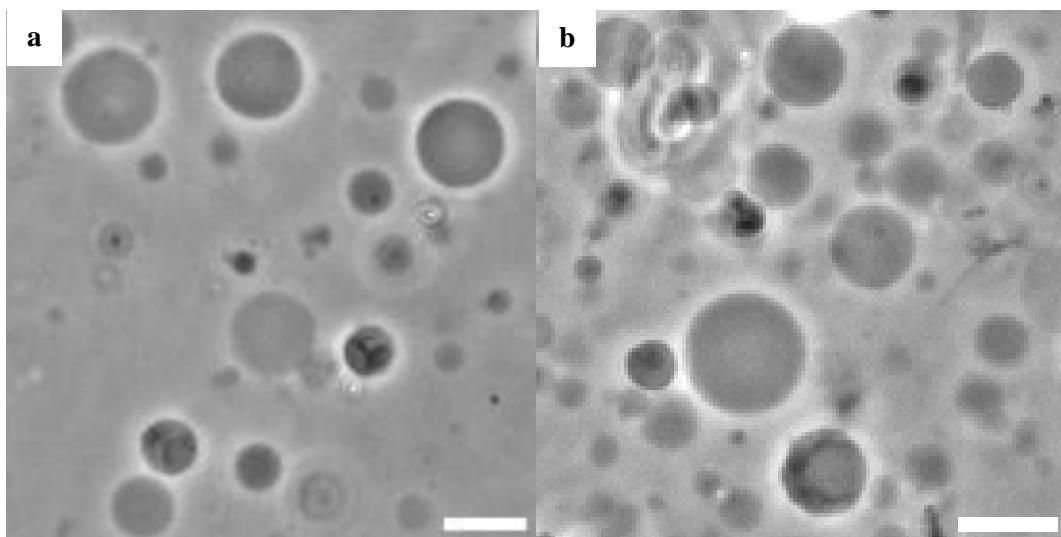


Figure 3.27. GUVs-AP observées par microscopie à contraste de phase a) 2 h et b) 24 h après leur formation. Nuances de gris.
Barre d'échelle = 10 µm.

- (2) Deux heures après avoir été mises en présence du peptide précurseur **Fmoc-FFpY**, les **GUVs-biot** présentent toujours un fort contraste de phase et conservent leur forme sphérique, elles sont dépourvues d'agrégats noirs nanométriques (Figure 3.28a). Les mêmes observations sont établies au bout de 24 h (Figure 3.28b).

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

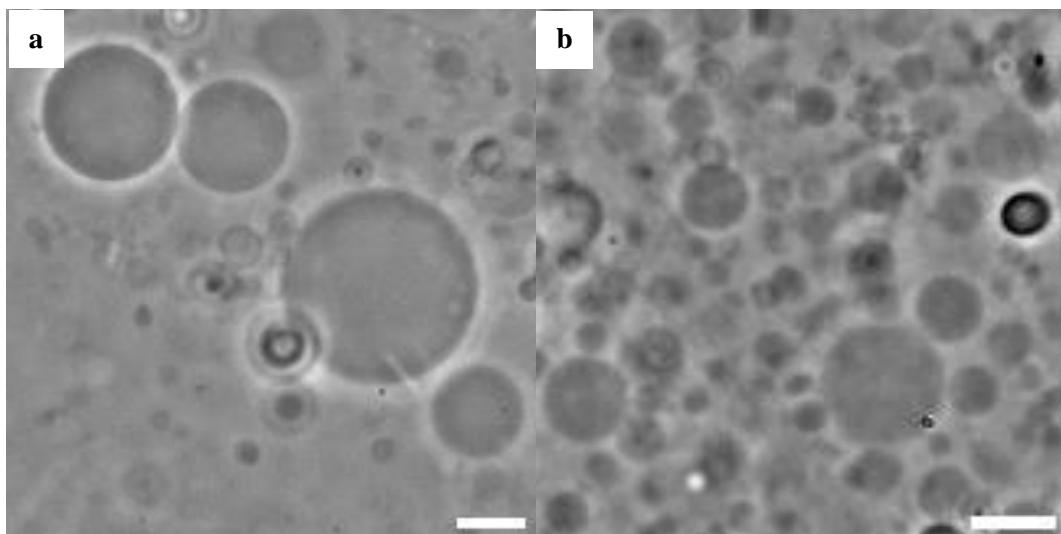


Figure 3.28. GUVs-biot en présence du **Fmoc-FFpY** observées par microscopie à contraste de phase a) après 2 h et b) après 24 h. Nuances de gris. Barre d'échelle = 10 µm.

(3) Le mélange **GUVs-biot, AP** (non conjugué à la streptavidine) et le peptide précurseur **Fmoc-FFpY** est observé après 10 minutes. Les vésicules possèdent encore toutes un fort contraste de phase et conservent leur forme parfaitement sphérique, elles sont en outre dépourvues d'agrégats noirs nanométriques (Figure 3.29a). Les mêmes observations sont réalisées lorsque l'échantillon est analysé 2 h plus tard (Figure 3.29b), une durée au bout de laquelle les **GUVs-AP** en présence du **Fmoc-FFpY** avaient déjà toutes perdu leur contraste de phase et possédaient toutes des agrégats noirs nanométriques à leur surface.

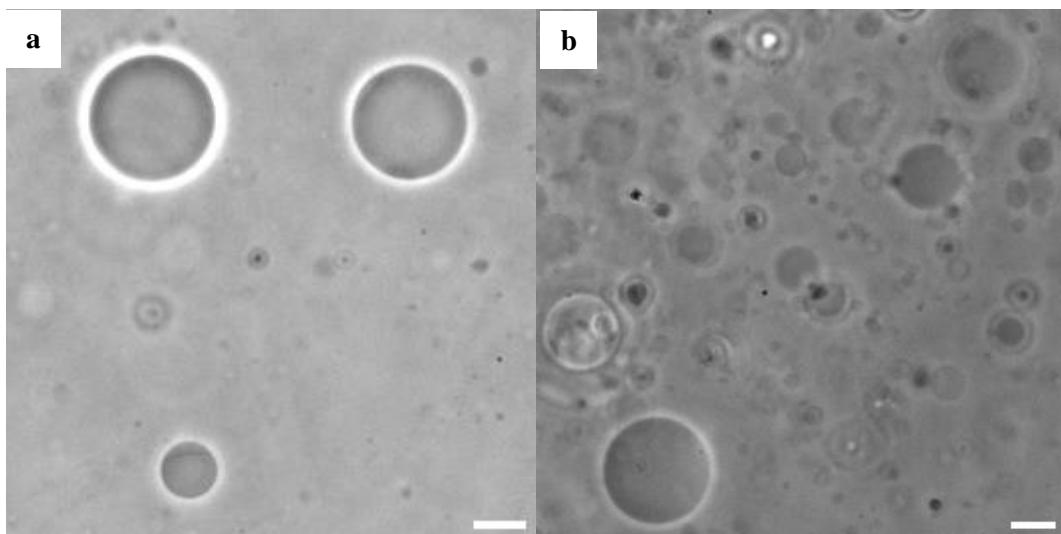


Figure 3.29. GUVs-biot en présence d'**AP** et de **Fmoc-FFpY** observées en microscopie à contraste de phase a) après 10 minutes et b) après 2 h. Nuances de gris. Barre d'échelle = 10 µm.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

L'ensemble des vésicules observées au cours de ces trois expériences de contrôle (1), (2) et (3) ont toutes conservé leur contraste de phase et aucun agrégat noir n'a été observé. Ceci confirme donc que les événements décrits dans les parties 3.2.1 à 3.2.3 sont dus à l'initiation de l'autoassemblage de **Fmoc-FFY** depuis la surface des vésicules de **GUVs-biot** modifiées par l'**AP**.

3.3 Expérience d'électroporation : mise en évidence d'une perméabilité transitoire induite par l'autoassemblage de **Fmoc-FFY**

La perte du contraste de phase est supposée résulter d'une perméabilité transitoire et réversible de la membrane des vésicules induit par l'autoassemblage, sans provoquer la dégradation/dissolution des GUVs. Pour mettre en évidence cette formation de pores, des expériences d'électroporation ont été réalisées. Une bicouche phospholipidique de même composition que celle des **GUVs-biot** est formée sur une électrode (Figure 3.30 *gauche*) constituant une cellule de mesure, avant de modifier une surface de cette dernière par l'**AP-strep**. Enfin cette membrane est mise au contact du peptide **Fmoc-FFpY** en présence de chlorure de potassium (Figure 3.30 *droite*). Une tension est appliquée en même temps qu'une mesure d'intensité (courant) à travers la membrane, qui serait symptomatique d'une perméabilité de la membrane.

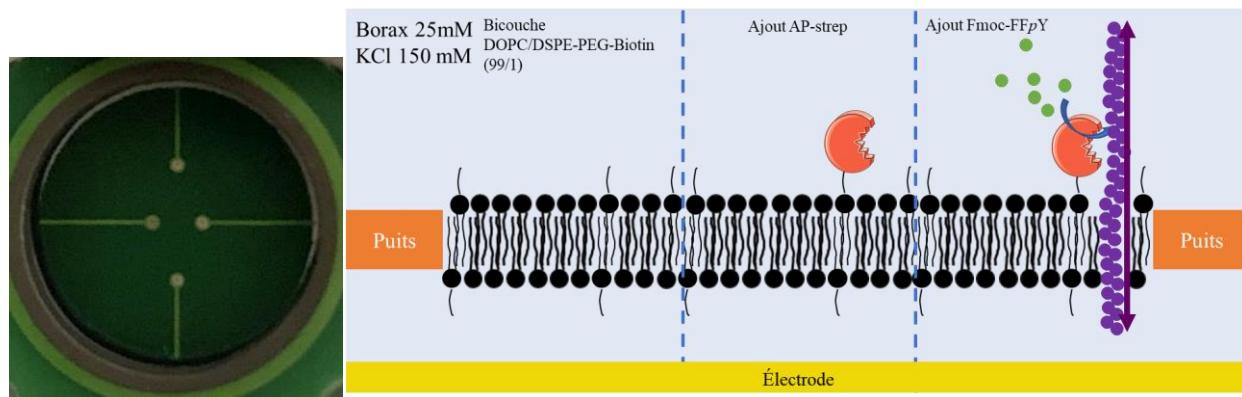


Figure 3.30. (*gauche*) Plan rapproché sur une cellule de mesure d'électroporation, montrant les 4 puits qu'elle contient. (*droite*) Représentation schématique de l'expérience d'électroporation réalisée à partir d'une membrane phospholipidique identique à celle utilisée lors de la formation des **GUVs-AP**, la flèche violette matérialise le courant hypothétique mesuré.

Cette expérience a été réalisée dans un premier temps avec une membrane phospholipidique constituée uniquement de **DOPC/DSPE-PEG-Biotin**. Dans ce cas, lorsque la tension appliquée est de +25 mV, - 25 mV, + 50 mV et -50 mV successivement, aucun courant significatif n'est mesuré et la membrane reste intègre (Figure 3.32, tracé bleu). Lorsque la même membrane phospholipidique constituée de **DOPC/DSPE-PEG-Biotin** est modifiée par l'**AP-Strep** puis l'ajout du peptide précurseur **Fmoc-FFpY**, et que les mêmes paliers de tension sont appliqués, la mesure d'un courant faible de l'ordre de ± 2 à ± 4 pA

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

est enregistrée. Il semble que ce courant devient nul quand la tension s'arrête. Ces premiers résultats en accord avec l'hypothèse d'une formation de pores induit par l'autoassemblage de peptides ont été très difficiles à reproduire. La difficulté provient du fait que ces membranes phospholipidiques de composition **DOPC/DSPE-PEG-Biotin**, alors sous la forme de bicouches, sont mécaniquement très fragiles et se forment difficilement sur les électrodes de mesure.

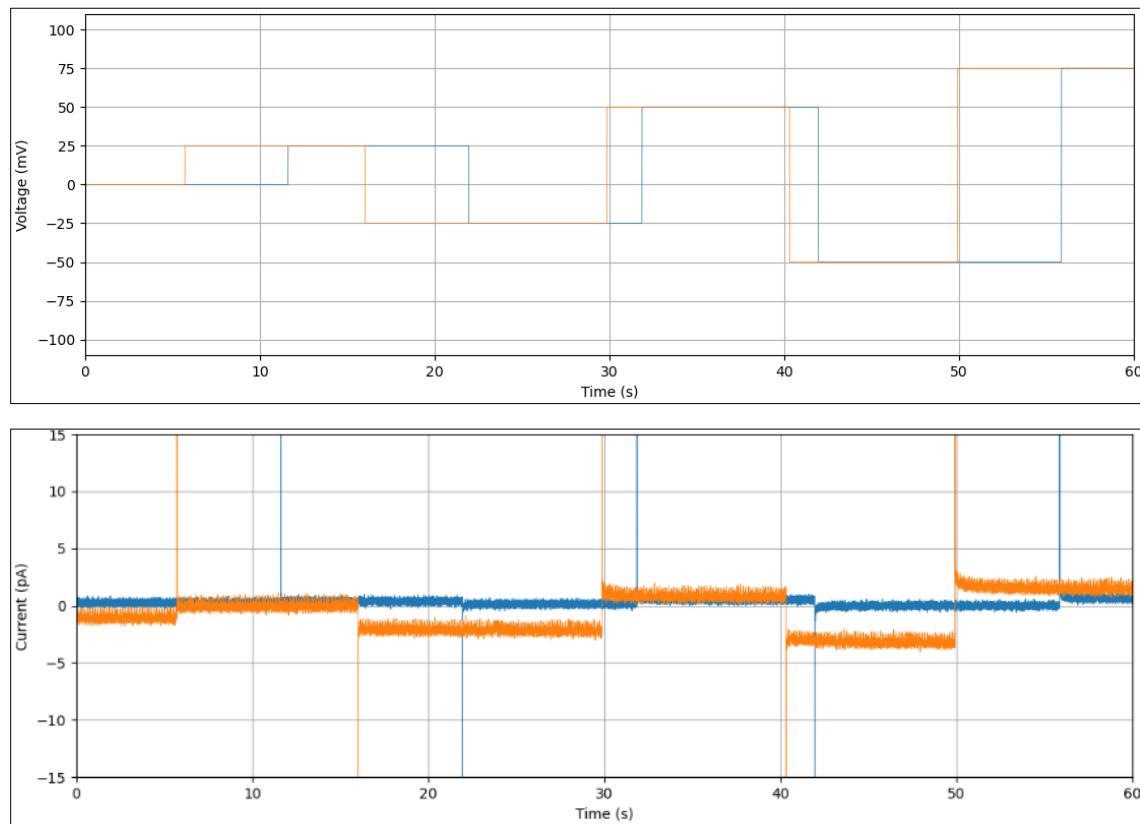


Figure 3.32. (Haut) Tension appliquée à la cellule de mesure modifiée par une membrane **DOPC/DSPE-PEG-Biotin** modifiée par l'**AP-Strep** (tracé bleu) ou par une membrane **DOPC/DSPE-PEG-Biotin** modifiée par l'**AP-Strep** en présence du **Fmoc-FFpY** (tracé orange). (Bas) Courant mesuré à travers une membrane phospholipidique **DOPC/DSPE-PEG-Biotin** modifiée par l'**AP-Strep** (tracé bleu) ou à travers une membrane phospholipidique **DOPC/DSPE-PEG-Biotin** modifiée par l'**AP-Strep** en présence du **Fmoc-FFpY** (tracé orange)

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

4 Processus d'autoassemblage à partir des SUVs. Étude par cryo-TEM

4.1 Choix de la microscopie électronique à transmission en mode cryo

L'ensemble des expériences décrites dans les parties qui suivent ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Marc Schmutz, expert en cryo-microscopie électronique et responsable de la plateforme de microscopie PLAMICS de l'ICS.

Dans la partie 3 précédente, nous avons montré que l'autoassemblage de **Fmoc-FFY** est localisé à la surface des **GUVs-AP**, mais nous n'avons pas été en mesure d'observer la formation de nanofibres qui constituent l'autoassemblage. En effet, celles-ci mesurent environ 5 nm de diamètre,³ et ne sont pas observables à travers les outils de microscopie à contraste de phase, à épifluorescence et confocale. La microscopie électronique à transmission (TEM) rend possible l'observation de ces nanofibres de peptides, mais à cause de leur diamètre allant de quelques microns à quelques dizaines de microns, les GUVs sont des objets bien trop grands pour être étudiés par cette technique. Pour observer simultanément les vésicules phospholipidiques et les événements liés à l'utilisation du LEASA, il est nécessaire de travailler avec des vésicules plus petites appelées *Small Unilamellar Vesicles* (SUVs) ayant un diamètre de 10 à 200 nm.³² D'autre part, l'utilisation du mode cryo (cryo-TEM) est motivée par la vitrification de l'échantillon dans un liquide cryogénique (voir Chapitre II), qui permet de préserver l'échantillon dans sa structure native (à savoir les SUVs et les nanofibres).³³

Ainsi, la cryo-TEM rend possible l'observation simultanée des événements liés au LEASA et des SUVs. Nous serions donc en mesure (i) d'observer les nanofibres de **Fmoc-FFY** ; (ii) de s'assurer si elles possèdent un point d'ancre à la surface des SUVs qui seront fonctionnalisées avec l'**AP** ; (iii) d'observer si l'autoassemblage induit des déformations aux membranes des SUVs et/ou s'il les connecte entre elles. Enfin le mode de préparation de l'échantillon stoppe la croissance des fibres, ce qui nous permet de nous placer à des intervalles de temps précis après l'ajout du peptide dans le milieu. Ceci rend possible l'observation des différentes étapes de formation des nanofibres : leur nucléation puis leur croissance, et proposer un mécanisme du LEASA depuis la surface des SUVs.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

4.2 Modification de la surface des SUVs par l'AP

4.2.1 Préparation et caractérisation des SUVs constituées de 1 % de phospholipide biotinylé, **SUVs-biot₁**

Les **SUVs-biot₁** sont constituées du même mélange de phospholipides **DOPC/DSPE-PEG-Biotin** (99/1) que celui utilisé pour la préparation des **GUVs-biot**, avec 1% de phospholipides biotinyrés. Elles sont préparées par une méthode de sonication-extrusion. Une solution de phospholipides dans le chloroforme est déposée dans un ballon rond et est ensuite évaporée créant un film phospholipidique. Ce film est ensuite mis en suspension dans du tampon Borax, puis est soumis aux ultrasons (sonication). La suspension obtenue est extrudée à travers une membrane de porosité 0.8 µm (extrusion). La solution extrudée est à nouveau soumise aux ultrasons (voir Chapitre II pour plus de détails expérimentaux).

Les **SUVs-biot₁** sont caractérisées par diffusion dynamique de la lumière (DLS). La distribution des tailles en intensité et en nombre sont représentées (Figure 3.33 *haut*). Le diamètre moyen mesuré des **SUVs-biot₁** est de 70 nm. Les **SUVs-biot₁** sont également observées par cryo-TEM. Elles apparaissent parfaitement sphériques et la bicouche phospholipidique est bien visible et mesure environ 5 nm d'épaisseur. La bicouche apparaît sous la forme de deux traits noirs circulaires et concentriques, ceci est dû à la présence des phosphates dans la tête hydrophile des phospholipides. Inversement, la partie hydrophobe des phospholipides apparaît plus claire, celle-ci étant riche en carbone. Les atomes de phosphore ayant un numéro atomique plus élevé que celui des atomes de carbones, les électrons seront plus déviés, rendant la partie hydrophiles des phospholipides plus foncée lors de l'observation. Une large polydispersité de diamètres est observée. Certaines vésicules sont formées à l'intérieur d'autres vésicules plus grandes (Figure 3.33 *bas*).

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

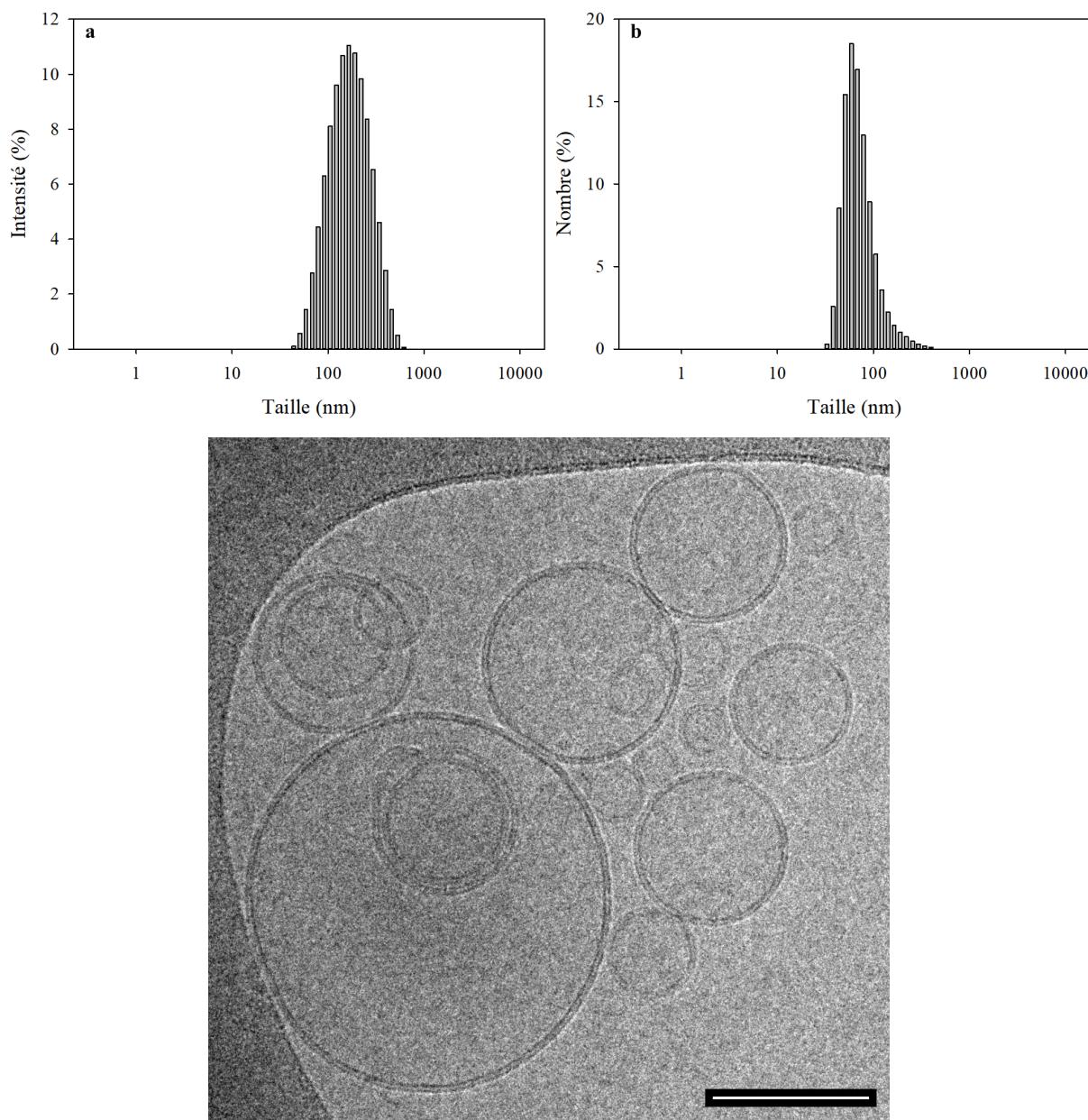


Figure 3.33. (haut) Distribution du diamètre des **SUVs-biot₁** en a) intensité et b) en nombre mesurée par DLS. (bas) **SUVs-biot₁** observée par cryo-TEM. Barre d'échelle = 100 nm.

4.2.2 Préparation et caractérisation des SUVs constituées de 1 % d'AP, **SUVs-AP₁**

Les **SUVs-AP₁** sont préparées en ajoutant une solution d'**AP-strep** à une suspension de **SUVs-biot₁**. Elles sont tout d'abord caractérisées par DLS. La distribution des tailles en intensité et en nombre sont représentées sur la Figures 3.34 (haut). Le diamètre moyen mesuré des **SUVs-AP₁** est de 78 nm. Les **SUVs-AP₁** sont ensuite observées par cryo-TEM. Elles possèdent les mêmes caractéristiques morphologiques que les **SUVs-biot₁**, cependant la bicouche présente un aspect légèrement différent. Bien qu'elle mesure toujours environ 5 nm d'épaisseur, elle présente un caractère légèrement plus rugueux

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

comparé aux **SUVs-biot₁**, une observation en accord avec la présence d'enzymes à la surface des vésicules (Figure 3.34 *bas*).

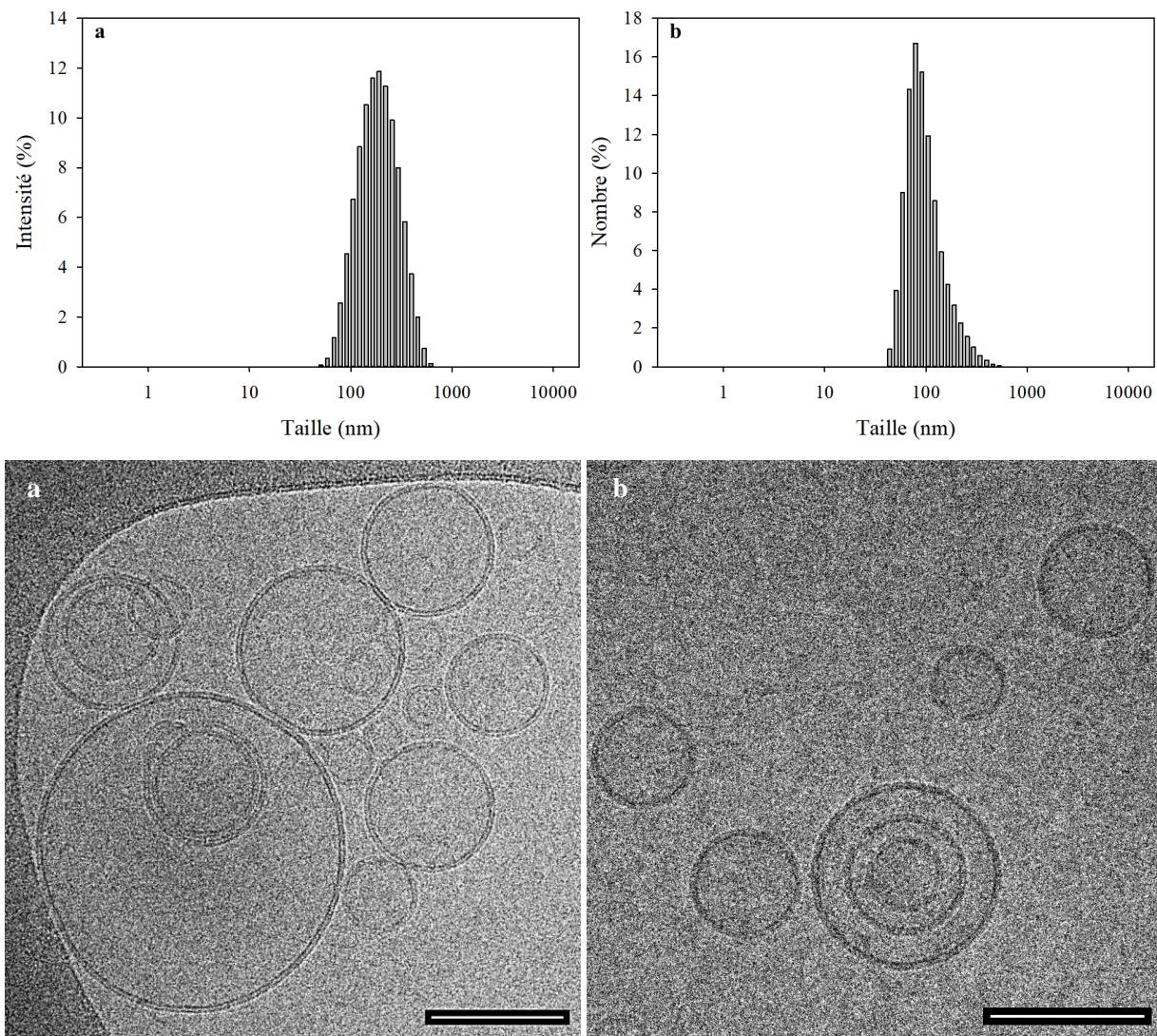


Figure 3.34. (*haut*) Distribution des tailles des **SUVs-AP₁** en a) intensité et b) en nombre mesurée par DLS. (*bas*) Comparaison entre a) les **SUVs-biot₁** et les b) **SUVs-AP₁** observées en cryo-TEM. Barre d'échelle = 100 nm.

4.2.3 Préparation et caractérisation de SUVs constituées de 10 % de phospholipide biotinylé, **SUVs-biot₁₀**

Pour le suivi de l'autoassemblage de peptides à la surface des vésicules présenté dans la partie 4.3, il a été nécessaire de préparer des SUVs constituées de 10 % de phospholipides biotinylés (**SUVs-biot₁₀**). Bien entendu, l'intérêt de préparer ce type de SUVs est de pouvoir disposer de vésicules présentant davantage d'**AP** sur leur membrane que les **SUVs-AP₁**. Les **SUVs-biot₁₀** sont préparées en utilisant le même

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

procédé que pour la préparation des **SUVs-biot₁** (voir [Chapitre II](#)). Les **SUVs-biot₁₀** sont caractérisées par DLS et présentent une distribution des tailles en intensité et en nombre représentées en Figure 3.35 (*haut*). Le diamètre moyen mesurée des **SUVs-biot₁₀** est de 69 nm. Elles ont également été caractérisées par cryo-TEM (Figure 3.35 *bas*). Elles sont parfaitement sphériques, et la surface de leur membrane apparaît lisse (dans le sens, non rugueux).

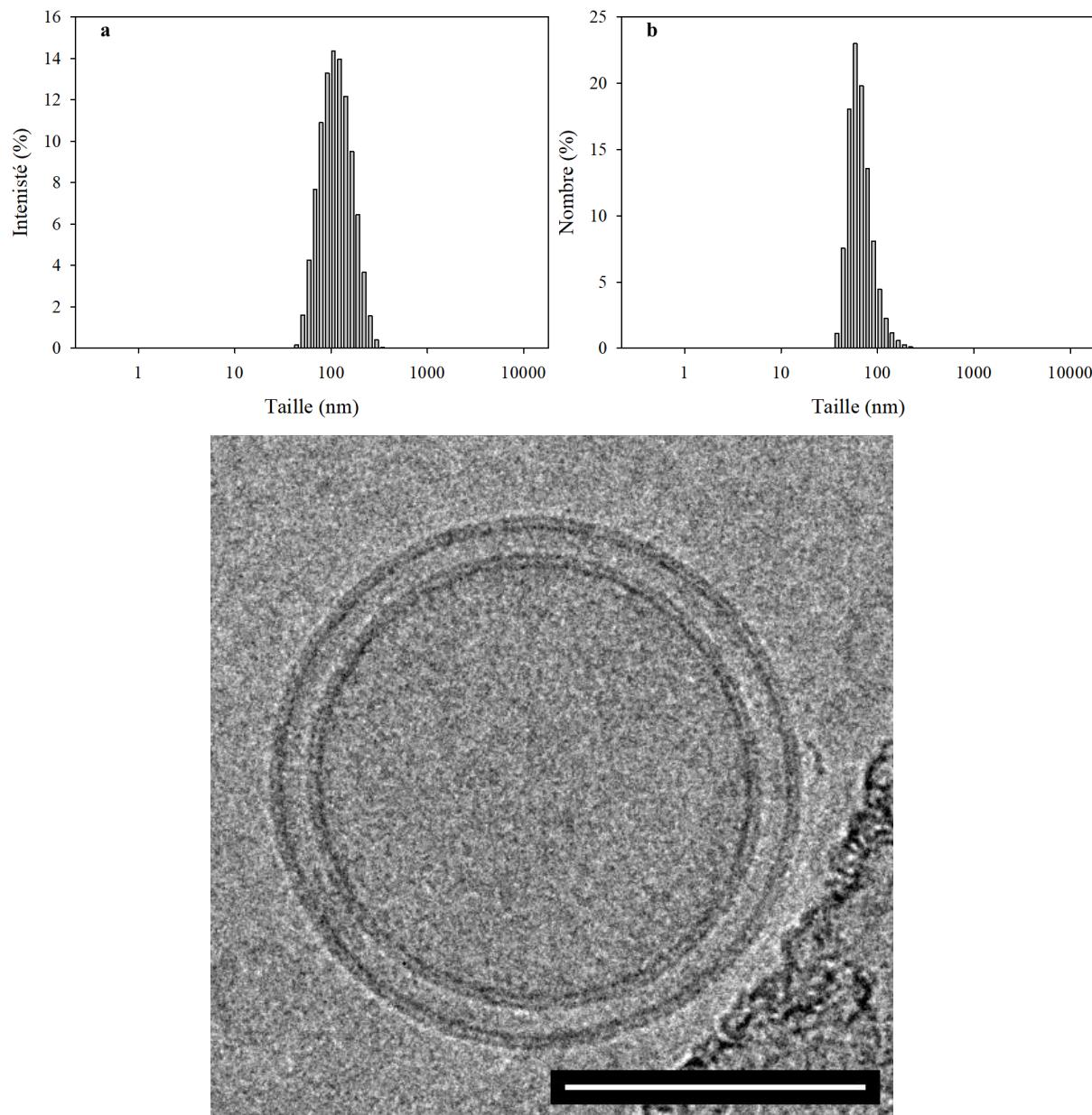


Figure 3.35. (*haut*) Distribution des tailles des **SUVs-biot₁₀** en a) intensité et b) en nombre mesurée par DLS. (*bas*) **SUVs-biot₁₀** (une dans une autre) observées par cryo-TEM. Barre d'échelle = 100 nm.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

La mise en contact de l'**AP-strep** avec les **SUVs-biot₁₀** conduit à la formation des **SUVs-AP₁₀**. Elles sont caractérisées par DLS. La distribution des tailles en intensité et en nombre sont représentées en Figure 3.46 (*haut*). Le diamètre moyen mesuré des **SUVs-AP₁** est de 71 nm. Comme dans le cas de l'observation par cryo-TEM des **SUVs-AP₁** (Figure 3.34), la membrane phospholipidique des **SUVs-AP₁₀** présente une rugosité plus importante en surface que les vésicules **SUVs-biot₁₀**. Les **SUVs-AP₁₀** apparaissent toujours parfaitement sphériques (Figure 3.36 *bas*).

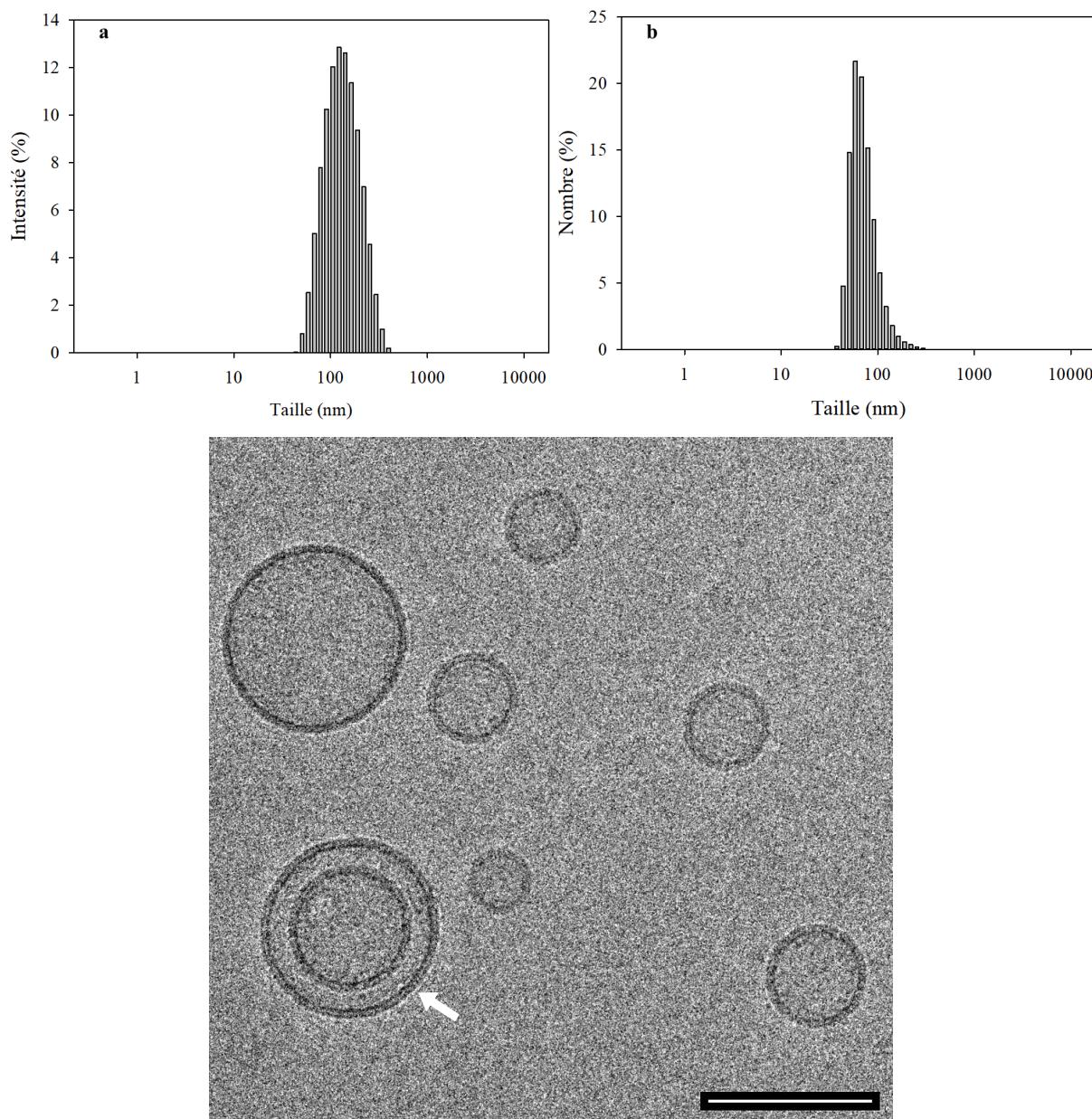


Figure 3.36. (*haut*) Distribution des tailles des **SUVs-AP₁₀** en a) intensité et b) en nombre mesurée par DLS. (*bas*) **SUVs-AP₁₀** observées par cryo-TEM. La flèche blanche indique la rugosité induite par la présence de l'enzyme à la surface des **SUVs-AP₁₀**. Barre d'échelle = 100 nm.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

4.3 Suivi de l'autoassemblage de **Fmoc-FFY** au cours du temps par cryo-TEM

4.3.1 Investigations à partir de **SUVs-AP₁**

Le précurseur **Fmoc-FFpY** est ajouté à une concentration de 0.01 mg.mL^{-1} aux **SUVs-AP₁** et le mélange résultant est observé par cryo-TEM. Il est possible d'observer l'apparition de rares nanofibres d'environ 5 nm de diamètre et longue de plusieurs centaines de nanomètres (Figure 3.37). Celles-ci se trouvent toutes exclusivement en contact avec des vésicules ou alors sont présentes dans leur environnement proche, à moins de 10 nm de distance. À la surface des **SUVs-AP₁** se trouvent des agrégats, également répartis à quelques nanomètres de la membrane phospholipidique. On observe que toutes les **SUVs-AP₁** ne sont pas parfaitement sphériques, certaines vésicules ont une forme oblongue (flèches rouges sur la Figure 3.37). Les nanofibres semblent présenter également des aspérités de quelques nanomètres le long de leur structure (flèches blanches sur la Figure 3.37b).

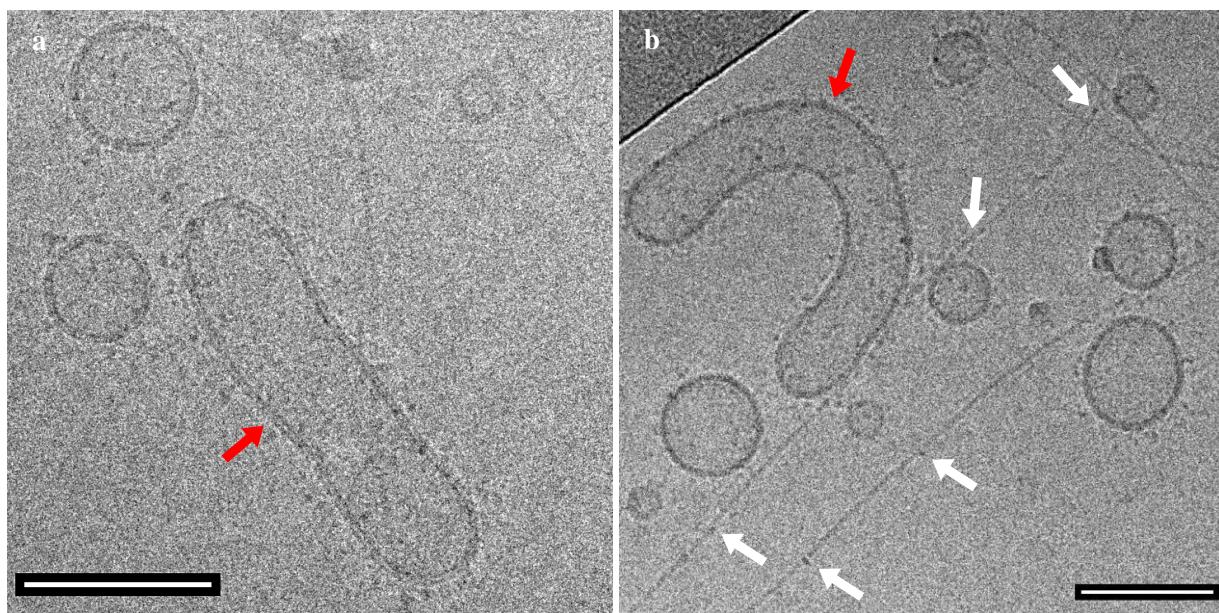


Figure 3.37. **SUVs-AP₁** en présence de **Fmoc-FFpY** (0.01 mg.mL^{-1}) observées en cryo-TEM, a) et b) les **SUVs-AP₁** déformées sont marquées avec une flèche rouge, b) les flèches blanches mettent en évidence les aspérités le long des fibres de **Fmoc-FFY**. Barre d'échelle = 100 nm.

Afin de retirer l'**AP-strep** libre qui peut gêner nos interprétations, et ainsi s'assurer d'initier la croissance de nanofibres uniquement depuis la surface des vésicules **SUVs-AP₁**, ces dernières ont été purifiées grâce à l'utilisation d'une colonne de Sépharose CL-4B.³⁴ Pour l'ensemble des expériences suivantes, les **SUVs-AP₁** (ainsi que les **SUVs-AP₁₀**) seront utilisés sans enzymes libres.

4.3.2 Approche exploratoire du suivi de la formation de nanofibres au cours du temps

Nous avons reproduit l'expérience précédente (Partie 4.3.1.) en mettant les **SUVs-AP₁** dépourvues d'**AP-strep** libre en contact avec le peptide précurseur **Fmoc-FFpY** à une concentration de 0.01 mg.mL^{-1} . Moins d'une minute après l'ajout du **Fmoc-FFpY**, toutes les **SUVs-AP₁** observées sont toujours sphériques et seulement quelques-unes semblent présenter des agrégats nanométriques à quelques nanomètres de distance de leur surface (cercle rouge, Figure 3.38, *gauche*).

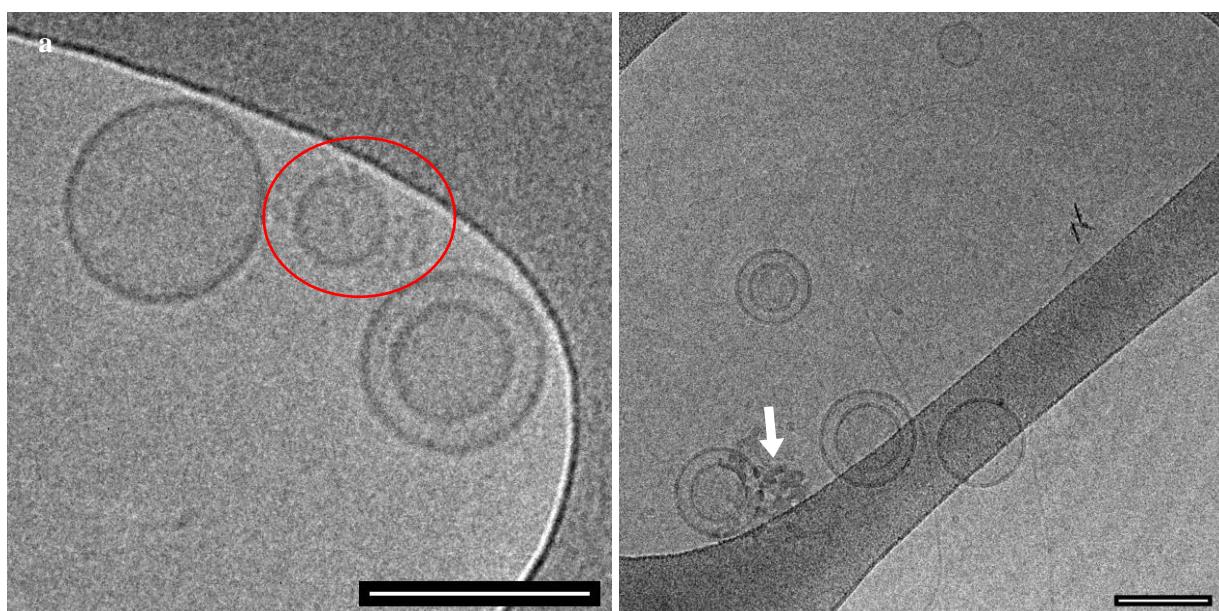


Figure 3.38. (*gauche*) Observations réalisées par cryo-TEM de **SUVs-AP₁** une minute après la mise en contact avec le peptide précurseur **Fmoc-FFpY** (0.01 mg.mL^{-1}). (*droite*) 30 minutes plus tard. La flèche blanche indique la présence d'une contamination due à la préparation de l'échantillon, il ne s'agit pas d'agrégats. Barre d'échelle = 100 nm.

Trente minutes après l'ajout du peptide précurseur **Fmoc-FFpY**, les **SUVs-AP₁** semblent toujours conserver leur forme sphérique mais on observe quasiment plus de vésicules présentant des agrégats dispersés autour et sur la membrane (Figure 3.28, *droite*). Cependant, on observe l'apparition de rares nanofibres. Il ne s'agit pas de petits fragments, mais déjà de très longues fibres uniques (au moins 100 nm de longueur), positionnées à proximité des **SUVs-AP₁**.

La faible quantité de nanofibres formées et le fait que peu de vésicules présentent des agrégats de surface nous ont conduit à reproduire ce suivi au cours du temps, mais avec une concentration en peptide précurseur **Fmoc-FFpY** dix fois supérieure à celle utilisée précédemment, à savoir 0.1 mg.mL^{-1} . Les échantillons ont été observés trente, puis soixante minutes après l'ajout de **Fmoc-FFpY**. Au bout de 30 min, les vésicules ont toujours une forme sphérique, la surface de la bicouche phospholipidique de quasiment

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

toutes les vésicules semble rugueuse (Figure 3.39). En outre, nous sommes en mesure d'observer plusieurs nanofibres, longues de plusieurs centaines de nanomètres, localisées dans l'environnement proche des vésicules. Nous n'observons pas d'amas de nanofibres ou de nanofibres isolés sans la présence vésicules à proximité.

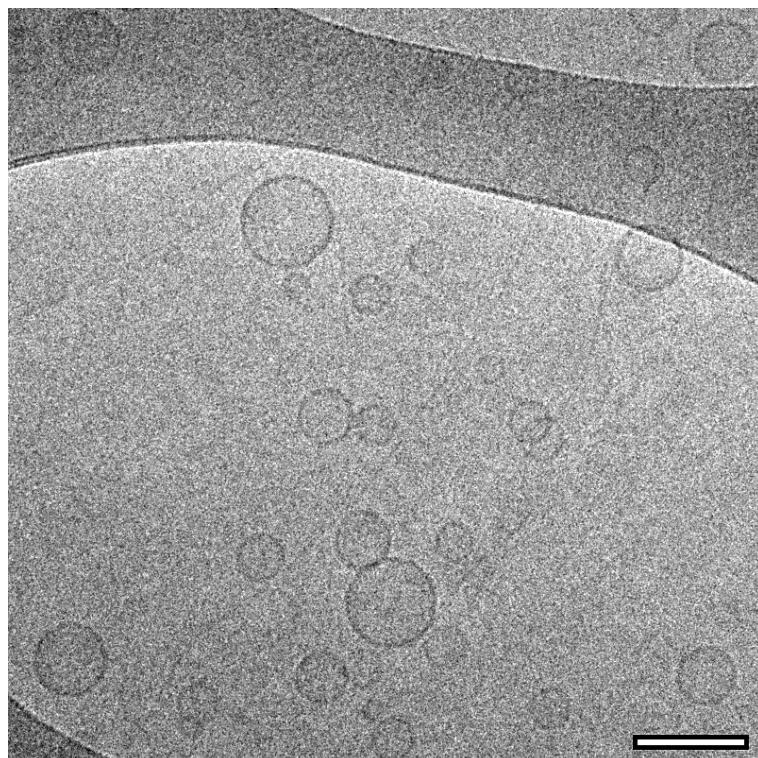


Figure 3.39. SUVs-AP et nanofibres de **Fmoc-FFY** autoassemblés observées par cryo-TEM 30 minutes après l'ajout du peptide précurseur **Fmoc-FFpY** (0.1 mg.mL^{-1}). Barre d'échelle = 100 nm.

Après 60 minutes de contact avec le peptide précurseur, on observe toujours aucune **SUVs-AP₁** déformée. Bien que nous ne soyons pas en mesure de faire un décompte exact du nombre de nanofibres par rapport au nombre de vésicules dans l'échantillon étudié, celui-ci semble néanmoins avoir significativement augmenté par rapport à la situation trente minutes avant. En outre, après analyse systématique de toutes les images prises, il apparaît clairement que toutes les nanofibres de plusieurs micromètres de long ont toutes un point de contact avec au moins une vésicule **SUVs-AP₁** (Figure 3.40).

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

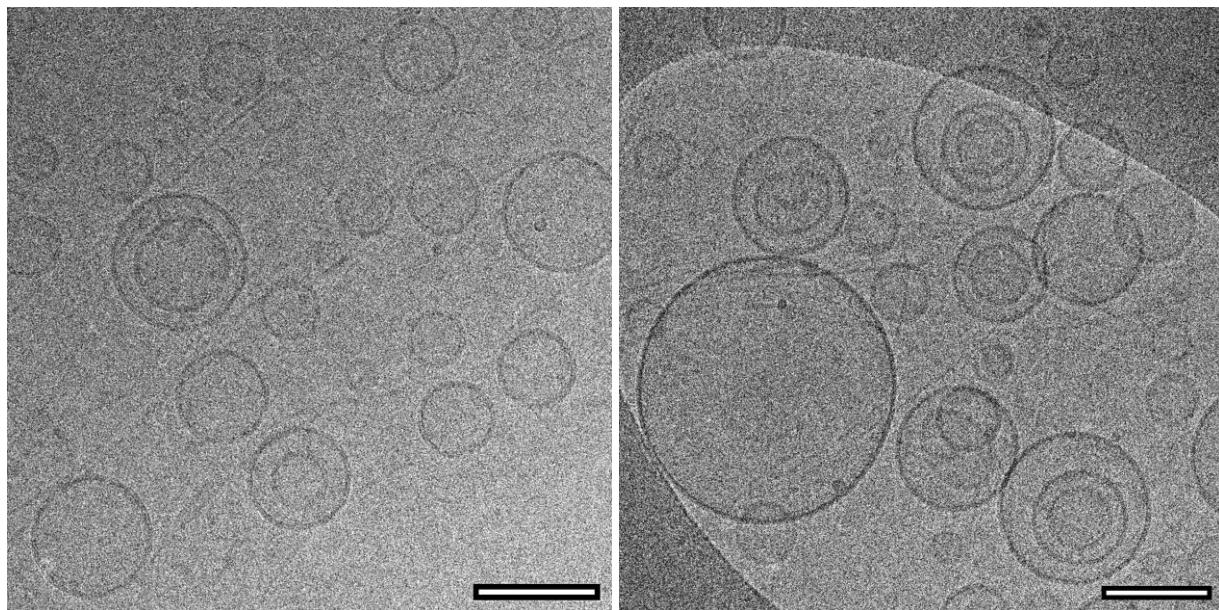


Figure 3.40. Deux images typiques de **SUVs-AP** et de nanofibres de **Fmoc-FFpY** observées par cryo-TEM 60 minutes après l'ajout du peptide précurseur **Fmoc-FFpY** (0.1 mg.mL^{-1}). Barre d'échelle = 100 nm.

Le même échantillon de **SUVs-AP₁** a été observé cette fois trois jours après l'ajout du peptide précurseur **Fmoc-FFpY** (Figure 3.41). À nouveau, aucune **SUV-AP₁** déformée n'est observée, en revanche de nombreuses vésicules présentent des agrégats dans leur environnement proche (croix rouges sur la Figure 3.41). Le nombre de nanofibres a augmenté et celles-ci restent localisées là où des vésicules se trouvent. Ainsi toutes les nanofibres ont au moins un point de contact avec une vésicule (Figure 3.41). Onze jours après l'introduction du peptide précurseur **Fmoc-FFpY**, la situation observée est la même qu'après trois jours, hormis le fait que le réseau nanofibrillaire s'est densifié là où des vésicules sont présentes (Figure 3.42).

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

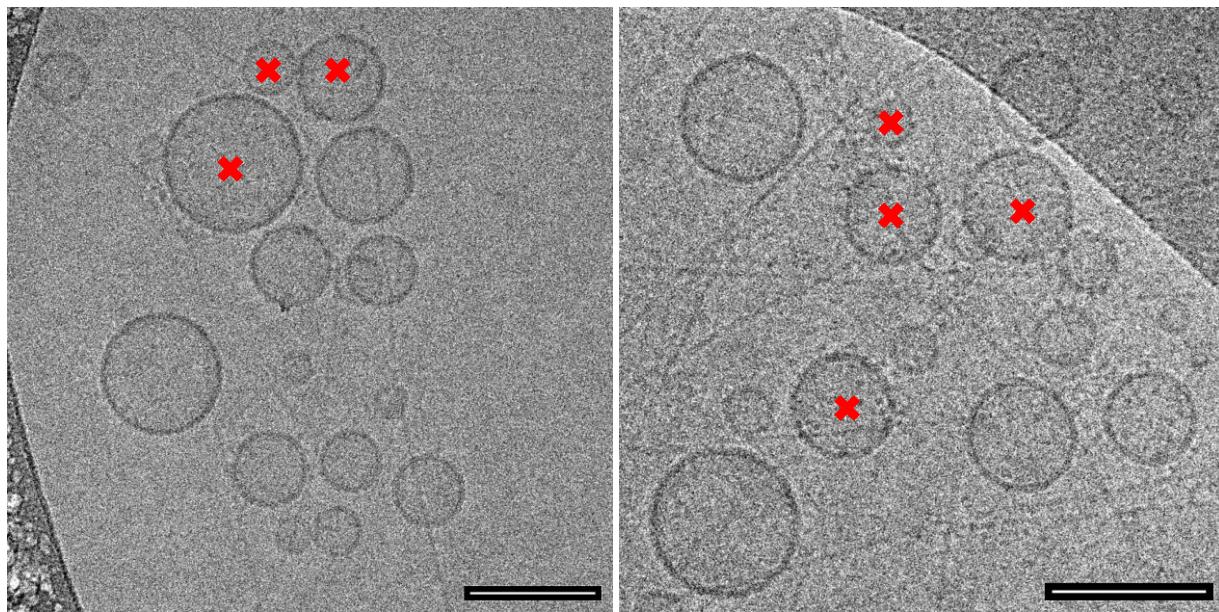


Figure 3.41. Deux images typiques de **SUVs-AP₁** et de nanofibres de **Fmoc-FFY** observées par cryo-TEM, trois jours après l'ajout du peptide précurseur **Fmoc-FFpY** (0.1 mg.mL^{-1}). Les croix rouges indiquent où des agrégats sont présents. Barre d'échelle = 100 nm.

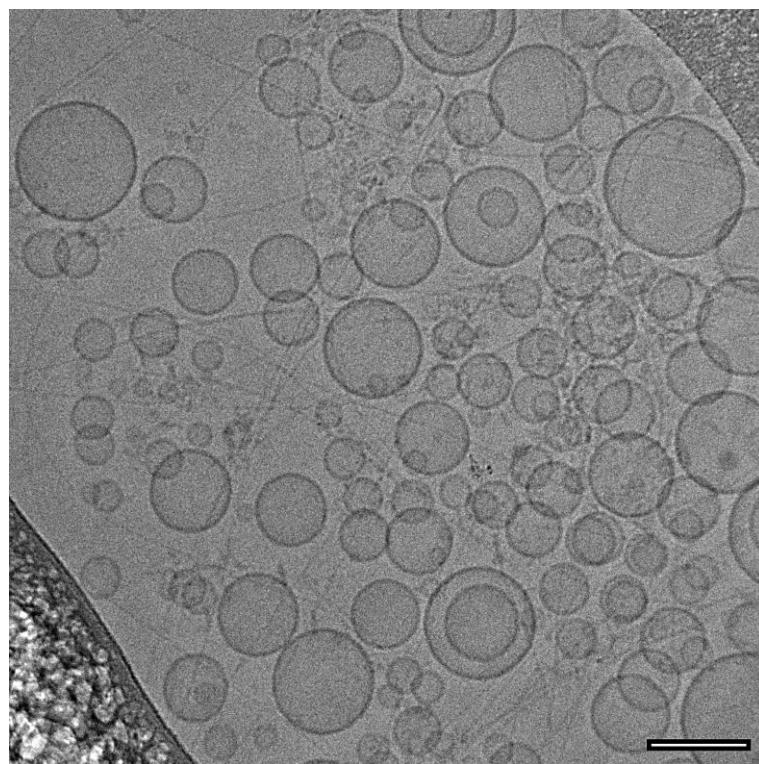


Figure 3.42. Image typique de **SUVs-AP₁** et de nanofibres de **Fmoc-FFY** observées par cryo-TEM, onze jours après l'ajout du peptide précurseur **Fmoc-FFpY** (0.1 mg.mL^{-1}). Barre d'échelle = 100 nm.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

En comparaison avec l'étude de l'autoassemblage depuis la surface de GUVS en partie 3 de ce Chapitre III, qui s'appuie sur des observations réalisées par microscopie à contraste de phase et épifluorescence, on peut relever les points suivants :

- La technique du cryo-TEM nous permet bel et bien d'observer la présence des nanofibres de peptides **Fmoc-FFY** autoassemblés, ce que l'on ne pouvait pas faire avec les outils de visualisation précédents.
- L'apparition d'agrégats en surface des vésicules semble une première étape avant la formation des nanofibres. En outre, on observe que ceux-ci sont soit liés, soit à proximité (moins de 10 nm de distance) de la surface de la bicouche phospholipidique des vésicules. Cette observation n'avait pas été faite dans l'étude précédente.
- Nous nous attendions à observer des nanofibres en grand nombre partant depuis la surface des vésicules comme un « soleil ». Or ce phénomène n'a pas été observé, ce qui indique que chacune des enzymes présentes à la surface des vésicules ne produit pas de nanofibre de manière indépendante, mais nous serions plutôt face à un processus coopératif.
- Les nanofibres sont toujours proches des vésicules, sont généralement en contact avec, la croissance de nanofibres depuis la surface de vésicules n'a jamais été observée. Plus surprenant, ces nanofibres sont soit très longues, ou alors n'existent pas. En effet, nous n'avons pas mis en évidence la présence d'amorce courte (de quelques dizaines de nanomètres par exemple) de ces nanofibres.
- Contrairement à l'étude précédente réalisée sur des GUVs, nous n'observons pas d'altération (aspect en « peau d'orange ») de la membrane des SUVs lors de l'autoassemblage.

4.3.3 Vers la mise en évidence des premiers instants de la formation des nanofibres de peptides autoassemblés de **Fmoc-FFY**

Malgré nos efforts, nous ne sommes pas parvenus à observer les premiers instants de la formation de nanofibres de peptides autoassemblés depuis la surface des vésicules. Nous observons une première étape conduisant à l'apparition d'une rugosité de surface, puis la formation d'agrégats en surface et dans l'environnement proche des vésicules, avant leur disparition et l'apparition de longues nanofibres. Faisant l'hypothèse que la quantité de **Fmoc-FFY** donnant naissance à la formation des nanofibres était trop faible,

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

nous avions augmenté la concentration en précurseurs **Fmoc-FFpY**. Poursuivant dans cette voie, nous avons décidé de favoriser l'apparition de ces événements (densité locale d'enzymes plus grande, donc hydrolyse de **Fmoc-FFpY** et accumulation locale de **Fmoc-FFY** plus importantes) autour des vésicules en immobilisant plus d'**AP** à leur surface. Pour ce faire, nous avons fabriqués des **SUVs-biot₁₀** que nous avons ensuite fonctionnalisées avec l'**AP-strep** pour obtenir des **SUVs-AP₁₀** comme décrit en partie 4.2 de ce Chapitre III.

Dans un premier temps, les **SUVs-AP₁₀** ont été mises en contact avec le précurseur **Fmoc-FFpY** à une concentration de 0.1 mg.mL^{-1} puis observées 15 min plus tard. L'ensemble des SUVs observées présentent une rugosité importante à la surface de leur membrane (Figure 3.43). D'autre part, environ la moitié des **SUVs-AP₁₀** sont déformées : elles adoptent une forme oblongue ou perdent leur morphologie sphérique comme observées en l'absence de peptides **Fmoc-FFpY**. Sur la Figure 3.43, on observe une vésicule qui a pris la forme d'un « bec de canard » (indiqué par une flèche rouge sur la Figure 3.43). Dans cet espace confiné on constate une importante concentration d'agrégats, mesurant chacun environ 5 nm et semblent s'aligner (flèche rouge sur la Figure 3.43).

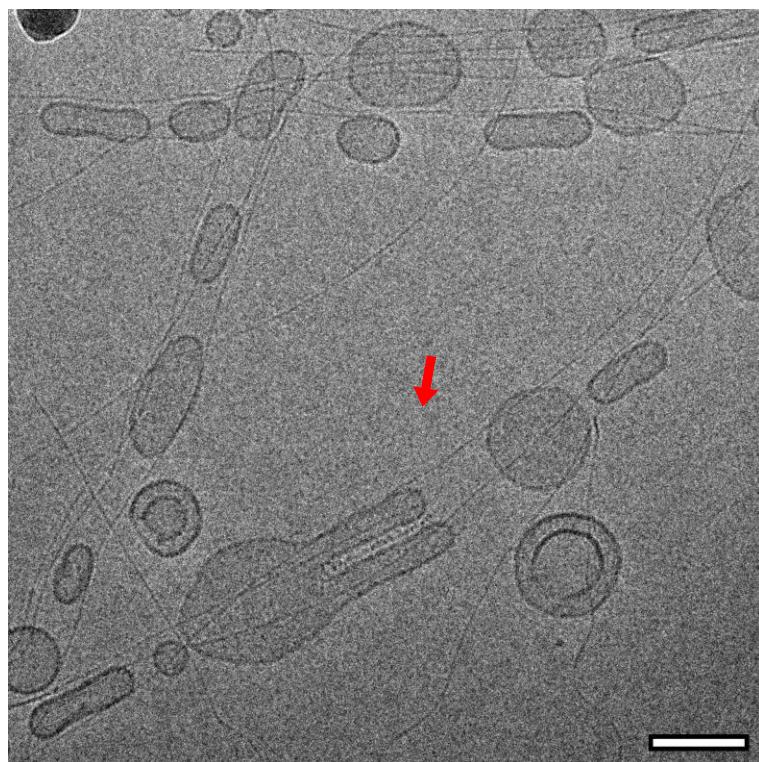


Figure 3.43. Image typique de **SUVs-AP₁₀** et nanofibres de **Fmoc-FFY** autoassemblés observées par cryo-TEM 15 min après l'introduction du peptide précurseur **Fmoc-FFpY** à forte concentration (0.1 mg.mL^{-1}). La flèche rouge indique la SUV déformée en forme de « bec de canard ». Barre d'échelle = 100 nm.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

Cette organisation pourrait-elle être à l'origine de la formation des nanofibres ? Est-ce que la formation des fibres résulterait d'un assemblage linéaire d'agrégats mis bout à bout ?

De façon assez surprenante, les vésicules **SUVs-AP₁₀**, présentant une densité en AP plus importante à leur surface que les SUVs ou GUVS utilisées précédemment, semblent se déformer pour adhérer aux nanofibres. Est-ce que les nanofibres déforment les vésicules lorsqu'elles se forment, ou bien les vésicules adhèrent à la surface des nanofibres et se déforment en interagissant avec elles ? Dans le cas de certaines **SUVs-AP₁₀**, il ne s'agit plus de simples points de contact, mais véritablement de zones de contact étendues allant jusqu'à une centaine de nanomètres (Figures 3.43 et 3.44). Dans certains cas, les vésicules semblent s'étaler sur les fibres (flèche rouge sur la Figure 3.44), dans d'autres elles en sont à moins de 10 nm (flèche blanche sur la Figure 3.44).

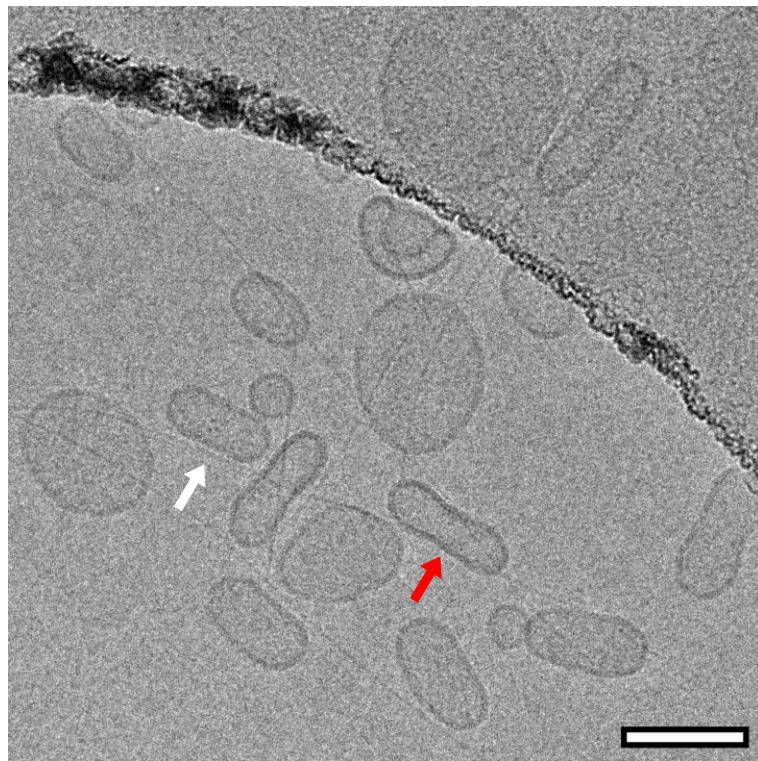


Figure 3.44. SUVs-AP₁₀ et nanofibres de **Fmoc-FFY** observées en cryo-TEM 15 min après l'ajout du **Fmoc-FFpY** (0.1 mg.mL⁻¹). La flèche rouge indique la nanofibre s'étalant sur une SUV et la flèche blanche indique la fibre se trouvant à une dizaine de nanomètre de la SUV. . Barre d'échelle = 100 nm.

Malgré l'augmentation de la densité d'**AP** à la surface des SUVs, nous n'avons pas été en mesure d'observer les premiers stades de la formation des nanofibres de peptides autoassemblés. Cependant, le cas particulier de la vésicule en forme de « bec de canard » ci-dessus (Figure 3.43), nous laisse à penser que

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

davantage de peptide s'autoassemble. Augmenter la quantité de peptide précurseur pourrait nous permettre d'isoler la « nucléation » et les premiers instants de la croissance des nanofibres pour en élucider le mécanisme. Nous avons alors utilisé le **Fmoc-FFpY** à une concentration de 1 mg.mL^{-1} en présence de **SUVs-AP}_{10}**. Bien entendu, si la densité d'**AP** à la surface des enzymes est importante et si la concentration en peptide précurseur est élevée, les évènements que l'on souhaite observer vont se produire très rapidement après le mélange. Les images de cryo-SEM ont donc été prises dès une minute après le mélange (Figure 3.45). Il est déjà possible d'observer de longues nanofibres formées. Cependant, on observe également des nanofibres très courtes, certaines de l'ordre de seulement une dizaine de nanomètres. Les vésicules **SUVs-AP}_{10}** sont déformées et semblent s'aligner ou s'étirer le long de nanofibres. D'autre part, la surface de leur membrane est rugueuse et pour certaines vésicules, on observe un ensemble d'agrégats nanométriques sur les membranes et dans un environnement très proche. Cette fois, on observe également des nanofibres dans le prolongement d'agrégats en accord avec l'idée qu'ils seraient des assemblages de **Fmoc-FFY**, et que la formation de nanofibres résulterait de leur l'association.

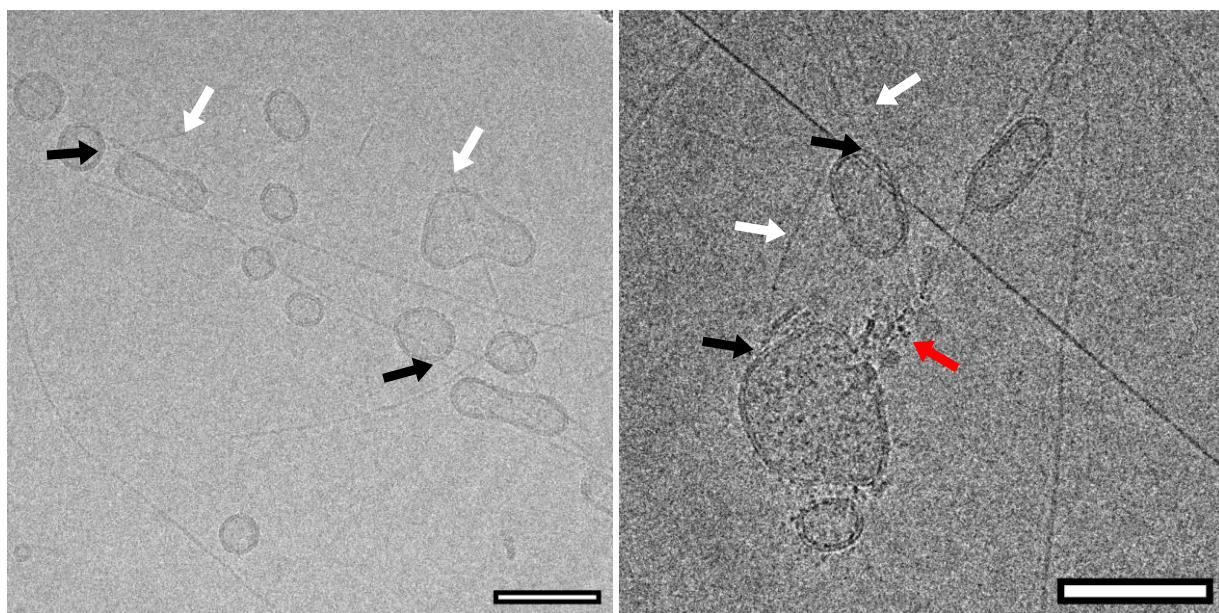


Figure 3.45. Images typiques de **SUVs-AP}_{10}** et de nanofibres de **Fmoc-FFpY** autoassemblés observées en cryo-TEM une minutes après l'ajout du peptide précurseur **Fmoc-FFpY** (1 mg.mL^{-1}). La flèche blanche montre des nanofibres courtes de moins de 100 nm. La flèche rouge montre des agrégats semblant donner naissance à des nanofibres. La flèche noire indique une nanofibre qui démarre depuis une **SUVs-AP}_{10}**. . Barre d'échelle = 100 nm.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

5 Conclusions du Chapitre III

5.1 Porosité induite et localisation de l'autoassemblage à la surface des GUVs

Le suivi au cours du temps réalisé par microscopie à contraste de phase, épifluorescence et microscopie confocale à fluorescence nous a permis d'observer les effets induits par l'autoassemblage de **Fmoc-FFY** lorsqu'il est initié depuis la surface de **GUVs-AP**. Celui-ci semble être à l'origine d'une perte quasi-intégrale du contraste de phase sur l'ensemble des vésicules, un phénomène pouvant s'expliquer par la formation de pores au sein des membranes phospholipidiques. Ces pores sont transitoires car les vésicules restent intègres à l'échelle de plusieurs jours. Leur formation pourrait s'expliquer par une contrainte stérique imposée par des édifices autoassemblés en croissance sur la surface des membranes. Cette hypothèse est en accord avec la modification de la forme sphérique des **GUVs-AP** au cours du temps et de la morphologie de la membrane qui adopte un aspect « peau d'orange ». Il est à noter que l'assemblage de peptides pouvant induire la formation de pores sur des membranes phospholipidiques est à l'origine de l'action antimicrobienne de certaines séquences peptidiques. À titre d'exemple, le peptide **FLGALFKALSHLL** (PTP-7b), chargé positivement, adopte une conformation en hélice qui leur permet d'interagir de façon électrostatique avec les membranes plasmiques des cellules chargées négativement. Les hélices s'y autoassemblent pour former une entité supramoléculaire « pénétrante » qui, en s'enfouissant dans les membranes, conduisent à la lyse cellulaire (Figure 3.46).³⁵

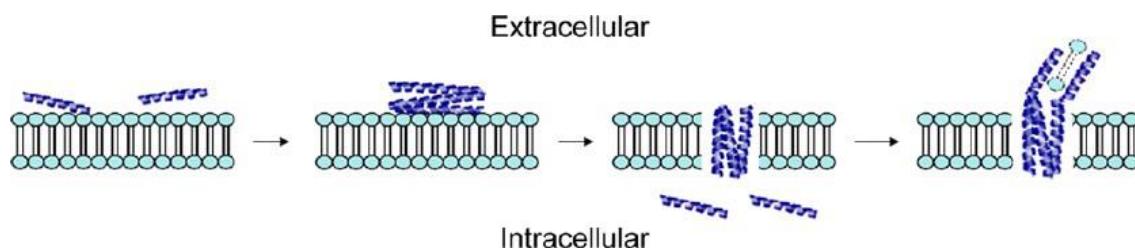


Figure 3.46. Représentation schématique de la lyse cellulaire induite par l'autoassemblage des peptides **FLGALFKALSHLL**.

Reproduit avec la permission de l'American Chemical Society depuis la référence [35].

5.2 Formation des nanofibres depuis la surface des SUVs et mécanisme du LEASA

5.2.1 Nucléation et croissance des nanofibres et leurs interactions avec les SUVs

Les expériences en cryo-TEM nous ont permis d'observer les nanofibres de **Fmoc-FFY** simultanément avec les SUVs et d'identifier les différentes étapes de leur formation. Les agrégats nanométriques, à la surface des SUVs sont composés de **Fmoc-FFY** et semblent être la manifestation du moment qui précède la nucléation des nanofibres. Contrairement à ce que nous avions supposé, les nanofibres ne sont pas initiées aléatoirement sur toute la surface des SUVs pour former un réseau de fibres

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

« en soleil ». Les points de contact entre l’extrémité de certaines nanofibres et les vésicules laissent à penser que les nanofibres se forment et croissent depuis la surface des SUVs. Cependant, il est très difficile d’observer la nucléation et la croissance des nanofibres. Ce phénomène ne semblent pas résulter d’un processus en chaîne où chaque nouvelle molécule de **Fmoc-FFY** formée s’assemblerait sur une nanofibre en croissance, mais plutôt d’un assemblage par étapes. Des (nano)agrégats « unitaires » s’assembleraient pour former des dimères, ces dimères pouvant s’assembler pour former des tétramères etc, conduisant à une croissance exponentielle des fibres. Ce mécanisme de croissance permet de rendre compte pourquoi nous observons aisément des situations où sont présents les (nano)agrégats et/ou de longues nanofibres, et plus difficilement des nanofibres courtes ou en formation.

Outre les événements directement liés à la formation des nanofibres nous avons également pu mettre en évidence l’impact que celles-ci ont sur les vésicules, à savoir des déformations qui conduisent à une perte de leur morphologie sphérique observée sur les GUVs. C’est l’introduction de davantage d’enzyme à la surface des SUVs qui a permis d’observer le même phénomène. Il faut rappeler ici deux points importants à considérer : (i) les phospholipides sont mobiles au sein des membranes, ce qui signifie que les AP peuvent se mouvoir³⁶ et (ii) les enzymes interagissent avec les autoassemblages des peptides en croissance de façon irréversible.³¹ Autrement dit, on pourrait supposer que les enzymes jouent le rôle de point d’ancrage entre les nanofibres et les vésicules, expliquant que certaines SUVs vont jusqu’à se déformer pour « s’étaler » sur des nanofibres.

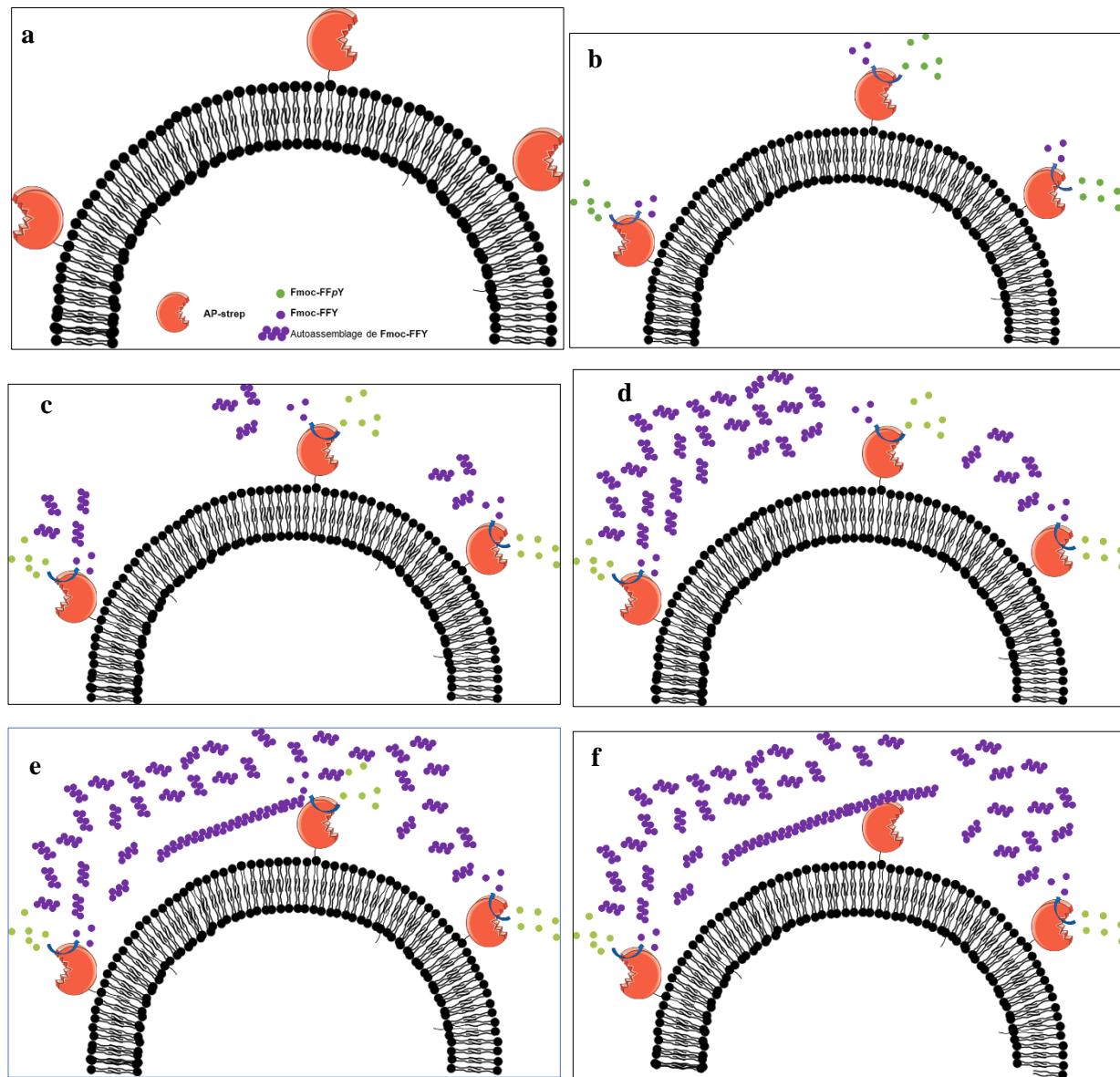
5.2.2 Mécanisme du LEASA depuis la surface de vésicules

Dans un premier temps, les vésicules porteuses de l’AP (Figure 3.47a) rencontrent le peptide précurseur **Fmoc-FFpY** et le processus de déphosphorylation enzymatique s’opère (Figure 3.47b). Le peptide **Fmoc-FFY** est généré à proximité de la surface de la membrane sous la forme de (nano)agrégats de peptides autoassemblés (Figure 3.47c). Le processus de déphosphorylation étant continu, la quantité de **Fmoc-FFY** générée augmente significativement, créant ainsi une concentration importante en (nano)agrégats (Figure 3.47d). Au-delà d’une certaine concentration, on peut supposer d’une amorce de nanofibre (Figure 3.47e). Certaines de ces amorces de fibres pourraient se lier à la membrane grâce aux AP (Figure 3.47f). Comme les enzymes sont mobiles au sein de la membrane, plusieurs d’entre elles peuvent se lier à une même amorce (Figure 3.47g). Les interactions nanofibre/AP se multiplient à mesure que la nanofibre croît, ainsi d’autres enzymes vont se lier à la nanofibre (Figure 3.47h). Finalement, le nombre d’interactions serait suffisamment important pour contraindre la bicouche phospholipidique de se déformer (Figure 3.47i). La croissance de la fibre se poursuivant, parallèlement à la bicouche

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

phospholipidique, celle-ci pourrait induire des contraintes mécaniques, causant ainsi la formation d'un pore à travers la membrane (Figure 3.47j)



Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

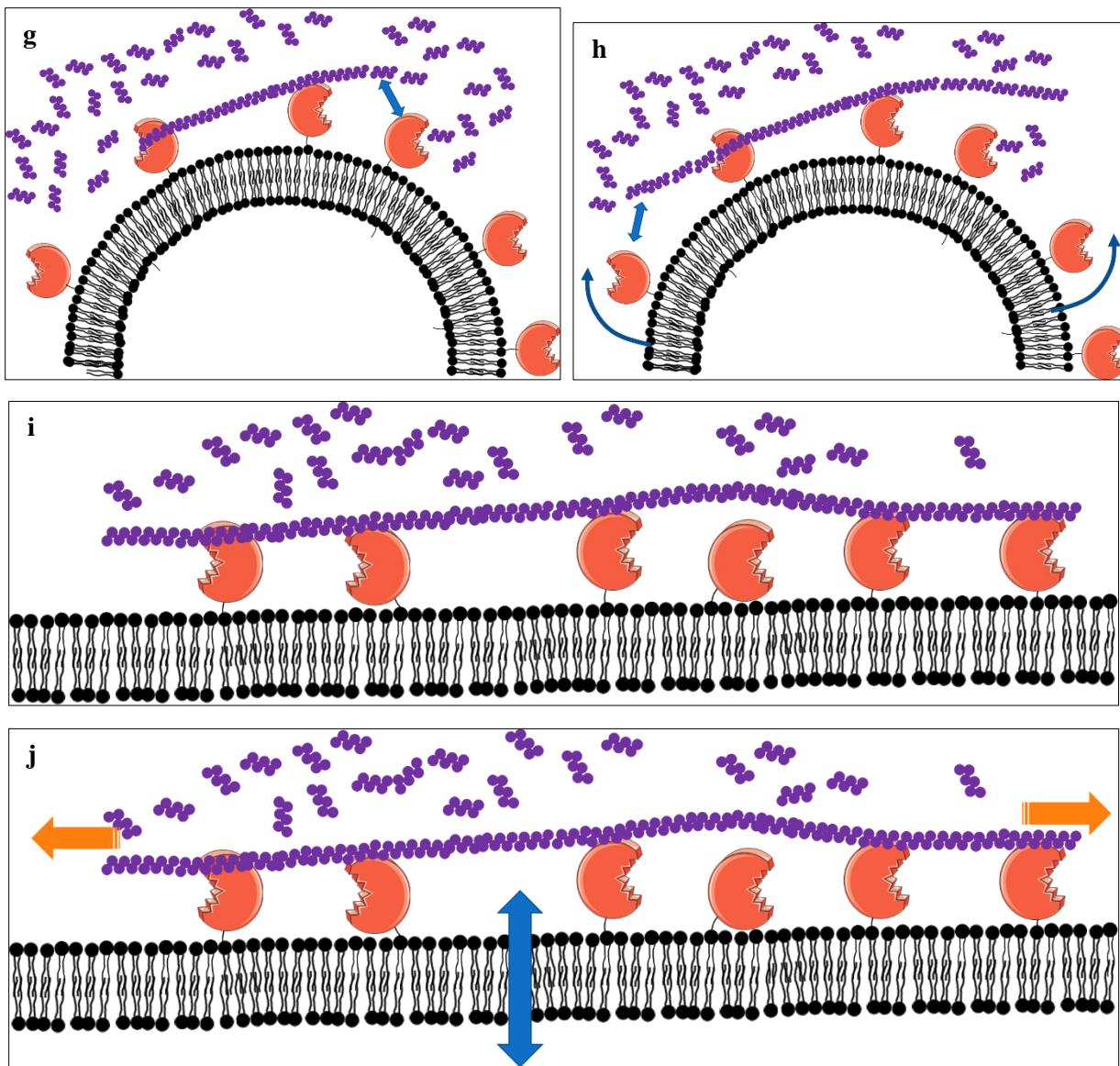


Figure 3.47. Représentation schématique du mécanisme du LEASA à la surface de vésicules.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

6 Références

- [1] C. Muller, A. Ontani, A. Bigo-Simon, P. Schaaf, L. Jierry, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2022**, *304*, 102660. DOI : 10.1016/j.cis.2022.102660.
- [2] M. Criado-Gonzalez, J. Rodon Fores, D. Wagner, A. P. Schröder, A. Carvalho, M. Schmutz, E. Harth, P. Schaaf, L. Jierry, F. Boulmedais, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 1156-1159. DOI : 10.1039/C8CC09437C.
- [3] M. Criado-Gonzalez, J. Rodon Fores, A. Carvalho, C. Blanck, M. Schmutz, L. Kocgozlu, P. Schaaf, L. Jierry, F. Boulmedais, *Langmuir* **2019**, *35*, 10838-10845. DOI : 10.1021/acs.langmuir.9b01420.
- [4] C. Vigier-Carrière, T. Garnier, D. Wagner, P. Lavalle, M. Rabineau, J. Hemmerlé, B. Senger, P. Schaaf, F. Boulmedais, L. Jierry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10198-10201. DOI : 10.1002/ange.201504761.
- [5] X. Sun, Y. Dong, Y. Liu, N. Song, F. Li, D. Yang, *Sci China Chem.* **2022**, *65*, 31-47. DOI : 10.1007/s11426-021-1091-x.
- [6] Z. Yang, G. Liang, Z. Guo, Z. Guo, B. Xu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (43), 8216-8219. DOI : 10.1002/anie.200701697.
- [7] M. Hughes, S. Debnath, C. W. Knapp, R. V. Ulijn, *Biomater. Sci.* **2013**, *1*, 1138-1142. DOI : 10.1039/c3bm60135h.
- [8] T. Hiratsuka, T. Kato, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 6318–6322. DOI : 10.1016/S0021-9258(18)45572-X.
- [9] Y. Gao, J. Shi, D. Yuan, B. Xu, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1033. DOI : 10.1038/ncomms2040.
- [10] J. Li, Y. Gao, Y. Kuang, J. Shi, X. Du, J. Zhou, H. Wang, Z. Yang, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (26), 9907–9914. DOI : 10.1021/ja404215g.
- [11] H. Wang, Z. Feng, D. Wu, K. J. Fritzsching, M. Rigney, J. Zhou, Y. Jiang, K. Schmidt-Rohr, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10758-10761. DOI : 10.1021/jacs.6b06075.
- [12] J. Zhou, X. Du, C. Berciu, H. He, J. Shi, D. Nicastro, B. Xu, *Chem.* **2016**, *1*, 246-263. DOI : 10.1016/j.chempr.2016.07.003.
- [13] Z. Feng, X. Han, H. Wang, T. Tang, B. Xu, *Chem.*, **2019**, *5* (9), 2442-2449. DOI : 10.1016/j.chempr.2019.06.020.
- [14] R. A. Pires, Y. M. Abul-Haija, D. S. Costa, R. Novoa-Carballal, R. L. Reis, R. V. Ulijn, I. Pashkuleva, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (2), 576–579. DOI : 10.1021/ja5111893.
- [15] D. Kalafatovic, M. Nobis, J. Son, K. I. Anderson, R. V. Ulijn, *Biomaterials*, **2016**, *98*, 192-202. DOI : 10.1016/j.biomaterials.2016.04.039.
- [16] C. Wu, C. Wang, T. Zhang, G. Gao, M. Wei, Y. Chen, X. Li, F. Wang, G. Liang, *Adv. Healthcare Mater.* **2022**, *11*, 2101346. DOI : 10.1002/adhm.202101346.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

- [17] P. Walde, K. Cosentino, H. Engel, P. Stano, *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 848-865. DOI : 10.1002/cbic.201000010.
- [18] BLD Pharma, **2022**, Fmoc-Tyr(H₂PO₃)-OH, BLD Pharma Products/Life Science/Amino acids/Amino acid derivatives, <https://www.blldpharm.com/products/147762-53-6.html>, consulté le 19/08/2022.
- [19] Iris Biotech, **2022**, Fmoc-L-Tyr(PO₃H₂)-OH, Iris Biotech Products, <https://www.iris-biotech.de/fr/faa1755>, consulté le 19/08/2022.
- [20] Merck, **2022**, Fmoc-Tyr(PO₃H₂)-OH, Merck/Sigma-Aldrich/Products, <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sial/00147>, consulté le 19/08/2022.
- [21] abcr, **2022**, N-alpha-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-L-phosphotyrosine, 98% (Fmoc-L-Tyr(PO₃H₂)-OH), abcr Products, https://abcr.com/de_fr/ab176017, consulté le 19/08/2022.
- [22] A. Weinberger, F.-C. Tsai, G. H. Koenderink, T. F. Schmidt, R. Itri ; W. Meier, T. Schmatko, A. Schröder, C. Marques, *Biophys. J.* **2013**, *105*, 154-164. DOI : 10.1016/j.bpj.2013.05.024.
- [23] L. Chaiet, F. J. Wolf, *Arch. Biochem. Biophys.* **1964**, *106*, 1-5. DOI : 10.1016/0003-9861(64)90150-X.
- [24] P. F. Alewood, R. B. Johns, R. M. Valerio, *Synthesis*, **1983**, 30-31.
- [25] S. Changqing, 2018-12-21, Modified synthesis method of oxidative phosphorylation-L-tyrosine (CN109053797A), Chengdu Baishixing Science and Tech Industry CO Ltd.
- [26] E. A. Ottinger, L. L. Shekels, D. A. Bernlohr, G. Barany, *Biochemistry*, **1993**, *32* (16), 4354-4361. DOI : 10.1021/bi00067a027.
- [27] J. Rodon Fores, **2019**, Auto-assemblages localisés assistés par des protéines : du mécanisme aux applications, Thèse, Université de Strasbourg, Strasbourg.
- [27] D. Mertz, **2008**, Films multicouches de polyélectrolytes répondant aux stimuli mécaniques : applications à la libération de molécules et à la biocatalyse contrôlées, Thèse, Université de Strasbourg, Strasbourg.
- [28] D. B. Murphy, R. Oldfield, S. Schwartz, M. W. Davidson, **2022**, Introduction to Phase Contrast Microscopy, Nikon Instruments Inc. <https://www.microscopyu.com/techniques/phase-contrast/introduction-to-phase-contrast-microscopy>, consulté le 14/09/2022.
- [29] A. Elhaddaoui, A. Delacourte, S. Turrel, *J. Mol. Struct.* **1993**, *294*, 115-118. DOI : 10.1016/0022-2860(93)80328-S.
- [30] J. Rodon Fores, A. Bigo-Simon, D. Wagner, M. Payrastre, C. Damestoy, L. Blandin, F. Boulmedais, J. Kelber, M. Schmutz, M. Rabineau, M. Criado-Gonzalez, P. Schaaf, L. Jierry, *Polymers*, **2021**, *13*, 1793. DOI : 10.3390/polym13111793.

Chapitre III

Étude de la formation et de la croissance de nanofibres de peptides depuis la surface de vésicules phospholipidiques modifiées par des enzymes

- [31] J. Y. Runser, M. Criado-Gonzalez, F. Fneich, M. Rabineau, B. Senger, L. Jierry, P. Schaaf, *J. Colloid Interface Sci.* **2022**, *620*, 234-241. DOI : 10.1016/j.jcis.2022.03.150.
- [32] W. HPitcher, W. H. Huestis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *296* (5), 1352-1355. DOI : 10.1016/S0006-291X(02)02092-2.
- [33] M. Almgren, K. Edwards, G. Karlsson *Colloids and Surfaces A*, **2000**, *174*, 3-21. DOI : 10.1016/S0927-7757(00)00516-1.
- [34] M. Schmutz, D. Kling, S. Tzartos, A. Brisson, *J. Histochem. Cytochem.* **1994**, *42* (3), 315-327. DOI : 10.1177/42.3.7508471.
- [35] L. Chen, N. Patrone, J. F. Liang, *Biomacromolecules*, **2012**, *13*, 3327-3333. DOI : 10.1021/bm301106p.
- [36] R. D. Kornberg, H. M. McConnell, *Prod. Nat. Acad. Sci.* **1971**, *68* (10), 2564-2568. DOI : 10.1073/pnas.68.10.2564.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés.

Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

Table des matières

Table des matières.....	181
1 Contexte	182
1.1 Hydrogel supramoléculaire catalytiquement actif supporté.....	182
1.2 Comment accroître le nombre d'enzymes immobilisées au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés ?	185
2 Etude de la préparation d'un film multicouche contenant une, deux ou trois couches d'enzyme	187
2.1 Suivi de la construction des films multicouches enzymatique par QCM-D	187
2.2 Mesure de l'épaisseur des hydrogels supramoléculaires formés à partir d'une, deux ou trois couches d' AP présentes dans la multicouche	189
2.3 Étude de l'activité enzymatique des hydrogels supramoléculaires en fonction du nombre de couches d' AP au sein des films de polyélectrolytes.....	190
2.4 Caractérisation de la présence des hydrogels supramoléculaires à la surface des mousses polymères à cellules ouvertes	192
3 Suivi de l'hydrolyse enzymatique de <i>p</i>NPP dans un réacteur en flux	195
3.1 Réacteur en « flux recyclé ».....	195
3.2 Lavage des mousses Mel@AP	197
3.3 Optimisation des conditions.....	198
3.3.1 Premier suivi et réutilisabilité des mousses Mel@AP	198
3.3.2 Expérience de contrôle négatif : suivi de la conversion du <i>p</i> NPP en <i>p</i> NP en flux recyclé en présence de mousses de mélamine « nues ».....	202
4 Premiers suivis de l'activité catalytique des mousses Mel@AP en flux continu	203
4.1 Développement d'un réacteur basé sur un hydrogel supramoléculaire enzymatique supporté sur une mousse en mélamine Mel@AP , pour une production en flux continu.	203
4.2 Comparaison des activités des mousses avec et sans hydrogel.....	203
5 Conclusion et perspectives.....	205
Références.....	207

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

1 Contexte

1.1 Hydrogel supramoléculaire catalytiquement actif supporté

Comme exposé dans le Chapitre I, l'application du concept de LEASA trouve également un intérêt dans le domaine du développement de procédés pour la production de composés d'intérêts en flux. L'unique exemple dans ce domaine a été établi par notre équipe, plus précisément par le Dr. J. Rodon Fores qui a conçu et développé en 2019 un hydrogel catalytique supporté sur des mousses polymère à cellules ouvertes, utilisé dans un réacteur en flux.¹ L'application du LEASA permet de former un hydrogel catalytique uniquement là où les enzymes sont préalablement déposées, en l'occurrence à la surface de mousses polymères qui jouent donc le rôle de support catalytique. Dans ces travaux, l'enzyme utilisée est l'**AP** et le peptide précurseur est un heptapeptide bi-phosphorylé, le **Fmoc-GFFpYGHpY** (**H** = *L*-histidine). Une fois ce précurseur déphosphorylé par l'**AP**, il conduit à l'autoassemblage de **Fmoc-GFFYGHY** dont l'édifice supramoléculaire présente des propriétés catalytiques de type estérase (Figure 4.1), ce qui en fait un hydrogel supramoléculaire supporté catalytiquement actif (*supported catalytically-active supramolecular hydrogel* ou *supported-CASH*).

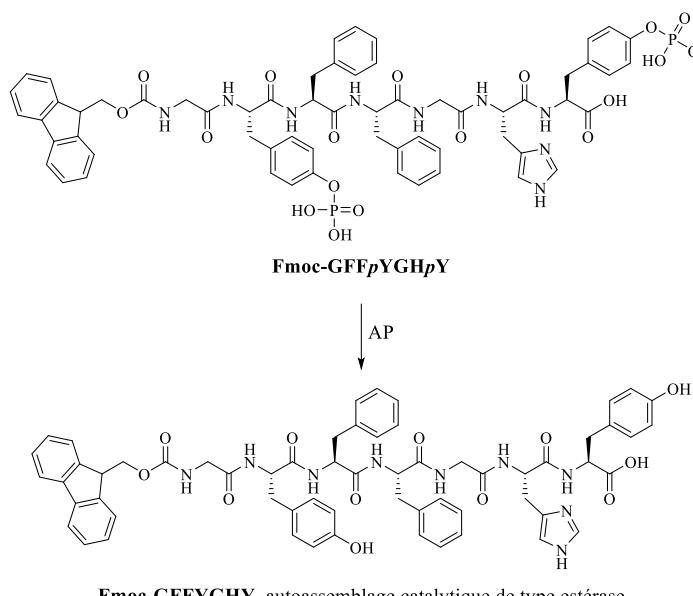


Figure 4.1. Structure du **Fmoc-GFFpYGHpY** déphosphorylé par l'**AP** en **Fmoc-GFFYGHY**. Reproduit avec la permission de Wiley-VCH depuis la référence [1].

Pour concevoir cet hydrogel supramoléculaire supporté, l'**AP** est immobilisée de manière non covalente à la surface d'une mousse en mélamine à cellules ouvertes, qui est ensuite mise en contact avec le peptide précurseur **Fmoc-GFFpYGHpY**. Les Figures 4.1a et 4.1b montrent une section de mousse avant

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

et après la formation de l'hydrogel vue par cryo-SEM, soulignant la présence d'un réseau fibrillaire entre les arrêtes de la mousse en mélamine. Ceci a conduit à la formation de l'hydrogel au sein même de la mousse qui a ensuite été introduite dans une colonne et utilisée en flux, dont une représentation du montage est présentée en Figure 4.1c. La conversion du 4-phényle acétate (**pNA**) et du (tert-butoxycarbonyl)-*L*-tyrosinate de méthyle (**MtBL**) en leur acide carboxylique correspondant a été étudiée en flux (respectivement Figures 4.1d et e).

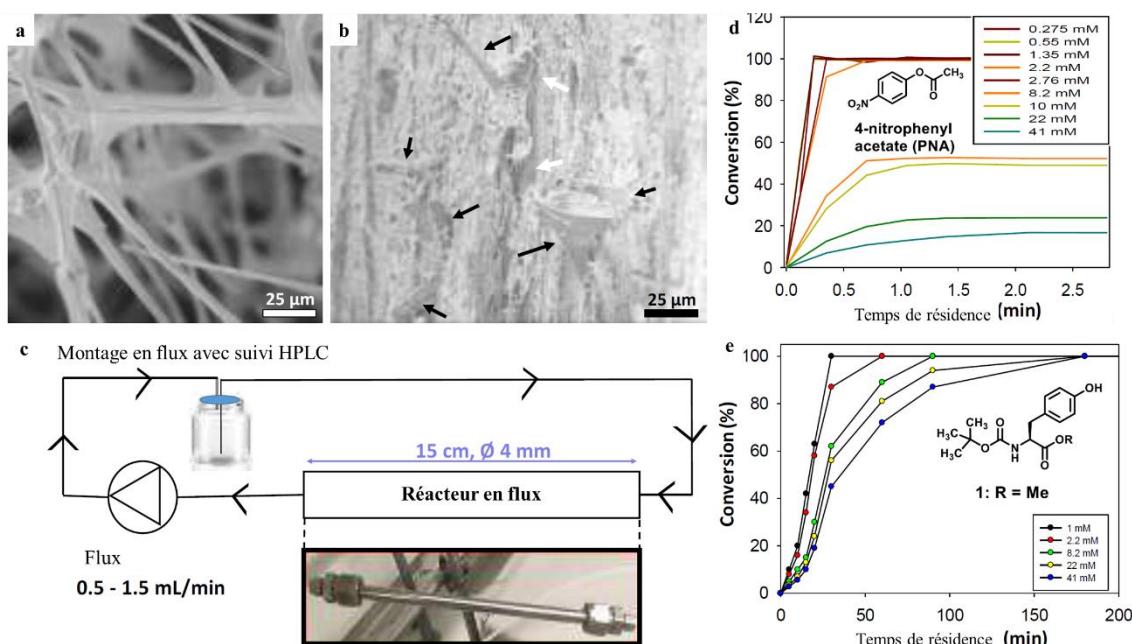


Figure 4.2. (a) Mousse en mélamine à cellules ouvertes observée par SEM. (b) Mousse en mélamine avec autoassemblage de Fmoc-GFFYGHY vue par cryo-SEM (flèches noires : arrêtes de la mousse de mélamine ; flèches blanches : réseau fibrillaire de peptides autoassemblés). (c) Représentation schématique du montage en flux avec colonne contenant la mousse fonctionnalisée. Conversion au cours du temps du (d) **pNA** et du (e) **MtBL**. Reproduit avec la permission de Wiley-VCH depuis la référence [1]

Cependant, au cours de son doctorat, la Dr. J. Rodon Fores a également démontré que ce même matériau catalysait l'hydrolyse du 4-nitrophényle phosphate (**pNPP**) en 4-nitrophénol (**pNP**) (Figure 4.3a). La mousse modifiée en surface par l'hydrogel présente donc des propriétés de type phosphatase non pas issues de l'hydrogel à proprement dit, mais bien entendu des enzymes qui ont été préalablement immobilisées dans l'hydrogel supramoléculaire. Ces résultats sont en accord avec les observations déjà reportées par Li et *al.*² et Q. Wang et *al.*³ qui ont montré que des hydrogels supramoléculaires formés à l'aide de l'**AP** étaient toujours enzymatiquement actifs. Cependant, la Dr. J. Rodon Fores a mis en évidence un autre aspect inattendu : l'activité enzymatique est maintenue sur des durées particulièrement longues : plus d'une trentaine d'essais catalytiques (hydrolyse du **pNPP**) ont été réalisés sur une durée d'un an en

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

utilisant la même colonne (et donc le même hydrogel supramoléculaire supporté), sans perte de l'activité catalytique de l'enzyme (Figure 4.3b). Ces résultats ont fait l'objet d'un brevet.⁴

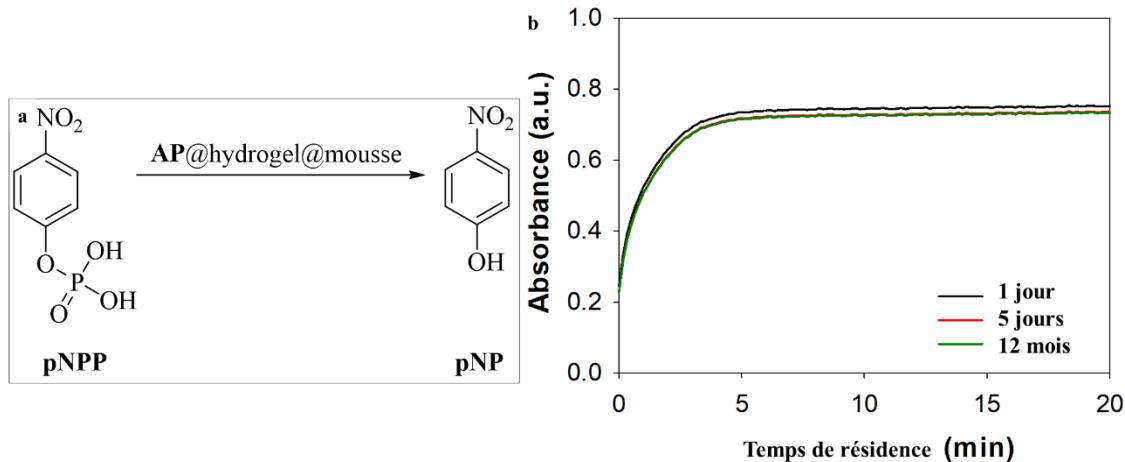


Figure 4.3. (a) Représentation schématique de l'hydrolyse du *p*NPP en *p*NP par l'AP présente au sein de l'hydrogel supporté par une mousse polymère (est appelé AP@hydrogel@mousse dans cette Figure). (b) Courbes d'activité de la mousse âgée de 1 jour, 5 jours et 12 mois vis-à-vis du *p*NPP. Issu de [5].

Ainsi, l'enzyme, présente au sein de l'hydrogel supramoléculaire, dont elle a elle-même initié la formation, voit son activité catalytique stabilisée. Ces résultats ont conduit au financement d'un projet de recherche soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche, le projet CASH (2021-2025) dans lequel s'inscrivent les travaux décrits dans ce chapitre.⁵

Si l'activité enzymatique est bel et bien présente dans ces hydrogels supportés et stable au cours du temps, celle-ci reste cependant limitée par la faible surface fournie par le support, en l'occurrence la mousse en mélamine à cellule ouverte. Les objectifs de ce second projet de ma thèse qui constituent ce Chapitre IV sont les suivants :

1. Augmenter la quantité d'enzymes immobilisées au sein des hydrogels supramoléculaires supportés. Puis, montrer qu'en augmentant la quantité d'enzymes supportées, on augmente l'activité enzymatique du matériau dans un procédé en flux continu.
2. La stabilité de l'activité catalytique de l'AP a été observée dans le cas d'un hydrogel à base de l'heptapeptide Fmoc-GFFYGHY.¹ On souhaite montrer qu'il est possible d'utiliser d'autres peptides pour piéger l'AP, idéalement des peptides de séquences plus simples.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

3. Les hydrogels supramoléculaires permettent d'immobiliser les enzymes à la surface des mousses. Montrer alors les intérêts (s'il y en a) de cette approche par rapport à l'adsorption d'enzymes à la surface des mêmes mousses polymères.

Pour répondre à ces trois points **1., 2. et 3.**, il est proposé d'utiliser le système enzyme/précureur **AP/Fmoc-FFpY** déjà mis à profit comme système modèle dans le cadre du Chapitre III. En plus d'être déjà parfaitement maîtrisé par notre groupe, ce système permet également d'utiliser un peptide précurseur de structure plus simple et de préparation plus rapide et moins onéreuse.

1.2 Comment accroître le nombre d'enzymes immobilisées au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés ?

La formation d'un hydrogel supramoléculaire à la surface d'un matériau nécessite que l'enzyme qui initie la formation de l'autoassemblage ne soit pas immobilisée « de façon robuste » sur la surface. En effet, lorsque l'enzyme est liée de façon covalente sur la surface d'un matériau, on observe uniquement la formation de nanofibres étalées sur la surface, mais pas l'obtention d'un hydrogel.^{6,7} Il semble donc essentiel que l'enzyme puisse diffuser dans l'édifice autoassemblé en formation. Depuis 2015, mon laboratoire d'accueil localise des processus d'autoassemblage de peptides depuis la surface de divers matériaux en adsorbant, au préalable, des enzymes de façon électrostatique.⁸ Ceci est possible grâce à l'utilisation de la technique dite de « couche-par-couche » (plus connu sous le terme *Layer-by-Layer* en anglais ou LbL) décrite pour la première fois par G. Decher en 1994⁹ et 1997.¹⁰ Cette technique repose sur des interactions électrostatiques entre polyanions et polycations. Un tel film multicouche résultant est construit sur un substrat qui est trempé dans un premier temps dans une solution de polycation, puis rincé, puis trempé dans une solution de polyanion, puis rincé. L'ensemble du processus est répété jusqu'à obtenir le nombre de couches et l'architecture souhaitée (Figure 4.4). Cette technique s'est, entre autres, révélée particulièrement performante pour immobiliser des protéines^{11,12} à la surface de matériaux.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

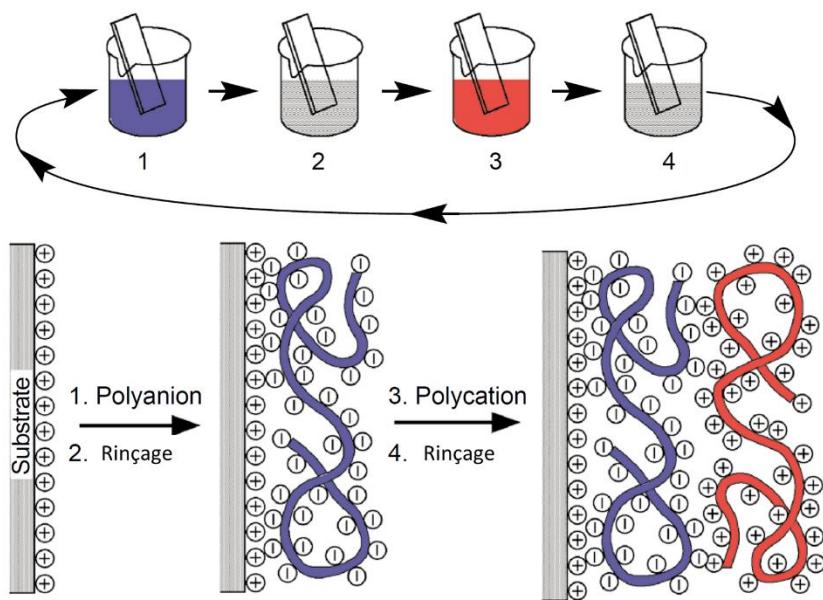


Figure 4.4. Représentation schématique de la technique du LbL. Reproduit avec la permission de l'American Association for the Advancement of Science depuis la référence [10].

La multicouche employée pour immobiliser l'**AP** au sein de la mousse de mélamine décrit par le Dr. J. Rodon Fores présente l'architecture suivante : **(PEI/PSS)₂/PEI/AP** où le **PEI** est la poly(éthylène imine), donc un polycation, et le **PSS** est le poly(styrène sulfonate) de sodium, un polyanion, dont les structures moléculaires sont représentées sur la Figure 4.5a. L'**AP** a un point isoélectrique situé entre 4.4 et 4.8.⁸ Ainsi, en travaillant à pH physiologique, l'enzyme est chargée négativement et s'adsorbe sur les polycations. Dans le cas de cette multicouche, l'**AP** est située au sommet du film, directement en contact avec la solution du peptide précurseur **Fmoc-FFpY** pour former l'hydrogel supramoléculaire. Pour pouvoir augmenter le nombre d'enzymes, il est proposé de déposer à la surface des mousses un film présentant plusieurs couches d'**AP**. Pour ce faire, notre choix s'est porté vers la multicouche possédant l'architecture suivante : **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n** où le polycation ici utilisé est le **PAH** = poly(hydrochlorure d'allylamine), *poly(allylamine hydrochloride)* et *n* le nombre de couches d'**AP** présentes. Le **PEI** est un polymère branché qui permet d'assurer un recouvrement important par des charges positives de la surface du matériau revêtu. La double couche de **(PSS/PAH)₂** permet aux couches suivantes d'être indépendantes de la nature du substrat (= du matériau). Le nombre *n* de bicouches **(PAH/AP)_n** permet de contrôler la quantité relative d'enzymes. Nous nous proposons de faire varier *n* de 1, 2 et 3.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

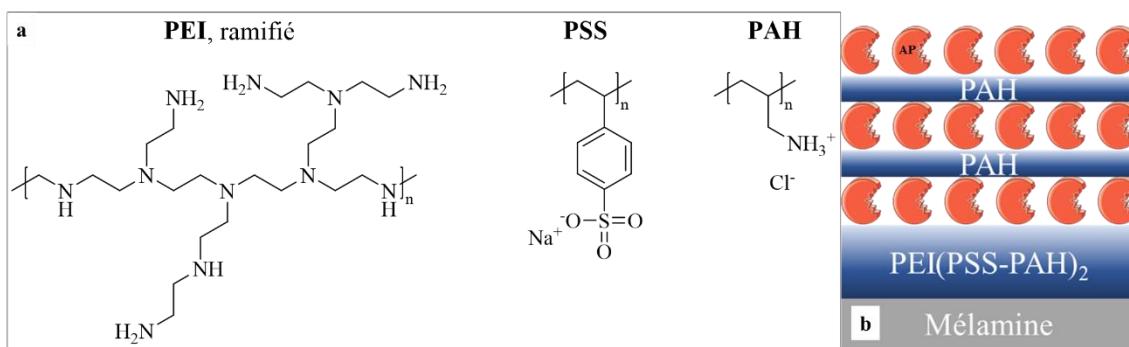


Figure 4.5. (a) Structures des différents polyélectrolytes, **PEI**, **PSS** et **PAH** utilisés pour (b) la construction de la multicouche visant à immobiliser une, deux ou trois couches d'**AP** à la surface d'une mousse en mélamine.

2 Etude de la préparation d'un film multicouche contenant une, deux ou trois couches d'enzyme

2.1 Suivi de la construction des films multicouches enzymatique par QCM-D

La microbalance à cristal de quartz avec suivi de la dissipation (QCM-D) est un outil d'analyse qui permet de suivre le dépôt de masse successif réalisé sur un cristal de quartz piézoélectrique. L'application d'un potentiel adéquat permet de faire vibrer ce matériau et tous dépôts de masse conduit à une diminution de sa fréquence de vibration Δf . En première approximation, cette diminution de fréquence est linéairement proportionnelle à la quantité de masse déposée. Plus de détails sur le principe et l'utilisation de cet instrument sont mentionnés dans le [Chapitre II](#). En plus de la variation de la fréquence de vibration fondamentale $v = 1$, la variation de fréquence de la troisième, cinquième et septième harmonique Δf_v ($v = 3, 5$ et 7) est suivie. Il est alors possible de tracer $\Delta f_v/v$ en fonction du temps pour ($v = 3, 5$ et 7).

Les trois multicouches d'architecture **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n** (avec $n = 1, 2$ et 3) ont été construites et suivies par QCM-D (Figure 4.6). Pour ces trois constructions, on observe que chaque dépôt conduit à une diminution de la fréquence quel que soit l'harmonique considérée. Plus particulièrement, on distingue nettement une diminution plus importante de la variation de fréquence lorsque l'on passe d'une couche, à deux couches puis à trois couches d'**AP**. Cela signifie qu'en augmentant le nombre de couches d'enzymes on est bien en mesure d'augmenter la quantité de masse d'**AP** dans la multicouche. On notera également que les rinçages effectués à la fin de la construction de chaque film n'affectent pas l'intégrité de ces derniers.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

Il est alors possible de mettre en contact chacun de ces multicoches enzymatiques avec une solution de peptides précurseurs **Fmoc-FFpY** et ainsi d'observer si la masse d'hydrogel supramoléculaire formé est bien proportionnelle au nombre de couches d'enzyme présentes dans la multicoche. Ceci a été réalisé mais la masse d'hydrogel formé étant tellement importante, que les valeurs des variations de fréquences observées ne peuvent plus être mesurées avec confiance par QCM-D. Il a donc été proposé de mesurer l'épaisseur des hydrogels depuis chacune des multicoches enzymatiques d'une autre manière décrite dans la partie suivante.

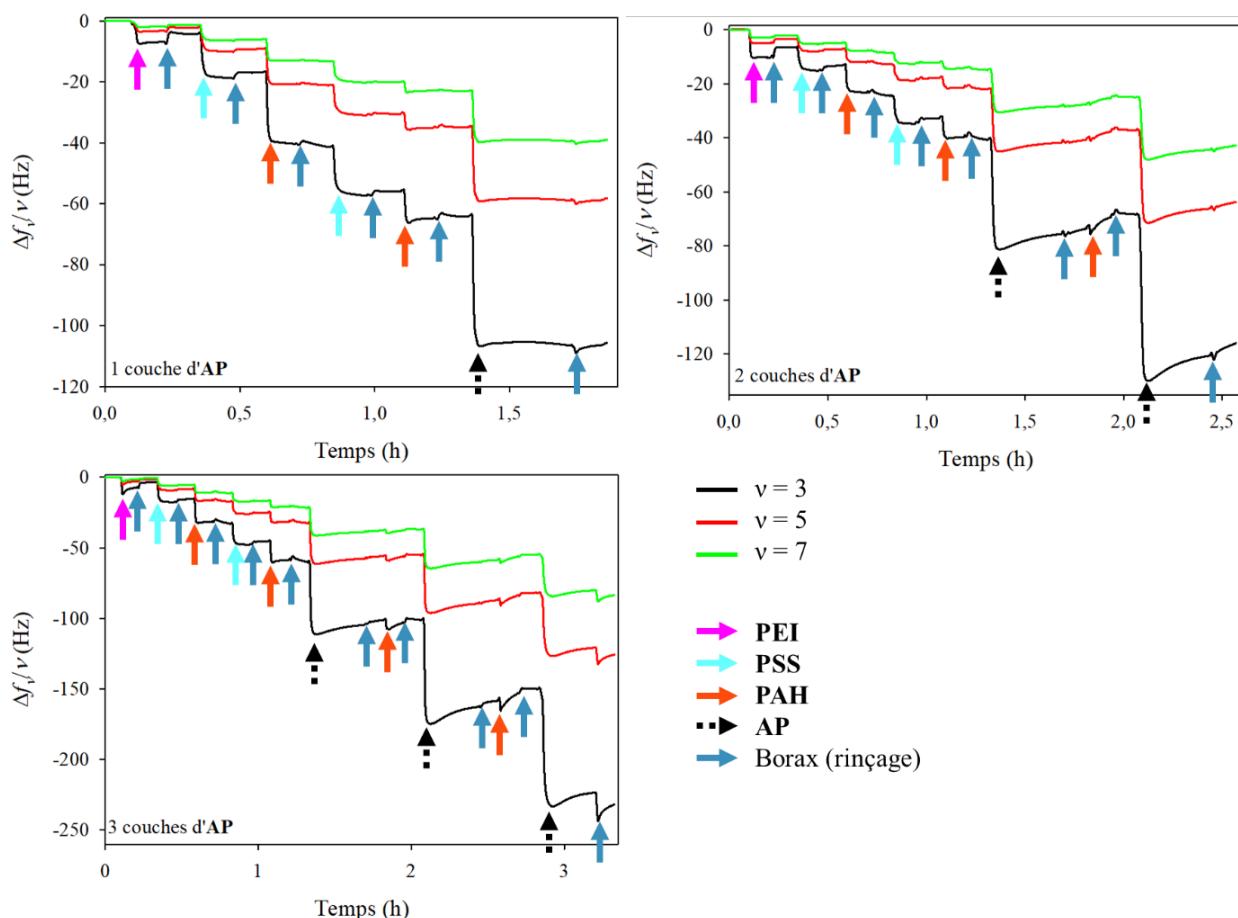


Figure 4.6. Suivi de la construction des films **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n** ($n = 1, 2, 3$) par QCM-D. Les flèches de couleur indiquent les moments auxquels les différents constituants de la multicoche ont été déposés sur le cristal.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

2.2 Mesure de l'épaisseur des hydrogels supramoléculaires formés à partir d'une, deux ou trois couches d'AP présentes dans la multicouche

Pour mesurer l'épaisseur de chacun des hydrogels formés lors de la mise en contact des films **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n** (avec $n = 1, 2$ ou 3) avec le peptide précurseur **Fmoc-FFpY**, nous avons choisi de construire les multicouches par trempage sur des wafers de silicium. La multicouche est alors trempée pendant 15 minutes en présence de **Fmoc-FFpY** puis cryogénisée par un trempage dans de l'azote liquide. L'échantillon est alors sectionné à froid de façon à pouvoir observer une coupe de l'hydrogel formé en surface, et ainsi mesurer son épaisseur. Dans la suite de ce Chapitre IV, lorsque l'hydrogel est formé, le revêtement résultant sera appelé **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n/Fmoc-FFY**.

La multicouche contenant une seule couche d'**AP** a conduit à la formation d'un hydrogel **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)₁/Fmoc-FFY** d'une épaisseur d'environ $2 \mu\text{m}$. Cette valeur atteint $17 \mu\text{m}$ avec deux couches d'enzyme et $350 \mu\text{m}$ avec trois couches d'enzyme (Figure 4.7). Dans les trois cas, on observe bien la formation d'un hydrogel de surface partout sur le substrat, présentant une épaisseur micrométrique. L'épaisseur des revêtements **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n/Fmoc-FFY** augmente avec le nombre n de couche d'**AP** dans la multicouche. Ainsi plus on dispose d'enzymes, plus d'hydrogélateurs **Fmoc-FFY** sont générés par hydrolyse enzymatique du peptide précurseur **Fmoc-FFpY**. On observe également que l'augmentation de l'épaisseur en fonction du nombre de couches d'**AP** semble quasi-exponentielle.

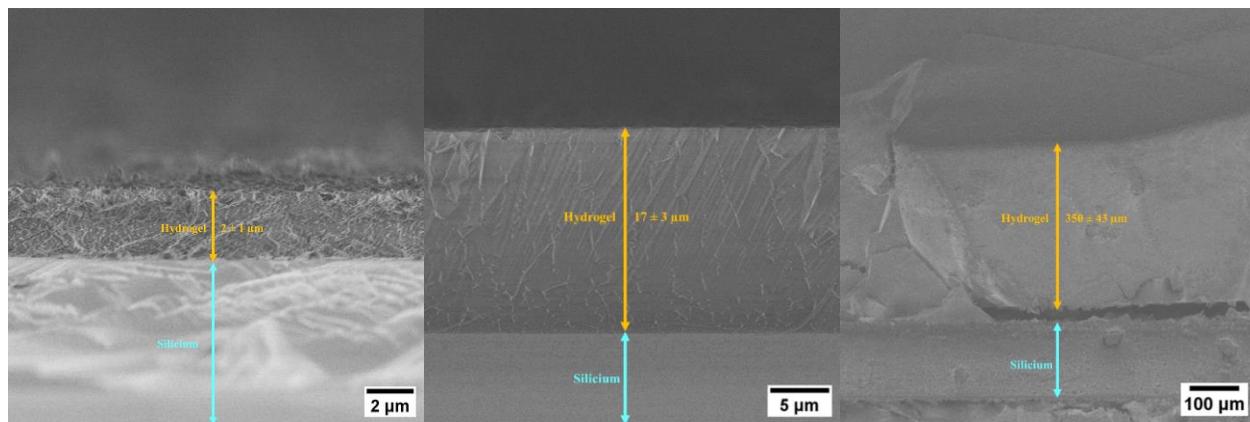


Figure 4.7. Images obtenues par cryo-SEM d'une coupe transversale de l'hydrogel supramoléculaire à base de peptides **Fmoc-FFY** formé à partir de la multicouche **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n** mise en contact pendant 15 minutes avec le peptide précurseur **Fmoc-FFpY** : gauche, $n = 1$; centre, $n = 2$; droite, $n = 3$. L'incertitude sur la mesure de l'épaisseur représente l'écart-type obtenu sur une moyenne d'au moins trois mesures distinctes.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

Avant de préparer ces hydrogels supramoléculaires à la surface des mousses polymères, nous avons souhaité nous assurer que les enzymes ainsi enfouies au sein des hydrogels étaient toujours actives. L'étude de l'activité enzymatique en fonction du nombre de couches est également une donnée importante à connaître pour la conception d'un réacteur en flux continu performant.

2.3 Étude de l'activité enzymatique des hydrogels supramoléculaires en fonction du nombre de couches d'**AP** au sein des films de polyélectrolytes.

Les films multicouches **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n** (avec $n = 1, 2$ ou 3), et les hydrogels correspondants **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n/Fmoc-FFY** ont été construits sur des lamelles de verre. Ce substrat transparent va nous permettre de suivre l'activité enzymatique de chacun des revêtements préparés en utilisant un lecteur de microplaques automatisé. En plus de mesurer l'activité enzymatique des trois hydrogels, nous nous sommes également intéressés à l'activité des films multicouches **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n**. Six échantillons ont donc été étudiés.

Des lamelles de verre modifiées uniquement par **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n** (avec $n = 1, 2$ ou 3) et par les hydrogels correspondants **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n/Fmoc-FFY** sont disposées dans des puits (plaques multi-puits adaptées) avant d'être mises en contact avec une solution de **pNPP** à 1 % en masse. La production de **pNP** est suivie au cours du temps par la mesure de l'évolution de l'absorbance à 405 nm toutes les 5 minutes pendant une période courte de 30 minutes (Figure 4.8). Ceci nous permet de déterminer le coefficient directeur (ou pente) des droites obtenues dans chacun des six cas. Ces pentes sont répertoriées dans le Tableau 4.1.

En l'absence d'hydrogel, on observe que l'augmentation, de un à trois, du nombre n de couches d'**AP** dans les films de structure **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n** augmente l'activité catalytique du film. Ce qui se traduit par une augmentation de la pente en passant de $n = 1, 2$ puis 3 . Lorsque l'hydrogel peptidique est formé à partir de chacune de ces multicouches enzymatiques, on observe bien une augmentation de la valeur de la pente entre une seule couche d'**AP** et deux couches d'**AP** : en effet, cette pente est trois fois plus importante lorsque $n = 2$ que lorsque $n = 1$. Cependant, les pentes relatives à l'activité enzymatique dans le cas de deux et dans celui de trois couches d'**AP** sont quasi-identiques.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

On observe également que les activités enzymatiques d'une seule ou deux couches d'**AP** dans le film, avec ou sans hydrogel, sont très proches. Dans le cas de multicouches comptant trois couches d'**AP**, la présence de l'hydrogel semble réduire plus significativement l'activité catalytique du matériau.

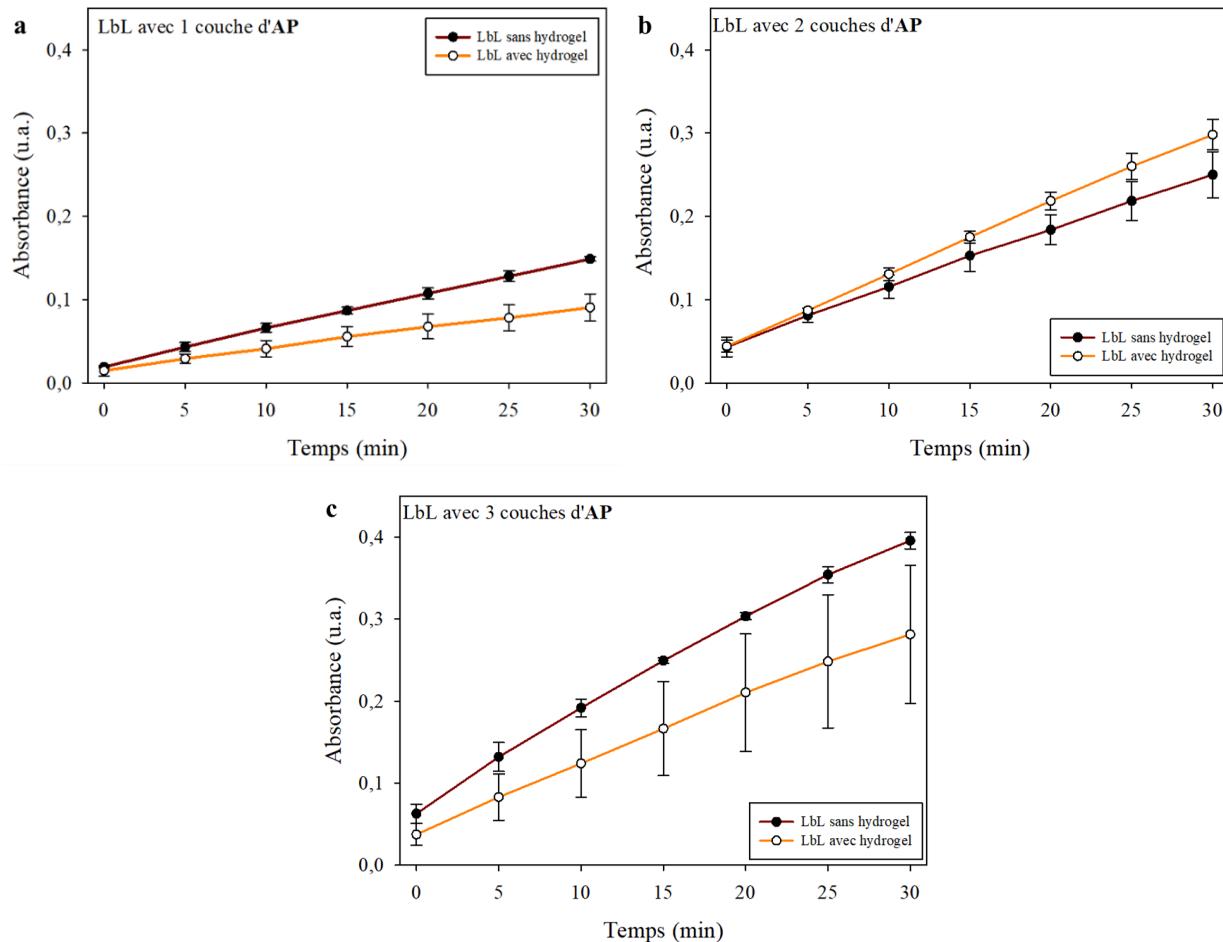


Figure 4.8. Courbes dévolution de l'absorbance en fonction du temps d'une solution de *p*NPP en présence des différents LbL construits sur des lamelles de verre.

PEI/(PSS/PAH) ₂ /PSS/(PAH/AP) _n ou PEI/(PSS/PAH) ₂ /PSS/(PAH/AP) _n /Fmoc- FFY	1 couche d'AP		2 couches d'AP		3 couches d'AP	
	sans hydrogel	avec hydrogel	sans hydrogel	avec hydrogel	sans hydrogel	avec hydrogel
Valeur de la pente	4.2×10^{-3}	2.5×10^{-3}	6.8×10^{-3}	8.5×10^{-3}	1.1×10^{-2}	8.2×10^{-3}

Tableau 4.1. Evaluation de l'activité enzymatique des différents revêtements PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n et PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n/Fmoc-FFY (avec $n = 1, 2$ ou 3) déposés à la surface d'une lamelle de verre mises en présence de *p*NPP pendant 30 minutes.

Pour interpréter ces résultats, il convient de se rappeler que l'utilisation de trois couches d'enzymes dans la multicouche conduit à un hydrogel peptidique plus de vingt fois supérieur à celui obtenu avec

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

seulement deux couches d'**AP** (350 µm pour trois couches d'**AP** contre 17 µm pour deux couches d'**AP**). Cette information est importante car elle permet d'expliquer pourquoi le revêtement **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)₃/Fmoc-FFY** catalyse l'hydrolyse de **pNPP** en **pNP** aussi rapidement que l'hydrogel **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)₂/Fmoc-FFY**. La transformation enzymatique du **pNPP** nécessite que ce dernier diffuse au sein des hydrogels pour y rencontrer l'enzyme. On peut raisonnablement imaginer que la vitesse de diffusion du **pNPP** dans l'hydrogel est plus faible qu'en solution. Ainsi, si l'hydrogel est très épais, la cinétique d'hydrolyse sera ralentie par rapport à un hydrogel moins épais (à nombre d'enzyme équivalent dans les gels). Cela peut expliquer aussi pourquoi les films multicouches dépourvus d'hydrogel **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_{1 ou 3}/Fmoc-FFY**, présentent une pente plus importante que le même revêtement **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_{1 ou 3}/Fmoc-FFY**.

2.4 Caractérisation de la présence des hydrogels supramoléculaires à la surface des mousses polymères à cellules ouvertes

Les multicouches de polyélectrolytes sont des films minces pouvant être déposés sur n'importe quels substrats, quel que soit leur nature chimique ou leur forme. Les parties 2.1, 2.2 et 2.3 précédentes nous ont montré que des hydrogels supramoléculaires enzymatiquement actifs pouvaient se former à la surface de substrats plans. L'étape suivante dans notre démarche consiste à former ces hydrogels à la surface de notre support catalytique, en l'occurrence des mousses en mélamine à cellules ouvertes, et démontrer leur présence. En outre, nous nous sommes intéressés à la formation de ces hydrogels induits par une, deux ou trois couches d'**AP** dans la multicouche initialement déposée. Pour ce faire, notre approche consiste à utiliser un marqueur fluorescent de l'autoassemblage de peptides, la Thioflavine T (**ThT**). Ce composé, largement utilisé dans la littérature,¹³⁻¹⁵ devient fluorescent lorsqu'il se lie à des peptides associés sous la forme de feuillet β ($\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$). Nous avons utilisé la microscopie confocale à fluorescence pour pouvoir observer la formation des hydrogels à l'intérieur des mousses.

Les films multicouches **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n** (avec $n = 1, 2$ ou 3) ont été construits sur des disques de mousse en mélamine par trempages successifs dans des solutions de polyélectrolytes adéquats, d'**AP** puis de peptides précurseurs **Fmoc-FFpY**, comme décrit en détails dans le Chapitre II. Ces disques ont un diamètre de 14.0 mm et une épaisseur en 3.5 mm (Figure 4.9).

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

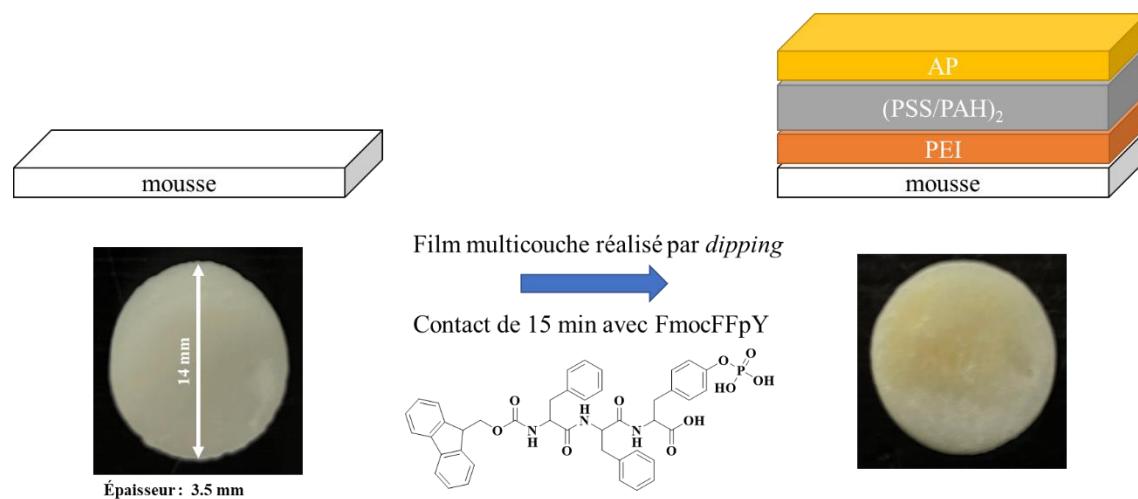


Figure 4.9. Disques de mousse avant et après le dépôt du revêtement **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n/Fmoc-FFY**.

Avant d'observer par microscopie confocale à fluorescence des échantillons de mousses en mélamine modifiée par **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n/Fmoc-FFY** (avec $n = 1, 2$ ou 3), nous avons réalisé une observation de contrôle. Une mousse en mélamine « nue » traitée à la **ThT** a été observée dans un premier temps (Figure 4.10, *gauche*). Une légère adsorption de la **ThT** à la surface des mousses en mélamine peut être observée. On distingue presque l'architecture alvéolaire de ce matériau, confirmant la présence de cellules ouvertes de l'ordre de $200\ \mu\text{m}$ en moyenne. Lorsque la mousse en mélamine est modifiée par une multicouche **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)₁** comportant une couche d'enzyme, l'intensité de fluorescence émise est à peine plus importante, permettant cependant de mettre en évidence des points particulièrement plus fluorescents sur certaines arêtes (Figure 4.10, *droite*). Ceci peut s'expliquer par le fait que les arêtes ne sont pas planes et présentent des courbures.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

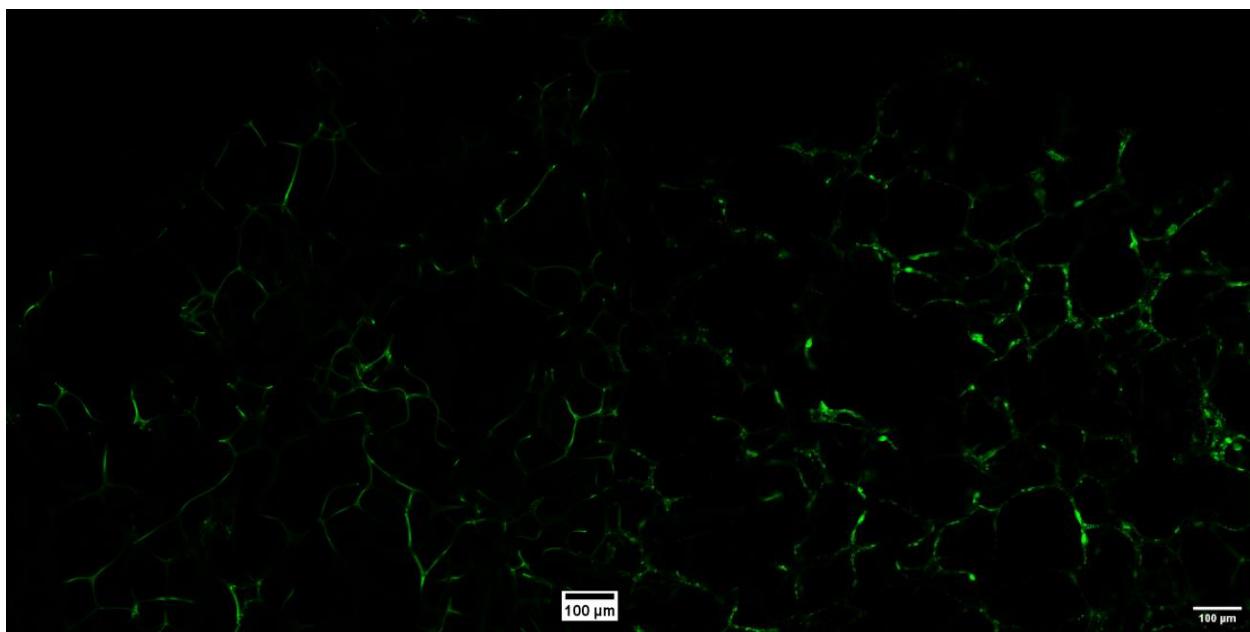


Figure 4.10. Observation typique d'un échantillon de mousse en mélamine « nue » mis en contact avec la ThT (*gauche*) et un autre échantillon recouvert préalablement par le film **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)₁** avant sa mise en contact avec le peptide précurseur **Fmoc-FFpY** puis la ThT (*droite*). Images prises par microscopie confocale à fluorescence. Objectif x10. Fluorescence de la ThT colorisée en vert ($\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 476 \text{ nm}$).

Une même mousse en mélamine a été modifiée par le revêtement **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)₁/Fmoc-FFY**, traitée à la ThT et observée par microscopie confocale (Figure 4.10, *droite*). En utilisant les mêmes conditions d'excitation de l'échantillon et de collecte de l'émission de fluorescence, il est possible de comparer les images obtenues avec celle de la Figure 4.10 (*droite*). La visualisation des arêtes de la mousse est plus aisée car elles sont plus fluorescentes. Cela est en accord avec la formation de l'hydrogel peptidique. L'hydrogel n'est pas présent de manière homogène au sein de la mousse. Des agrégats fluorescents de 3 à 15 μm d'épaisseur sont visibles, pouvant s'étaler sur presque 200 μm le long des arêtes. Il est cependant difficile de mesurer précisément une épaisseur à cette échelle, d'autant que les arête de la mousse ne sont pas planes, comme mentionné précédemment. Certaines arêtes peuvent apparaître moins fluorescentes, voire présenter une quasi-absence de fluorescence. Ceci peut résulter du fait que celles-ci ne se situent hors du plan focal d'analyse.

Avec deux couches d'**AP** (Figure 4.11, *centre*), l'hydrogel peptidique résultant apparaît encore plus épais qu'avec une seule couche d'enzyme car l'émission de fluorescence est plus intense. On observe clairement que l'épaisseur de l'autoassemblage de **Fmoc-FFY** n'est pas homogène : on distingue la formation de plusieurs agrégats pouvant atteindre 20 à 30 μm de diamètre, répartis le long des arêtes. Cela contraste avec l'hydrogel supramoléculaire construit sur des wafers de silicium observé par cryo-SEM

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

(Figure 4.7), qui est quasiment plan. L'utilisation de trois couches d'enzymes dans la multicouche **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)₃** préalablement déposée sur la mousse en mélamine avant la mise en contact avec le peptide précurseur **Fmoc-FFpY** conduit à un hydrogel très épais, atteignant presque 50 µm par endroit. Cependant, l'ensemble des pores restes ouverts. Dans le cadre de l'application en flux continu, cet aspect est important car il permet au fluide transportant les substrats à transformer de passer aisément à travers la mousse enzymatique (sans application d'une pression importante).

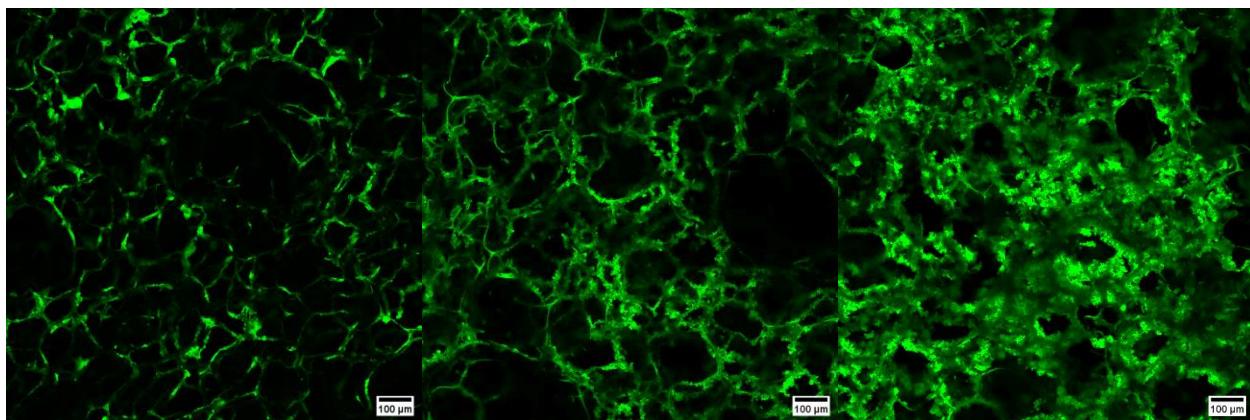


Figure 4.11. Observation typique d'un échantillon de mousse en mélamine modifiée par **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n/Fmoc-FFY** prise par microscopie confocale à fluorescence : *gauche, n = 1 ; centre, n = 2 ; droite, n = 3*. Objectif x10. Fluorescence de la **ThT** colorisée en vert ($\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$).

3 Suivi de l'hydrolyse enzymatique de *p*NPP dans un réacteur en flux

3.1 Réacteur en « flux recyclé »

Dorénavant, et pour le reste de ce Chapitre IV, les mousses en mélamine fonctionnalisées par l'**AP** grâce à la formation d'un hydrogel à base de peptides **Fmoc-FFY** autoassemblés, sera nommé **Mel@AP**. Cette mousse est préparée à partir d'un film multicouche ne présentant qu'une seule couche d'**AP** (c'est-à-dire **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)₁**) mise en présence du peptide précurseur **Fmoc-FFpY** pendant 15 minutes.

Un des objectifs principaux de ce projet est de développer un réacteur chimique utilisable en flux continu (à la différence des travaux précédents de mon groupe dans ce domaine¹) c'est-à-dire un réacteur où la solution du substrat enzymatique passe une seule fois à travers le matériau catalytique pour conduire à l'obtention d'une solution de substrat partiellement ou entièrement convertie en produit souhaité.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

Avant de développer un réacteur de production en continue, nous avons souhaité nous assurer que les mousses **Mel@AP** préparées comme décrit précédemment sont (1) enzymatique performante dans des conditions en flux, (2) peuvent être réutilisées plusieurs fois, ce qui est une condition *sine qua non* pour espérer une application en continu, et que (3) l'**AP** ne désorbe pas du support au cours du temps (et donc lors de l'application du flux). Pour ce faire, nous avons réalisé un réacteur dit en flux « recyclé » : cela signifie qu'une fois que la solution est passée une première fois à travers la mousse **Mel@AP**, elle y revient. Pour réaliser ces essais en flux « recyclé », nous avons étudié la transformation enzymatique du **pNPP** en **pNP**, et utilisés les mêmes mousses que celles préparées pour la caractérisation par microscopie confocale à fluorescence (Partie 2.4).

Le réacteur utilisé ici est constitué d'une cartouche de chromatographie que nous avons rempli par quatre échantillons de mousses fonctionnalisées **Mel@AP** (diamètre 14.0 mm, épaisseur 3.5 mm). Le reste de la colonne est rempli par une mousse en mélamine « nue » (Figure 4.12). Le flux de substrat entrant par le coté de la mousse « nue » puis traverse les mousses catalytiques **Mel@AP**, avant de ressortir de la colonne et d'y entrer à nouveau par la mousse « nue ».

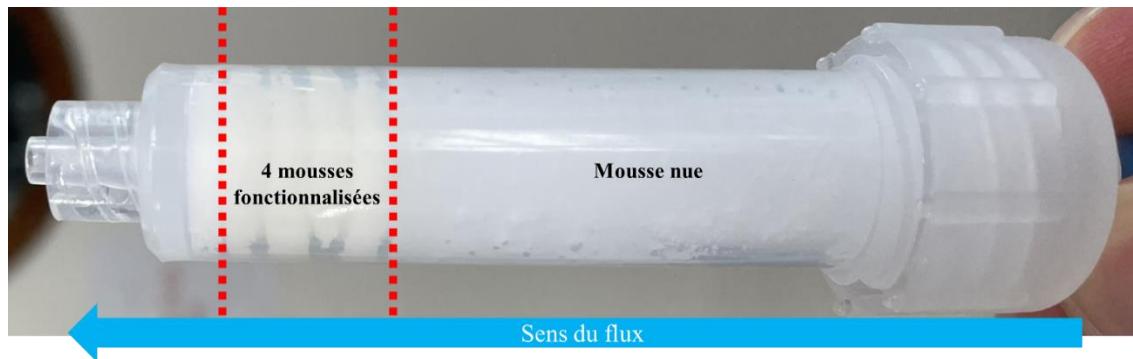


Figure 4.12. Photographie d'un réacteur typique utilisé en conditions de flux « recyclé ». La colonne de chromatographie est remplie par quatre échantillons de mousses **Mel@AP** et complétée par une mousse « nue » en mélamine.

Une solution de substrat **pNPP** à 1% en masse passe à travers le réacteur contenant **Mel@AP** grâce à l'utilisation d'une pompe péristaltique qui l'achemine à un débit de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Le dispositif mis en place est schématisé sur la Figure 4.13. On notera que le suivi de la transformation enzymatique de **pNPP** en **pNP** est réalisé à température ambiante (entre 21 et 24 °C) et que le dispositif permet de prélever des aliquots ($50 \mu\text{L}$) du milieu réactionnel circulant au cours du temps grâce à l'inclusion d'un « réservoir » dans le procédé. Ce prélèvement est dilué dans le Borax ($100 \mu\text{L}$), et l'absorbance est mesurée à 405 nm par spectroscopie UV.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

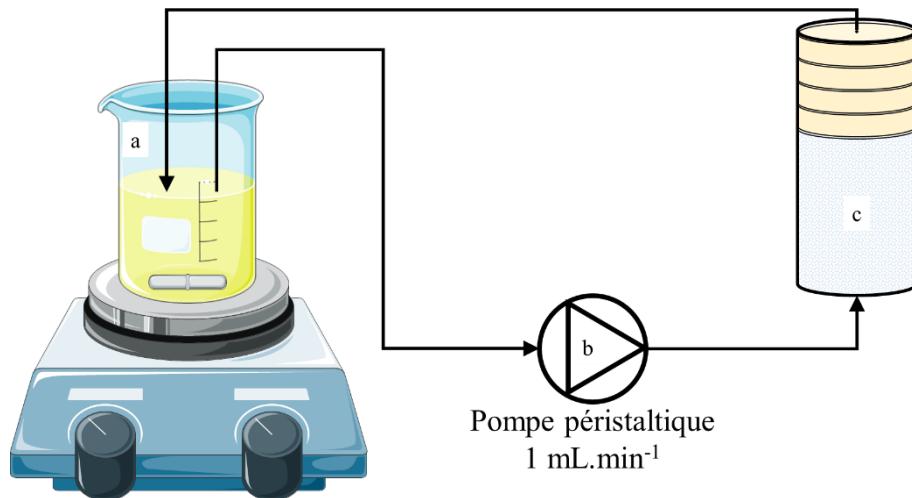


Figure 4.13. Dispositif en flux dit « recyclé » pour réaliser la transformation enzymatique de *pNPP* en *pNP* via l'utilisation d'une colonne garnie par **Mel@AP**; (a) représente le réservoir (6 mL) de solution de *pNPP* qui va aussi accumuler du *pNP* au cours du temps; (b) pompe péristaltique qui va permettre de « pousser » la solution du substrat *pNPP* à travers le (c) réacteur contenant les mousses supportant l'**AP**, c'est-à-dire **Mel@AP**.

Cependant, avant de procéder aux différents essais enzymatiques, nous nous sommes assurés que l'enzyme ainsi supportée sur les mousses en mélamine, **Mel@AP**, ne se désorbait pas sous l'action d'un flux appliqué à un débit de $1 \text{ mL}/\text{min}^{-1}$.

3.2 Lavage des mousses **Mel@AP**

Pour pouvoir retirer les enzymes « faiblement piégées » au sein de l'hydrogel supramoléculaire et qui pourraient sortir lors de l'application d'un flux, et ainsi biaiser les conclusions de notre étude, les mousses **Mel@AP** disposées dans la colonne de chromatographie telle que conçue et décrite dans la partie 3.1. précédente, sont lavées en faisant circuler au moins 200 mL de tampon Borax (pH 9.5, tampon servant à la formation de l'hydrogel supramoléculaire) à un débit de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, comme schématisé sur la Figure 4.14. Les eaux de lavage sont récoltées et la présence d'**AP** est mise en évidence grâce à l'ajout d'une solution commerciale de *pNPP*. L'absorbance de cette solution, et donc la détection de *pNP*, est réalisée par spectroscopie UV à 405 nm. Dès lors que l'on constate une absence d'évolution de l'absorbance, on considère qu'il n'y a plus de relargage d'**AP** dans les mousses **Mel@AP**. Les détails expérimentaux de ce lavage sont décrits dans le Chapitre II.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

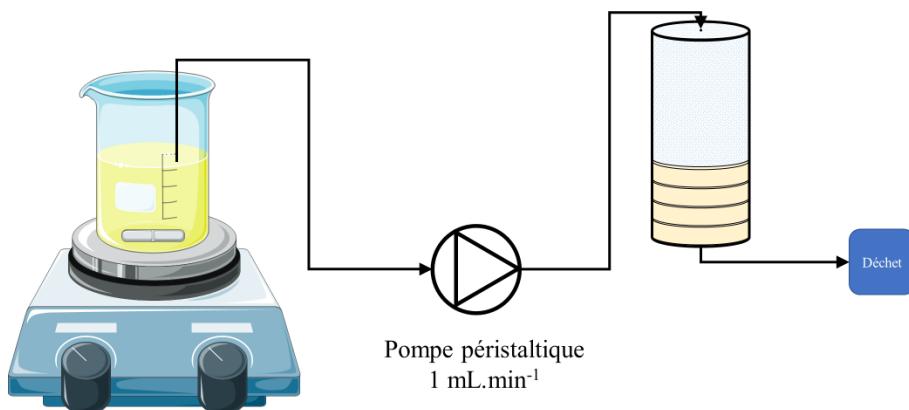


Figure 4.14. Schématisation du procédé de lavage des mousses **Mel@AP** au sein du réacteur.

3.3 Optimisation des conditions

3.3.1 Premier suivi et réutilisabilité des mousses **Mel@AP**

Le premier suivi de l'activité des mousses **Mel@AP** dans un procédé en flux « recyclé » avait pour but de nous assurer que le matériau était performant dans ces conditions et que les **AP** restaient immobilisées sur la mousse comme nous nous y attendions à la suite des lavages (Partie 3.2). Nous voulions également nous assurer que ce suivi pouvait être répété en utilisant les mêmes mousses catalytiques **Mel@AP**. Ces étapes validées, il pourrait alors être envisagé de démarrer l'étude en flux continu (Partie 4 de ce Chapitre IV).

Une évolution linéaire de l'absorption à 405 nm est observée pendant environ 2h30 avant un ralentissement et l'apparition d'un plateau d'absorbance de 0.29 u.a. (unités arbitraires) au bout de 4h (Figure 4.15). Il est à noter que la conversion de **pNPP** en **pNP** au niveau du plateau ne correspond pas à une conversion totale, mais à une conversion d'environ 25 %. En effet, une conversion totale devrait être caractérisée par un plateau d'absorbance de l'ordre de $A_{max} = 1.153$ u.a. La conversion plus faible obtenue peut s'expliquer par la présence de l'ion phosphate HPO_4^{2-} généré au cours de la conversion du **pNPP** en **pNP**. Ce produit secondaire de la réaction est un inhibiteur de l'**AP**¹⁶ (rétro-contrôle enzymatique en milieu physiologique), en circulant en flux « recyclé », il s'accumule et finit par inhiber l'**AP** lorsqu'il atteint une concentration adéquate.

Les aliquots prélevés (et dilués) lors de la première utilisation ayant été conservés, l'absorbance a été mesurée à nouveau 24h plus tard et comparée aux valeurs d'absorbance obtenues précédemment (Figure 4.15). Les deux évolutions de l'absorbance à 405 nm sont quasi-identiques. Ce résultat est en accord avec une absence d'**AP** libérées lors de la réaction en flux « recyclé » dans ces conditions.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

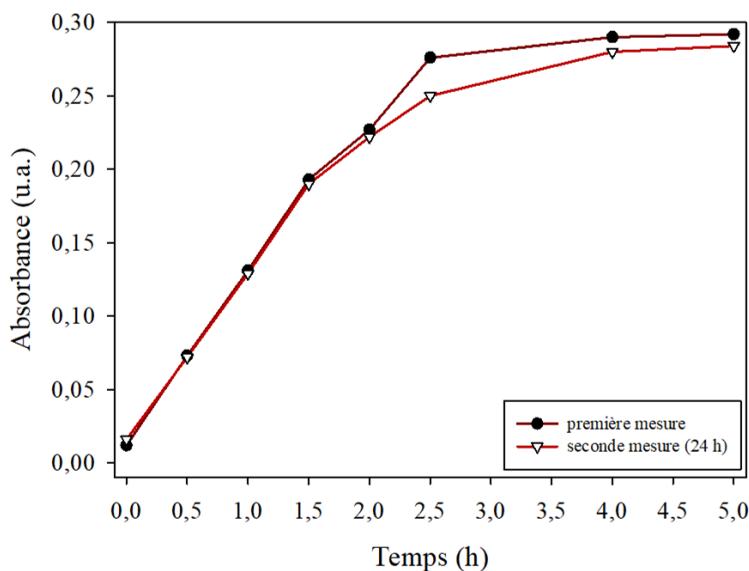


Figure 4.15. Évolution de l'absorbance à 405 nm du milieu réactionnel au sein du réacteur en flux recyclé (ligne brune, points noires). Mesure de l'absorbance à 405 nm des aliquots 24h après leur prélèvement (ligne rouge, triangles blancs).

La colonne dans laquelle se trouve les mousses **Mel@AP** est rincée jusqu'à ce que tout le **pNPP** et le **pNP** résiduels soient retirés de l'ensemble du réacteur (environ 40 mL de tampon Borax sont nécessaires pour cela). Pour s'assurer de la répétabilité de ce premier suivi, nous avons procédé à un deuxième suivi, puis un troisième dans les mêmes conditions que le premier, avec les mêmes mousses **Mel@AP**. Lors du deuxième suivi, on observe une évolution linéaire de l'absorbance pendant 5h atteignant une conversion d'environ 8 % (0.095 u.a.) (Figure 4.16). Lors du troisième suivi, l'expérience a été stoppée au bout de 2 h où un plateau d'absorbance semble être atteint (0.022 u.a.), correspondant à une conversion de moins de 2 %. Il semblerait donc que l'enzyme au sein des mousses **Mel@AP** ait perdu considérablement de son activité catalytique, et ce, déjà dès le deuxième suivi.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

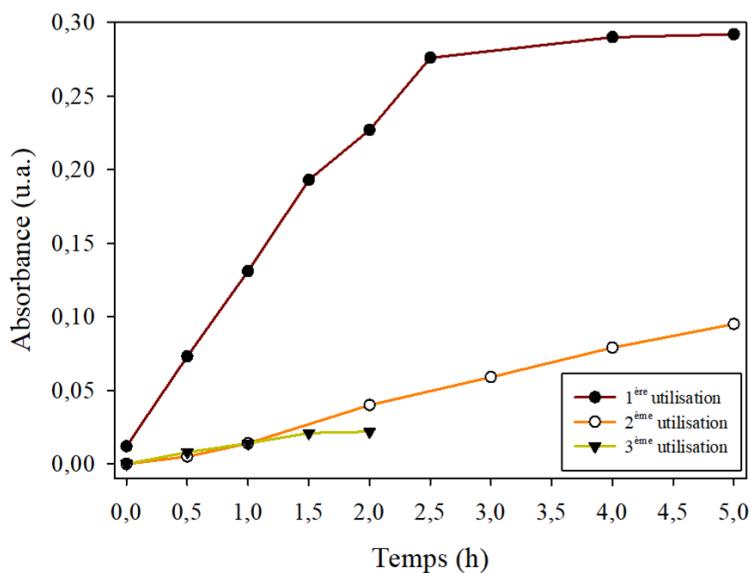


Figure 4.16. Évolution de l'absorbance à 405 nm du milieu réactionnel au sein du réacteur en flux recyclé après un premier suivi (courbe brune), un deuxième (courbe orange) et un troisième (courbe verte) en utilisant les mêmes mousses **Mel@AP**.

P. J. O'Brien et D. Herschlag ont mené une étude sur les différentes valeurs de la constante de spécificité k_{cat}/K_m calculées pour l'**AP** issue de *E. coli*.¹⁶ Ici le k_{cat} correspond à la constante catalytique (nombre de moles de produit formé par seconde et par mole d'enzyme) le K_m correspondant à la constante de Michaelis (valeur de la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction enzymatique est égale à la moitié de la vitesse maximale V_{max}). Le rapport k_{cat}/K_m donne une mesure de l'efficacité de l'enzyme. La grande majorité de ces valeurs sont obtenues en utilisant le **pNPP** comme substrat. Les auteurs montrent qu'une concentration de 1 µM en **pNPP** conduit à une absorbance de l'ordre de 0.016 u.a. pour une conversion complète du **pNPP** en **pNP**. Cependant, cette valeur d'absorbance est très faible et rend l'appréciation des conversions en fonction de l'absorbance peu fiable. C'est d'ailleurs pour cette raison que la plupart des travaux basés sur l'activité de l'**AP** présentent l'utilisation de concentrations en **pNPP** bien supérieures à 1 µM. Malheureusement, ces concentrations plus élevées en substrat ont pour conséquence de générer *in situ* une concentration en ions phosphates suffisamment élevée pour inhiber l'**AP**, conduisant à une estimation erronée du k_{cat}/K_m . D'un point de vue mécanistique, les ions phosphates inhibent l'**AP** en se fixant de manière réversible sur les centres métalliques **Mg²⁺** et **Zn²⁺** des deux sites actifs. Les auteurs recommandent donc de travailler à une concentration en substrat inférieure à 1 µM et/ou d'utiliser des ions **Mg²⁺** et **Zn²⁺** dans le milieu pour limiter l'inhibition de l'**AP**. En utilisant une concentration en **pNPP** supérieure à 1 µM, il est donc impossible d'observer une conversion totale en **pNP**.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

Ainsi le tampon Borax (25 mM), utilisé jusqu'alors pour les trois premiers suivis présentés précédemment, a été modifié par l'addition de chlorure de magnésium ($MgCl_2$ 1 mM) et de sulfate de zinc ($ZnSO_4$, 0.1 mM), comme recommandé par la littérature.¹⁶ Les mêmes mousses de **Mel@AP** déjà utilisées lors des trois premiers suivis (résultats présentés sur la Figure 4.16) ont été lavées avec ce nouveau tampon appelé « Borax-MgZn », puis utilisées pour réaliser un quatrième suivi en flux « recyclé ». La solution de **pNPP** commerciale a été diluée en utilisant ce même tampon, ce qui a permis d'atteindre une valeur d'absorbance de 0.295 u.a. après 5 h, rappelons que cette valeur était de 0.290 u.a. lors du premier suivi (Figure 4.17).

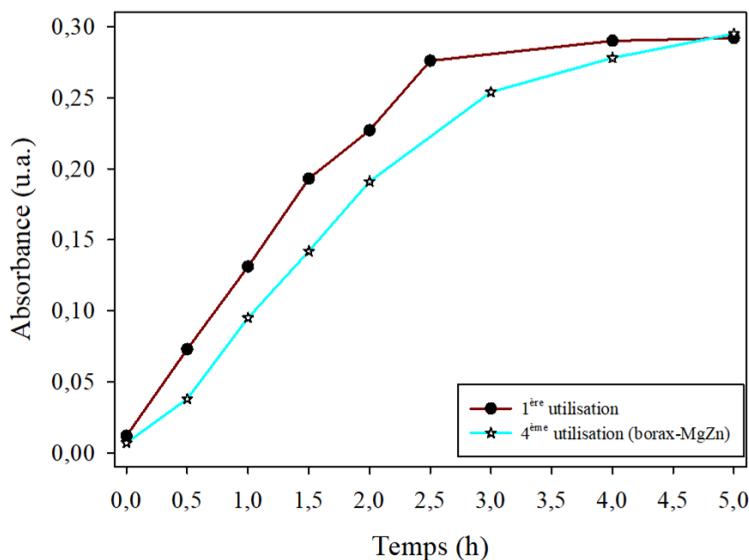


Figure 4.17. Comparaison de l'évolution de l'absorbance à 405 nm du milieu réactionnel au sein du réacteur en flux recyclé après un premier suivi (courbe brune) et un quatrième suivi (courbe bleue) réalisé dans un tampon « Borax-MgZn » en utilisant les mêmes mousses **Mel@AP**.

Ce quatrième suivi montre que l'on retrouve une évolution de l'absorbance mesurée à 405 nm très proche de celle observée lors du premier suivi. Ainsi, les enzymes sur les mousses **Mel@AP** semblent retrouver leur activité perdue probablement à cause de la présence d'ions phosphates dans l'hydrogel de surface. Il est à noter que le problème de l'accumulation de produits secondaires pouvant inhiber les enzymes ne devraient pas être observé dans des conditions en flux continu. En effet, dans ces conditions, il ne devrait pas y avoir d'accumulation possible.

Les prochains suivis seront effectués avec ce tampon « Borax-MgZn » pour la préparation de la solution de **pNPP** mais aussi pour le rinçage du réacteur après son utilisation.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

3.3.2 Expérience de contrôle négatif : suivi de la conversion du *p*NPP en *p*NP en flux recyclé en présence de mousses de mélamine « nues »

Des mousses en mélamine « nues », c'est-à-dire sans le dépôt d'**AP** via l'utilisation d'un film multicouche adéquat puis la formation de l'hydrogel catalytique, sont utilisées dans le réacteur en flux recyclé, dans les mêmes conditions que précédemment (même concentration en *p*NPP et même tampon Borax-MgZn). Dans ces conditions, aucune évolution de l'absorbance n'a été mesurée. Ceci indique que le matériau lui-même n'a pas d'influence sur la conversion du *p*NPP en *p*NP (Figure 4.18) et que l'**AP** est bien le catalyseur à l'origine de l'hydrolyse du groupement phosphate. En outre, cela montre également que l'hydrolyse dite « chimique » est très lente et non détectable sur une durée de quatre heures.

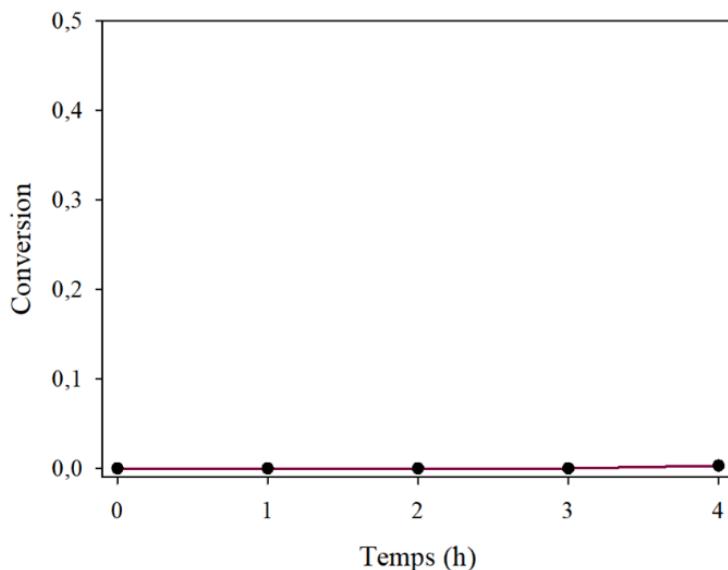


Figure 4.18. Evolution de l'absorbance à 405 nm du milieu réactionnel au sein du réacteur en flux « recyclé » utilisant des mousses « nues » en mélamine à la place des mousses **Mel@AP**.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

4 Premiers suivis de l'activité catalytique des mousses Mel@AP en flux continu

4.1 Développement d'un réacteur basé sur un hydrogel supramoléculaire enzymatique supporté sur une mousse en mélamine Mel@AP, pour une production en flux continu.

Comme précédemment, le procédé utilisé est très simple car il doit servir de preuve de concept : il consiste en l'utilisation d'une colonne contenant une mousse **Mel@AP**, connecté à une seringue contenant 60 mL de solution de **pNPP** à 450 μM dans le tampon « borax-MgZn ». Il convient de souligner ici que cette mousse **Mel@AP** est de dimension plus grande (3 cm) que celles utilisées lors des suivis en flux « recyclé » (les détails expérimentaux sont décrits dans le [Chapitre II](#)). La seringue contenant la solution de **pNPP** est installée dans un pousse-seringue réglé à un débit de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. « Trois gouttes » de solution en sortie de la seringue sont régulièrement collectées au cours du temps (dans un tube de type Eppendorf), et 50 μL de cette solution sont diluées dans 100 μL de tampon avant d'en mesurer l'absorbance (Figure 4.19).

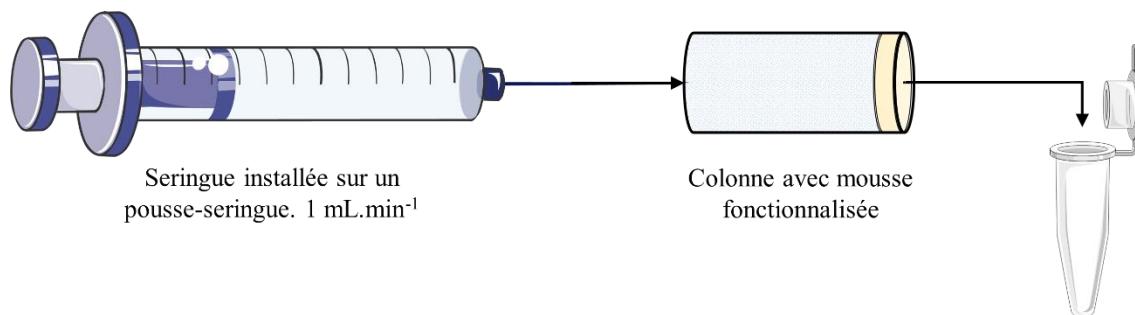


Figure 4.19. Montage utilisé pour les réactions de suivi en flux continu.

4.2 Comparaison des activités des mousses avec et sans hydrogel

Les deux types de mousse catalytique, à savoir **Mel@AP** et celle recouverte uniquement du film multicoche **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)₁**, ont été utilisées dans le montage présentée sur la Figure 4.19. Cette partie a été réalisée en étroite collaboration avec le Dr. S. H. More, chercheur post-doctorant dans notre groupe.

La conversion du **pNP** a été évaluée en utilisant une mousse recouverte uniquement de la multicoche **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)₁**, donc sans hydrogel supramoléculaire. On observe une conversion de 38 % qui semble stable sur une échelle de 2 heures de suivi (Figure 4.20). Lorsque cette même mousse est lavée, stockée 12 h à 4 °C et réutilisée dans les mêmes conditions que précédemment, on observe que la

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

conversion en *p*NP a diminué et zqt de l'ordre de 28 %. On n'observe pas d'évolution de la conversion dans les aliquots récoltés au cours du temps, ce qui signifie que des AP actives ne sont pas relarguées lors de l'application du flux.

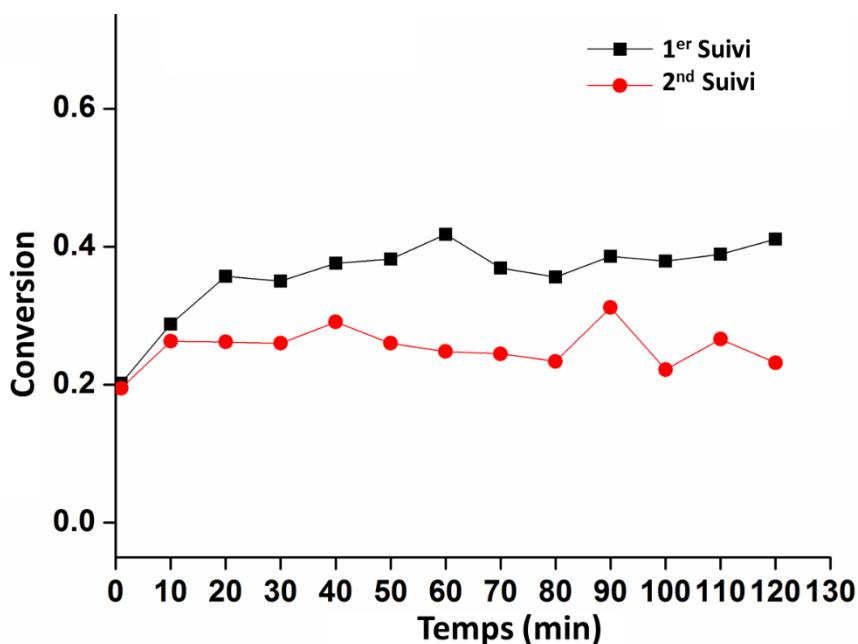


Figure 4.20. Succession de deux suivis de la conversion de *p*NPP en *p*NP au cours du temps en utilisant une mousse en mélamine recouverte du film multicouche **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)**₁ en flux continu. Entre chaque suivi, un lavage/rinçage des mousses au sein du montage et un stockage de 12 h à 4 °C est effectué.

Lorsqu'une mousse **Mel@AP** de même dimension que la précédente, préparée avec l'hydrogel, est utilisée dans le montage dédié aux suivis en flux continu, on observe un comportement très différent de celui observé sans hydrogel de surface (Figure 4.21). En effet, la conversion mesurée en *p*NP est d'environ 25% pendant 30 minutes avant de décroître au cours du temps de façon quasiment linéaire. On observe que lorsqu'un deuxième suivi est réalisé, dans les mêmes conditions, à partir de la même mousse ayant été rincée et stockée 12h à 4°C, la conversion en *p*NP est à nouveau d'environ 25% pendant 30 minutes avant de chuter. À la différence de la mousse modifiée uniquement par le film **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)**₁, le comportement sur deux suivis successifs est répétable. Pourquoi observe-t-on une diminution de l'activité catalytique après 30 minutes et pourquoi celle-ci semble se rétablir avec les étapes de rinçage et de stockage ? Nous pouvons ici à nouveau faire l'hypothèse d'une inhibition de l'hydrogel enzymatique par la présence des ions phosphates. Ceux-ci ne diffusent pas suffisamment vers l'extérieur du revêtement et contribueraient à inhiber l'AP.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

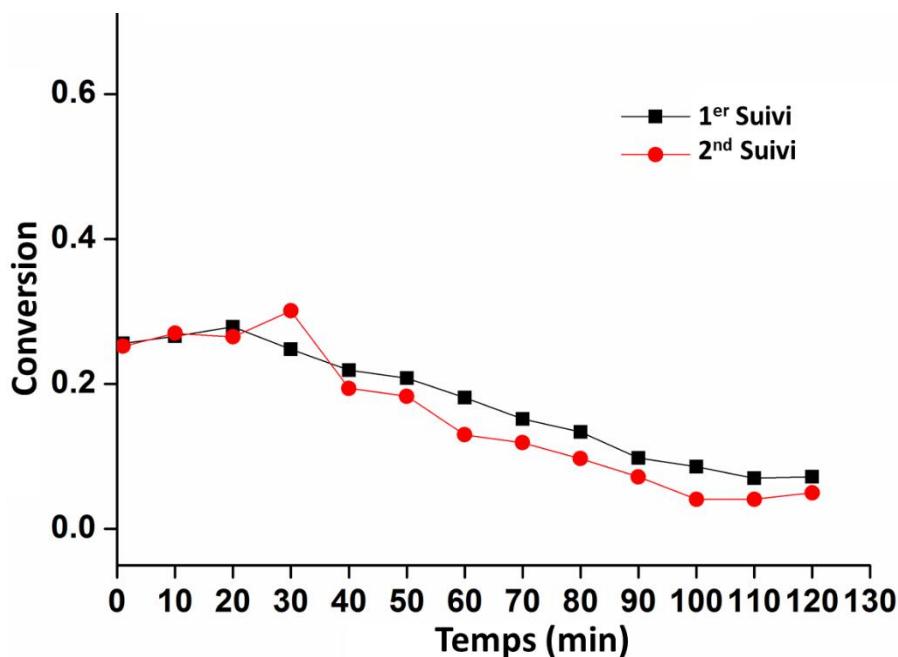


Figure 4.21. Succession de trois suivis de la conversion de *p*NPP en *p*NP au cours du temps en utilisant une mousse Mel@AP en flux continu. Entre deux premiers suivis, un lavage/rinçage de la mousse Mel@AP dans le montage et un stockage de 12 h à 4 °C est effectué.

5 Conclusion et perspectives

Les suivis par QCM-D montrent qu'il est possible d'immobiliser jusqu'à au moins trois couches d'AP en une multicouche d'architecture **PEI/(PSS/PAH)₂/PSS/(PAH/AP)_n** (avec $n = 1, 2$ et 3). Ce qui a été mesuré en QCM-D a été confirmé par la suite avec les expériences de microscopie. Une analyse par cryo-SEM a permis de mettre en évidence que l'épaisseur de l'hydrogel supramoléculaire à base de **Fmoc-FFY** autoassemblés augmentait avec le nombre de couches d'enzyme préalablement déposées. Les premières expériences sur les lamelles ont montré que ces revêtements restent enzymatiquement actifs. La mise en évidence de ces hydrogels à la surface des mousses en mélamine a été effectuée par microscopie confocale à fluorescence grâce à l'utilisation d'un marqueur fluorescent de nos autoassemblages de peptides. À mesure que le nombre de couches d'AP augmente on observe un hydrogel qui se répartit de manière plus homogène le long de la structure du matériau et gagne en épaisseur.

Les expériences menées sur les lamelles de verre ont pu mettre en évidence une tendance entre le nombre de couches d'enzyme et l'activité du matériau : plus le nombre de couche d'AP augmente plus l'activité est importante. La présence de l'hydrogel supramoléculaire tend à réduire l'activité enzymatique

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

par rapport aux lamelles modifiées uniquement par une multicouche enzymatique. Cela pourrait s'expliquer par une diffusion ralentie du substrat vers les enzymes lorsque ces dernières sont enfouies dans l'hydrogel.

J'ai mis en place et optimisé un montage permettant d'évaluer l'activité catalytique des mousses enzymatiques. Dans un procédé dit en flux « recyclé » et en flux continu, il a été mis en évidence un problème, très probable, d'accumulation des ions phosphates inhibant l'AP. Pour contre-carrer au moins partiellement ce problème, l'ajout d'ions magnésium et zinc est préconisé selon la littérature.¹⁶ Cette initiative a permis de retrouver l'activité de l'enzyme avant inhibition.

Ces résultats constituent les premiers pas vers la possibilité d'accroître la quantité d'enzymes en sein des hydrogels supramoléculaires supportés qui sont des travaux poursuivis dans mon groupe au-delà de la durée de mon doctorat.

Chapitre IV

Augmentation de la quantité d'enzymes au sein d'hydrogels supramoléculaires supportés. Application aux procédés de production enzymatique en flux continu

Références

- [1] J. Rodon Fores, M. Criado-Gonzalez, A. Chaumont, A. Carvalho, C. Blanck, M. Schmutz, C. A. Serra, F. Boulmedais, P. Schaaf, L. Jierry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (52), 18817-18822. DOI : 10.1002/anie.201909424.
- [2] D. Li, H. Wang, D. Kong, Z. Yang, *Nanoscale*, **2012**, *4*, 3047-3049. DOI: 10.1039/C2NR12117D.
- [3] Q. Wang, Z. Yang, Y. Gao, W. Ge, L. Wang, B. Xu, *Soft Matter*, **2008**, *4*, 550-553. DOI : 10.1039/B715439A.
- [4] J. Rodon Fores, C. A. Serra, F. Boulmedais, P. Schaaf, L. Jierry, EP19306077, Sept. 9th 2019.
- [5] Demande de projet ANR AAPG2021 coordinée par L. Jierry.
- [6] R. J. Williams, A. M. Smith, R. Collins, N. Hodson, A. K. Das, R. V. Ulijn, *Nature Nanotech.* **2009**, *4*, 19-24. DOI : 10.1038/nnano.2008.378.
- [7] M. P. Conte, K. H. A. Lau, R. V. Ulijn, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, *9* (4), 3266–3271. DOI : 10.1021/acsami.6b13162.
- [8] C. Vigier-Carriere, T. Garnier, D. Wagner, P. Lavalle, M. Rabineau, J. Hemmerlé, B. Senger, P. Schaaf, F. Boulmedais, L. Jierry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10198-10201. DOI: 10.1002/anie.201504761.
- [9] G. Decher, J. D. Hong, J. Schmitt, *Thin Solid Films*, **1994**, *210*, 831-835. DOI : 10.1016/0040-6090(92)90417-a.
- [10] G. Decher, *Science*, **1997**, *277*, 1232-1237. DOI : 10.1126/science.277.5330.1232.
- [11] Y. Lvov, K. Ariga, I. Ichinose, T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6117-6123. DOI : 10.1021/ja00127a026.
- [12] J. Hodak, R. Etchenique, E. J. Calvo, *Langmuir*, **1997**, *13*, 2708-2716. DOI : 10.1021/la962014h.
- [13] A. Elhaddaoui, A. Delacourte, S. Turrel, *J. Mol. Struct.* **1993**, *294*, 115-118. DOI : 10.1016/0022-2860(93)80328-S.
- [14] J. Rodon Fores, A. Bigo-Simon, D. Wagner, M. Payrastre, C. Damestoy, L. Blandin, F. Boulmedais, J. Kelber, M. Schmutz, M. Rabineau, M. Criado-Gonzalez, P. Schaaf, L. Jierry, *Polymers*, **2021**, *13*, 1793. DOI : 10.3390/polym13111793.
- [15] J. Y. Runser, M. Criado-Gonzalez, F. Fneich, M. Rabineau, B. Senger, L. Jierry, P. Schaaf, *J. Colloid Interface Sci.* **2022**, *620*, 234-241. DOI : 10.1016/j.jcis.2022.03.150.
- [16] P. J. O'Brien, D. Herschlag, *Biochemistry*, **2002**, *41*, 3207-3225. DOI : 10.1021/bi012166y.

Conclusion Générale

Conclusion générale

Le premier projet de ma thèse, présenté dans le Chapitre III, avait pour objectif de déterminer s'il était possible de mettre en place l'autoassemblage localisé induit par des enzymes (LESA) depuis la surface de vésicules phospholipidiques avec en outre, la volonté de répondre aux questions suivantes : sous quelle forme l'autoassemblage de **Fmoc-FFY** est-il observable depuis la surface des GUVs et de SUVs ? Quel impact l'autoassemblage peut avoir sur les propriétés morphologiques et physico-chimiques des vésicules ? Quel est le mécanisme du LEASA à partir des vésicules ?

Les expériences menées par microscopie optique ont permis de confirmer la faisabilité du LEASA à partir des GUVs, ceci a été rendu possible en introduisant à hauteur de 1 % en masse un phospholipide porteur d'un motif biotine : **DSPE-PEG-Biotin**. La présence de ces ligands « biotine » permet au bioconjugué **AP-strep** de s'y fixer et de garantir l'immobilisation de l'initiateur de l'autoassemblage, en l'occurrence l'enzyme.

Les **GUVs** sont des objets mesurant environ 10 µm de diamètre, or les nanofibres de **Fmoc-FFY** sont connues pour mesurer 5 nm de diamètre : bien entendu la microscopie optique ne rend pas possible l'observation des nanofibres depuis la surface des **GUVs**. Cependant, il a été possible de visualiser et de localiser la présence d'un ensemble de fibres (fibrilles) de dimension micrométrique grâce à l'utilisation d'un fluorophore révélateur de l'autoassemblage du peptide **Fmoc-FFY** : la **ThT**. La fluorescence induite par ce composé au sein des amas de fibres nous a révélé que l'autoassemblage se confondait avec la membrane des **GUVs**, comme si lors de sa formation celui-ci se construisait au plus près de la surface des vésicules.

Inversement, les **SUVs** ont un diamètre d'environ 70 nm, rendant possible l'observation des nanofibres en microscopie électronique à transmission en mode cryo (cryo-TEM). Les différentes expériences menées en cryo-TEM nous ont permis de nous rendre compte que les nanofibres se forment et grandissent depuis la surface des **SUVs**, renforçant l'idée selon laquelle l'autoassemblage s'initie dans l'environnement proche des zones où les **AP** se trouvent. Contrairement à ce que nous avions imaginé, les fibres ne croient pas « en soleil » depuis la surface des **SUVs**, mais leur nombre est limité et leur structure ont le plus souvent une zone de contact ou d'affleurement avec la membrane d'une ou plusieurs vésicules mesurant plusieurs dizaines de nanomètres. En plus des nanofibres, des agrégats de taille nanométrique ont également été observés et associés aux premiers instants de formation des nanofibres.

Initié depuis la surface des **GUVs**, l'autoassemblage induit une perméabilité de la membrane, moins d'une heure après l'ajout du peptide dans le milieu, qui est caractérisée par une perte de contraste de phase

Conclusion générale

lors des observations en microscopie à contraste de phase. Après trois jours de contact, nous avons pu mettre en évidence, grâce à la microscopie confocale, des altérations de la membrane phospholipidique, celle présentant un aspect en « peau d'orange ». En revanche, la taille moyenne des **GUVs** n'a pas été modifiée par l'autoassemblage.

L'étude des **SUVs-AP** par cryo-TEM a pu apporter des éléments de réponse concernant le mécanisme du LEASA depuis la surface des vésicules. Comme mentionné plus tôt, des agrégats nanométriques ont été observés, dans un premier temps, à la surface des **SUVs-AP₁** et ont été associés aux premiers instants de la formation des fibres. Dès lors nous avons tenté de favoriser la formation de ces agrégats. C'est pourquoi des **SUVs-AP₁₀** ont été fabriquées puis mises en contact avec le peptide précurseur **Fmoc-FFpY**. Dans ces conditions nous avons pu favoriser la présence de nanofibres courtes (moins de 100 nm de longueur) et d'agrégats à la surface des vésicules. Il a alors été possible de proposer un mécanisme du LEASA en cinq étapes : (i) déphosphorylation rapide du peptide à la surface des vésicules grâce à l'**AP** immobilisée puis production de **Fmoc-FFY** dans l'environnement proche des toutes les enzymes ; (ii) formation d'agrégats de **Fmoc-FFY** et rapprochement des phospholipides porteurs d'**AP** qui se lient aux agrégats, induisant une distribution non homogène de l'assemblage tout autour des vésicules ; (iii) augmentation de la concentration en agrégats adsorbés sur les membranes mais aussi localisés dans un environnement proche de quelques dizaines de nanomètres ; (iv) nucléation d'une fibre depuis la surface d'une vésicule ou très proche d'elle ; (v) la croissance qui va consommer les agrégats déjà présents (qui disparaissent donc) et ceux produits ultérieurement.

Une déformation des **SUVs** a également était observée, semblant se « coller » aux nanofibres de **Fmoc-FFY** autoassemblés, ou bien déformer par elles. Comment les vésicules adhèrent aux fibres ? Est-ce à cause des enzymes ? Est-ce que la formation de ces nanofibres engendre simultanément la déformation des vésicules ou bien ces dernières se déforment-elles au contact des fibres ? Des expériences complémentaires sont toujours en cours de réalisation pour tenter de répondre à ces questions.

Le second projet de ma thèse, décrit dans le Chapitre IV, portait sur l'élaboration d'un matériau biocatalytique pour une application en chimie en flux. Ce projet avait pour objectif (i) de déterminer s'il était possible de créer un film multicouche contenant jusqu'à trois couches d'enzyme, et de déposer ce dernier à la surface d'une mousse polymère à cellules ouvertes en mélamine; (ii) si l'activité enzymatique du matériau augmentait avec le nombre de couche d'enzyme ; (iii) s'il existait une différence d'activité entre un matériau avec et sans autoassemblage et si ce dernier pouvait apporter une robustesse au matériau biocatalytique face aux utilisations répétées et au vieillissement.

Conclusion générale

Les suivis de la construction de multicouches par QCM-D nous ont apporté la preuve qu'il était possible de déposer jusqu'à au moins trois couches d'**AP** sur un matériau. Ces multicouches ont été construits sur des *wafer* de silicium afin de mesurer l'épaisseur de l'hydrogel de **Fmoc-FFY** autoassemblés formé. Celui-ci est plus épais à mesure que le nombre de couches d'enzyme augmente. Finalement les multicouches ont été formés sur des disques de mousse en mélamine puis observés en microscopie confocale, ce qui a permis de mettre en évidence la présence des hydrogels sur les arrêtes de la mousse. Même avec trois couches d'enzyme, les cellules de la mousse ne sont pas obstruées par l'hydrogel catalytique formé. Des premiers essais d'activité catalytique avec des lamelles de verre nous ont permis de mettre en évidence le fait que l'activité du matériau augmentait avec le nombre de couches d'enzyme. Le procédé catalytique a nécessité un certain nombre d'améliorations. En particulier, il semble que l'accumulation d'ions phosphate dans le milieu réactionnel dans le cas d'un procédé en flux « recyclé », et probablement au sein des hydrogels, soit à l'origine d'une baisse de l'activité catalytique des enzymes. Ce problème doit à présent être pris en compte dans le cadre du développement de réacteurs en flux performants.

Aymeric ONTANI
**AUTOASSEMBLAGE
LOCALISE DE PEPTIDES
INDUIT PAR DES ENZYMES**

L'autoassemblage localisé induit par des enzymes est un outil qui permet d'initier l'autoassemblage de nanofibres de peptides avec un contrôle spatio-temporel. Au cours de mon projet doctoral, l'alcaline phosphatase conjuguée à la streptavidine a été immobilisé à la surface de vésicules unilamellaires pour étudier l'impact du processus d'autoassemblage de peptides sur leurs propriétés physico-chimiques. Il a ainsi été montré que des déformations morphologiques et une perméabilité de la bicouche des vésicules sont provoquées par l'autoassemblage de peptides. Les nanofibres ainsi formées enrobent les vésicules de façon inhomogène. Sur la base d'une étude par microscopie optique, électronique et confocale à fluorescence, un mécanisme de formation par étape des nanofibres de peptides autour de vésicules phospholipidiques a été proposé.

Mots clés: synthèse peptidique, autoassemblage, nanofibres, vésicules, hydrogel supramoléculaire.

Localized enzyme-assisted self-assembly is a tool to initiate the self-assembly of peptide nanofibers with spatiotemporal control. During my PhD project, streptavidin-conjugated alkaline phosphatase was immobilized on the surface of unilamellar vesicles to study the impact of the peptide self-assembly process on their physicochemical properties. It was shown that morphological deformations and transient permeability of the vesicle bilayer are caused by the self-assembly of peptides. The resulting nanofibers coat the vesicles through an inhomogeneous way. Based on light, electron and confocal fluorescence microscopy, a stepwise mechanism of peptide nanofibers formation around enzyme-modified vesicles was proposed.

Keywords: self-assembly, nanofibers, vesicles, supramolecular hydrogel.