Le prix de thèse 2020 attribué par la commission enseignement du GFP a été décerné à Jennifer Rodon Fores qui a réalisé son doctorat à l´Institut Charles Sadron (Université de Strasbourg) entre 2016 et 2019 au sein de l´équipe PECMAT (Thèse soutenue le 20 septembre 2019). Elle a été dirigée par le Pr. Loïc Jierry (ICS), en étroite collaboration avec le Pr. Pierre Schaaf (INSERM U1121/ICS) et le Dr. Fouzia Boulmedais (ICS) dans le cadre d´un projet de recherche soutenu par la Fondation pour la Recherche en Chimie de l´UNISTRA. Son sujet de thèse est intitulé « *Auto-assemblages localisés assisté par des enzymes : du mécanisme aux applications* ».

Dans les systèmes vivants, l'auto-assemblage est un processus qui permet, entre autres, la formation d'architectures organisées et fonctionnelles. Malgré son caractère spontané, la nature a développé des procédés permettant de contrôler l'auto-assemblage de protéines ou de peptides en un lieu précis et selon un timing bien défini, c'est ce qu'on appelle le contrôle spatiotemporel.[1] Les processus d'auto-assemblage sont au cœur de la chimie supramoléculaire. En s'appuyant sur des liaisons non covalentes et donc réversibles, ils permettent l'élaboration de matériaux toujours plus complexes s'inspirant fortement d'approches biomimétiques. Ils sont également capables de s'adapter à leur environnement immédiat.[2] Dans cette quête de nouveaux matériaux possédant des caractéristiques de haute performance similaires à ceux trouvés dans les milieux biologiques, une condition préalable est de pouvoir contrôler ces processus d'auto-assemblage dans l'espace et dans le temps. Dans ce cadre, l'utilisation d'enzymes permettant de déclencher l'auto-assemblage localisé de peptides s'est avérée extrêmement prometteur.[3] En effet, les enzymes peuvent catalyser la transformation d'entités moléculaire non assemblées en entités capable de se reconnaitre et de s'auto-assembler rapidement.[4]

Le projet doctoral de Mme Rodon Fores consistait à concevoir une surface capable d'initier de façon autonome l'auto-assemblage de peptides exclusivement à l'interface solide - liquide. S'inspirant du développement morphogénique de tissus vivants,[5] une surface a été modifié par une enzyme capable de transformer un peptide présent dans le milieu environnant en un hydrogélateur performant (Fig. 1). L'auto-assemblage de cet hydrogélateur engendre la formation de fibres générant l'ossature d'un hydrogel.

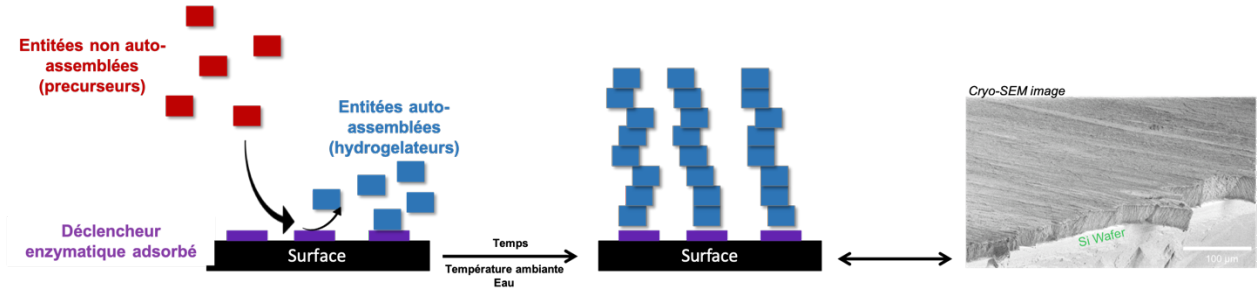

Figure 1: Représentation schématique du concept d'auto-assemblage localisé en surface grâce à l'utilisation d'enzyme. L'image de *cryo*-SEM (*droite*) présente l'épaisseur micrométrique d'un hydrogel supramoléculaire formé à partir d'un wafer de silicium modifié par une enzyme

Au cours de cette thèse, il a été mis en évidence que l'activité enzymatique d'une protéine n'était pas l'unique façon d'induire l'auto-assemblage de peptides choisis (**1**). Certaines protéines dépourvues d'activités catalytiques mais présentant des zones chargées positivement à leur surface peuvent également amorcer le processus d'auto-assemblage *via* le déplacement d'un équilibre chimique entre un peptide et sa forme « hydrogélatrice ».[6] L'auto-assemblage localisé depuis une électrode permettant de générer un gradient de protons par voie électrochimique est une approche efficace pour diriger l'auto-assemblage de peptides, et a fait l'objet de récents et nombreux travaux.[7,8] Cependant, la nécessité de devoir utiliser une surface conductrice limite le champ des applications possibles, en particulier pour le domaine biomédical. En déposant une enzyme productrice de protons et déposée à la surface d'un matériau, il a été possible de créer la première surface capable de diriger l'auto-assemblage de peptides en utilisant un gradient de protons produit par voie enzymatique (**2**). Cette stratégie est ainsi généralisable à tous les types de matériaux. L'auto-assemblage peut conduire à l'émergence de nouvelles propriétés, comme l'aptitude

catalytique. Inspiré par des travaux de la littérature,[9,10] un peptide capable d'induire la formation d'un hydrogel catalytique depuis une surface modifiée par une enzyme adéquate a été conçu (**3**). Pour permettre l'utilisation de cet hydrogel catalytique fragile mécaniquement, ce dernier a été formé au sein d'un matériau polymère poreux, permettant son utilisation pour la réalisation de transformations chimiques sous flux. L'hydrogel catalytique étudié présente une activité estérase sur les trois classes d'esters et permet la résolution cinétique d'esters racémiques. En incorporant un bio-polymère lors de la formation de l´auto-assemblage, des surfaces possédant des propriétés mécaniques modulable ont été conçu comme support de culture cellulaire (**4**).

1. Auto-assemblage initié par des protéines dépourvues d'activités catalytiques

L´heptapeptide Fmoc-***A***-SS-***B*** représenté en Figure 2a a été conçu avec un pont disulfure dans sa structure, afin d´être clivé en présence d'une enzyme, la glutathion réductase. Cette réduction enzymatique engendre la formation d'un nouveau peptide, le Fmoc-***A***-SH, qui est capable de s'auto-assembler pour conduire à la formation de nanofibres. Le réseau fibrillaire ainsi obtenu soutient la formation d'un hydrogel. De façon assez surprenante, l'albumine et l'alcaline phosphatase, deux autres protéines ne présentant pas d'activités réductrices vis-à-vis des liaisons S-S, génèrent également la production de l'hydrogélateur Fmoc-***A***-SH et ainsi la formation d'hydrogel. Pour comprendre cette observation inattendue, différentes techniques de chimie et physico-chimie ont été utilisées pour étudier l'auto-assemblage du peptide Fmoc-***A***-SH et son mécanisme : spectroscopie RMN, IR, dichroïsme circulaire, fluorescence, microscopie à force atomique, microscopie électronique et rhéologie. Cette étude a montré que la présence de protéines présentant des charges positives sont capables de déplacer l'équilibre disulfure-thiol en faveur du dérivé Fmoc-***A***-SH et ainsi initier le processus de gélation. Les protéines ou polypeptides chargés positivement sont indispensables pour initier ce mécanisme. De plus, il semble que l'initiation de l'auto-assemblage soit spécifiquement localisée à la surface des protéines. Ainsi lorsque des protéines dépourvues d'activités catalytiques sont déposées à la surface d'un matériau, il est possible de faire croitre des nanofibres depuis cette surface *via* une approche dite *bottom-up* (Figure 1b). ***L'utilisation de protéines pour initier l'auto-assemblage de peptide n'a jamais été décrite et représente un changement de paradigme dans ce domaine.***[11] Il constitue une approche universelle de la localisation d'hydrogels supramoléculaires puisque l'auto-assemblage peut être initié et contrôlé par n'importe quelle protéine.

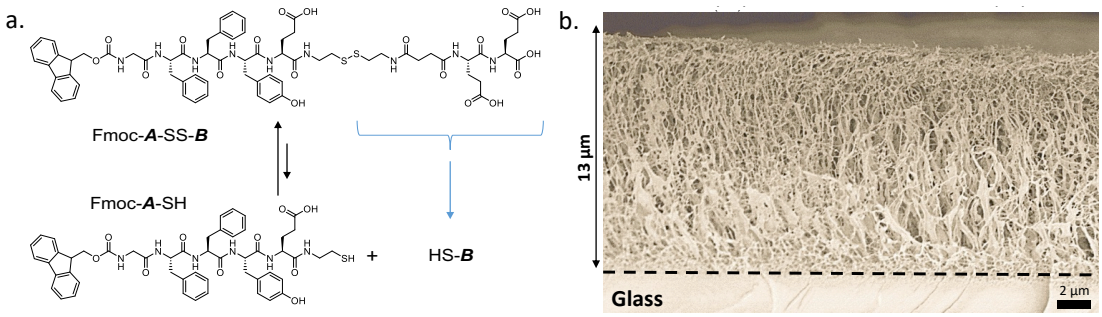

Figure 2 : (a) Équilibre chimique entre Fmoc-***A***-SS-***B*** et Fmoc-***A***-SH ; (b) Image de *Cryo*-MEB d'un hydrogel supramoléculaire de Fmoc-***A***-SH formé à partir d'une couche de phosphatase alcaline préalablement adsorbée sur une lame de verre (vue en section z). Published by The Royal Society of Chemistry (RSC) on behalf of the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the RSC. Copyright © 2019. [11]

2. Auto-assemblage depuis une surface modifiée par une enzyme génératrice de protons

Par électrochimie, il est aisément possible de générer un gradient de protons depuis la surface d'une électrode.[7] Ceci a permis de diriger spécifiquement l'auto-assemblage de peptides sur une électrode en utilisant des peptides ne pouvant s'auto-assembler qu'en milieu acide.[8] En immobilisant la glucose oxydase (GOx) dans un film multicouche déposé à la surface d'un matériau *non conducteur* (Figure 3a), Mme Rodon Fores a démontré qu'il était possible de générer un gradient de protons depuis une surface par une voie enzymatique (Figure 3b) et engendrer ainsi l'auto-assemblage de peptides choisis (Figure 3c). Différents peptides ont été synthétisés et des tests de gélation en milieu acide ont été réalisés afin de déterminer la gamme de pH des différents peptides choisis. Le dipeptide dialanine présentant un groupement protecteur Fmoc en N-terminal (Fmoc-AA-OH) s'est avéré le plus adapté à cette étude car capable de s'auto-assembler dans la gamme de pH

acide produite par la GOx. Lorsque celle-ci est adsorbée à la surface d'un film multicouche adéquat, sa mise en présence du Fmoc-AA-OH n'amorce aucun assemblage, comme attendu. Par contre, si la solution du peptide contient du glucose, l'enzyme transforme ce substrat en acide gluconique, acidifiant l'espace proche de la surface, ce qui se traduit par la protonation du précurseur générant l´hydrogélateur qui va pouvoir s´auto-assembler. Cet auto-assemblage correspond à un hydrogel d'épaisseur micrométrique composé de nanofibres. L'épaisseur de cet hydrogel peut être modulée par la concentration en glucose et la densité d'enzymes présentent en surface. Il a été également montré que l'auto-assemblage se produisait exclusivement là où l'enzyme était déposée. Ces travaux ouvrent la porte à l'application d'hydrogels supramoléculaires formés à la surface de matériaux non conducteurs, ce qui pourrait être particulièrement intéressant dans le domaine des biomatériaux.[12]

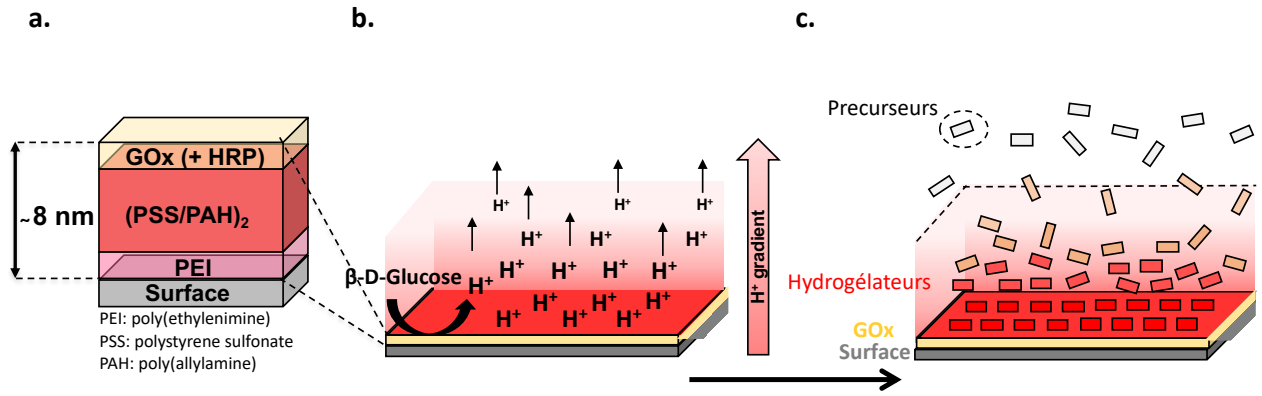

Figure 3 : (a) Représentation schématique du film multicouche conçu pour y déposer la GOx en surface. (b) Formation d´un gradient de proton à partir de la surface en présence de glucose, (c) conduisant à la formation *in situ* de l´hydrogélateur et à son auto-assemblage localisé en surface. Copyright © 2019, published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.[11]

3. Hydrogel supramoléculaire catalytique pour des réacteurs chimiques en flux

L'auto-assemblage d'entités moléculaires peut donner lieu à l'émergence de nouvelles propriétés. Dans ce domaine, les hydrogels supramoléculaires catalytiques sont intéressants tant d'un point de vue fondamental qu'appliqué.

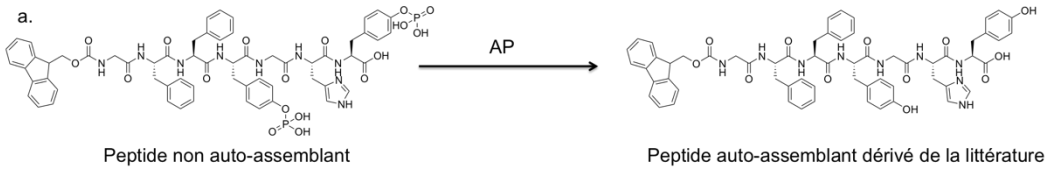

Figure 4 : Déphosphorylation enzymatique par l'alcaline phosphatase (AP) d'un peptide dont l'auto-assemblage engendre la formation d'un hydrogel catalytique présentant une activité esterase-like. Copyright Copyright © 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.[12]

En s'inspirant d'un peptide décrit dans la littérature[9,10] dont l'auto-assemblage exhibe une activité de type « estérase », un nouveau peptide présentant deux groupements phosphates a été conçu, lui permettant ainsi d'être soluble dans l'eau à température ambiante (Figure 4). Lorsqu'une enzyme, l'alcaline phosphatase, capable de cliver ces groupements phosphates est déposée à la surface d'un matériau puis mis au contact du peptide, un hydrogel catalytique est formé. Il a été montré qu'il était possible de supporter un hydrogel catalytique sur une mousse polymère à cellules ouvertes. Ce matériau poreux, souple et élastique permet une utilisation aisée de ce nouveau système catalytique dans des réacteurs chimique en flux (Figure 5).

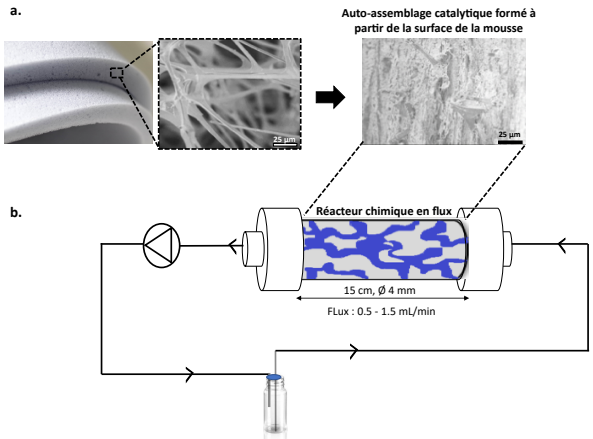

Figure 5 : (a) Formation de l´auto-assemblage sur la surface d´une mousse polymère permettant (b) l´utilisation de l'hydrogel catalytique dans un réacteur chimique en flux. Copyright © 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.[12]

L'activité catalytique de l'auto-assemblage est conservé en surface et s'est révélé être performante pour l'hydrolyse de toutes les classes d'esters. En outre, il permet également la résolution cinétique d'esters racémiques.[12] Ce projet a inspiré la conception d´un auto-assemblage auto-catalytique pouvant être généré à partir d´une surface. Cette surface va pouvoir générer son propre revêtement à partir d´une quantité très faible d´enzyme initiatrice (10^{-18}M).[13]

4. Contrôle des propriétés mécaniques de l'hydrogel supramoléculaire *via* l´incorporation d´un biopolymère

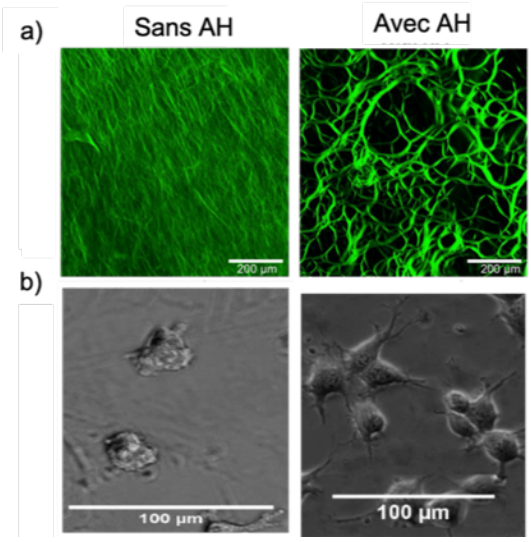

Figure 6 : Images (a) confocale du réseau de fibres formé en présence ou en absence d´AH et (b) optique de culture de fibroblastes NIH 3T3 sur un hydrogel formé en présence ou en absence d´AH. Images obtenues en collaboration avec le Dr. M. Rabineau (INSERM U1121).

Dans le dernier chapitre de sa thèse, Mme Rodon Fores a conçu de nouveaux hydrogels composites en combinant un auto-assemblage peptidique (Fmoc-FFY-OH) et l´acide hyaluronique (AH). En combinant ces deux composés, une gamme de propriétés morphologiques et mécaniques, adaptées à son utilisation comme substrat pour la culture cellulaire, a été obtenue. Lorsque la proportion d´AH dans l´hydrogel augmente légèrement, la dureté des matériaux résultants diminue mais la viabilité cellulaire des fibroblastes NIH 3T3 augmente (Figure 6). Afin de comprendre pourquoi et comment la morphologie et les propriétés mécaniques des hydrogels varient en présence de AH, une étude des caractéristiques physico-chimique d´hydrogels hybrides présentant différentes proportions de AH a été réalisé : dichroïsme circulaire, infrarouge, microscopie à fluorescence, confocale et électronique à balayage et transmission. Cette étude conclut que l´AH interagit avec l´auto-assemblage peptidique bien que les deux molécules soient chargées négativement. Ces travaux vont faire l'objet d'une soumission pour un prochain article.

En conclusion, ces travaux démontrent tout le potentiel de la localisation d'auto-assemblages de peptides, et plus largement d'hydrogels supramoléculaires, depuis la surface de matériau. Au cours de sa thèse, Mme Rodon Fores a établi des concepts nouveaux mais aussi ouvert des portes à des applications originales.

Références

1. (a) Mann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5306-5320; (b) Barral *et al.*, *BioEssays* **1999**, *21*, 813 – 823; (c) Li *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14*, 141-152.
2. (a) Lehn, *Supramolecular Chemistry*, Wiley-VCH:Weinheim, **1995**; (b) Aida *et al.*, *Science* **2012**, *335*, 813-817; (c) Mattia *et al.*, *Nat. Nanotechnol.* **2015**, *10*, 111-119; Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3276-3289.
3. (a) Williams *et al.*, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 19-24; (b) Williams *et al.*, *Biomaterials* **2011**, *32*, 5304-5310; (c) Olive *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4132-4136; (d) Vigier-Carrière *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10198-10201; (e) Spitzer *et al.*, *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 11519-11523.
4. Du *et al.*, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 13165-13307.
5. (a) Hartgerink, *et al.*, *Science*, **2001**, *294*,1684−1688. (b) Holmes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, *97*, 6728−6733. (c) Haines *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 17025−17029. (d) Galler *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 3217−3223.
6. Rodon Fores, *et al.*, *Chemical Science*, **2019**,*10,* 4761-4766.
7. Johnson *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 5130 – 5136.
8. a) Mu *et al.*, *Biomacromolecules*, **2012**, *13*, 3562 – 3571; b) Jayawarna *et al.*, *J. Adv. Mater.*, **2006**, *18*, 611 – 614; c) Adams *et al.*, *Soft Matter*, **2010**, *6*, 1971 – 1980.; d) Cheng *et al.*, *Sci. China-Phys. Mech. Astron.*, **2016**, *59*, 678711 – 678716.
9. Yang *et al. Chin. J. Chem.*, **2013**, *31*, 494-500.
10. Zhou *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, 10040-10043.
11. Rodon Fores, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*, 15984-15988.
12. Rodon Fores, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, *58*, 18817-18822.
13. Rodon Fores, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *59*, 14558-14563.