



**HAL**  
open science

# Hydrogels supramoléculaires mono- et multi-composés formés d'hybrides peptides/acides nucléiques : synthèse, caractérisation et analyse multi-échelle

Tristan Giraud

► **To cite this version:**

Tristan Giraud. Hydrogels supramoléculaires mono- et multi-composés formés d'hybrides peptides/acides nucléiques : synthèse, caractérisation et analyse multi-échelle. Génie des procédés. Université de Lorraine, 2021. Français. NNT : 2021LORR0226 . tel-03653170

**HAL Id: tel-03653170**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03653170v1>**

Submitted on 22 Feb 2023

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

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



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

## Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention : Génie des Procédés, des Produits et des Molécules**

par **Tristan GIRAUD**

sous la direction de **Dr. Marie-Christine AVERLANT-PETIT**

et **Dr. Loïc STEFAN**

**Hydrogels supramoléculaires mono- et multi-composés  
formés d'hybrides peptides/acides nucléiques : synthèse,  
caractérisation et analyse multi-échelle**

**soutenue le : 14 Décembre 2021**

### **Membres du jury :**

Directrice de thèse :	Mme Marie-Christine AVERLANT-PETIT	CR CNRS, Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire UMR7375, Nancy
Co-directeur :	M. Loïc STEFAN	CR CNRS, Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire UMR7375, Nancy
Rapporteurs :	Mme Fouzia BOULMEDAIS	DR CNRS, Institut Charles Sadron UPR22, Strasbourg
	M. Philippe BARTHELEMY	Professeur, Laboratoire ARNA, INSERM U1212, CNRS UMR 5320, Bordeaux
Examineurs :	M. Gilles SUBRA	Professeur, Institut des Biomolécules Max Mousseron UMR5247, Montpellier
	Mme Christine GERARDIN (Présidente du jury)	Professeur, Laboratoire d'Etudes et de Recherche sur le MATériau Bois EA4370, Nancy
Membres invités :	M. Philippe MARCHAL	Ingénieur de Recherche CNRS, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés UMR7274, Nancy



*À mon entourage,*

*À ceux qui pensent que ça n'a rien à voir,*

*(mais un petit peu quand même)*



# Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit est le fruit de trois années de recherches effectuées au sein de l'équipe « Gels » du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM, UMR 7375) de Nancy. Je tiens à remercier Alain Durand, alors directeur, de m'avoir permis d'intégrer son laboratoire en tant que doctorant. Je remercie également le ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, pour la bourse doctorale ayant financé ces travaux.

Je souhaite ensuite adresser mes remerciements aux membres du jury, ayant aimablement accepté de juger ce travail, Mme Fouzia BOULMEDAIS et M. Philippe BARTHELEMY en leurs qualités de rapporteurs, et M. Gilles SUBRA en sa qualité d'examineur. Je remercie en particulier, pour leur suivi tout au long de cette thèse, Mme Christine GERARDIN ainsi que M. Philippe MARCHAL avec qui la rhéologie n'a jamais paru autant couler de source. Merci pour ces discussions fructueuses qui ont su faire émerger de nouvelles idées et pour ces encouragements qui ont jalonné mon parcours.

J'aimerais remercier des plus chaleureusement Marie-Christine AVERLANT-PETIT d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse. Elle a chapeauté ce travail avec bienveillance, donnant des impulsions au sujet, confirmant avec confiance nos décisions et apportant régulièrement, de son œil averti, l'expérience dont nous avons besoin. Notamment, elle m'a prouvé que l'attribution de signaux RMN pouvait être une enquête palpitante, si l'on sait décrypter ces taches kaléidoscopiques. Je suis persuadé que sa force, son optimisme et sa bonne humeur ont largement contribué à l'épanouissement de ce travail.

Des mots ne pourraient malheureusement pas exprimer toute la gratitude que je porte envers Loïc STEFAN, co-directeur sur le papier, mais directeur dans l'âme de cette thèse. Je n'aurais pu rêver de meilleur encadrant que toi, Loïc. Je pense sincèrement que tu as su me montrer ce qu'est la Recherche, la démarche scientifique et la manière de penser un projet de recherche scientifique. J'espère de tout cœur que la flamme passionnée que tu possèdes et que tu m'as transmise ne s'éteindra jamais, que tu continueras de la prodiguer aux étudiants avec pédagogie et patience comme tu l'as fait avec moi.

Les travaux présentés dans ce manuscrit n'auraient jamais vu le jour sans la contribution de Sabine BOUGUET-BONNET qui m'a toujours accueilli avec le sourire pour les expériences de relaxométrie, ou encore celles de Marie-José STEBE et Lionel RICHAUDEAU qui nous ont permis de réaliser des mesures de SAXS, une pièce qui aurait cruellement manqué à l'étude proposée dans ce manuscrit. Merci beaucoup à Émilie VELOT pour avoir tenté de réaliser nos rêves concernant des tests biologiques. Je remercie aussi Anne ROBERT, Sylvie MIGOT-CHOUX, Sébastien LECLERC, Marc QUINTERNET et Alexandre KRIZNIK pour leurs participations à ce projet.

Merci encore à tous les membres du LCPM, de ceux qui ont pris part à ce projet au plus près tels Guillaume et ses bonnes idées, Mathilde à la synthèse peptidique et à la HPLC ou encore Olivier à la RMN ; et à ceux qui ont été là, autour d'un repas, d'un café ou d'un thé accompagné d'oursons à la guimauve. Un grand merci à tous !

Enfin, j'accorde des remerciements tout particuliers à mes amis doctorants : ceux qui furent là avant, qui m'ont montré les rouages du laboratoire, Tanya, Olga, Amina, Géraldine and you, Cùn ; et ceux qui assistèrent aux moments les plus difficiles, Ludivine, Djallal, Thomas, Paul et Laurène. Paul, l'année que nous avons passée en vaut bien le double tant elle fut intense, sache que j'ai entièrement confiance en toi pour la suite. Laurène, je suis sûr que ta thèse sera incroyable, j'admire ton énergie et ta persévérance, qui ont été un soutien sans failles tant aux TP de chimie organique, qu'à l'ED ou qu'au laboratoire.

Je terminerais ces remerciements par un petit coucou à ma famille, ma grande-tante Annie, mon grand-oncle Jean-Pierre et mes cousins Julien et Fanny qui m'ont accueilli à bras ouverts en Lorraine. J'adresse un dernier merci à mes parents, mon frère Aurélien et ma sœur Noémie pour leur soutien constant.

Merci beaucoup !





# Table des matières

<b>LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS</b>	<b>VII</b>
<b>TABLE DES ACIDES AMINES</b>	<b>XI</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : HYDROGELS SUPRAMOLECULAIRES MONO- ET MULTI-COMPOSES FORMES D'HYBRIDES PEPTIDES/ACIDES NUCLEIQUES : ETAT DE L'ART</b>	<b>11</b>
I.1 HYDROGELS SUPRAMOLECULAIRES PEPTIDIQUES, DESIGN MOLECULAIRE ET APPLICATIONS	11
<i>I.1.a Définition</i>	11
<i>I.1.b Peptides formant des assemblages de type feuillets <math>\beta</math></i>	13
<i>I.1.c Peptides amphipathiques</i>	15
<i>I.1.d Conclusion</i>	18
I.2 CONCEVOIR DES HYBRIDES PEPTIDES/ACIDES NUCLEIQUES, STRUCTURES, ET APPLICATIONS	19
<i>I.2.a Définitions : des acides nucléiques aux nucléopeptides</i>	19
<i>I.2.b Concevoir des nucléopeptides</i>	22
<i>I.2.c Nucléopeptides capables de former des auto-assemblages supramoléculaires</i>	27
<i>I.2.d Nucléopeptides capables de former des hydrogels</i>	29
<i>I.2.e Conclusion</i>	35
I.3 APPROCHE MULTI-COMPOSES POUR LA FORMULATION DE GELS SUPRAMOLECULAIRES	36
<i>I.3.a Définition</i>	36
<i>I.3.b Gels supramoléculaires multi-composés</i>	38
I.3.b.i Introduction	38
I.3.b.ii Comportement de « self-sorting » dans les gels supramoléculaires	40
I.3.b.iii Comportement de co-assemblage au sein des gels supramoléculaires	44
I.3.b.iv Contrôler le mode d'assemblage supramoléculaire	48
<i>I.3.c Hydrogels supramoléculaires peptidiques multi-composés</i>	50
I.3.c.i Introduire une nouvelle fonction par co-assemblage	51
I.3.c.ii Générer des points de jonctions par réticulation du réseau supramoléculaire	53
I.3.c.iii Mélanges de peptides aromatiques	55
I.3.c.iv Mélanges de peptides de stéréochimies différentes	57
I.3.c.v Structures moléculaires portant des charges complémentaires	58
I.3.c.vi Nucléopeptides portant des bases nucléiques complémentaires	59
I.3.c.vii Conclusion	61
I.4 CONCLUSION	61
<b>CHAPITRE II : COMPOSES HYBRIDES PEPTIDE/ACIDE NUCLEIQUE MODIFIES PAR UN PNA EN N-TERMINAL : SYNTHÈSE, FORMULATIONS ET CARACTERISATIONS MULTI-ECHELLES D'HYDROGELS MONO-COMPOSES</b>	<b>65</b>
II.1 INTRODUCTION	65
II.2 DESIGN MOLECULAIRE DES NUCLEOPEPTIDES DE L'ETUDE ET CHOIX DES REFERENCES	66
<i>II.2.a Choix de la partie peptidique</i>	66
<i>II.2.b Choix de la partie acide nucléique</i>	70
<i>II.2.c Choix du design des nucléopeptides</i>	72
<i>II.2.d Choix des composés de référence pour l'étude</i>	73
II. 3 SYNTHÈSE DES COMPOSES PEPTIDIQUES ET NUCLEOPEPTIDIQUES PAR SYNTHÈSE PEPTIDIQUE SUR SUPPORT SOLIDE (SPPS)	74
II.4 CARACTERISATION CHIMIQUE DES COMPOSES SYNTHETISES	76
II.5 FORMULATION DES HYDROGELS : CHOIX DES CONDITIONS ET PREMIERES OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES	78

II.5.a	Choix des conditions de formulation des hydrogels	78
II.5.b	Etude du comportement de gélification des composés en fonction du pH	79
II.5.c	Etude du comportement de gélification en fonction de la concentration des composés	80
II.6	CARACTERISATION MECANIQUE DES GELS PAR RHEOLOGIE	82
II.6.a	Cinétique de formation des hydrogels par balayage en temps	83
II.6.b	Résistance des hydrogels à la contrainte mécanique	84
II.6.c	Comportement des hydrogels en température	87
II.7	CARACTERISATION DU MILIEU STRUCTUREL INTERNE DES HYDROGELS PAR RELAXOMETRIE RMN	90
II.8	OBSERVATION DES MICROSTRUCTURES CONSTITUANT LES HYDROGELS, PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION	93
II.9	SUIVI DE LA CINETIQUE DE FORMATION DES FIBRILLES PAR FLUORESCENCE DE LA THIOFLAVINE T	96
II.9.a	Choix des conditions expérimentales	97
II.9.b	Etat fibrillaire des systèmes en auto-assemblage	98
II.9.c	Cinétique de formation des fibres	99
II.10	IDENTIFICATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DE L'ASSEMBLAGE SUPRAMOLECULAIRE PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE ET DICHROÏSME CIRCULAIRE	100
II.10.a	Etude de la structuration des composés en conditions déstructurantes	101
II.10.b	Etude de la structuration des assemblages peptidiques/nucloépeptidiques	102
II.10.c	Contribution des bases nucléiques à la structure secondaire	104
II.11	ETUDE DE LA STRUCTURE FINE DES PEPTIDES/NUCLEOPEPTIDES EN MILIEU ASSEMBLE, PAR RMN	105
II.11.a	Spectres RMN des composés en tampon Tris.HCl	105
II.11.b	Utilisation du « NMR chemical shift index »	106
II.12	MISE EN EVIDENCE DES INTERACTIONS DE $\pi$ -STACKING PAR SPECTROFLUORIMETRIE	107
II.12.a	Analyse des spectres de fluorescence	107
II.12.b	Présence d'un effet de « red-edge excitation shift »	110
II.13	CONCLUSION	111

### **CHAPITRE III : FORMULATIONS ET CARACTERISATIONS MULTI-EHELLES D'HYDROGELS MULTI-COMPOSES : ETUDE DE MELANGES DE NUCLEOPEPTIDES AUX BASES NUCLEIQUES COMPLEMENTAIRES**

III.1	INTRODUCTION	117
III.2	FORMULATION ET OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES DE MELANGES EQUIMOLAIRES DES COMPOSES COMPLEMENTAIRES	120
III.3	CARACTERISATIONS MECANQUES DES HYDROGELS MULTI-COMPOSES {A+T} ET {C+G} PAR RHEOMETRIE	122
III.3.a	Cinétique de formation des hydrogels	122
III.3.b	Résistance à la contrainte mécanique des hydrogels	125
III.3.c	Comportement des hydrogels à la température	126
III.4	FORMULATIONS ET OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES DE MELANGES COMPLEMENTAIRES A DIFFERENTS RATIOS	129
III.5	CARACTERISATIONS MECANQUES DES HYDROGELS MULTI-COMPOSES COMPLEMENTAIRES A DIFFERENTS RATIOS	132
III.6	FORMULATION ET OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES : COMPARAISON DES MELANGES EQUIMOLAIRES COMPLEMENTAIRES {A+T} ET {C+G} AVEC DES MELANGES EQUIMOLAIRES TEMOINS CONTENANT AEG-PEP	135
III.7	CARACTERISATIONS MECANQUES DES HYDROGELS PAR RHEOMETRIE : COMPARAISON DES MELANGES EQUIMOLAIRES COMPLEMENTAIRES AVEC LES MELANGES TEMOINS	137
III.7.a	Cinétique de formation des hydrogels témoins par balayage en temps	137
III.7.b	Comparaison de la résistance à la contrainte mécanique des hydrogels témoins par balayage en contrainte	140
III.8	CARACTERISATION DU MILIEU STRUCTUREL INTERNE DES HYDROGELS MULTI-COMPOSES EQUIMOLAIRES PAR RELAXOMETRIE RMN	141
III.9	CARACTERISATION DU RESEAU FIBRILLAIRE DES HYDROGELS MULTI-COMPOSES EQUIMOLAIRES PAR DIFFUSION DES RAYONS X (SAXS)	144
III.10	OBSERVATION DES MICROSTRUCTURES CONSTITUANT LES HYDROGELS MULTI-COMPOSES EQUIMOLAIRES PAR MICROSCOPIE TEM	149

III.11 CARACTERISATION DES ASSEMBLAGES SUPRAMOLECULAIRES DES MELANGES EQUIMOLAIRES PAR SPECTROSCOPIES IRTF ET CD	152
III.11.a Identification de la structure secondaire des assemblages supramoléculaires	152
III.11.b Identification du mode d'assemblage des systèmes multi-composés	154
III.12 CINÉTIQUE DE FORMATION DES SYSTÈMES FIBRILLAIRES DE MELANGES EQUIMOLAIRES PAR SUIVI DE LA FLUORESCENCE DE LA THIOFLAVINE T	158
III.13 MISE EN EVIDENCE D'INTERACTIONS DE $\pi$ -STACKING PAR SPECTROFLUORIMÉTRIE	162
III.13.a Analyse des spectres de fluorescence	162
III.13.b Présence d'un effet de « red-edge emission shift » (REES)	165
III.14 ÉTUDE DE LA STRUCTURE FINE DES ASSEMBLAGES MULTI-COMPOSÉS COMPLÉMENTAIRES {A+T} ET {C+G}, PAR RMN	166
III.14.a Spectres RMN en tampon Tris.HCl	167
III.14.b Identification de pics quadripolaires sur les spectres de relaxométrie RMN	167
III.15 CONCLUSION	169
<b>CHAPITRE IV : VERS DE NOUVEAUX SYSTÈMES MULTI-COMPOSÉS : SYNTHÈSE ET FORMULATION DE COMPOSÉS NUCLEOPEPTIDIQUES COMPLÉMENTAIRES</b>	<b>175</b>
IV.1 INTRODUCTION	175
IV.2 COMPOSÉS AUX PARTIES PEPTIDIQUES AUTO-COMPLÉMENTAIRES ET AUX PARTIES PNA COMPLÉMENTAIRES	177
IV.2.a Design moléculaire des nucléopeptides de l'étude	177
IV.2.b Synthèse et purification des composés PNA(GTG)-pep et PNA(CAC)-pep	179
IV.2.c Formulation des échantillons multi-composés et observations macroscopiques	180
IV.2.d Conclusions et discussion	182
IV.3 COMPOSÉS AUX PARTIES PEPTIDIQUES AUTO-COMPLÉMENTAIRES ET AUX PARTIES PNA COMPLÉMENTAIRES	183
IV.3.a Design moléculaire des nucléopeptides de l'étude	183
IV.3.b Synthèse et purification des composés PNA(ACGT)-FEFE et PNA(ACGT)-FKFK	185
IV.3.c Formulation des échantillons multi-composés et observations macroscopiques	186
IV.3.d Conclusions et discussion	188
IV.4 COMPOSÉS AUX PARTIES PEPTIDIQUES COMPLÉMENTAIRES ET AUX PARTIES PNA COMPLÉMENTAIRES	189
IV.4.a Design moléculaire des nucléopeptides de l'étude	189
IV.4.b Synthèse et purification des composés PNA(A)-pep <sub>(+)</sub> , PNA(C)-pep <sub>(-)</sub> , PNA(G)-pep <sub>(+)</sub> et PNA(T)-pep <sub>(-)</sub>	191
IV.4.c Formulation des échantillons multi-composés et observations macroscopiques	192
IV.4.d Conclusions et discussion	196
IV.5 CONCLUSION	197
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b>	<b>201</b>
<b>CHAPITRE V : PARTIE EXPÉRIMENTALE</b>	<b>207</b>
V.1 HYDROGELS SUPRAMOLECULAIRES MONO-COMPOSÉS À PARTIR DES NUCLEOPEPTIDES PNA(X)-PEP	207
V.1.a Peptide synthesis, purification, and chemical analyses	207
V.1.b Mono-component samples preparation	208
V.1.c Rheological characterizations	208
V.1.d Relaxometry	209
V.1.e Transmission electron microscopy	210
V.1.f Thioflavin T fluorescence	210
V.1.g FTIR (IRTF)	210
V.1.h Circular dichroism	211
V.1.i NMR CSI (RMN)	211
V.1.j Fluorescence	212
V.2 HYDROGELS SUPRAMOLECULAIRES MULTI-COMPOSÉS À PARTIR DES NUCLEOPEPTIDES PNA(X)-PEP	212

V.2.a Multicomponent sample preparation	212
V.2.b Rheological characterizations	213
V.2.c Relaxometry	213
V.2.d Small-Angle X-ray scattering (SAXS)	214
V.2.e Transmission electron microscopy (TEM)	215
V.2.f FTIR (IRTF)	215
V.2.g Circular dichroism	215
V.2.h Thioflavin T fluorescence	216
V.2.i Fluorescence	216
V.2.j NMR (RMN)	217
V.3 NOUVEAUX SYSTEMES SUPRAMOLECULAIRES MULTI-COMPOSES A PARTIR DE NUCLEOPEPTIDES COMPLEMENTAIRES	217
V.3.a Peptide synthesis, purification, and chemical analyses of PNA(GTG)-pep and PNA(CAC)-pep	217
V.3.b Peptide synthesis, purification, and chemical analyses of Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH <sub>2</sub> , Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH <sub>2</sub> , Ac-FEFE-NH <sub>2</sub> and Ac-FKFK-NH <sub>2</sub>	218
V.3.c Peptide synthesis, purification, and chemical analyses of PNA(A)-pep <sub>(+)</sub> , PNA(C)-pep <sub>(-)</sub> , PNA(G)-pep <sub>(+)</sub> et PNA(T)-pep <sub>(-)</sub>	219
V.3.d Samples preparation	221
V.3.c Rheological characterizations	221
V.4 ESSAIS PRELIMINAIRES D'EVALUATION DE LA PERTINENCE DES COMPOSES PNA(X)-PEP POUR LE DEVELOPPEMENT DE BIOMATERIAUX	222
<b>REFERENCES</b>	<b>224</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>251</b>
<b>ANNEXES – CHAPITRE I</b>	<b>S1</b>
<b><u>SI.I.1 SCHEMAS COMPLEMENTAIRES</u></b>	<b>S1</b>
<b>ANNEXES – CHAPITRE II</b>	<b>S2</b>
<b><u>SI.II.1 SYNTHESE ET CHARACTERISATION CHIMIQUE</u></b>	<b>S2</b>
<b><u>SI.II.2 FORMULATIONS ET CHARACTERISATIONS RHEOLOGIQUES</u></b>	<b>S10</b>
<b><u>SI.II.3 MICROSCOPIE TEM ET FLUORESCENCE</u></b>	<b>S15</b>
<b>ANNEXES – CHAPITRE III</b>	<b>S18</b>
<b><u>SI.III.1 FORMULATIONS ET CHARACTERISATIONS RHEOLOGIQUES</u></b>	<b>S18</b>
<b><u>SI.III.2 RELAXOMETRIE, SAXS, MICROSCOPIE TEM ET FLUORESCENCE</u></b>	<b>S23</b>
<b>ANNEXES – CHAPITRE IV</b>	<b>S28</b>
<b><u>SI.IV.1 SYNTHESE ET CHARACTERISATION CHIMIQUE</u></b>	<b>S28</b>
<b><u>SI.IV.2 OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES SUPPLEMENTAIRES</u></b>	<b>S37</b>

## Liste des publications

Les travaux de cette thèse ont été valorisés par des publications dans des revues à comité de lecture et par un chapitre de livre scientifique :

- Article scientifique : Giraud, T.; Bouguet-Bonnet, S.; Marchal, P.; Pickaert, G.; Averlant-Petit, M.-C.; Stefan, L. « Improving and fine-tuning the properties of peptide-based hydrogels via incorporation of peptide nucleic acids » *Nanoscale*, **2020**, *12*, 19905-19917.<sup>148</sup>
- Article scientifique : Giraud, T.; Bouguet-Bonnet, S.; Stébé, M.-J.; Richaudeau, L.; Pickaert, G.; Averlant-Petit, M.-C.; Stefan, L. « Co-assembly and multicomponent hydrogel formation upon mixing nucleobase-containing peptides » *Nanoscale*, **2021**, *13*, 10566-10578.<sup>171</sup>
- Chapitre de livre : El Hajj, S. *et al.* in *Biologically Active Peptides: From Basic Science to Applications for Human Health*; ed. Toldra, F., Wu, J., Elsevier, à **paraître**, chap. 19, pp 455–494<sup>485</sup>
- Article scientifique : Giraud, T.; Hoschtettler, P.; Pickaert, G.; Averlant-Petit, M.-C.; Stefan, L. « Emerging low-molecular weight nucleopeptide-based hydrogels: state of the art, applications, challenges and perspectives », **soumis**.

## Liste des présentations

Les travaux de cette thèse ont été valorisés au cours de communications par poster et par présentations orales :

- Poster : **Giraud, T.**; Pickaert, G.; Averlant-Petit, M.-C.; Stefan, L. « Synthesis and characterization of smart supramolecular peptide-based hydrogels » *21e congrès du GFPP 2019*, **2019**, Amboise (FR)
- Poster : **Giraud, T.**; Pickaert, G.; Averlant-Petit, M.-C.; Stefan, L. « Synthesis and characterization of supramolecular nucleopeptide-based hydrogels » *Journée de l'école doctorale SIMPPE 2020*, **2020**, Nancy (FR)
- Communication orale : **Giraud, T.** « Composés hybrides peptides/acides nucléiques pour le développement d'hydrogels supramoléculaires aux propriétés optimisées et contrôlées » *Journée de l'école doctorale SIMPPE 2021*, **2021**, Nancy (FR) « 1<sup>er</sup> prix de la communication orale »
- Communication orale **Giraud, T.** « Hydrogels supramoléculaires formés d'hybrides peptides/acides nucléiques : synthèse, caractérisation et analyse multi-échelle » *55<sup>e</sup> congrès du GFR 2021*, **2021**, Bordeaux (FR)



## Liste des sigles et abréviations

Ac- : Acétyl-

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFM : *Atomic force microscopy* (Microscopie à force atomique)

$\alpha$ MEM : *Minimum essential medium Eagle – Alpha modifications*

ARN : Acide ribonucléique

ATP : *Adenosine triphosphate*

ATR : *Attenuated total reflectance* (Réflectance totale atténuée)

Bhoc- : Benzhydryloxy-carbonylamino-

bNPCs : *Bovine nucleus pulposus cells* (Cellules de nucleus pulposus (disque intervertébral) bovins)

Boc- : *Tert*-butoxycarbonyl-

Cbz- : Carboxybenzyl-

CCG : Concentration critique de gélification

CD : *Circular dichroism* (Dichroïsme circulaire)

CSI : *NMR chemical shift index* »

C-term : Position C-terminale

COSY : *COrrrelation SpectroscopY*

cryo-SEM : *Cryogenic scanning electron microscopy* (Microscopie électronique à balayage cryogénique (cryo-MEB))

cryo-TEM : *Cryogenic transmission electron microscopy* (Microscopie électronique en transmission cryogénique (cryo-MET))

DABCO- : 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octanyl-

DBS : 1,3:2,4-dibenzylidène-D-sorbitol

dH<sub>2</sub>O : *distilled water* (Eau distillée)

ddH<sub>2</sub>O : *double-distilled water* (Eau doublement distillée)

DIBAC- : Dibenzoazacyclooctynyl-

DIPEA : *N,N*-diisopropyléthylamine



DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMF : *N,N*-diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DNase : Désoxyribonucléase

ECM : *Extra-cellular matrix* (Matrice extra-cellulaire)

eq. : Equivalents

ESI : *ElectroSpray Ionization* (Ionisation par électrospray)

Fmoc- : Fluorénylméthoxycarbonyl-

HATU : Hexafluorophosphate de 3-oxyde de 1-[Bis(diméthylamino)méthylène]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium

HBTU : Hexafluorophosphate de 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium

HFIP : Hexafluoroisopropanol

hMSCs : *Human Mesenchymal Stem Cells* (Cellules mésenchymateuses humaines)

HRMS : *High resolution mass spectrometry* (Spectrométrie de masse haute résolution)

HPLC : *High performance liquid chromatography* (Chromatographie en phase liquide à haute performance)

IRTF : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

LC-MS : *Liquid chromatography - mass spectrometry* (Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse)

LNA : *Locked nucleic acids* (Acide nucléique bloqué)

MALDI : *Matrix-assisted laser desorption/ionization* (Désorption-ionisation laser assistée par matrice)

MRE : *Mean residual ellipticity* (Ellipticité moyenne par résidu)

MS : *Mass spectrometry* (Spectrométrie de masse)

MTS : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5(3-carboxyméthonyphénol)-2-(4-sulfophényl)-2*H*-tétrazolium

NADH/NAD<sup>+</sup> : Nicotinamide adénine dinucléotide

n.d. : Non déterminé

NOE : *Nuclear Overhauser Effect*

NOESY : *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*

NMM : *N*-méthylmorpholine

NMRD : *Nuclear magnetic relaxation dispersion* (Relaxation de résonance magnétique nucléaire)

N-term : Position N-terminale

O<sup>t</sup>Bu- : *tert*-butoxycarbonyl- = Boc-

PBS : *Phosphate buffer saline* (Tampon phosphate salin)

PEG : Polyéthylène glycol

PNA : *Peptide nucleic acid* (Acide nucléique peptidique)

PMO : *Phosphorodiamidate morpholino oligomer* (Oligomère morpholino)

PMT : *Photomultiplier tension* (Tension du photomultiplicateur)

PyBop : Hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxytrypyrrolidinophosphonium

rBMSCs : *Rabbit bone mesenchymal stem cells* (Cellules osseuses mésenchymateuses de lapin)

REES : *Red-edge excitation shift*

ref. : Références

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROESY : *Rotation frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*

SANS : *Small-angle neutron scattering* (Diffusion de neutrons aux petits angles)

SAXS : *Small-angle x-ray scattering* (Diffusion des rayons X aux petits angles)

SEM : *Scanning electron microscopy* (Microscopie électronique à balayage (MEB))

SPPS : *Solid phase peptide synthesis* (Synthèse peptidique sur support solide)

<sup>t</sup>Bu- ou *t*-Bu- : *tert*-butyl-

TEM : *Transmission electron microscopy* (Microscopie électronique en transmission (MET))

TFA : *Trifluoroacetic acid* (Acide trifluoroacétique)

ThT : Thioflavine T

TIPS : Triisopropylsilane

TOCSY : *TOTally Correlated Spectroscopy*

tpy- : terpyridinyl

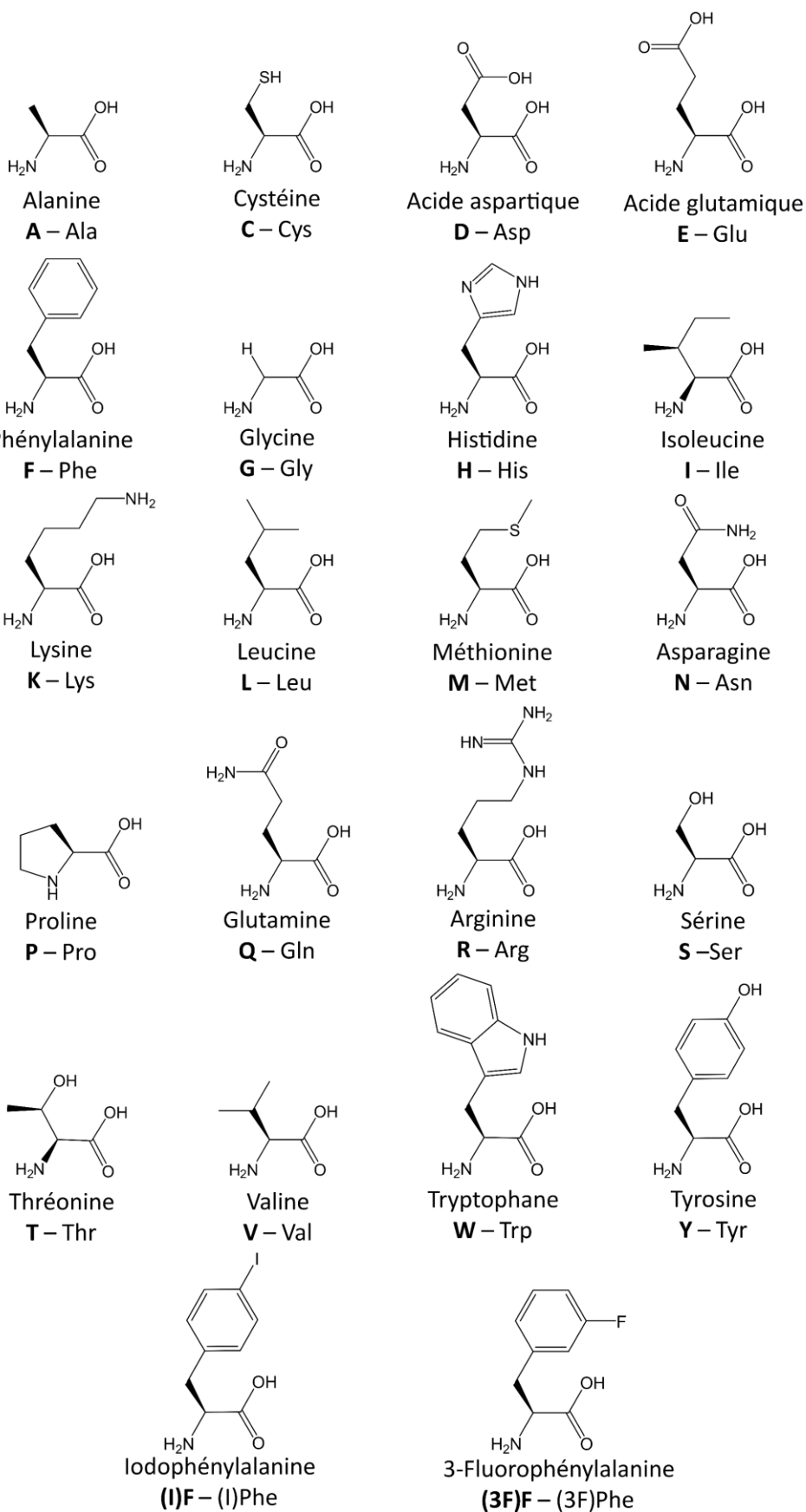
u.a. : Unités arbitraires

UV : Ultra-violet

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



## Table des Acides Aminés





**HYDROGELS SUPRAMOLÉCULAIRES MONO- ET  
MULTI-COMPOSÉS FORMES D'HYBRIDES  
PEPTIDES/ACIDES NUCLÉIQUES : SYNTHÈSE,  
CARACTÉRISATION ET ANALYSE MULTI-ÉCHELLE**



# Introduction générale

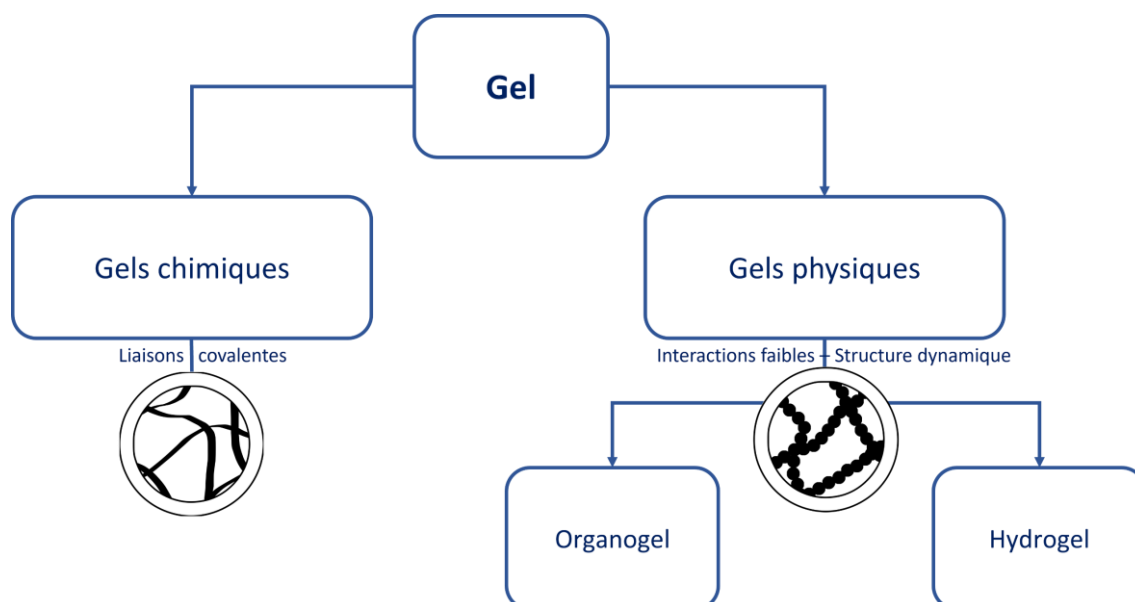
## *Contexte de ce travail de thèse*

A la frontière entre matériaux solides et liquides, les gels présentent des caractéristiques hybrides qui leur assurent une place prépondérante parmi les matériaux mous (« *soft materials* », en anglais) qui sont caractérisés par une phase condensée structurée sensible à de faibles perturbations énergétiques.<sup>1,2</sup> Ainsi, le matériau gel est décrit comme un état non fluide de la matière, au comportement solide dans un temps d'observation donné, et généralement défini par ses propriétés mécaniques de solide viscoélastique.<sup>3-5</sup> D'un point de vue plus structurel, les gels sont formés par l'extension tridimensionnelle d'un réseau colloïdal ou polymère d'unités de gélifiants dans un solvant.<sup>6,7</sup> Souvent, la proportion massique entre le gélifiant et ce solvant est faible (inférieure à 15 % en masse et pouvant descendre jusqu'à 0.03 % pour les super-gélifiants)<sup>8-10</sup> ce qui donne à ces matériaux un atout certain à l'heure où l'économie d'atomes, un des principes fondamentaux de la chimie verte, se trouve au cœur de nombreuses stratégies de recherche et développement.<sup>11</sup> La nature propose un certain nombre de molécules gélifiantes (gélatine,<sup>12,13</sup> fibrine de soie,<sup>14</sup> lécithine,<sup>15</sup> polysaccharides<sup>13</sup>), mais les gélifiants synthétiques permettent de former des matériaux adaptés à de nombreuses applications. En effet, les gels sont omniprésents dans la vie quotidienne, du domaine des cosmétiques à l'agroalimentaire,<sup>16,17</sup> en passant par les matériaux<sup>18,19</sup> et les applications biomédicales.<sup>20-24</sup>

Si les gels polymères (ou gels chimiques) sont constitués d'un réseau tridimensionnel formé de liaisons covalentes, les gels supramoléculaires (appelés également gels physiques) sont eux soutenus par des interactions faibles, dont les liaisons hydrogène, les interactions électrostatiques ou hydrophobes, les coordinations métal-ligand ou encore les interactions  $\pi$ - $\pi$  (Figure O-1).<sup>25,26</sup> Ces forces non-covalentes mais directives,<sup>4</sup> permettent aux molécules gélifiantes de s'auto-assembler et ainsi de créer des assemblages supramoléculaires formant des nano-objets principalement unidimensionnels (fibres, bandes, rubans ou tubules) dont les enchevêtrements conduisent à la formation du réseau tridimensionnel capable de retenir le solvant.<sup>5</sup> Cet assemblage reste dynamique, avec des mouvements et transitions moléculaires qui se font à des vitesses significativement élevées vis-à-vis du temps d'observation, ce qui



confère au matériau une certaine versatilité,<sup>27-32</sup> offrant ainsi aux gels supramoléculaires un avenir prometteur dans le domaine des matériaux intelligents (« *smart materials* », en anglais).<sup>33-37</sup> Ces gels sont par conséquent appliqués à la production de nanomatériaux innovants, de capteurs,<sup>38</sup> à la conception de systèmes électroniques moléculaires<sup>39</sup> à la catalyse<sup>40,41</sup> ou encore au traitement des eaux.<sup>30,42,43</sup>



**Figure O-1.** Classification des gels se distinguant par la nature de leurs réseaux et de leurs solvants. Les inserts circulaires schématisent la structure du réseau d'un gel chimique et d'un gel physique.

Les gels supramoléculaires sont également fortement plébiscités dans le domaine biomédical (ingénierie tissulaire, soins médicaux, délivrance de médicaments,<sup>39,44</sup> reconstruction osseuse,<sup>45</sup> formulation de vaccins,<sup>44</sup> etc...) mais cela implique que leurs constituants soient impérativement non toxiques, non immunogènes, en d'autres termes : biocompatibles. Le choix du solvant est alors crucial pour répondre à ces attentes, ce dernier représentant généralement plus de 98 % de la masse des gels.<sup>4,30</sup> Ce solvant peut être organique (dérivé de n-alcanes, toluène, chloroforme, dichlorométhane ou encore DMSO),<sup>9,10,46</sup> les gels sont alors appelés « organogels ».<sup>47</sup> En revanche, bien que certains organogels soient proposés dans le cadre d'applications au vivant,<sup>8,48</sup> les hydrogels,<sup>49,50</sup> dont le solvant est une solution aqueuse ou un tampon, leur sont souvent préférés.<sup>51-54</sup> En effet, leurs propriétés mécaniques et leur haute teneur en eau les rendent similaires aux milieux biologiques (et notamment à la matrice extracellulaire, « *extracellular matrix* » en anglais, ECM).<sup>55-57</sup> En particulier, les hydrogels supramoléculaires constituent une catégorie non négligeable parmi les matériaux biocompatibles: ils sont reportés comme chemo- et bio-

capteurs,<sup>58-60</sup> transporteurs de médicaments (*in vitro* et *in vivo*)<sup>56,61-63</sup> ou de sondes pour l'imagerie médicale,<sup>58,64,65</sup> support d'encapsulation et de relargage contrôlé de médicaments,<sup>23,66,67</sup> lutte contre les agents infectieux,<sup>68-70</sup> matrices d'ingénierie tissulaire,<sup>71</sup> ou encore comme promoteurs de régénération cellulaire.<sup>56</sup>

Le choix et le design du motif gélifiant est également un élément crucial dans la formulation d'hydrogels supramoléculaires. De nombreuses molécules sont de potentiels gélifiants de milieux aqueux et proviennent de classes variées, allant des molécules inorganiques (ligands carboxylés, aminés, phosphatés ou thiolés associés à des métaux tels le zinc, l'argent, le cuivre, le palladium ou encore le gadolinium) à organiques (dérivés de pyridine, d'urées, polyhydroxylés, aliphatiques rigides, polyaromatiques, molécules amphiphiles simples ou bola-amphiphiles)<sup>49,72</sup> en passant par des systèmes hybrides organiques/inorganiques.<sup>73-76</sup> Ces systèmes plus ou moins complexes présentent pour la majorité une structure amphiphile qui leur permet, une fois auto-assemblés, de former une phase pseudo-soluble métastable qui n'est ni entièrement soluble dans l'eau, ni précipitée ou cristallisée.<sup>8,10,35,49</sup>

Aussi, si l'objectif est de former des hydrogels supramoléculaires à visée biomédicale, le choix va généralement se porter sur des dérivés de biomolécules, biocompatibles, à l'instar des sucres,<sup>26,58,77,78</sup> des acides nucléiques (comportant des bases nucléiques),<sup>48,58,79,80</sup> ou des peptides.<sup>26,81-84</sup> En particulier, ces derniers présentent de nombreux avantages puisqu'ils sont généralement biocompatibles et facilement métabolisables, biodégradables et synthétisables avec une grande pureté et une bonne reproductibilité.<sup>57,82,83</sup>

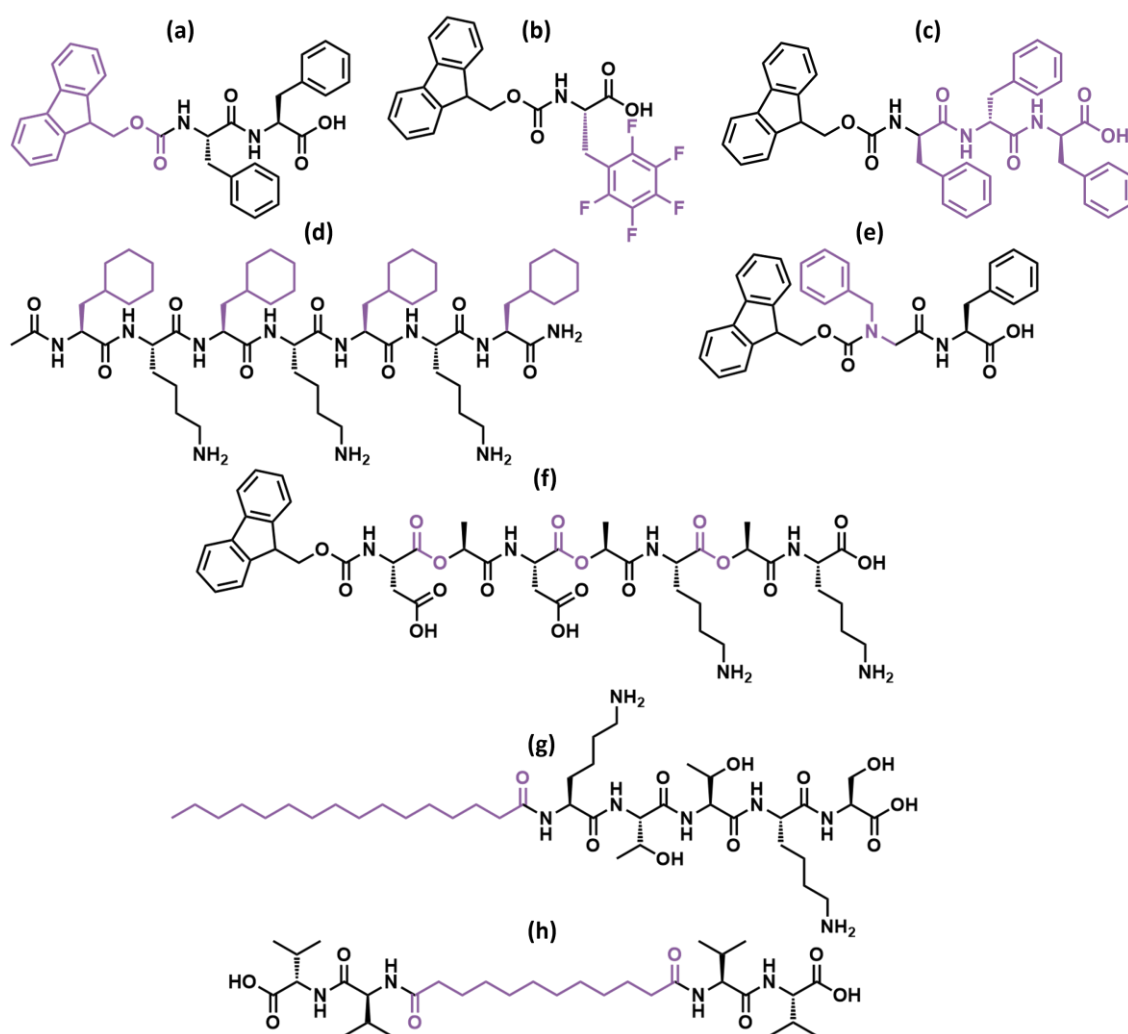
De nombreux peptides de séquences variées ont ainsi révélé une propension à former des gels supramoléculaires en milieu aqueux, et l'intérêt de certains hydrogels supramoléculaires peptidiques a été démontré dans le domaine biomédical<sup>21,85-88</sup> (régénération tissulaire,<sup>89-92</sup> formulation d'ECM de synthèse,<sup>57,93-96</sup> délivrance d'agents thérapeutiques,<sup>83,88,97-102</sup> détection d'analytes,<sup>103,104</sup> etc...) mais aussi en nanotechnologie (matrice de nanomatériaux et nanoparticules, nanoélectronique).<sup>83,103-105</sup> Certains sont même déjà commercialisés en tant que milieu de culture cellulaire (Hydromatrix<sup>TM</sup>, Puramatrix<sup>®</sup>, Peptigel, PGmatrix<sup>TM</sup> et Biogelx<sup>TM</sup>) et matrice biomédicale dentaire (Curolux<sup>®</sup>),<sup>95,106,107</sup> ouvrant la voie à l'utilisation de tels matériaux dans la vie quotidienne. Plus de détails sur les peptides hydrogélifiants sont proposés Partie I.1 (Chapitre I).

La recherche concernant de nouvelles structures dérivées des peptides s'est intensifiée au cours des vingt dernières années avec pour objectif d'élargir le champ d'application des hydrogels peptidiques mais également d'obtenir des gels aux propriétés parfaitement contrôlées. A ces fins, diverses stratégies ont été suivies<sup>106</sup> :

- Développement de pseudopeptides et peptidomimétiques dont le squelette peptidique est modifié (acides  $\beta$ -aminés, N-acides aminés, liaisons aza, liaisons ester, etc..., voir (e) et (f) Figure O-2).<sup>108-112</sup> Par exemple, les depsipeptides sont une classe de pseudopeptides dont les fonctions amides sont remplacées par des esters, conférant à ces composés une facilité d'hydrolyse et des propriétés d'assemblages différentes.<sup>113</sup>
- Utilisation d'acides aminés non naturels (acides  $\alpha$ -aminés de série D,<sup>67,114</sup> acides aminés non canoniques tels que la cyclohexylalanine,<sup>115</sup> l'ornithine,<sup>116</sup> les acides aminés halogénés,<sup>115,117-119</sup> etc... voir (b), (c) et (d), Figure O-2).
- Greffage de groupements aromatiques, en N-terminal notamment (Fmoc, Nap, pyrène, carbobenzène, voir (a), Figure O-2).<sup>83,108,120-124</sup>
- Greffage de chaînes aliphatiques : formation de peptides amphiphiles ou de bola-amphiphiles. Les peptides amphiphiles possèdent une « tête » polaire peptidique et une chaîne alcane tandis que les bola-amphiphiles présentent deux « têtes » reliées par la chaîne alcane (voir (g) et (h), Figure O-2). Leur design est calqué sur celui des surfactants induisant un comportement d'assemblage qui leur est similaire, dépendant de l'équilibre entre la tête hydrophile et la queue hydrophobe.<sup>26,82,125,126</sup> Certains peptides amphiphiles capables de former des hydrogels ont montré leur intérêt en cosmétiques,<sup>127</sup> comme par exemple, le composé C<sub>16</sub>-KTTKS (g, Figure O-2) commercialisé sous le nom Matrixyl<sup>TM</sup>.<sup>104,128-130</sup>
- Greffage d'une autre biomolécule pour former des composés hybrides, notamment hybrides peptides/sucres,<sup>131-135</sup> et hybrides acides nucléiques/peptides (nommés également nucléopeptides).<sup>84,136-138</sup>

Parmi ces possibilités, les nucléopeptides ont particulièrement attiré notre attention. En effet, déjà au cœur d'applications biologiques (biologie moléculaire, biotechnologies,<sup>136</sup> biomatériaux,<sup>84</sup> catalyse biochimique<sup>137,139</sup>), ces molécules hybrides peptides/acides nucléiques permettent de combiner les caractéristiques de deux grandes familles de biomolécules pour former des hydrogels aux propriétés nouvelles. Si, comme présenté plus

haut, l'intérêt des peptides dans ce but n'est plus à démontrer, leur association avec les acides nucléique se justifie par le fait que ces derniers, en plus d'être biocompatibles,<sup>140</sup> sont naturellement capables de former des assemblages supramoléculaires complexes (appariements de Hoogsteen et Watson-Crick, *i*-motif, G-quadruplexes..., discutés Chapitre I),<sup>141-146</sup> et possèdent donc un fort potentiel dans le cadre d'assemblages supramoléculaires. Les principales avancées en termes de nucléopeptides et, en particulier, d'hydrogels nucléopeptidiques supramoléculaires sont rappelées Chapitre I (Partie I.2.f) de ce manuscrit.



**Figure O-2.** Exemple de structures chimiques de composés gélifiants dérivés de peptides avec ajout d'un groupement aromatique (a),<sup>122</sup> utilisation d'acides aminés non canoniques (halogénés (b),<sup>117</sup> série D (c),<sup>114</sup> cyclohexylalanine (d)),<sup>115</sup> modification du squelette peptidique (N-acides aminés (e),<sup>109</sup> depsipeptide (f),<sup>113</sup> peptides amphiphiles (g)<sup>128</sup> ou bola-amphiphile (h).<sup>147</sup>

## *Présentation des travaux de recherche*

Une approche originale que nous proposons dans le cadre de cette thèse vise donc à étudier de nouvelles molécules hybrides nucléopeptidiques dans le cadre de la formation d'hydrogels. L'objectif général est ainsi de faire émerger de nouvelles propriétés d'hydrogels *via* l'utilisation de composés hybrides peptides/acides nucléiques inédits, capables de former des structures supramoléculaires originales.

Le chapitre II de ce manuscrit présente ainsi notre démarche pour la conception et la synthèse de quatre nucléopeptides (constitués d'un heptapeptide modifié par l'incorporation d'un acide nucléique sous forme de PNA, PNA(X)-EFEFKFK avec X = base nucléique). Nous avons montré leur capacité à gélifier un tampon biologique à pH physiologique, et présentons l'analyse des hydrogels formés par différentes techniques de caractérisation (rhéologie, relaxométrie RMN, TEM, spectroscopie IRTF, dichroïsme circulaire, spectrofluorimétrie). Notre étude, dont les résultats ont été publiés en 2020,<sup>148</sup> met en évidence l'impact de la partie acide nucléique selon une approche multi-échelle afin de mieux comprendre le lien entre la structure moléculaire et les propriétés résultantes du matériau. En effet, la compréhension du lien structure/propriétés des hydrogels supramoléculaires reste une problématique d'actualité,<sup>58,149–153</sup> et nous avons souhaité, par ces travaux de thèses, y apporter une contribution.

Le design raisonné de composés originaux permet de générer de nouveaux gélifiants et de nouveaux hydrogels supramoléculaires aux propriétés adaptées pour de nouvelles applications. Les propriétés physiques et physicochimiques de ces gels sont intimement liées à la structure moléculaire du gélifiant (voir Chapitre II).<sup>150,154,155</sup> Elles peuvent être modérément modulées en modifiant la concentration en composé et, pour les gels qui y sont sensibles (« *smart hydrogels* »), en faisant varier la température, le pH ou la force ionique, par exemple.<sup>36,53,83,156</sup> En revanche, dans des conditions où ces paramètres sont fixés (par exemple en milieu physiologique : température T = 37 °C, pH = 7.4), il devient difficile d'obtenir des gels aux propriétés parfaitement adaptées sans devoir synthétiser de nouveaux composés.

L'utilisation de systèmes multi-composés, c'est-à-dire comportant plusieurs constituants, est une approche qui a fait ses preuves dans de nombreux domaines des matériaux (polymères,<sup>157-159</sup> structures métaux/composés organiques,<sup>160</sup> alliages, matériaux composites,<sup>157</sup> etc...). Elle se développe de plus en plus dans le cadre de la formulation d'hydrogels supramoléculaires car elle ouvre de nouvelles possibilités de modulation des propriétés de ces gels, voire permet l'émergence de nouvelles propriétés.<sup>82,161-164</sup> Ainsi, contrairement aux gels mono-composés (formés d'un seul gélifiant et d'un solvant), ces hydrogels sont formulés à partir de deux (ou plus) composés qui s'impliquent dans le réseau de gélifiant (nous excluons donc ici les mélanges de solvant, l'ajout de sels ou d'ions métalliques et les molécules encapsulées) ce qui offre un nouveau paramètre de formulation : la proportion entre chaque composé. En effet, la variation du ratio permet d'influencer les propriétés de la structure supramoléculaire et de moduler finement – et donc de contrôler – les propriétés des hydrogels résultants.<sup>165-169</sup>

La manière dont les composés en présence interagissent est un point clé dans la compréhension du lien structure/propriété qui existe au sein de ces gels multi-composés, car différents modes d'assemblage peuvent émerger : un comportement narcissique ou du co-assemblage, pour ne citer que les principaux.<sup>105,164,170</sup> Aussi, notons que le mélange de deux composés incapables de former des hydrogels seuls en solution peut donner lieu à un gel, et inversement.<sup>167</sup> Ces différents aspects concernant les hydrogels supramoléculaires multi-composés sont discutés au Chapitre I (Partie I.3).

L'approche multi-composé est encore rare dans la recherche de nouveaux hydrogels supramoléculaires peptidiques alors qu'elle s'est avérée pertinente dans notre cas pour obtenir de nouveaux gels nucléopeptidiques aux propriétés intéressantes. Les composés hybrides peptides/acides nucléiques présentés au Chapitre II, ont été conçus de manière à former deux couples fondés sur la complémentarité des bases nucléiques : PNA(A)-EFEFKFK + PNA(T)-EFEFKFK (adénine + thymine) et PNA(C)-EFEFKFK + PNA(G)-EFEFKFK (cytosine + guanine). Ainsi, nous avons effectué ces mélanges, qui permettent l'obtention d'hydrogels multi-composés possédant certaines caractéristiques en commun avec leurs hydrogels « parents », mais voient également émerger des propriétés propres. Ces nouveaux hydrogels ont été caractérisés par plusieurs techniques d'analyse, apportant des informations de l'échelle macroscopique à l'échelle (supra)-moléculaire, permettant d'observer l'impact du

mélange de nucléopeptides à toutes les échelles. La comparaison avec d'autres hydrogels que nous avons formulés (gels mono-composés, gels multi-composés à différents ratios, gels témoins utilisant un composé ne comportant pas de base nucléique) nous a permis d'identifier les modalités d'interaction entre les composés mélangés et de mesurer l'effet de la complémentarité des bases nucléiques. Les résultats, déjà publiés pour certains en 2021<sup>171</sup> sont présentés au Chapitre III de ce manuscrit.

Fort des résultats obtenus et discutés Chapitres II et III, nous avons cherché à concevoir de nouveaux systèmes multi-composés, introduits dans ce manuscrit au Chapitre IV. En particulier, l'objectif a été de renforcer le caractère complémentaire des composés mélangés afin d'explorer de nouveaux comportements d'assemblage et faire émerger de nouvelles propriétés d'hydrogels.

Là où les composés PNA(X)-EFEFKFK comportaient un équilibre PNA/acides aminés de 1 : 7, nous avons conçu de nouvelles séquences nucléopeptidiques, relativement plus riches en PNA (3 : 7, 4 : 4, 1 : 4) afin de favoriser des structures guidées davantage par les acides nucléiques. Plusieurs approches ont en effet été examinées :

- L'allongement de la séquence PNA pour favoriser la reconnaissance entre nucléopeptides (structures PNA(GTG)-EFEFKFK et PNA(CAC)-EFEFKFK, Partie IV.2, Chapitre IV).
- L'utilisation de parties peptidiques non plus auto-complémentaires mais plutôt complémentaires deux à deux, avec des séquences PNA non plus complémentaires mais auto-complémentaires (Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub>, Partie IV.3, Chapitre IV).
- L'utilisation de parties peptidiques complémentaires deux à deux greffées de PNA complémentaires (composés Ac-PNA(X)-FKFK-NH<sub>2</sub> et Ac-PNA(Y)-FEFE-NH<sub>2</sub> (X = A ou G, Y = C ou T), Partie IV.4, Chapitre IV).

Le caractère complémentaire des composés mis en présence est également exacerbé, par l'utilisation des motifs peptidiques aux charges électrostatiques opposées (FEFE chargé négativement et FKFK chargé positivement), une approche déjà reportée dans la littérature.<sup>172-175</sup>

Cette étude, dont les travaux sont encore en cours actuellement, fait ressortir la complexité de concevoir des couples de nucléopeptides gélifiants et souligne la métastabilité de l'état gel : les composés complémentaires doivent présenter un équilibre entre leur affinité avec l'eau, leur affinité propre (propension à l'auto-assemblage) et l'affinité pour leur complémentaire (propension au co-assemblage).<sup>176</sup> Ainsi, les résultats de ces expériences mettent en évidence une synergie d'assemblage entre les nucléopeptides complémentaires pour former des hydrogels. Ces structures originales ouvrent des perspectives nouvelles dans la conception de systèmes multi-composés basés sur des hybrides peptides/acides nucléiques complémentaires.





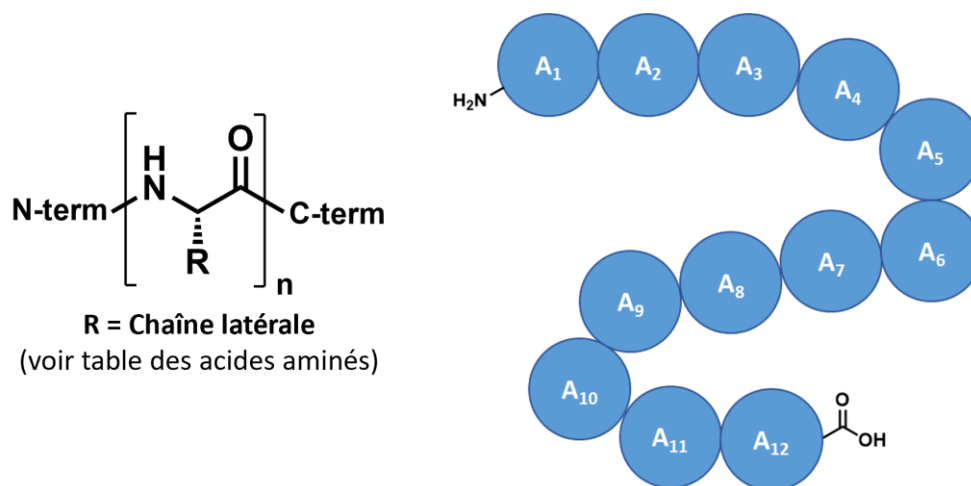
# **Chapitre I : Hydrogels supramoléculaires mono- et multi-composés formés d'hybrides peptides/acides nucléiques : état de l'art**

Comme présenté en introduction de ce manuscrit, la recherche de nouveaux composés bio-inspirés capables de former des hydrogels supramoléculaires dans des conditions compatibles avec le vivant est un sujet qui s'inscrit dans la continuité de nombreux travaux publiés. Ce premier chapitre a pour objectif de faire un état de l'art dans les trois domaines principaux abordés au cours de cette thèse, afin de relever les avancées et les enjeux de la recherche actuelle, et en présentant quelques exemples remarquables.

## **I.1 Hydrogels supramoléculaires peptidiques, design moléculaire et applications**

### **I.1.a Définition**

Les hydrogels supramoléculaires peptidiques sont des gels physiques dont le solvant est une solution ou un tampon aqueux et dont l'unité colloïdale gélifiante est un peptide. Plus courts que les protéines, les peptides sont, pour rappel, des chaînes d'acides aminés, (voir Table des acides aminés page XI) liés par des fonctions amides (liaisons peptidiques). Chaque acide aminé possède des propriétés qui lui sont propres, liées à sa chaîne latérale qui peut être polaire (sérine, thréonine, asparagine, glutamine) voire chargée (glutamate, aspartate, lysine, arginine, histidine), apolaire (alanine, valine, isoleucine, leucine, méthionine) ou encore aromatique (phénylalanine, tyrosine, tryptophane).<sup>177</sup> Ainsi, leur nature, leur nombre et leur ordre dans la séquence vont déterminer les propriétés des peptides. La capacité du peptide à se structurer, sa capacité d'interaction et, *in fine*, d'auto-assemblage supramoléculaire sont ainsi intrinsèquement liées à la séquence peptidique choisie.

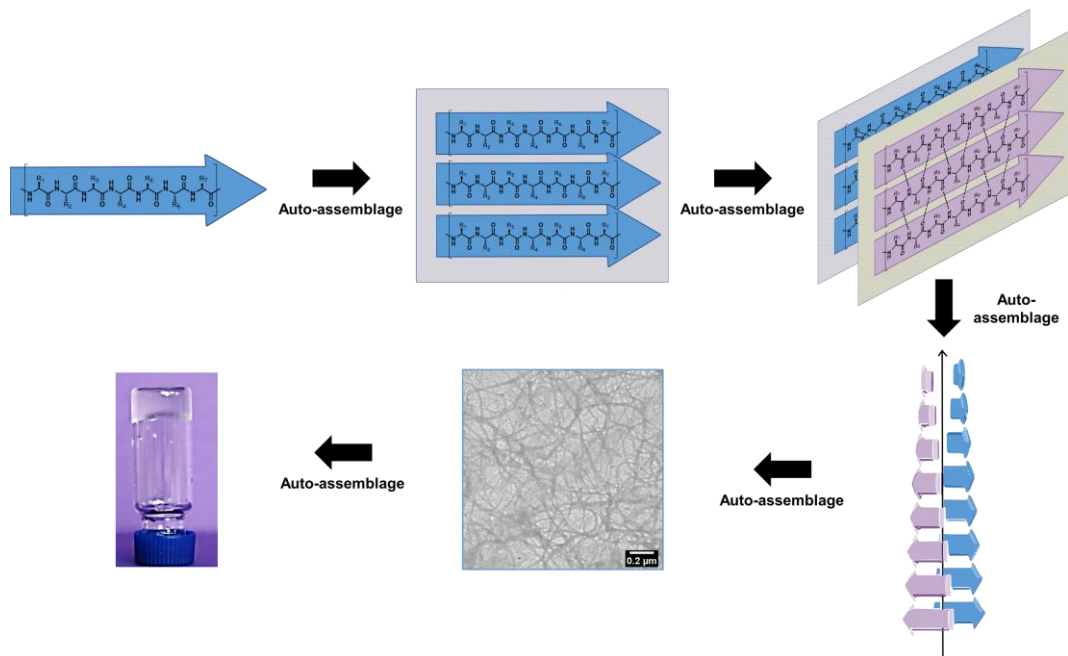


**Figure I-1.** Structure générale des peptides (gauche) et schéma d'un dodécapeptide linéaire (droite,  $A_i$  correspondant à l'acide aminé  $i$ ) sans modifications ni en position N-terminale ni en C-terminale.

En effet, par leur structure chimique, les peptides sont capables d'interagir par liaisons faibles : interactions électrostatiques (chaînes latérales, carboxyle C-terminal et amine N-terminale),  $\pi$ -stacking aromatique (chaînes latérales), interactions hydrophobes (chaînes latérales) et liaisons hydrogène (chaînes latérales et squelette peptidique).<sup>26,130</sup> Dans certains cas, ces interactions sont capables de diriger l'auto-assemblage ordonné des peptides pour former des nano-objets supramoléculaires, voire un réseau fibrillaire capable de retenir un solvant, donnant ainsi naissance à un hydrogel. Dans le but d'identifier les séquences donnant lieu à des peptides gélifiants, la recherche s'est beaucoup inspirée de systèmes naturels protéiques capables d'auto-assemblage (assemblages  $\beta$ -amyloïdes,<sup>178-180</sup> fibroïne, microtubules, myosine).<sup>13</sup> Ont également été déterminés certains prérequis concernant la structure primaire, comme la nécessité d'un équilibre entre groupements hydrophiles (assurant la solubilité) et hydrophobes (favorisant l'assemblage), par exemple.<sup>78,82,140</sup> Différentes structures peptidiques sont ainsi ressorties comme pouvant donner lieu à des hydrogels : les hélices  $\alpha$ ,<sup>54,84,181,182</sup> les systèmes superhélicoïdaux (« *coiled coil* », en anglais)<sup>53,57,182-185</sup> et les assemblages de type feuillets  $\beta$  (feuillets  $\beta$  ou épingles «  *$\beta$ -hairpins* »).<sup>54,83,181</sup> Ces derniers sont d'ailleurs les plus répandus pour former des hydrogels peptidiques.<sup>84</sup>

### I.1.b Peptides formant des assemblages de type feuillets $\beta$

Les assemblages de type feuillets  $\beta$ , similaires aux structures secondaires en feuillets  $\beta$  des protéines, consistent en l'association latérale de plusieurs peptides par liaisons hydrogène issues de leur squelette peptidique (grâce à la fonction amide capable d'être donneuse et accepteuse de liaisons hydrogène).<sup>83</sup> Les peptides s'assemblent ainsi de manière ordonnée et hiérarchique (Figure I-2) formant des bandes et des rubans, des fibrilles et des fibres (rassemblant plusieurs fibrilles) qui vont composer le réseau de l'hydrogel.<sup>161,186</sup> En s'inspirant notamment des  $\beta$ -amyloïdes impliquées dans la maladie d'Alzheimer,<sup>103,187</sup> les chercheurs ont identifié différents designs moléculaires prometteurs.<sup>178,180</sup> Ainsi, le motif diphénylalanine (FF) se retrouve dans la séquence de certains peptides parmi les plus simples capables de former des gels (Fmoc-FF, Nap-FF, Nap-GFFY, FEFFK, etc...)<sup>82,117,121</sup> où les groupements aromatiques sont essentiels dans le processus d'auto-assemblage et la stabilisation de la structure supramoléculaire. Notons que la modification en position N-terminale par un groupement aromatique (Fmoc, Nap, pyrène, Cbz) est fréquente car elle permet d'augmenter l'hydrophobie<sup>124</sup> et la capacité de  $\pi$ -stacking des peptides. Par conséquent, de nombreuses structures de ce type ont été reportées jusqu'à présent.<sup>83,108,130</sup>



**Figure I-2.** Représentation schématique de l'auto-assemblage d'un peptide pour former de manière hiérarchique feuillets, fibrilles et fibres constituant le réseau fibrillaire d'un hydrogel supramoléculaire.

Plutôt que sur le cœur aromatique, la famille de peptides  $P_{11}$  s'appuie sur des séquences riches en glutamine (Q) capables de former des liaisons hydrogène intermoléculaires. Par exemple,  $P_{11-1}$ ,  $P_{11-2}$  et  $P_{11-4}$ ,<sup>188,189</sup> dont les séquences sont décrites Tableau I-1, sont trois peptides capables de former des hydrogels. L'intérêt de  $P_{11-4}$  a même été démontré pour de l'ingénierie tissulaire,<sup>190</sup> donnant lieu à une commercialisation sous le nom Curolox®.<sup>191</sup> Il est intéressant de remarquer que ces composés présentent une symétrie dans leur séquence afin de favoriser les interactions intermoléculaires et le positionnement antiparallèle des molécules dans l'assemblage (par exemple, le glutamate (E) chargé négativement se retrouvant face à l'arginine (R) chargée positivement dans la famille  $P_{11}$ ). En effet, ce choix de séquence s'inscrit dans une démarche développée depuis une trentaine d'années environ, cherchant à diriger le mieux possible l'auto-assemblage par une rationalisation du design moléculaire. C'est dans ce contexte qu'ont été développés les peptides amphipatiques.

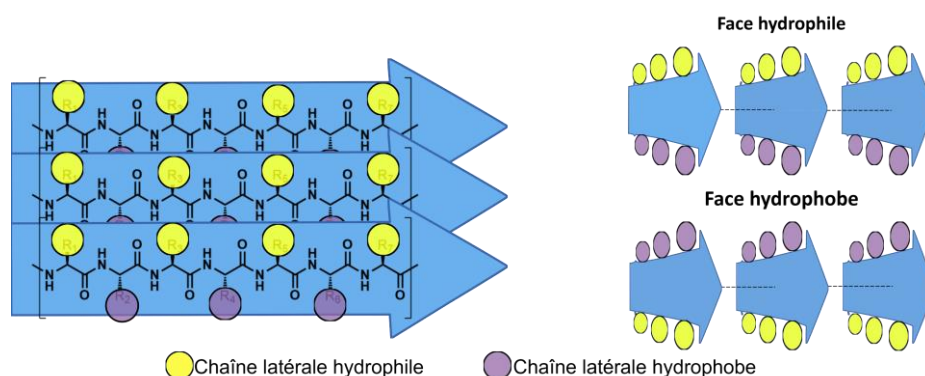
Peptide	Séquence	Référence
$P_{11-1}$	Ac-QQRQQQQEQQ-NH <sub>2</sub>	Aggeli <i>et al.</i> (2001) <sup>189</sup>
$P_{11-2}$	Ac-QQRFQWQFEQQ-NH <sub>2</sub>	Aggeli <i>et al.</i> (2003) <sup>116</sup>
$P_{11-4}$	Ac-QQRFEFWEFEQQ-NH <sub>2</sub>	Aggeli <i>et al.</i> (2003) <sup>116</sup>
MAX1	VKVKVKVKV <sup>D</sup> PPTKVVKVKVKV-NH <sub>2</sub>	Shneider <i>et al.</i> (2002) <sup>192</sup>
MAX8	VKVKVKVKV <sup>D</sup> PPTKVEVKVKV-NH <sub>2</sub>	Haines-Butterick <i>et al.</i> (2007) <sup>197,215</sup>
MAX118	<u>I</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>I</u> <sup>D</sup> PPTK <u>I</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>I</u> -NH <sub>2</sub>	Chen <i>et al.</i> (2014) <sup>201</sup>
RADA16/RAD16-II	Ac-RARADADARARADADA-NH <sub>2</sub>	Zhang <i>et al.</i> (1994) <sup>203,212</sup>
RAD16-I	Ac-RADARADARADA-NH <sub>2</sub>	Holmes <i>et al.</i> (2000) <sup>212</sup>
EAK16	Ac-AEAEAKAKAEAEAKAK-NH <sub>2</sub>	Zhang <i>et al.</i> (1993) <sup>202,203</sup>
FEK16	H <sub>2</sub> N-FEFEFKFEFEFEKFEK-COOH	Collier <i>et al.</i> (2001) <sup>216</sup>
KLD-12	Ac-KLDLKL <sup>D</sup> LKL <sup>D</sup> L -NH <sub>2</sub>	Kisiday <i>et al.</i> (2002) <sup>217</sup>
KFE12	H <sub>2</sub> N-FKFEFKFEFEKFE-COOH	Caplan <i>et al.</i> (2002) <sup>218</sup>
VEVK12	Ac-VEVKVEVKVEVK-NH <sub>2</sub>	Kumada <i>et al.</i> (2010) <sup>219</sup>
KFE8	Ac-FKFEFKFE-NH <sub>2</sub>	Caplan <i>et al.</i> (2002) <sup>218</sup>
EFK8	H <sub>2</sub> N-KFEFKFEF-COOH	Leon <i>et al.</i> (1998) <sup>155</sup>
FEFEFKFK	H <sub>2</sub> N-FEFEFKFK-COOH	Mohammed <i>et al.</i> (2007) <sup>220</sup>

**Tableau I-1.** Exemples de séquences peptidiques utilisées pour la formation d'hydrogels supramoléculaires. Pour  $P_{11-2}$  et  $P_{11-4}$ , les modifications par rapport à  $P_{11-4}$  sont soulignées. Pour MAX8 et MAX118, les modifications par rapport à MAX1 sont soulignées. Pour les autres peptides sont mis en évidence les groupements chargés positivement (en rouge) et négativement (en bleu) à pH neutre.

### I.1.c Peptides amphipathiques

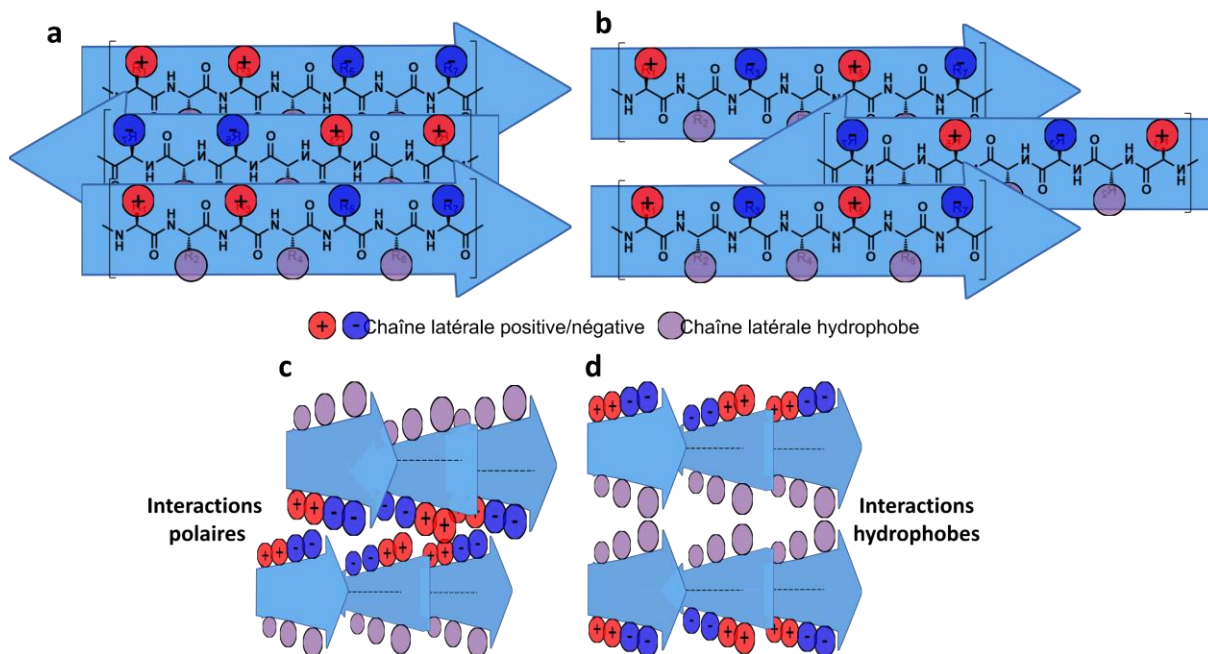
Les peptides amphipathiques sont une classe particulière de peptides dont la structure primaire alterne des acides aminés hydrophobes, aliphatiques (alanine, valine, isoleucine, leucine, méthionine) ou aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane), et des acides aminés hydrophiles polaires (tels que la sérine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine) voire chargés positivement (tels que l'arginine, l'histidine et la lysine) ou négativement (tels que l'aspartate et le glutamate) à pH physiologique, voir Table des acides aminés page XI). Cette alternance permet, en ce qui concerne la structure secondaire, de distinguer virtuellement une face hydrophobe et une face hydrophile distinctes, qui favorisent l'assemblage supramoléculaire en cloisonnant les interactions électrostatiques polaires des systèmes apolaires ou aromatiques. (Figure I-3) Le grand nombre de peptides amphipathiques reportés dans la littérature montre bien leur place centrale dans le domaine des hydrogels supramoléculaires peptidiques.<sup>81,86</sup>

Schneider *et al.* (2002)<sup>192</sup> ont ainsi reporté le peptide MAX1, un peptide formant des épingles  $\beta$  capables de s'associer pour former des hydrogels aux propriétés intéressantes (modules viscoélastiques significatifs, comportement thixotrope, sensibilité au pH et à la force ionique).<sup>193</sup> Ces derniers paraissent prometteurs dans le cadre de la culture cellulaire (cytocompatibilité et promotion de la prolifération de fibroblastes de rats),<sup>194</sup> la délivrance d'agents thérapeutiques,<sup>195</sup> ou la lutte contre les pathogènes,<sup>196</sup> par exemple. D'autres peptides, dérivés de MAX1, ont également été développés par la suite pour des applications biologiques : MAX8 dont les propriétés mécaniques sont intéressantes dans le cadre de la thérapie cellulaire,<sup>197</sup> l'injection de médicament<sup>198,199</sup> ou de facteurs de croissance,<sup>200</sup> ou encore MAX118 dans le cadre de l'encapsulation de cellules.<sup>201</sup>



**Figure I-3.** Représentation schématique de l'assemblage en feuillet  $\beta$  de peptides amphipathiques.

Accentuant le caractère auto-complémentaire du design, Zhang *et al.* (1993)<sup>202,203</sup> ont proposé les composés EAK16 et RADA16, dont les séquences sont décrites Tableau I-1. Il s'agit de peptides amphipathiques ioniques conçus de manière à ce que les charges opposées de leurs acides aminés polaires se trouvent spatialement en vis-à-vis lors de la formation d'un assemblage de type feuillet  $\beta$  antiparallèles (Figure I-4).<sup>83</sup> Ainsi, lors de l'assemblage, les acides aminés chargés positivement (glutamates pour EAK16 et aspartates pour RADA16) se placent en interaction électrostatique avec les acides aminés chargés négativement (lysines pour EAK16 et arginines pour RADA16), renforçant la structure supramoléculaire déjà formée par les liaisons hydrogène intermoléculaires. Selon les auteurs de l'étude, la stabilité des assemblages de type feuillet  $\beta$  formés par des peptides amphipathiques ioniques auto-complémentaires est également assurée par des interactions hydrophobes intermoléculaires (présence d'alanines), et l'alignement décalé des assemblages comme présenté en Figure I-4.<sup>204</sup> EAK16 et RADA16 sont ainsi capables de s'auto-assembler et de former des hydrogels en milieu biocompatible, en présence de sels et à différents pH.<sup>203</sup> Par conséquent, ces gels ont été proposés pour développer des biomatériaux,<sup>205,206</sup> ou comme promoteurs de régénération tissulaire,<sup>207</sup> d'hémostase<sup>208</sup> ou d'angiogenèse.<sup>209</sup> Ces hydrogels ont même été démontrés capables de supporter l'attachement de différents types cellulaires (fibroblastes de souris, cellules cancéreuses humaines, kératinocytes humains, etc...)<sup>204</sup>. Des dérivés de RADA16 ont été développés par la suite, portant des motifs peptidiques capable de promouvoir certaines réponses biologiques.<sup>91,92,205,210,211</sup> Par exemple, le peptide RAD16-I qui a été développé par le même groupe de recherche que RADA16,<sup>212</sup> possède une séquence similaire mais avec une alternance de charges différente (Tableau I-1) et présente notamment le motif RAD imitant le motif d'adhésion cellulaire RGD.<sup>213</sup> L'hydrogel formé par RADA16-I s'est avéré un bon support de culture cellulaire (cellules neuronales de rats et de souris, neuroblastome humain)<sup>212</sup> et a été par la suite commercialisé comme ECM de synthèse (Puramatrix®).<sup>214</sup>



**Figure I-4.** Représentation schématique de l'assemblage en feuillets  $\beta$  antiparallèles de peptides amphipathiques ioniques auto-complémentaires de motifs +++- (a) et +-+- (b). Mise en évidence de l'assemblage entre fibrilles, selon un axe perpendiculaire aux liaisons hydrogène du feuillet (c et d).

Le remplacement des alanines de la séquence peptidique de EAK16 par des phénylalanines donne lieu au peptide FEK16, étudié pour la première fois par *Collier et al.* (2001).<sup>216</sup> La présence de cycles aromatiques apportés par les phénylalanines ajoute des possibilités d'interactions supplémentaires de  $\pi$ -stacking à la structure, la renforçant. Il a été montré par la suite que les peptides amphipathiques présentant des chaînes latérales aromatiques plutôt qu'aliphatiques ont tendance à former des hydrogels aux propriétés viscoélastiques effectivement supérieures.<sup>115</sup> Aussi, les chercheurs ont étudié l'impact de la longueur de la séquence peptidique, afin notamment de déterminer le nombre d'alternances d'acides aminés hydrophobes/hydrophiles nécessaire pour voir émerger une structure gélifiante.<sup>81,221,222</sup> Les résultats ont mis en évidence que des peptides amphipathiques ioniques plus courts constitués de 12 ou 8 acides aminés étaient capables de gélifier, alors qu'en raccourcissant davantage la chaîne à 4 acides aminés, les propriétés de gélification étaient perdues. Ces résultats sont en parfaite concordance avec certains peptides déjà reportés : des dodécapeptides (KLD12,<sup>217</sup> KFE12,<sup>223</sup> VEVK12)<sup>219</sup> et des octapeptides (EFK8,<sup>155</sup> KFE8)<sup>218,224</sup> dont les séquences sont explicitées Tableau I-1. Bien que les assemblages supramoléculaires des peptides courts soient moins stables, ces peptides ont l'avantage d'être moins coûteux, plus faciles à synthétiser, à purifier, et à caractériser chimiquement.<sup>130,155</sup>



C'est dans ce contexte que l'octapeptide FEFEFKFK a été développé.<sup>220</sup> Il s'agit d'un peptide amphipathique ionique auto-complémentaire capable de former des hydrogels dans différentes conditions de formulation (comme discuté plus en détail Chapitre II, Partie II.2.a). Brièvement, des gels de FEFEFKFK ont été caractérisés par différentes techniques (rhéologie, microscopie, spectroscopie, etc...)<sup>166,225-227</sup> et son intérêt dans le cadre d'applications biologiques a été démontré de multiples fois : pour la délivrance de médicaments,<sup>228</sup> la culture cellulaire (chondrocytes, ostéoblastes, fibroblastes, etc...)<sup>229-234</sup> et l'ingénierie tissulaire<sup>230,231,234</sup> par exemple. Ce peptide est encore au cœur de la recherche actuelle dans le domaine puisqu'il a encore été utilisé récemment pour l'encapsulation de cellules progénitrices cardiaques en thérapie cellulaire<sup>235</sup> et pour la bio-impression de tissus osseux (reconstruction crânio-maxillo-faciale).<sup>236</sup>

#### **I.1.d Conclusion**

Les peptides et notamment les peptides amphipathiques ioniques auto-complémentaires font donc partie des composés les plus prometteurs dans le cadre de la formulation d'hydrogels appliqués aux domaines biomédicaux. Les peptides sont en effet faciles à produire, biodégradables car facilement métabolisés, peu toxiques, généralement non-immunogènes et biocompatibles.<sup>57,82,83</sup> De plus, leurs hydrogels ont divers avantages : ils sont stables physiquement, leurs propriétés sont modulables par une rationalisation du design moléculaire, leurs caractéristiques physiques et physicochimiques sont proches de celles des milieux biologiques (matériau viscoélastique, forte teneur en eau, nanostructure fibrillaire) et certains sont capables de se reformer après déstructuration.<sup>57,82,87</sup> Ces hydrogels sont par conséquent proposés dans le cadre de nombreuses applications : encapsulation de cellules et de molécules d'intérêt pour injection ou libération contrôlée, culture cellulaire, ingénierie tissulaire, etc...<sup>75,82,83,86,237</sup>

Néanmoins, si les possibilités de séquences peptidiques à partir des vingt acides aminés protéinogènes sont virtuellement infinies, l'optimisation des séquences amphipathiques ioniques auto-complémentaires atteint ses limites.<sup>82</sup> Afin d'augmenter les possibilités de design moléculaire, les chercheurs ont proposé différentes modifications des structures peptidiques afin de moduler et d'améliorer certaines propriétés des peptides hydrogélifiants. Diverses stratégies ont été abordées précédemment (voir Introduction générale) comme l'ajout de groupements aromatiques (voir aussi Partie I.1.b) ou de chaînes aliphatiques, le

remplacement du squelette peptidique classique pour former des pseudopeptides ou des peptidomimétiques, l'utilisation d'acides aminés non naturels ou encore la formation de molécules hybrides.

## **I.2 Concevoir des hybrides peptides/acides nucléiques, structures, et applications**

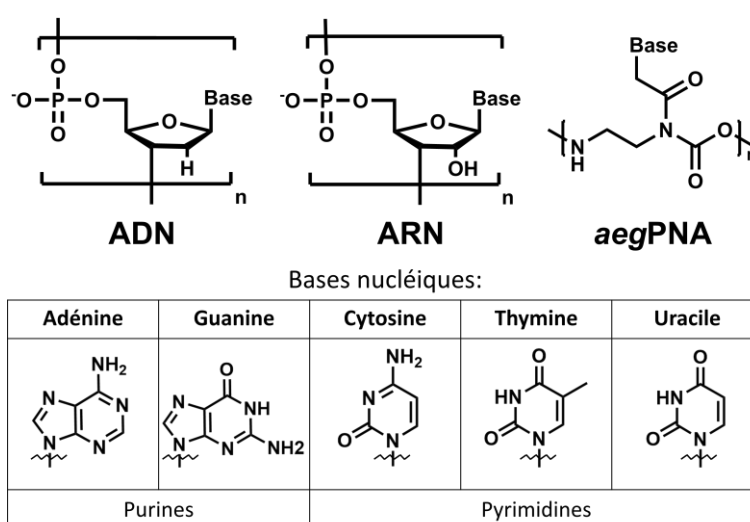
La recherche de nouveaux composés gélifiants biocompatibles occupe une place centrale dans la conception d'hydrogels supramoléculaires innovants, notamment pour le domaine biomédical. Ainsi, de nombreux peptides capables de gélifier les tampons aqueux ont été reportés au cours des trente dernières années (voir ci-avant, Partie I.1), faisant ressortir certaines caractéristiques importantes du design moléculaire (équilibre hydrophile/hydrophobe, interactions stabilisantes par les chaînes latérales, etc...). La compréhension grandissante de la relation structure moléculaire/propriétés des gels permet de plus en plus aux chercheurs de viser certaines applications par design rationnel de la molécule gélifiante.<sup>44,75,81,82,130,181</sup> C'est avec pour objectif d'élargir les possibilités de design moléculaire, et par conséquent le champ d'application des hydrogels supramoléculaires, que de nombreuses équipes de recherche se sont intéressées à la synthèse de peptides modifiés et, en particulier, de molécules hybrides entre peptides et autres molécules.

Ces hybrides, associant un squelette peptidique et la structure d'une autre classe de molécule, sont particulièrement prometteurs pour faire émerger de nouvelles propriétés mécaniques, physicochimiques et biologiques. Néanmoins, afin de conserver le caractère bio-inspiré, biocompatible et biodégradable des hydrogels peptidiques supramoléculaires,<sup>140</sup> il est intéressant de concevoir des hybrides de peptides avec d'autres biomolécules (peptides/sucres, acides nucléiques/sucres ou peptides/acides nucléiques/sucres, notamment).<sup>131,238,239</sup> Si certains hybrides peptides/sucres ont déjà été reportés,<sup>131-135</sup> les hybrides peptides/acides nucléiques font montre d'un grand potentiel pour la formulation d'hydrogels supramoléculaires aux propriétés nouvelles.

### **I.2.a Définitions : des acides nucléiques aux nucléopeptides**

Les hybrides peptides/acides nucléiques, nommés également nucléopeptides, sont constitués d'une partie peptidique liée par liaison covalente à une partie comportant une ou plusieurs bases nucléiques. Ces bases nucléiques, ou nucléobases, sont des structures aromatiques présentes dans l'ADN, les ARN et d'autres biomolécules (ATP, coenzyme A, NADH), et sont au cœur de nombreux processus biologiques essentiels (support, transcription

et traduction de l'information génétique, métabolisme...). Les nucléobases principales sont les deux purines adénine (A) et guanine (G), et les trois pyrimidines, cytosine (C), thymine (T) et uracile (U) (Figure I-5), bien qu'il existe d'autres bases naturelles (pseudo-uracile, inosine, hypoxanthine, 5-méthylcytosine, etc...). Des nucléobases synthétiques, fonctionnalisées, ont également été conçues pour leur conférer de nouvelles propriétés : fluorescence,<sup>240,241</sup> nouvelle réactivité,<sup>242</sup> coordination métallique,<sup>243</sup> bio-conjugaison.<sup>244</sup> Aussi, les différentes propriétés des bases nucléiques, notamment en termes d'interactions, de structuration et d'auto-assemblages, font de cette classe de molécules un choix idéal pour concevoir des systèmes supramoléculaires.



**Figure I-5.** Structures génériques des acides nucléiques aegPNA, ADN et ARN ainsi que les structures moléculaires des cinq nucléobases naturelles.

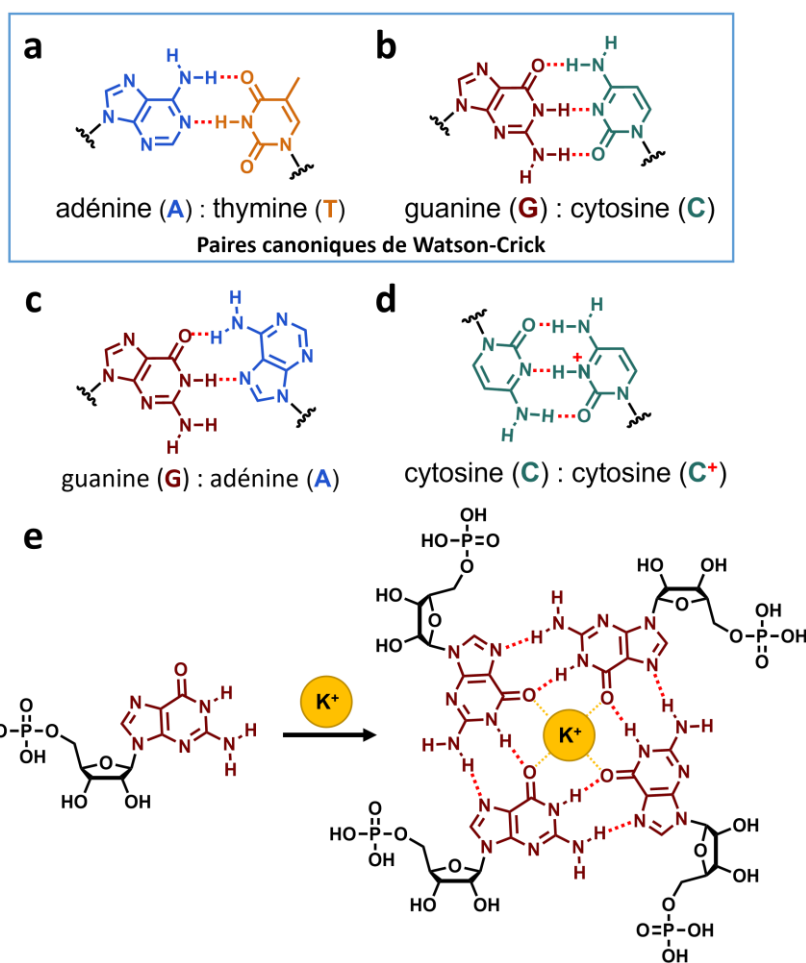
En pratique, les bases nucléiques sont incorporées dans les structures moléculaires soit directement, soit sous forme acide nucléique. Ce dernier peut être naturel – un ou plusieurs nucléotides (phosphate-sucre-base), ou nucléosides (sucre-base) où le sucre est un ribose comme dans l'ARN ou un désoxyribose comme dans l'ADN (Figure I-5) – ou une structure synthétique (LNA, PMO, PNA).<sup>136,245–247</sup> En particulier, les aegPNA, formés d'un squelette peptidique *N*-(2-aminoéthyl)glycine portant les nucléobases (Figure I-5), sont parmi les analogues d'acides nucléiques les plus prometteurs,<sup>136,248–250</sup> bien qu'il existe d'autre types de PNA (PNA chiraux,<sup>246,251–254</sup> PNA guanidines,<sup>255</sup>  $\epsilon$ LysPNA,<sup>256</sup> etc...). Les aegPNA (notés simplement PNA dans la suite de ce manuscrit) sont conçus de manière à ce que le positionnement des bases nucléiques dans leur structure secondaire soit identique à celui dans l'ADN (distances interatomiques, angles dièdres, etc...) mais sur un squelette non-chargé

pour limiter la répulsion électrostatique et la nécessité de contre-ions.<sup>257,258</sup> Ils présentent de nombreux avantages comparés aux acides nucléiques naturels, décrits plus en détails Partie II.2.b du Chapitre II. Brièvement, les PNA sont plus résistants à la dégradation métabolique (nucléases et protéases),<sup>249,258,259</sup> plus stables chimiquement<sup>136,246,247,258</sup> et sont capables de former des duplexes avec l'ADN et l'ARN plus stables que les homo-duplexes ADN/ADN ou ARN/ARN, ce qui les rend particulièrement utile dans des applications en biotechnologie.<sup>136,260</sup> Les PNA sont également utilisés dans d'autres applications biologiques<sup>246,247,249,258,261</sup> et nanotechnologiques<sup>246,262-264</sup> où leur capacité à former des structures supramoléculaires est particulièrement mise en avant.

En effet, les PNA, et les acides nucléiques plus généralement, sont capables de former des assemblages supramoléculaires complexes (duplexes, triplexes, triples jonctions, *i*-motif, G-quadruplexes)<sup>141-143</sup> notamment grâce aux interactions hydrophobes et de  $\pi$ -stacking apportés par le caractère aromatique des nucléobases, et de nombreuses possibilités d'interactions par liaisons hydrogène<sup>48,265,266</sup> dont le plus connu, l'appariement par bases complémentaires de type Watson-Crick (Figure I-6).

Si d'autres appariements sont possibles (Hoogsteen, Hoogsteen et Watson-Crick inversés, formation d'homodimères ou de triplets..., voir Figure I-6),<sup>144-146,250</sup> l'association de l'adénine avec la thymine par deux liaisons hydrogène et de la guanine avec la cytosine par trois liaisons hydrogène est au cœur de la structure en double hélice de l'ADN, présentée en 1953 par Watson et Crick.<sup>267</sup> La présence de cette complémentarité, de cette reconnaissance spécifique à l'échelle intermoléculaire, présente un fort potentiel dans le cadre de la formation d'assemblages et d'objets supramoléculaires.<sup>80,146,268,269</sup>

Notamment, la spécificité de reconnaissance des séquences à partir d'environ quatre bases nucléiques,<sup>266</sup> permet une certaine prédictibilité des interactions, démontrée dans des applications nanotechnologiques (nanostructures programmables,<sup>270-272</sup> origami d'ADN,<sup>79,273-275</sup> DNAzyme,<sup>276</sup> briques ADN<sup>277-279</sup>). Aussi, des structures supramoléculaires d'acides nucléiques ont été utilisées dans le cadre du développement de biocapteurs, de traitements thérapeutiques ou encore de la délivrance de médicament.<sup>268,276,280-282</sup> En particulier, des hydrogels dont le gélifiant comporte une ou plusieurs nucléobases ont été reportés<sup>48,79,80,283-285</sup> pour l'encapsulation de molécule d'intérêt<sup>286-288</sup> ou le développement de matériaux intelligents,<sup>289-294</sup> par exemple.



**Figure I-6.** Exemples d'associations supramoléculaires impliquant les bases nucléiques : paires de Watson-Crick entre l'adénine et la thymine (a) et entre guanine et cytosine (b) ; association de Hoogsteen entre guanine et adénine (c) ; homodimère de cytosine constituant les i-motifs d'ADN(d) ; formation d'un G-quadruplexe en présence d'un ion mono-charge ( $K^+$ )(e).

L'ensemble de ces applications démontre le potentiel de l'utilisation des acides nucléiques pour former de nouveaux hydrogels supramoléculaires. Les acides nucléiques possèdent des propriétés des plus intéressantes (par exemple : fonctions biologiques, capacités de structuration et reconnaissance spécifique) qui, si elles sont transférées à des hybrides peptides/acides nucléiques, peuvent donner lieu à de nouvelles biomolécules au potentiel considérable.

### 1.2.b Concevoir des nucléopeptides

Les nucléopeptides forment une famille de biomolécules principalement synthétiques – il existe assez peu de nucléopeptides naturels (dont ceux contenant la willardiine, acide aminé modifié, ou les peptidynucléosides)<sup>136,295,296</sup> – dont l'étude s'est considérablement développée depuis quelques années.<sup>136</sup> Grâce à la grande modularité des peptides (longueur,

séquence, nature des acides aminés) mais également de la partie portant les nucléobases (nature, longueur, nombre et séquence de nucléobases), la conception de nucléopeptides bénéficie d'une infinité de designs et de structures moléculaires possibles. Ainsi, la formation d'hybrides peptides/acides nucléiques permettrait de combiner les capacités structurales (par exemple : hélices, assemblage de type feuillets  $\beta$  pour les peptides (voir Partie I.1.a), nombreuses possibilités d'interactions par liaisons hydrogène,  $\pi$ -stacking aromatique pour les acides nucléiques)<sup>48</sup> et fonctionnelles (par exemple : bioactivité, bioconjugaison,<sup>297</sup> pénétration transmembranaire pour les peptides,<sup>298</sup> reconnaissance d'ADN ou d'ARN, assemblage programmable pour les acides nucléiques)<sup>137,299,300</sup> de chacune des parties pour former des hydrogels originaux, aux propriétés inédites, ouvrant ainsi le champ des applications possibles.

En termes de design, les nucléobases peuvent être introduites directement, sous forme de nucléotide(s), de nucléoside(s), ou encore d'acides nucléiques synthétiques comme vu précédemment (Partie I.2.a). De plus, la façon dont la partie peptidique et la partie nucléique sont associées l'une à l'autre a son importance : le greffage de la base ou de l'acide nucléique peut se faire sur la structure peptidique de différentes manières (en N-term, en C-term, incorporé directement dans la séquence, sur la chaîne latérale d'un acide aminé, etc...).

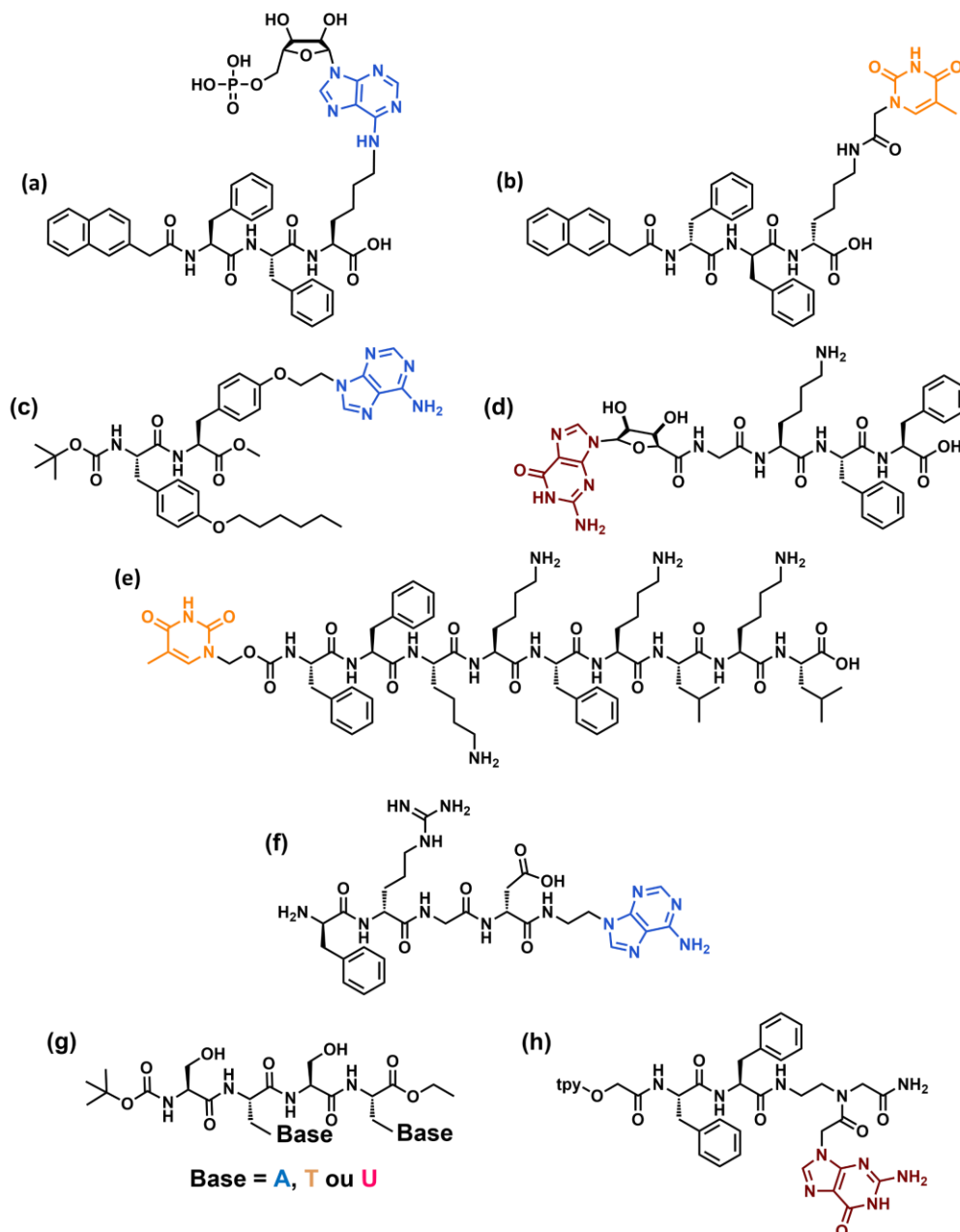
La synthèse séquentielle des nucléopeptides, à l'instar de ce qui se fait pour les peptides d'une part et pour les acides nucléiques d'autre part, est difficile car les groupes protecteurs utilisés et la stabilité de chaque partie doivent être compatibles avec l'ensemble des conditions de synthèse. Par exemple, le milieu acide fort utilisé pour le clivage des résines en synthèse peptidique sur support solide (SPPS) peut provoquer la dépurination, alors que les liaisons phosphodiester des nucléotides sont, elles, plutôt sensibles au milieu basique.<sup>301</sup> Plusieurs solutions ont été envisagées pour pouvoir synthétiser des nucléopeptides.

Une première idée, proposée dès la fin des années 80, consiste en la synthèse en deux temps de la partie peptidique et de la partie acide nucléique, qui est alors greffée sur une chaîne latérale d'acides aminés. Ainsi, plusieurs groupes présentent le greffage d'ADN (deux à plus de huit nucléotides) par liaison phosphodiester sur des acides aminés comportant un groupe hydroxyle : une sérine,<sup>302-307</sup> une tyrosine<sup>130,308-311</sup> ou encore une thréonine.<sup>312</sup> Plusieurs autres stratégies sont également proposées, comme la synthèse peptidique sur phase solide puis greffage du brin d'ADN,<sup>137</sup> ou l'utilisation de groupes protecteurs orthogonaux à

déprotection enzymatique,<sup>312</sup> par exemple. Les nucléopeptides, ainsi formés d'une structure peptidique de quelques acides aminés et d'une courte chaîne d'ADN, sont alors pressentis pour l'étude de nouveaux anticancéreux, antiviraux ou pour de la thérapie antisens.<sup>304,305</sup> Certains défauts demeurent pourtant, comme parfois la déphosphorylation de l'oligonucléotide ou des problèmes de régiosélectivité lorsque plusieurs hydroxyles sont libres.<sup>307</sup>

Le greffage sur l'amine ε d'une lysine a également été reporté par certains groupes liant la chaîne latérale de la lysine et la partie acide nucléique par une liaisons amide<sup>313-315</sup> ou une fonction amine secondaire (voir (a) et (b), Figure I-7).<sup>316,317</sup> Ces derniers ont été proposés dans l'étude de nouveaux biomatériaux à partir de dérivés de nucléotides aux rôles importants dans certaines voies métaboliques.

Cependant, il est facile de concevoir que ces nucléopeptides peuvent être peu satisfaisants en termes de structure, comportant de manière inhérente une structure ramifiée ou les deux parties peptide et acide nucléique sont spatialement distinctes. Une autre proposition est de fonctionnaliser les peptides par des acides nucléiques en bout de chaîne (N-term ou C-term). Ainsi sont ressorties des structures comportant une base nucléique directement liée par une fonction amide<sup>318</sup> ou greffée par un bras (« *linker* », en anglais) qui peut être méthyl-carboxylique<sup>319-321</sup> ou éthylamine,<sup>151</sup> par exemple (voir (d), (e) et (f) Figure I-7). En termes d'applications, nous pouvons citer l'exemple du composé présenté par Wang *et al.* (2018),<sup>319</sup> qui permet la séquestration d'ATP dans les cellules cancéreuses afin d'augmenter l'efficacité de molécules thérapeutiques. Un inconvénient de cette approche est qu'elle ne permet en général le greffage que d'une seule base nucléique sur la structure (pas de possibilité de séquences de nucléobases). Afin de greffer une séquence d'oligonucléotides, différentes stratégies utilisant un bras (« *linker* », *N*-hydroxysuccinimidyl esters, maléimide, *azalysine*-DABCO, bras triazole)<sup>137,139,322,323</sup> ont été proposées mais cette approche peut être délétère pour les propriétés des nucléopeptides notamment d'auto-assemblage, puisque leur structure subit une modification conséquente.



**Figure I-7.** Structures moléculaires de nucléopeptides montrant différentes stratégies d'introduction de bases nucléiques dans la séquence peptidique : greffage sur la lysine (a<sup>317</sup> et b<sup>314</sup>), greffage sur la tyrosine (c),<sup>311</sup> greffage direct (d),<sup>318</sup> par un linker en N-term (e)<sup>319</sup> ou en C-term (f),<sup>151</sup> et introduction par un PNA (g<sup>324</sup> et h<sup>325</sup>).

Une autre stratégie consistant en l'introduction des acides nucléiques au sein même de la séquence peptidique a été envisagée. En 1969, *Doel et al.*<sup>326</sup> proposent ainsi d'incorporer dans les séquences peptidiques des acides aminés portant une nucléobase afin de créer des nucléopeptides aux fonctions métaboliques potentiellement nouvelles. Les chercheurs synthétisent alors avec succès cinq dérivés d'alanine (comportant A, C, G, T ou U, voir Figure I-5), qu'ils introduisent (un ou deux) dans des séquences de deux à cinq acides aminés (voir



(g), Figure I-7).<sup>324</sup> Par la suite, des structures plus longues basées sur ces composés ont été proposées,<sup>327</sup> dont l'intérêt pressenti était de pouvoir interagir avec l'ADN ou l'ARN cellulaire.<sup>328</sup> Ce type de structure a ouvert la voie à l'utilisation des PNA (Figure I-5), qu'il est possible de coupler directement aux acides aminés, de manière séquentielle, dans des conditions de synthèse peptidique standards.<sup>315,329,330</sup> Si cette approche n'introduit pas des nucléotides complets (incluant phosphate et sucre), elle permet l'intégration d'une ou plusieurs bases dans la séquence peptidique (en N-term, C-term ou même en son sein) par des PNA, qui présentent une capacité de structuration similaire à celle de l'ADN et de nombreuses possibilités d'interaction par les nucléobases. Ainsi, quelques hybrides PNA/peptides de ce type ont été reportés dans la littérature, principalement à des fins de compréhension fondamentale des structures supramoléculaires de biomolécules, et pour des applications dans le domaine des matériaux fonctionnels.<sup>262,300,325,331-334</sup> Ces travaux s'appuient sur la richesse en termes de propriétés de la part de chaque partie : par exemple, DiMaio *et al.* (2017)<sup>133</sup> présentent des hybrides PNA/peptides dont la partie peptidique assure la formation d'assemblages de type feuillets  $\beta$  et de fibrilles, et la séquence de PNA (de dix unités) permet l'hybridation avec un bras d'ADN additionnel, formant ainsi des ponts interfibrilles (voir schéma (c) Figure I-9). La présence de ces points de réticulation améliore les propriétés du matériau gel formé, démontrant l'intérêt de la combinaison peptide/PNA.

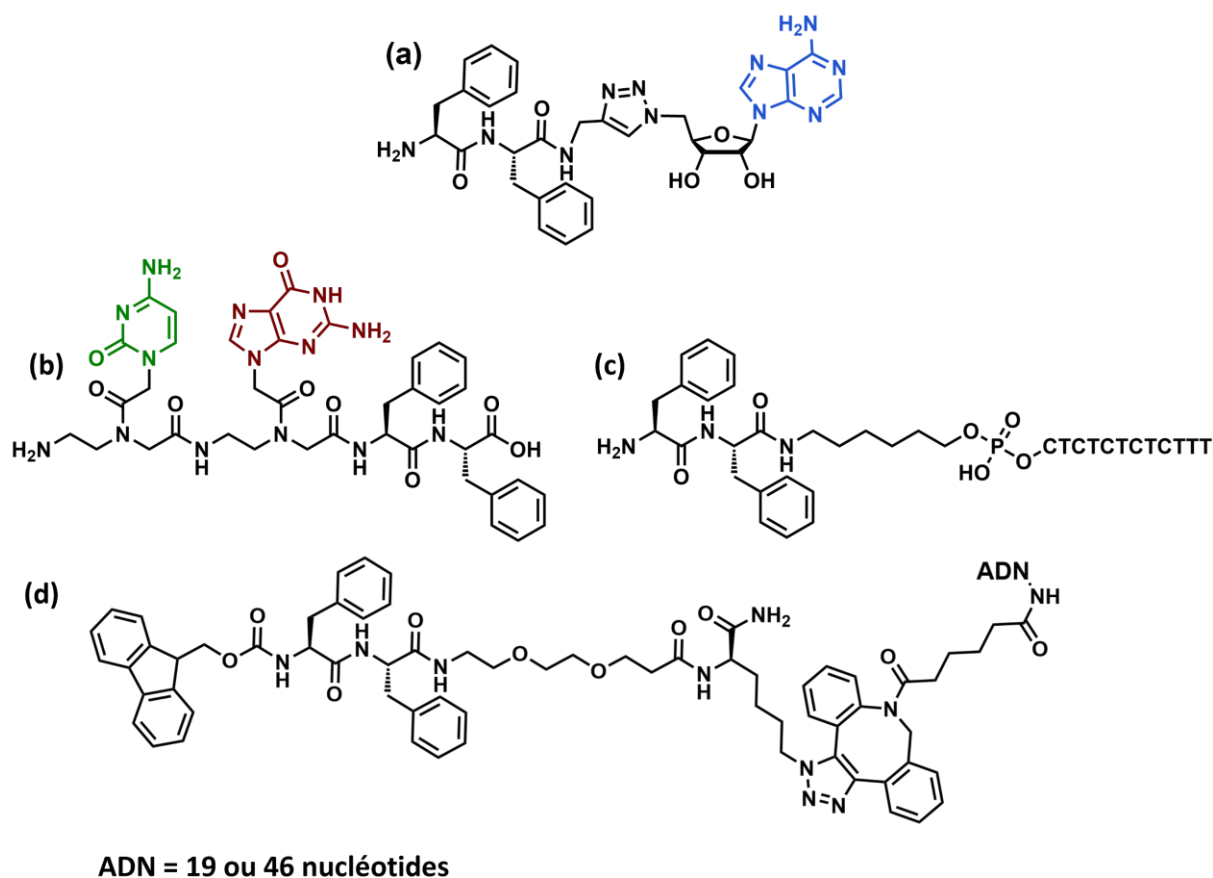
Les structures moléculaires des nucléopeptides s'avèrent donc diverses mais, par leur conception, les chercheurs se sont évertués à associer les nombreuses qualités des peptides et des acides nucléiques. Les nucléopeptides, en tant que composés biocompatibles et stables biologiquement, ont par conséquent essentiellement été développés pour des applications biologiques (effet thérapeutique, délivrance de biomolécules, biotechnologie, etc...).<sup>137,138,300,335</sup> En effet, par leur double appartenance, les nucléopeptides sont capables d'interagir aussi bien avec les systèmes protéiques<sup>137,238</sup> qu'avec des acides nucléiques,<sup>313,334,336</sup> ce qui peut leur conférer des fonctions biologiques particulières<sup>315</sup> ou la possibilité de transporter des biomolécules (PNA, ARN,<sup>336</sup> ADN<sup>313,335,337</sup>). Concernant leurs capacités structurales, l'utilisation d'hybrides peptides/acides nucléiques dans l'étude d'assemblages supramoléculaires reste un vaste domaine naissant qui reste à explorer.<sup>322,338,339</sup>

### I.2.c Nucléopeptides capables de former des auto-assemblages supramoléculaires

Les peptides, tout comme les acides nucléiques, sont connus pour être capables de former des structures supramoléculaires remarquables (voir Partie I.1.a et Partie I.2.a, respectivement). Si l'association de ces deux types de biomolécules dans une seule et même structure moléculaire présente un intérêt du point de vue fonctionnel (*vide supra*), des chercheurs ont montré que l'utilisation de nucléopeptides permet l'émergence de nouveaux systèmes supramoléculaires aux propriétés nouvelles et intéressantes.

L'introduction d'une ou plusieurs nucléobases au sein d'une structure peptidique connue pour s'auto-assembler peut modifier le mode d'assemblage et entraîner la formation de nanostructures d'un genre nouveau. Par exemple, certains groupes de chercheurs, s'inspirant des structures formées à partir du motif FF (voir Partie I.1.b), ont modifié ce dipeptide par l'ajout d'un nucléoside (adénosine, thymidine ou uridine liée par un bras triazole en C-term, voir exemple de l'adénosine, structure (a), Figure I-8),<sup>323</sup> de PNA (PNA(CG) adjoint en N-term ou en C-term (b, Figure I-8)<sup>340</sup> ou d'un brin d'ADN en N-term (13 nucléotides liés par un bras hexylamine (c, Figure I-8)<sup>341</sup> ou en C-term (19 ou 46 nucléotides liés par un bras PEG-K-DIBAC, voir (d), Figure I-8).<sup>338</sup> Le motif diphenylalanine est connu pour favoriser les auto-assemblages de type feuillet  $\beta$  et la formation de nanofibres. Or, les composés hybrides proposés dans ces exemples forment des nanostructures différentes dont certains présentent des avantages fonctionnels : le composé (b) (Figure I-8)<sup>340</sup> forme des agrégats, le composé (c) (Figure I-8)<sup>341</sup> produit des nanosphères exposant des brins d'ADN à sa surface, le composé (a) (Figure I-8)<sup>323</sup> s'assemble en nanovésicules capables de transporter des composés (encres, agents thérapeutiques) libérés en temps voulu sur adjonction de cations, et les fibres du composé (d) (Figure I-8)<sup>338</sup> forment un réseau complexe au caractère stimulant. En effet, le réseau fibrillaire dans ce dernier exemple possède une double sensibilité induite par la présence d'une partie Fmoc-peptide dégradable en milieu basique par déprotection de l'amine et d'une partie ADN qui peut être décomposée par des enzymes DNases. Dans le premier cas, les fibres se délitent en micelles sphériques et dans le second, elles perdent leur aspect hélicoïdal redevenant similaire à des structures formées par Fmoc-FF-OH. Cet exemple illustre parfaitement la possibilité qu'ont les chercheurs d'opérer un contrôle orthogonal sur les assemblages de nucléopeptides, c'est-à-dire de jouer sur la sensibilité de chaque partie peptidique ou acides nucléiques indépendamment.<sup>137</sup> L'ensemble de ces travaux est

représentatif de la synergie des parties peptidique et acide nucléique sur lesquelles s'appuient les structures supramoléculaires nucléopeptidiques : l'absence de l'une ou de l'autre partie est délétère pour les nano-objets formés.



**Figure I-8.** Structures moléculaires de nucléopeptides à motifs diphenylalanines capables d'auto-assemblage, intégrant un nucléoside (a)<sup>323</sup>, des PNA (b)<sup>340</sup>, ou des brins d'ADN (c)<sup>341</sup> et (d).<sup>338</sup>

D'autres systèmes nucléopeptidiques capables de s'auto-assembler ont été reportés.<sup>245,254,325,333,342,343</sup> Certains groupes proposent notamment des systèmes multi-composés (voir Partie I.3) basés sur des peptides/ADN aux séquences nucléiques complémentaires pour guider, ou complexifier l'assemblage supramoléculaire.<sup>338,339,344</sup> La spécificité des interactions permet une « programmabilité » de l'assemblage, c'est-à-dire que la façon dont les associations se font entre les différents composés du mélange est prédéterminée par le design moléculaire (comme cela peut se faire dans des systèmes purement composés d'acides nucléiques, voir ci-avant, Partie I.2.a).<sup>79,270-274</sup>

Par exemple, Buchberger *et al.* (2020)<sup>339</sup> proposent deux peptides capables de s'assembler en superhélices (« *coiled coil* », en anglais), chacun greffé d'un brin d'ADN conçu de manière à

pouvoir interagir avec des « cubes » d'origami d'ADN, microstructures cuboïdes d'environ 30 nm de long (schéma (a) et (b), Figure SI-1, en annexe). Cette interaction se produit grâce à l'exposition sur les faces des cubes de brins libres d'ADN complémentaires aux brins portés par les peptides (schéma (c), Figure SI-1, en annexe). Les chercheurs montrent alors la capacité de leurs composés à former spontanément des jonctions entre chaque cube et permettre ainsi la formation de chaînes linéaires comportant jusqu'à 80 cubes. Cette performance nanotechnologique utilise d'un côté le dimère peptidique superhélicoïdal comportant des avantages caractéristiques des assemblages peptidiques (réversibilité des interactions, séquence peptidique fonctionnalisable, modifiable par des variations de séquence) et de l'autre, l'hybridation des brins d'ADN pour interagir avec les objets. La spécificité de cette interaction permet de maîtriser complètement de mode d'assemblage des cubes et leur orientation dans la chaîne (schéma (d), Figure SI-1, en annexe).

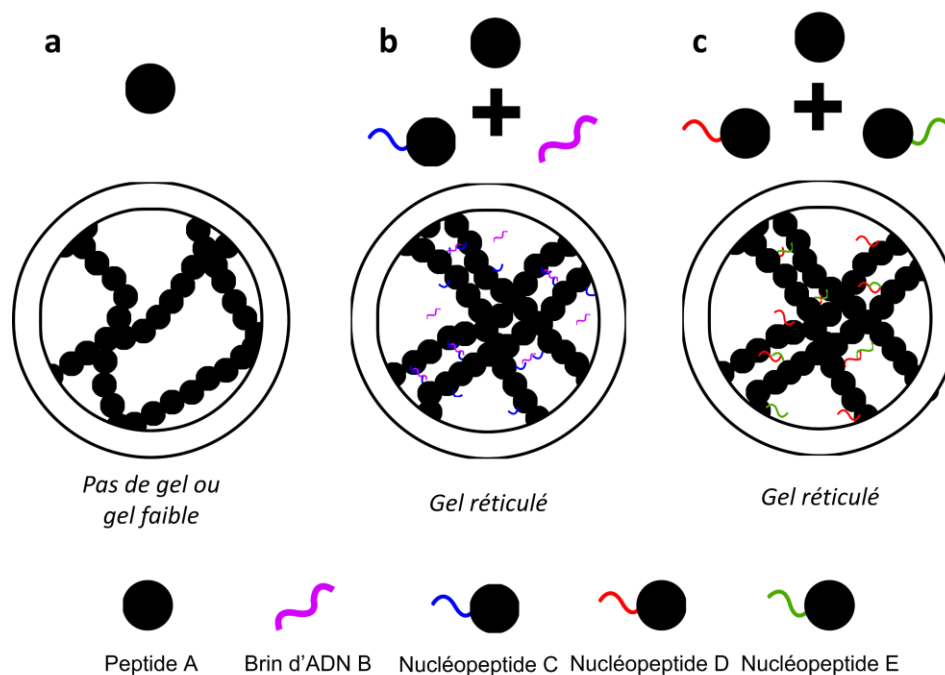
Ces exemples mettent pour la plupart à profit la capacité qu'ont les nucléopeptides à interagir d'une part « comme des peptides » (assemblages en superhélices, feuilletts  $\beta$  ...) et d'autre part « comme des acides nucléiques » (assemblages programmables liés aux paires de Watson-Crick, stabilisation par stacking des nucléobases, G-quartet, i-motifs...), ce qui permet la formation de structures supramoléculaires complexes. Ainsi, les chercheurs ont pu développer des systèmes supramoléculaires contrôlés, sous forme de nanotubes, nanofibres, nanosphères, micelles, voire nanovésicules à des fins d'applications en biomatériaux, médecine, biotechnologie et biologie moléculaire.<sup>138,300</sup> Aussi, cette capacité remarquable d'auto-assemblage rend les nucléopeptides particulièrement attractifs dans le cadre de la formulation d'hydrogels supramoléculaires.

#### **I.2.d Nucléopeptides capables de former des hydrogels**

Le développement de gels supramoléculaires à partir d'hybrides peptides/acides nucléiques est un sujet de recherche qui, bien que peu reporté dans la littérature pour le moment, a pris de l'ampleur ces dix dernières années. Il existe des exemples d'organogels nucléopeptidiques,<sup>311</sup> cependant, la majorité des études traitent de composés formant des hydrogels. Ont ainsi été reportés des nucléopeptides capables de gélifier les milieux aqueux dont la structure est inspirée de peptides gélifiants et pour lesquels la présence d'une partie acide nucléique va modifier les propriétés du gel formé. L'ensemble des exemples d'hydrogels introduits ci-après considère les nucléopeptides à concentration suffisante pour permettre la

gélification (c'est-à-dire supérieur à la concentration critique de gélification, CCG) même si elle n'est pas précisée dans chaque cas.

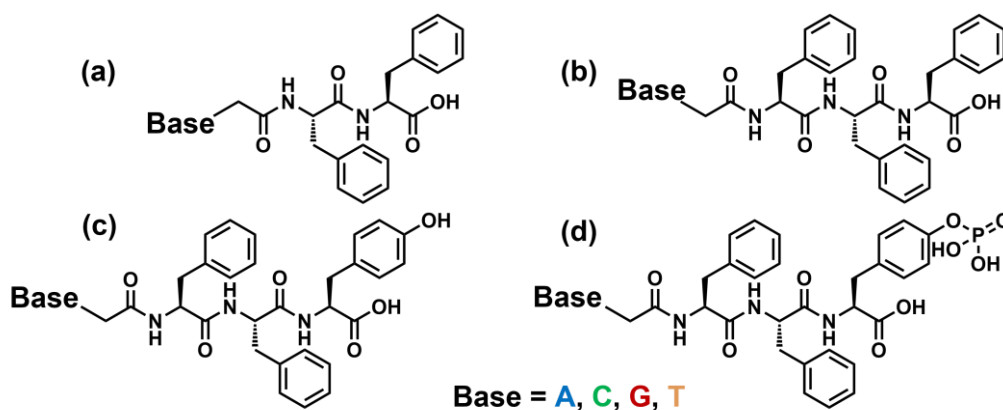
Certains groupes de recherche utilisent la partie acide nucléique des nucléopeptides pour induire une réticulation supplémentaire au sein du réseau fibrillaire porté par l'auto-assemblage de la partie peptidique. C'est le cas de DiMaio *et al.* (2017),<sup>133</sup> dont les travaux ont déjà été présenté ci-avant (Partie I.2.b), qui utilisent un brin d'ADN externe pour créer des jonctions interfibrilles (schéma (b), Figure I-9), ou Li *et al.* (2015)<sup>345</sup> pour lesquels le réseau fibrillaire ne peut pas former d'hydrogel sans l'adjonction d'un brin d'ADN adapté. Dans le cas des systèmes présentés par Freeman *et al.* (2018),<sup>322</sup> il n'est même pas nécessaire d'utiliser un brin d'ADN supplémentaire. Ils ont reporté des peptides amphiphiles portant chacun une séquence d'ADN complémentaire qui s'auto-assemblent en nanofibres. Les brins d'ADN, exposés à la surface des fibres, viennent réticuler le système en formant des duplexes hélicoïdaux d'ADN interfibrilles (schéma (c), Figure I-9). La présence de nombreux points de jonctions dans le réseau fibrillaire permet ainsi la formation d'un hydrogel plutôt fort (module élastique  $G' = 18000$  Pa). Ce gel est qualifié « d'intelligent » (« *smart hydrogel* », en anglais) puisqu'il s'avère qu'en présence d'un brin d'ADN « invasif », conçu pour défaire les duplexes d'ADN par déplacement de brin, le réseau fibrillaire se déstructure en partie et la force du gel diminue ( $G' < 1000$  Pa). Si un autre brin d'ADN (« anti-invasif ») capable de neutraliser le brin « invasif » est introduit dans le milieu, les duplexes réticulant le réseau fibrillaire se reforment et l'hydrogel retrouve ses propriétés initiales.



**Figure I-9.** Représentations schématiques de la stratégie de formation d'hydrogels nucléopeptidiques dont la réticulation s'appuie sur des complémentarités de séquences d'ADN. (a) Le peptide A est capable de s'auto-assembler mais ne forme pas de gels (ou des gels faibles). (b) Stratégie utilisant des nucléopeptides (C) pouvant être réticulés par des brins d'ADN externes (B) dont la séquence est doublement complémentaire (deux séquences bleues peuvent s'associer à la séquence violette). (c) Stratégie utilisant des nucléopeptides (D et E) aux brins d'ADN complémentaires (rouge et vert) pour réticuler le réseau peptidique et former un gel.

Ces approches mettent à profit la capacité de reconnaissance spécifique des brins d'ADN pour permettre une consolidation du réseau fibrillaire des hydrogels et présentent une stratégie intéressante pour le développement de nouveaux biomatériaux stimulables, aux propriétés mécaniques modulables.<sup>136</sup> Néanmoins, MacCulloch *et al.* (2018)<sup>137</sup> soulignent le caractère immunogène potentiel, le manque de stabilité en milieu biologique, et le coût de systèmes comportant de longs brins d'ADN. La recherche de nouveaux systèmes gélifiants s'est donc également intéressée à des structures nucléopeptidiques plus simples, où la partie acide nucléique, parfois réduite à une simple nucléobase, sert de modulateur de l'assemblage peptidique ou de générateur de nouvelles propriétés structurales et fonctionnelles. Ainsi Li *et al.* (2012)<sup>131</sup> se posent la question « quelle est le nombre minimal d'unité de biomolécules nécessaire pour former un hydrogel ? » et, travaillant autour des combinaisons glycoside/nucléobase/acide aminé,<sup>131,132,299,335,346</sup> identifient notamment de courts nucléopeptides gélifiants. Les composés X-FF (où X = A, C, G ou T, (voir structure (a),

Figure I-10) proposés par ce groupe,<sup>346</sup> sont constitués d'une diphenylalanine directement greffée d'une des quatre nucléobases en N-term. Ils forment des hydrogels en conditions légèrement acides (pH = 5) et dont les propriétés mécaniques dépendent de la nature de la base nucléique (module élastique allant de  $G' = 26$  Pa pour le composé cytosine à  $G' = 12600$  Pa pour le composé guanine). Ce lien entre les propriétés macroscopiques du gel et la nature de la nucléobase portée par le composé a également été observé par Baek *et al.* (2019) concernant leurs propres composés (b, Figure I-10).<sup>347</sup> Ces travaux soulignent ainsi d'une part l'intérêt d'étudier les quatre nucléobases et d'autre part la versatilité des systèmes nucléopeptidiques courts, qui sont très sensibles aux modifications de leur structure.<sup>130</sup> D'autres nucléopeptides proposés également par Li *et al.* (2011)<sup>346</sup> (c, Figure I-10) composent un système stimuable, capable de gélifier sur commande. En effet, sous l'action d'une phosphatase alcaline (enzyme opérant la déphosphorylation de la tyrosine), ces composés sont convertis en X-FFY (où X = A, C, G ou T, voir structure (d), Figure I-10) formant des gels, hormis dans le cas de C-FFY. Les hydrogels formés, à pH = 7.4, ont à nouveau des propriétés variables en fonction de la base nucléique (module élastique allant de  $G' = 2.9$  Pa pour le composé thymine à  $G' = 2100$  Pa pour le composé adénine). La possibilité d'induire la gélification en présence d'une enzyme permet d'envisager d'intéressantes applications pour ce type de nucléopeptides (biomatériaux sensibles, relargage contrôlé de composés thérapeutiques *in vivo*) et c'est pourquoi d'autres groupes ont également suivi une stratégie similaire.<sup>316,317</sup>



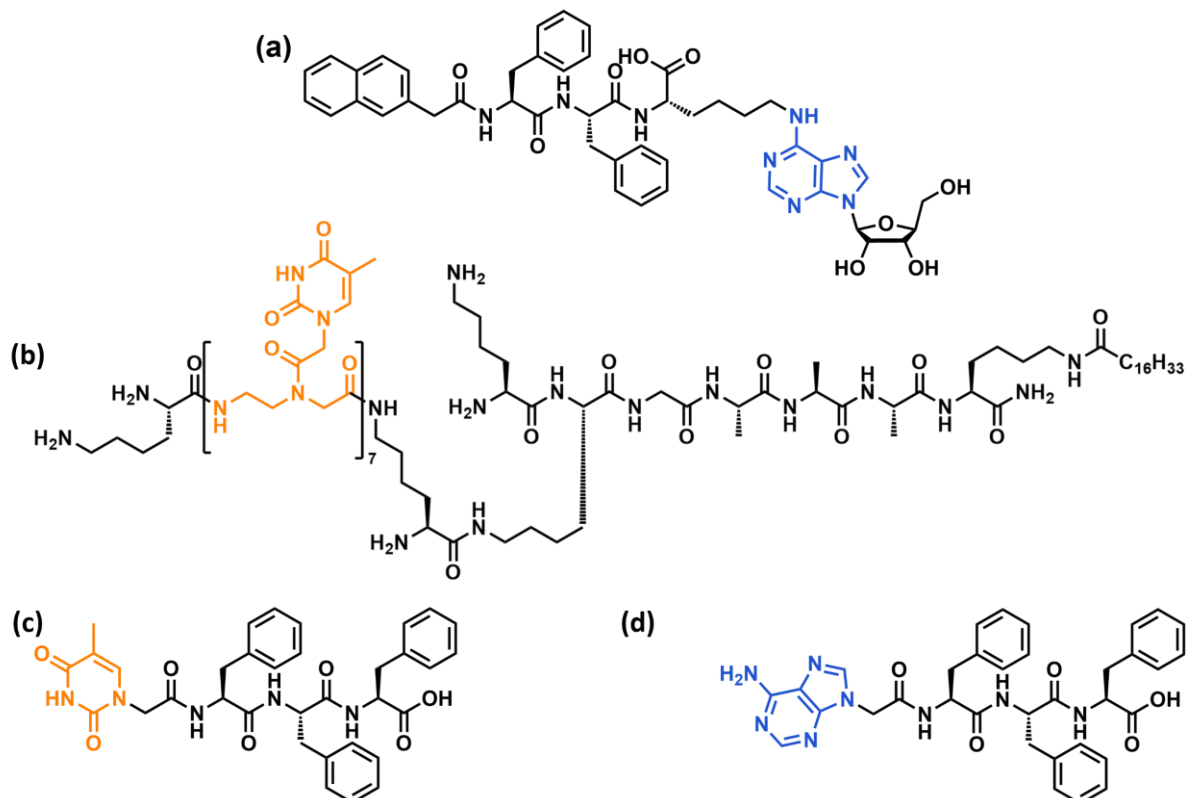
**Figure I-10.** Structures moléculaires de nucléopeptides formant des gels supramoléculaires (a),<sup>346</sup> (b),<sup>347</sup> (c) et son précurseur (d).<sup>346</sup> En effet, la déphosphorylation de (d) permet la formation de (c) in situ et entraîne la gélification.

L'objectif du greffage d'une partie nucléique sur un peptide déjà connu pour s'auto-assembler est généralement d'ajouter au système supramoléculaire peptidique de nouvelles capacités de structuration, spécifiques aux acides nucléiques. Si quelques exemples mettent en valeur les structures en G-quadruplexe (voir Figure I-6),<sup>318</sup> la plupart proposent des nucléopeptides capables d'interagir par appariement de Watson-Crick en présence des bases complémentaires. Ainsi, le composé (a)<sup>316</sup> portant une adénosine (Figure I-11) forme un gel dans l'eau (pH = 7.4), dont les caractéristiques mécaniques sont améliorées (module élastique  $G'$  multiplié par deux) en présence d'un brin d'ADN comportant des thymidines (10 nucléotides). Dans ce cas, la microscopie électronique en transmission (TEM) montre bien l'augmentation du nombre de points de jonction dans le réseau fibrillaire du gel, induit par la présence du brin d'ADN réticulant (à l'instar des exemples présentés plus haut). D'autres nucléopeptides gélifiants sont capables d'interagir avec des brins d'acides nucléiques<sup>313,346</sup> comme c'est le cas du composé (b), Figure I-11, dérivé de peptides amphiphiles.<sup>348</sup> Ce nucléopeptide peut former des hydrogels à pH = 7 et sa chaîne PNA est capable de s'hybrider avec un brin d'ADN ou d'ARN avec une bonne affinité et une bonne spécificité. Cette propriété peut être intéressante dans la recherche biomédicale pour l'étude de l'interférence par ARN, de l'extinction de gènes ou le développement de biocapteurs.<sup>137,300,348</sup> S'appuyant également sur les couples de bases complémentaires, certains groupes de chercheurs ont examiné l'effet du mélange de nucléopeptides complémentaires. Cette stratégie multi-composés est discutée plus en détails ci-après, Partie 1.3.c.vi.

Les propriétés mécaniques des hydrogels nucléopeptidiques, et notamment leur ajustabilité (par de petites modifications de design, par la sensibilité à un stimulus extérieur ou par une formulation associant des composés aux bases nucléiques complémentaires, *vide supra*) ainsi que la capacité d'interaction avec les acides nucléiques naturels, rendent ces composés hybrides plus que prometteurs dans le cadre de multiples applications biomédicales. En particulier, les gels de nucléopeptides pourraient s'avérer utiles pour de la culture cellulaire.<sup>140,238,349</sup> Par exemple, les résultats de viabilité cellulaire de fibroblastes cultivés sur un hydrogel du composé Thy-FFF (c, Figure I-11)<sup>140</sup> sont encourageants, les cellules présentant un métabolisme similaire à celles cultivées sur l'hydrogel peptidique commercial Puramatrix™, bien qu'avec un taux de prolifération plus modéré. Les hydrogels nucléopeptidiques sont également pressentis pour un usage en délivrance de médicament. Baek *et al.* (2020)<sup>350</sup> ont par exemple rapporté que le composé Adé-FFF (d, Figure I-11) formait



un gel dans l'eau (ou un tampon PBS à pH = 7.5) et que ce gel pouvait être chargé avec de la doxorubicine. En effet, cette molécule thérapeutique est un intercalant de l'ADN (à l'instar de certains autres anticancéreux comme la méthanesulfone-m-anisidide et l'ellipticine)<sup>351</sup> qui se stabilise au sein de la structure supramoléculaire de Adé-FFF, au niveau des cycles aromatiques des adénines. Le gel peut ainsi contenir une quantité élevée de doxorubicine qui peut être relarguée sur un temps long lors de la dégradation du gel par des enzymes (protéinase K notamment). Des tests *in vivo* ont été réalisés, montrant que l'hydrogel contenant la doxorubicine pouvait être injecté chez la souris au plus près des tumeurs cancéreuses, qui réduisent effectivement sous 12 jours chez les individus traités. Cet exemple met en évidence l'intérêt des nucléopeptides dans ce type d'applications, par leurs propriétés propres et la synergie entre les parties peptide et acide nucléique : le composé Adé-FFF est biocompatible (test de toxicité sur 7 jours) et dégradable *in vivo*, sa partie peptidique soutient la structure de l'hydrogel tandis que sa partie acide nucléique, en plus de moduler les propriétés mécaniques du gel, apporte sa capacité à interagir avec une molécule d'intérêt.



**Figure I-11.** Structures moléculaires de nucléopeptides formant des gels supramoléculaires : (a) forme un gel sensible à la présence de polythymidine,<sup>316</sup> (b),<sup>348</sup> (c)<sup>140</sup> et (d)<sup>350</sup> forment des hydrogels supramoléculaires.

### I.2.e Conclusion

Pour conclure, les nucléopeptides ont grandement attiré l'attention des chercheurs par leurs propriétés combinant des caractéristiques issues du monde des peptides et d'autres provenant des acides nucléiques. Ainsi, de nombreuses applications ont été envisagées pour ces molécules hybrides, allant de la thérapie *in vivo* à la délivrance de molécules d'intérêt en passant par les nanotechnologies.<sup>137,138,300,335</sup> En particulier, le design rationnel des nucléopeptides a permis de faire émerger des composés capables de s'auto-assembler de manière contrôlée, voire de former des hydrogels aux propriétés remarquables. Ces biomatériaux nouveaux sont singulièrement prometteurs dans le cadre du développement de systèmes intelligents, de milieux de culture cellulaire aux propriétés modulables et de vecteurs fonctionnels d'agents thérapeutiques. Pourtant, ce domaine de recherche n'en est qu'à ses balbutiements, avec assez peu d'occurrences dans la littérature. Dans le cas des nucléopeptides gélifiants « courts » (comme présentés ci-avant), les structures moléculaires sont principalement dérivées du cœur FF,<sup>140,314,316,346,347,350,352</sup> alors que de nombreuses séquences peptidiques sont connues pour favoriser l'auto-assemblage et permettre la formation d'hydrogels (les peptides amphipathiques par exemples, voir Partie I.1.c), laissant ouverte l'exploration de nouvelles structures nucléopeptidiques hydrogélifiantes. Aussi, les différents exemples de nucléopeptides gélifiants ont souligné quelques points clés concernant ces structures :

- Ces composés sont fortement versatiles, notamment les structures les plus courtes. En effet, même de petites modifications (amidation en C-term,<sup>318</sup> variation des nucléobases,<sup>132,346,347</sup> des acides aminés,<sup>347</sup> déphosphorylation,<sup>346</sup> etc...) se trouvent avoir un impact sur l'assemblage supramoléculaire et les caractéristiques des gels formés.
- Au sein de la structure supramoléculaire, l'existence simultanée d'interactions liées à la partie peptidique et d'interactions liées à la partie acide nucléique constitue un équilibre, discuté plus en détail au Chapitre IV de ce manuscrit de thèse. Dans certains cas, une structure peut prédominer l'autre et entraîner la perte de certaines propriétés.<sup>318</sup>
- Enfin, le mélange de composés portant des nucléobases complémentaires s'avère une stratégie des plus intéressantes pour former des hydrogels aux propriétés modulables et nouvelles comparées aux systèmes mono-composés (ne comportant qu'un seul type de nucléopeptide).

Ce dernier point aborde une stratégie de plus en plus répandue dans l'élaboration d'hydrogels supramoléculaires et qui présente de nombreux avantages : l'approche multi-composés.

### **I.3 Approche multi-composés pour la formulation de gels supramoléculaires**

#### **I.3.a Définition**

Le qualificatif « multi-composés » que nous utilisons définit les systèmes composés de plusieurs constituants. Il peut s'appliquer dans le milieu des matériaux à des alliages, des matériaux composites, des polymères,<sup>157-160</sup> et, en particulier parmi les matériaux mous, aux gels.<sup>168,353</sup> Dans ce cas, les gels multi-composés comportent au moins deux composés impliqués dans la structure interne du gel, par opposition aux gels mono-composés ne présentant qu'un seul type de gélifiant en plus du solvant. Ne sont ainsi ni considérés les systèmes associant un unique gélifiant avec un mélange de solvant ou les systèmes comprenant un gélifiant, un solvant et une (ou plusieurs) molécules ne participant pas à la structure du gel (colorants, sels, molécules encapsulées).

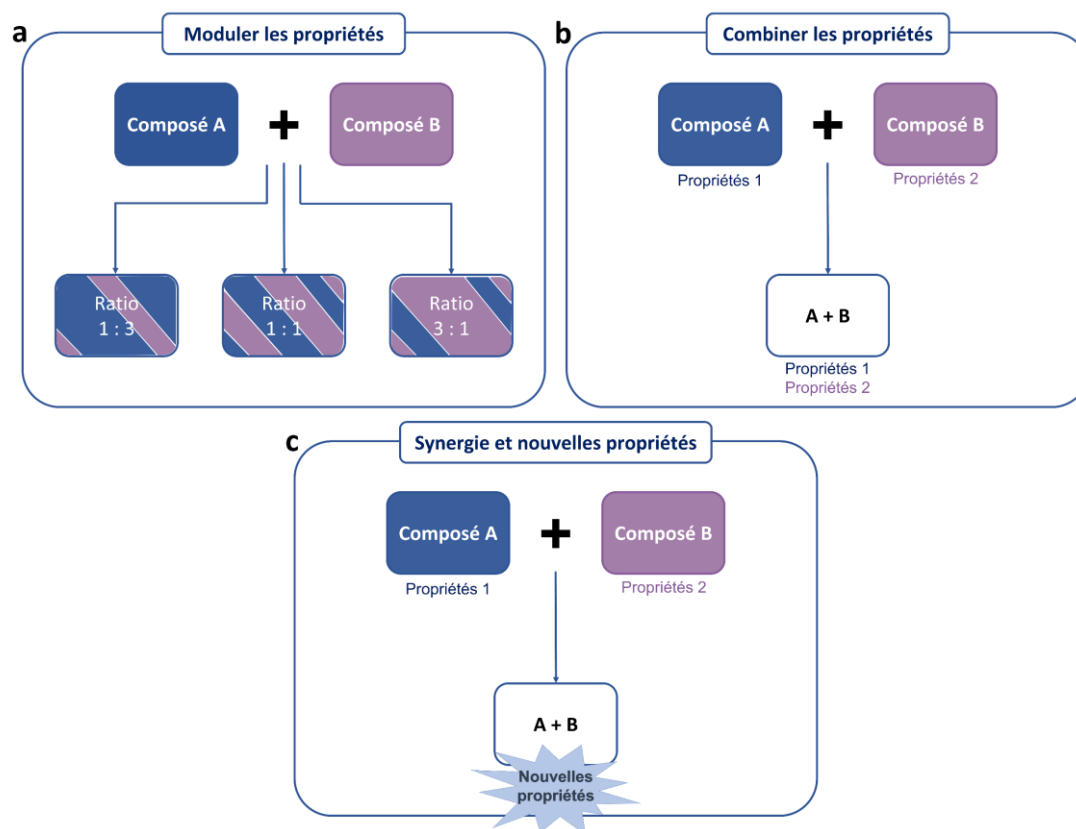
Dans le cas des gels (chimiques comme physiques), l'approche multi-composés peut avoir comme objectif de combiner les propriétés des deux systèmes « parents » (le terme « parent » désignant les formulations ne comportant qu'un seul des deux constituants)<sup>82,105</sup> ou de moduler leurs caractéristiques (force du gel,<sup>354</sup> cinétique de formation,<sup>355</sup> propriétés optiques,<sup>356</sup> par exemple) par l'ajout de composés supplémentaires. En effet, en jouant notamment sur la proportion de chaque composé dans le mélange final, il est en général possible de varier continument les propriétés du gel (a, Figure I-12). Le ratio, au même titre que la concentration en composés, le pH ou la température par exemple, devient un paramètre crucial dans la formulation des gels.<sup>162,165-167</sup> En outre, la variation du ratio est une approche facile à mettre en œuvre pour affecter leurs propriétés.<sup>168,169</sup> Par conséquent, l'utilisation de systèmes multi-composés apporte de la modulabilité aux gels, un aspect intéressant pour le développement de matériaux aux propriétés contrôlées.<sup>162,357</sup>

La combinaison de propriétés est également un avantage du mélange de composés. Par exemple, deux composés aux propriétés distinctes peuvent donner lieu à un gel possédant à la fois les propriétés du premier et du second (b, Figure I-12).<sup>162</sup> Cela peut permettre l'introduction de nouvelles fonctionnalités, ou de sensibilités (au pH, à la température, etc...) au sein d'un gel d'intérêt.<sup>118,163,358-364</sup> Outre cela, le mélange de composés peut faire émerger de nouvelles propriétés, qu'aucun des deux gels « parents » ne présente (c, Figure I-12). Dans

ce cas, plus qu'une simple addition, il s'agit de faire naître une interaction entre les deux composés au sein du gel, positive ou négative en fonction des attentes. En effet, la manière dont interagissent les constituants du système multi-composé est un élément important auquel sont liées les propriétés finales du mélange. Le design rationnel des molécules gélifiantes peut ainsi permettre d'espérer certaines interactions et de viser des propriétés particulières. L'utilisation de systèmes multi-composés permet alors d'atteindre un vaste champ de propriétés, inimaginable avec un seul composé.<sup>164,168,365,366</sup>

Notons que dans le cas des gels polymères, l'approche multi-composés pourrait correspondre à la fois à la synthèse de copolymères (où deux types de monomères sont associés de manière covalente pour former les macromolécules) – bien que cette définition soit légèrement impropre étant donné que le gel copolymère formé ne présente *in fine* qu'un seul type de macromolécule – et aux mélanges de plusieurs polymères. Ces deux domaines ont été grandement explorés, montrant à nouveau l'intérêt de ce type d'approche.<sup>157,158,367–370</sup> Des systèmes multi-composés associant polymères et gélifiants supramoléculaires ont également été reportés pour le développement de nouveaux biomatériaux,<sup>371–375</sup> de gels antibactériens<sup>376</sup>, pour l'encapsulation de molécules thérapeutiques<sup>374,377</sup> ou encore dans le cadre d'applications environnementales.<sup>374</sup> Aussi, la création de matériaux fonctionnels innovants par l'incorporation de nanotubes de carbone, de graphène, d'argiles ou de nanoparticules métalliques au sein des hydrogels supramoléculaires a déjà été reportée avec succès de multiples fois.<sup>68,365,378–380</sup>

Les systèmes multi-composés comportant uniquement des gélifiants supramoléculaires sont souvent comparés en termes de fonctionnalités aux copolymères, mais présentent tous les avantages des gels physiques : ajustabilité, sensibilité à l'environnement et réversibilité des structures. C'est la raison pour laquelle la stratégie multi-composés apparaît aussi prometteuse dans le cadre des gels supramoléculaires,<sup>105,121,162,357</sup> où les comportements d'assemblages sont fortement versatiles, donnant lieu à des nanostructures originales,<sup>121,162,381,382</sup> des matériaux aux propriétés mécaniques modulables,<sup>121,168,354,383,384</sup> des systèmes intelligents multi-responsifs<sup>358</sup> ou de nouveaux matériaux bio-fonctionnalisés.<sup>93,237,365,385</sup>

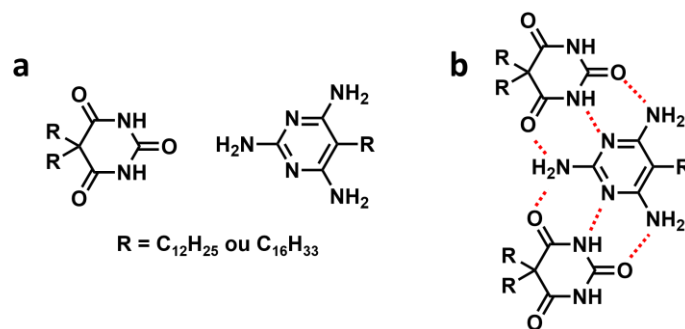


**Figure I-12.** Objectifs principaux de l'approche multi-composés : modulation et combinaison des propriétés des gels « parents », combinaison de propriété et émergence de nouvelles propriétés.

### I.3.b Gels supramoléculaires multi-composés

#### I.3.b.i Introduction

Selon Terech *et al.* (2006),<sup>5</sup> le premier système gélifiant comprenant deux composés a été reporté en 1993. Il s'agissait d'un couple associant un dérivé de triaminopyrimidine amphiphile et un dérivé d'acide barbiturique, capables de former ensemble des organogels, montrant ainsi le potentiel de cette approche pour formuler de nouveaux gels (Figure I-13).<sup>386</sup> Depuis, de nombreux gels supramoléculaires multi-composés (organogels et hydrogels) ont été reportés, ouvrant la voie vers de nombreuses applications (culture cellulaire,<sup>93,354,383,385,387</sup> encapsulation de composés d'intérêt<sup>387</sup> ou de cellules,<sup>388,389</sup> opto-électronique moléculaire,<sup>357,361,390–392</sup> fluorescence<sup>393,394</sup> ou traitement des eaux).<sup>357,364,395</sup>



**Figure I-13.** Structures moléculaires des composés du couple formant des organogels multi-composés présentés par Hanabusa et al. en 1993<sup>386</sup> (a) et co-assemblage supposé par liaisons hydrogène entre ces composés (b).

En pratique, les gels supramoléculaires multi-composés mettent donc en présence deux (ou plus) composés capables de former le réseau du gel grâce à des liaisons faibles (liaisons hydrogène, interactions électrostatiques ou hydrophobes, coordinations métal-ligand, les interactions  $\pi$ - $\pi$  (voir Introduction générale). En fonction de l'affinité des composés les uns pour les autres, leur comportement d'interaction lors de l'assemblage peut donner lieu à différentes situations. Ainsi, les chercheurs ont mis en évidence deux modes d'assemblage principaux<sup>176,357,365,396-398</sup> :

- Le « **self-sorting** », terme anglais désignant la ségrégation des composés lors de l'assemblage et la formation de structures distinctes constituées d'un seul type de composé à la fois.
- Le **co-assemblage** définissant le comportement inverse, où les composés s'assemblent conjointement pour former des structures mixtes comprenant des molécules de chaque composé.

Certains gels présentent des combinaisons de structures, entre *self-sorting* et co-assemblage,<sup>163</sup> ou d'autres encore peuvent passer d'un comportement à l'autre en fonction de stimuli extérieurs, ou de conditions particulières de préparation.<sup>394,399</sup>

### ***1.3.b.ii Comportement de « self-sorting » dans les gels supramoléculaires***

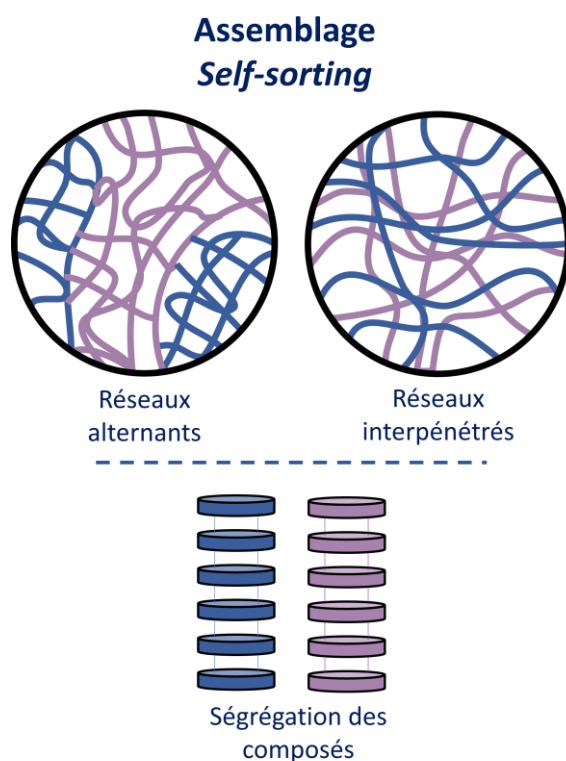
Le *self-sorting* est un processus d'assemblage correspondant à une situation où les composés forment des structures distinctes, de même type ou non (fibres, bandes, rubans, etc...). Le réseau fibrillaire d'un système *self-sorted* de deux composés est donc constitué de deux sortes de fibres, comprenant exclusivement un composé ou l'autre. Ces assemblages sont également dits « narcissiques », c'est-à-dire que chaque composé préfère, thermodynamiquement parlant, entreprendre de l'auto-assemblage plutôt que d'interagir avec l'autre composé. Ainsi, deux réseaux distincts, correspondant chacun à l'auto-assemblage d'un type de composé se forment alors, et ce, selon deux topologies de réseau principales,<sup>5,105,400</sup> à savoir :

- Les systèmes de **réseaux alternants**, où les composés s'excluent mutuellement, formant des réseaux indépendants, spatialement distincts. Des domaines propres se créent et forment des microphases au sein du gel, contenant un composé ou l'autre (Figure I-14).
- Les **réseaux interpénétrés**, où le *self-sorting* des composés induit la formation de structures distinctes mais où celles-ci ne s'excluent pas. Deux réseaux orthogonaux se créent, formant une phase homogène (Figure I-14).<sup>401</sup> Les réseaux interpénétrés possèdent un nombre de jonction variable allant théoriquement des réseaux parfaitement orthogonaux (sans interactions) aux systèmes enchevêtrés.<sup>5</sup>

Se rapprochant des gels composites et des microémulsions, les gels présentant des réseaux alternants peuvent présenter des propriétés potentiellement désirables, dans le cadre de développement de systèmes électroniques (hétérojonction n-p) par exemple.<sup>105</sup> Néanmoins, dans ce type de gel, les composés différents sont très peu en interaction (uniquement au niveau des jonctions de domaine) ce qui ne favorise pas l'émergence de propriétés synergiques. De plus, l'hétérogénéité du système peut s'avérer moins intéressante pour certaines applications (pour la culture cellulaire par exemple).<sup>365,383</sup> Ce type de comportement est en fait, à notre connaissance, peu observé et peu exploité dans le cadre de la formulation de gels supramoléculaires multi-composés.

Les systèmes *self-sorted* formant des réseaux interpénétrés sont plus fréquemment reportés.<sup>153,362,402-404</sup> Dans ce cas, les objets formés, contenant chacun un seul type des

composés constituant le mélange, sont dispersés homogènement dans le gel. Ils présentent des morphologies identiques à celles observées dans les gels « parents », leur assemblage étant très peu affecté par la présence d'autres composés.<sup>362,404,405</sup> Il est donc possible de reconnaître ce type de système, soit par observation des objets (directe par microscopie TEM, SEM, AFM<sup>362,404,405</sup> ou imagerie MALDI,<sup>406</sup> ou indirecte par le biais de sondes, fluorescentes<sup>407</sup> par exemple) soit par analyses spectroscopiques. En effet, les signatures des systèmes *self-sorted* en FTIR, spectroscopie UV-visible ou dichroïsme circulaire, sont la résultante d'une combinaison linéaire des signatures des assemblages « parents ».<sup>153,391,393,408,409</sup> Par exemple, les spectres d'absorption UV-visible et IRTF obtenus par Das *et al.* (2011)<sup>153</sup> pour un mélange de deux chromophores gélifiants sont superposables aux sommes algébriques des spectres obtenus pour les composés seuls.



**Figure I-14.** Représentations schématiques de réseaux possibles dans le cadre d'un assemblage de type self-sorting (haut), et représentation du mode d'assemblage (bas) de ce système multi-composé comprenant deux composés (bleu et violet).

En revanche, bien que les nano-objets soient les mêmes que dans les gels « parents », des différences se retrouvent soit au niveau de la cinétique d'assemblage (la présence du second composé peut ralentir ou accélérer l'auto-assemblage),<sup>359,366,404</sup> soit au niveau des caractéristiques macroscopique des gels. En effet, les assemblages multi-composés *self-sorted*

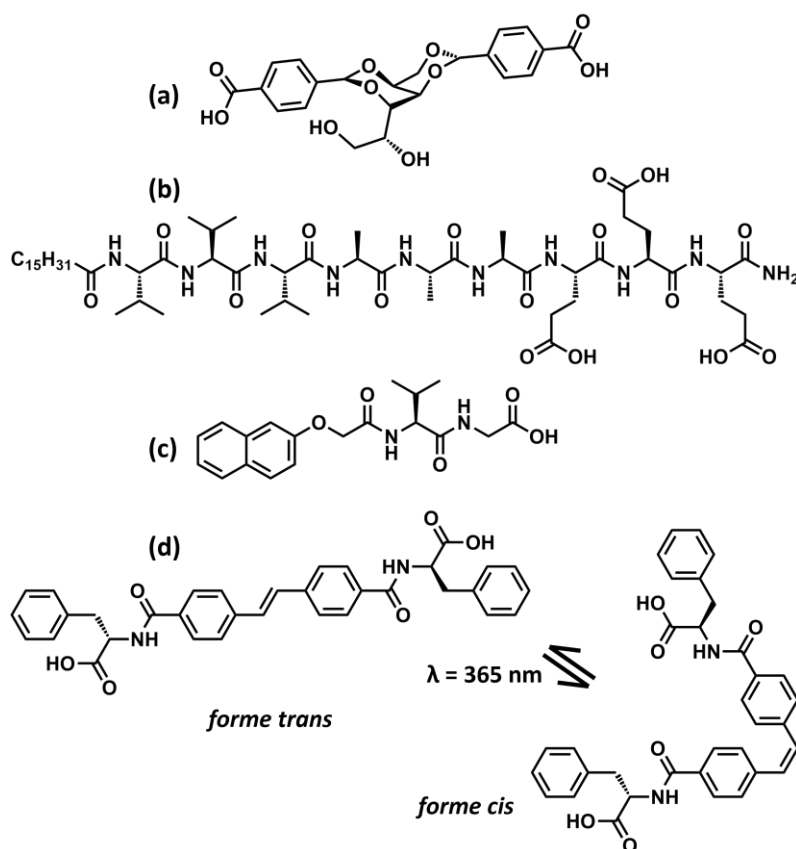


peuvent permettre de combiner les propriétés des systèmes « parents » (par exemple : propriétés mécaniques, stabilité thermique, fluorescence, capacité à gélifier dans divers solvants, biofonctionnalités).<sup>358–362,410</sup>

Ainsi, Okesola *et al.* (2019)<sup>359</sup> ont reporté un hydrogel comportant un peptide amphiphile et un dérivé du sorbitol (1,3:2,4-dibenzylidène-D-sorbitol, DBS) formant un assemblage de type *self-sorted* (voir (a) et (b), Figure I-15). Ce gel multi-composé présente à la fois une capacité de thixotropie (régénération des propriétés après une déstructuration mécanique du gel) et des modules viscoélastiques élevés, deux propriétés similaires à celles du gel de peptide seul, et une stabilité à la dégradation par des enzymes (protéinases K) induite par la présence du DBS. La combinaison de ces propriétés, associée à sa bonne cytocompatibilité (testée en présence de cellules souches adipeuses humaines), font de cet hydrogel un matériau prometteur pour de la médecine régénérative.

Cette stratégie s'avère également intéressante pour introduire des fonctionnalités particulières ou une sensibilité à certains stimuli, et ainsi développer des gels intelligents.<sup>162,358</sup>

Par exemple, certains groupes se sont intéressés à des hydrogels multi-composés constitués de deux réseaux interpénétrés, dont l'un des deux pouvait être défait sur commande par acidification *in situ* ou irradiation.<sup>411–413</sup> En effet, le couple de composés proposé par Draper *et al.* (2015)<sup>411</sup> comprend un dérivé peptidique capable de former des hydrogels seul ainsi qu'un dérivé de stilbène (structures moléculaires (c), (d) et (d'), Figure I-15). Ce dernier peut gélifier les milieux aqueux dans sa configuration *trans* (d, Figure I-15), tandis qu'il forme un précipité dans sa configuration *cis* (d', Figure I-15). Aussi, le changement de configuration *trans-cis* est induit par une irradiation à la longueur d'onde  $\lambda = 365$  nm. Les chercheurs ont ainsi formulé un gel où le dérivé peptidique et celui de stilbène *trans* forment des réseaux *self-sorted* interpénétrés. Lorsque ce gel est irradié à la longueur d'onde adéquate, le dérivé de stilbène change de configuration et précipite au sein du gel, venant perturber la structure peptidique à présent seule à maintenir la structure gel. Les propriétés mécaniques de l'hydrogel diminuent alors, avec un module élastique passant de  $G' \approx 40$  kPa à  $G' \approx 20$  kPa. L'approche multi-composé a permis dans cet exemple d'introduire une sensibilité à un stimulus, formulant un gel aux propriétés modulables sur commande. Notons que l'irradiation lumineuse peut être effectuée localement, provoquant une modulation spatialement résolue des propriétés mécaniques du gel, ce qui permet d'envisager le développement de matériaux complexes à partir de ce type de systèmes.



**Figure I-15.** Structures moléculaires de composés formant des hydrogels aux réseaux self-sorted : un dérivé du sorbitol (DBS, (a)) et un peptide amphiphile (b)<sup>359</sup> ; un dérivé peptidique (c) et un dérivé du stilbène (d)<sup>411</sup> sous sa forme trans (à gauche) et cis (à droite).

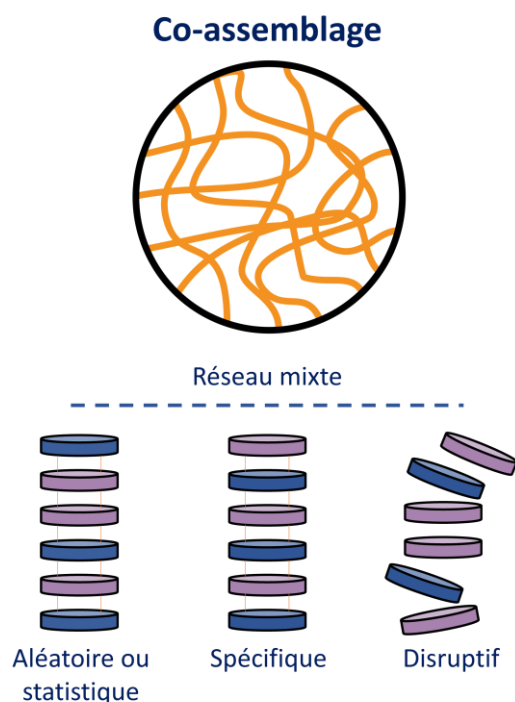
La combinaison des propriétés des gels « parents » s'accompagne parfois de l'émergence de nouvelles caractéristiques (amélioration des propriétés mécaniques,<sup>359,360</sup> des propriétés photo-physiques,<sup>361</sup> etc...), liée à l'interaction des fibres de natures différentes au sein de la structure. Certains groupes de recherche ont mis à profit cette caractéristique en concevant des couples de composés s'assemblant de manière narcissique, portant chacun des fonctions distinctes mais capables d'interagir pour produire un effet particulier et nouveau (catalyse,<sup>41</sup> réactivité particulière,<sup>163</sup> propriétés photoélectriques<sup>391,414</sup>). C'est le cas par exemple de Sugiyasu *et al.* (2008)<sup>391</sup> qui ont reporté un organogel supramoléculaire comportant les réseaux *self-sorted* de deux composés organiques semi-conducteurs, l'un de type n et l'autre de type p. Le contact des fibres au sein du gel permet la formation d'hétérojonctions n-p photosensibles. Par conséquent, lorsque ce gel est excité par irradiation lumineuse à la longueur d'onde d'absorption du système, il se crée une tension électrique permettant dans des conditions adéquates de fournir un courant. Ce type d'organogel a pour vocation d'ouvrir la voie à de nouveaux systèmes photo-électriques moléculaires organiques,

démontrant à nouveau l'intérêt de l'approche multi-composés pour formuler des hydrogels supramoléculaires.

### ***1.3.b.iii Comportement de co-assemblage au sein des gels supramoléculaires***

Le second type d'assemblage observé est le « co-assemblage » ou assemblage coopératif (Figure I-16).<sup>176,357,398,409,415</sup> Il s'agit d'une situation où les composés mis en présence s'assemblent conjointement et forment un gel au réseau homogène comportant des nanostructures constituées d'un mélange de chaque composé. La répartition des composés au sein de ces structures peut être aléatoire (pas de reconnaissance particulière entre les composés, ils se répartissent statistiquement dans l'assemblage) ou spécifique (assemblage ordonné, alterné entre les composés).<sup>105,120,176,365,397</sup>

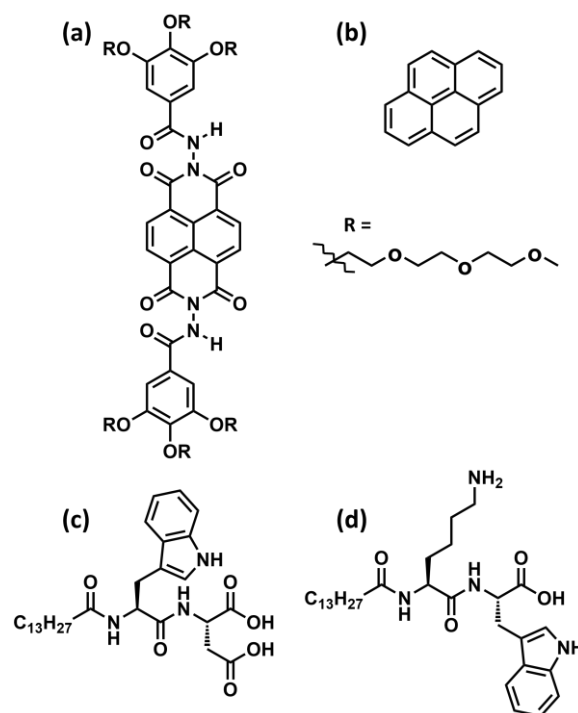
Dans le cadre du co-assemblage, il est possible que la morphologie des nano-objets soit différente de celles des constituants seuls.<sup>120,169,384,398,416</sup> Par exemple, deux composés formant respectivement des fibres et des rubans hélicoïdaux peuvent, une fois co-assemblés, former des bandes planes.<sup>382</sup> Ce changement de nanostructure peut être à l'origine de l'émergence de nouvelles propriétés, voire rendre possible la formation du gel. En effet, dans certains cas, deux composés incapables de former des gels lorsqu'ils sont pris à part peuvent donner lieu à une gélification une fois mis en présence, grâce à la formation de structures supramoléculaires mixtes. C'est le cas du système multi-composé présenté par Molla *et al.* (2012)<sup>381</sup> comprenant un dérivé diimide d'acide naphthalène-1,4,5,8-tétracarboxylique (NDI-1) et du pyrène (a et b, Figure I-17, respectivement). Ces chercheurs ont montré que le NDI-1 forme des vésicules d'environ 50 nm de diamètre externe en milieu aqueux. En revanche, en présence de pyrène (qui peut être ajouté subséquemment à la formation des vésicules) ces structures sphériques fusionnent et forment des objets unidimensionnels : des fibres qui en s'entremêlant forment la structure d'un hydrogel. En effet, le pyrène est capable de s'intercaler au sein de la structure constituée par les molécules de NDI-1 et de former ainsi une structure mixte à la morphologie modifiée. Ce type de transformation de vésicules à hydrogel, activée par l'ajout du second composé, pourrait être intéressante dans le cadre de la délivrance ciblée d'agent thérapeutique ou le développement de capteurs moléculaires.



**Figure I-16.** Représentation schématique du réseau mixte comprenant à la fois chacun des composés dans le cadre d'un co-assemblage (haut) et représentation du mode d'assemblage statistique, spécifique ou disruptif (bas) de ce système multi-composé comprenant deux composés (bleu et violet).

Ainsi, de nombreux cas de composés incapables seuls de former un gel par auto-assemblage (qui restent en solution ou précipitent par exemple) mais pour lesquels l'ajout d'un second composé approprié permet la gélification ont été reportés.<sup>82,162,357,417</sup> Les systèmes proposés mettent souvent en avant une complémentarité des composés par reconnaissance hôte/récepteur (« *host-guest* », en anglais),<sup>162,389,418</sup> complémentarité des charges<sup>419,420</sup> ou des liaisons hydrogène,<sup>162,386,421,422</sup> ou encore par interaction aromatique donneur/accepteur.<sup>165,384</sup> Un exemple de ce type de système a été donné par Hu *et al.* (2020)<sup>419</sup> qui associe des peptides amphiphiles aux charges opposées. Parmi eux, le composé C<sub>13</sub>-WD (Figure I-17) forme un liquide visqueux en milieu aqueux et pH acide tandis que C<sub>13</sub>-KW (Figure I-17) précipite dans ces mêmes conditions. Lorsque ces deux peptides amphiphiles sont mis en présence, la formation d'un hydrogel est observée. Ce gel présente un module élastique correct ( $G' \approx 5500$  Pa) qui pourrait être modulé en modifiant le ratio de chaque composé, une stratégie déjà éprouvée dans le cadre de la formulation de gels supramoléculaires par co-assemblage.<sup>384,416</sup> Cette co-gélification est la preuve irréfutable d'une coopération synergique entre les composés du système.<sup>162,168</sup> Ce mode d'assemblage

permet la formation de structures qui ne pourraient pas exister sans l'approche multi-composés, montrant les possibilités offertes par ce type de stratégie.



**Figure I-17.** Structures moléculaires de composés formant des hydrogels par co-assemblage : NDI-1 (a) et pyrène (b)<sup>381</sup> ; deux peptides amphiphiles C<sub>13</sub>-WD (c) et C<sub>13</sub>-KW (d).<sup>419</sup>

A l'inverse, l'ajout de composés supplémentaires peut avoir pour but de déstabiliser la structure supramoléculaire. En effet, si jusqu'à présent n'a été mentionné que l'assemblage coopératif synergique, positif pour la formation du gel, il est possible que le co-assemblage s'avère délétère (co-assemblage disruptif, Figure I-16).<sup>105,120</sup> L'interaction entre les composés provoque dans ce cas la formation de nano-objets ne participant pas à la structure du gel (précipités, agrégats solubles, nano-sphères) ou de systèmes moins forts.<sup>120,423</sup> Par conséquent, les gels multi-composés résultants peuvent être beaucoup plus faibles mécaniquement voire perdre complètement leur état solide viscoélastique.

Le co-assemblage n'implique pas toujours la création d'architectures supramoléculaires de morphologie nouvelle, l'assemblage semble parfois dirigé par l'un des composés en particulier, formant une structure proche de celle de son auto-assemblage. Certains chercheurs parlent de comportement « sergent-soldat » (« *sergent-soldier* », en anglais),<sup>398,399,424</sup> où le mode d'assemblage est imposé par l'un des composés. Les structures formées ne possèdent certes pas de propriétés structurelles nouvelles, mais leurs gels peuvent présenter de nouvelles caractéristiques intéressantes. En effet, un des avantages du

co-assemblage sur le *self-sorting* est la coexistence de multiples composés au sein de mêmes nanostructures, ce qui peut donner lieu à des effets d'interaction très fins et facilement modulables. L'ajout du second composé peut ainsi, dans certains cas, moduler les propriétés mécaniques,<sup>120,166,354,409,425</sup> photophysiques,<sup>392,426</sup> ou bio-fonctionnelles des gels.<sup>385,427</sup> Il suffit en théorie pour cela de faire varier le ratio entre les composés en présence pour modifier continuellement les propriétés des gels bien que, dans le cas des co-assemblages, la dépendance ratio/propriétés ne soit pas linéaire.<sup>118,399,428</sup>

De plus, le co-assemblage permet d'incorporer des fonctionnalités au sein des nanostructures.<sup>162</sup> Par exemple, Gasiorowski *et al.* (2011)<sup>163</sup> ont reporté un hydrogel multi-composé comportant le peptide Q<sub>11</sub> (Ac-QQKFQFQFEQQ-NH<sub>2</sub>, dérivé de P<sub>11</sub>, voir Tableau I-1 et Partie I.1.b) et son dérivé Q<sub>11</sub>-RGD (Ac-GGRGDSGGGQQKFQFQFEQQ-NH<sub>2</sub>, voir Table des acides aminés page XI). Par des méthodes de préparation différentes, ces chercheurs ont réussi à produire d'une part des gels co-assemblés, aux fibres contenant à la fois Q<sub>11</sub> et Q<sub>11</sub>-RGD et, d'autre part, des gels *self-sorted* dont le réseau était constitué de deux types de fibres. Bien que le gel issu du co-assemblage ait présenté des propriétés mécaniques légèrement plus faibles que l'hydrogel *self-sorted* ( $G' = 50$  kPa contre  $G' = 60$  kPa, respectivement), sa capacité à promouvoir la croissance cellulaire s'est avérée nettement meilleure (mesurée par test MTS après 3 jours de culture de cellules endothéliales primaires de la veine ombilicale humaine). Une hypothèse proposée par les chercheurs concernant cette dernière propriété serait que la répartition homogène des épitopes RGD au sein des fibres mixtes serait plus avantageuse que la ségrégation induite par le *self-sorting*. L'incorporation de Q<sub>11</sub>-RGD au sein de la structure de Q<sub>11</sub> (à proportion de 1: 10 au maximum pour éviter de perturber l'assemblage) permet de conférer des propriétés biologiques à l'hydrogel. La discussion concernant l'utilisation de cette stratégie pour les hydrogels peptidiques multi-composés sera approfondie Partie I.3.c.i.

A l'instar des systèmes multi-composés *self-sorted*, le co-assemblage permet donc de combiner les propriétés des systèmes « parents ».<sup>118,363,364</sup> Également, les nombreuses interactions au sein des structures issues de co-assemblage favorisent l'émergence de nouvelles propriétés qui peuvent être électroniques,<sup>390</sup> photo-physiques<sup>394,422</sup> ou biologique,<sup>429</sup> ou encore une sensibilité à un stimulus particulier.<sup>430</sup>

Pour conclure sur les modes d'assemblage possibles lors de la formulation de gels multi-composés, les systèmes *self-sorted* ainsi que les co-assemblages présentent de nombreux

avantages rendant ces matériaux prometteurs dans le cadre de multiples applications. Les deux permettent de combiner les caractéristiques des systèmes mono-composés « parents », voire de faire émerger, dans certains cas, de nouvelles propriétés. En particulier, le co-assemblage s'avère intéressant pour former des gels modulables aux propriétés sur mesures. D'un autre côté, il est possible grâce aux assemblages *self-sorted* d'intégrer des fonctionnalités ou de la sensibilité à certains stimuli tout en conservant les caractéristiques des réseaux individuels. En fonction des attentes des chercheurs, un mode d'assemblage peut être désiré plus que l'autre, expliquant les études de rationalisation du design et des protocoles de préparation des gélifiants multi-composés.

#### ***1.3.b.iv Contrôler le mode d'assemblage supramoléculaire***

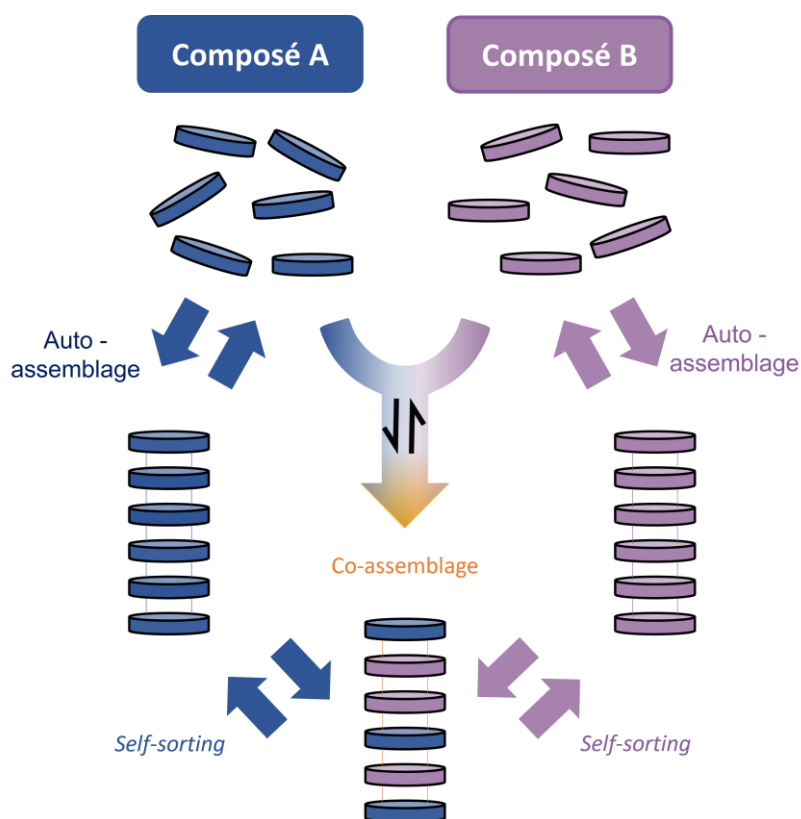
Le mode d'assemblage (co-assemblage ou *self-sorting*) observé pour un système multi-composé est à la fois dépendant de la nature de ses composés et des conditions de formulation. En effet, dans de nombreux cas, les deux états thermodynamiques sont possibles et sont en équilibre.<sup>163</sup> Dans le cas où les composés gélifiants sont seuls en solution, un seul équilibre existe entre l'état solvaté (affinité pour le solvant) et l'état assemblé (affinité du composé pour lui-même) qui permet d'obtenir cet état métastable qu'est le gel (ni solution, ni cristal ou précipité). Dans le cas d'un système bi-composé, il existe deux équilibres d'auto-assemblage ainsi qu'un équilibre supplémentaire entre l'état *self-sorted* et l'état co-assemblé (Figure I-18).<sup>176</sup> Dans le cas de tri-composés ou plus, les états possibles sont démultipliés, augmentant exponentiellement la complexité des systèmes.

L'étude des systèmes bi-composés a mis en lumière certaines caractéristiques des différents modes d'assemblage. Ainsi, le mécanisme du *self-sorting* est basé sur une reconnaissance spécifique des composés avec eux-mêmes, au détriment du co-assemblage où l'interaction hétéro-composés prime.<sup>400</sup> Par conséquent, des composés de tailles ou de chiralités différentes favorisent plutôt le *self-sorting*,<sup>108,403,405,431</sup> tandis que des molécules similaires ou aux modes d'interactions complémentaires vont avoir tendance à se co-assembler.<sup>105,165,176</sup> Néanmoins, certains systèmes sont capables d'entreprendre les deux types d'assemblage, en fonction des conditions de préparation notamment. Des chercheurs ont par conséquent mis au point des méthodes pour sélectionner préférentiellement l'assemblage *self-sorted*: initiation de la fibrillation avant de mélanger les composés,<sup>163</sup> changement progressif du pH (pour les composés sensibles à des pH différents)<sup>397,411,432</sup> ou

contrôle cinétique (acidification lente ou rapide par exemple).<sup>394,433</sup> Sachant que des gels formulés à partir des mêmes composés peuvent avoir des propriétés différentes selon le mode d'assemblage *self-sorted* ou co-assemblage,<sup>163,394,434</sup> il peut être intéressant de pouvoir déclencher le passage d'un état à l'autre pour adapter les propriétés des gels, formant ainsi de nouveaux matériaux intelligents.<sup>435</sup>

Par conséquent, une plus grande compréhension des mécanismes régissant les assemblages multi-composés, plus complexes que les systèmes mono-composés, permettrait aux chercheurs d'obtenir des gels aux propriétés nouvelles, modulables, contrôlées et sur mesures.<sup>170,416</sup> Aussi, les conditions de préparation mais également les choix des designs moléculaires de chaque composé ont une importance non négligeable dans les propriétés finales des gels. Au travers des exemples précédents sont ressorti des composés provenant de nombreuses classes de molécules organiques (peptides, peptides amphiphiles, dendrimères, dérivés d'uréthanes, d'urées ou de sucres).<sup>35,168,357</sup> Parmi ceux-ci, les peptides ont particulièrement attiré l'attention des chercheurs dans le cadre de la formulation de gels mono-composé par leur grande versatilité, les nombreuses possibilités de modification de leur structure et leur caractère biocompatible (Partie I.1). Ils ont ainsi été fortement plébiscités pour le développement de gels (et plus particulièrement d'hydrogels) multi-composés.





**Figure I-18.** Représentation schématique des équilibres d'association/dissociation régissant un système constitué d'un composé A et d'un composé B, capables chacun d'auto-assemblage et, ensemble de co-assemblage.

### I.3.c Hydrogels supramoléculaires peptidiques multi-composés

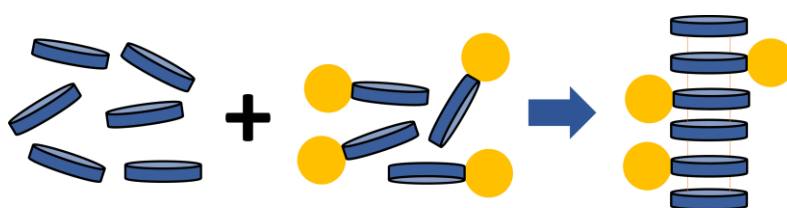
Les peptides et dérivés peptidiques sont largement utilisés en tant que gélifiants pour le développement d'hydrogels peptidiques supramoléculaires. Pourtant, malgré la diversité de structures moléculaires possibles et de modifications permettant d'améliorer de façon rationnelle les propriétés de ces gels, les scientifiques sont encore à la recherche de nouveaux systèmes finement modulables et intelligents, capables d'être adaptés à tout instant aux besoins des chercheurs. Comme présenté plus haut, l'approche multi-composés peut s'avérer fructueuse dans le développement de matériaux innovants et a été appliquée avec succès pour générer de nouveaux hydrogels peptidiques aux applications potentielles multiples.<sup>353,421</sup> Cinq grandes stratégies sont principalement suivies pour concevoir de tels gels, présentées ci-après.

### ***1.3.c.i Introduire une nouvelle fonction par co-assemblage***

Comme discuté précédemment, l'approche multi-composé peut permettre d'intégrer certaines fonctions particulières au sein des gels. Concernant les hydrogels supramoléculaires peptidique, une stratégie possible consiste à associer un peptide capable de gélifier avec le même peptide portant la fonction désirée (Figure I-19). Ce type de mélange produit le plus souvent un co-assemblage, à condition que la structure ne soit pas trop déséquilibrée par la présence du groupe fonctionnel. Il est également possible d'incorporer le peptide fonctionnalisé en proportion faible pour minimiser la perturbation induite par sa présence.<sup>163</sup>

Cette stratégie est plutôt répandue,<sup>164</sup> notamment pour formuler des gels ayant vocation à être utilisés en tant que biomatériaux. En effet, les hydrogels peptidiques supramoléculaires sont fortement plébiscités dans ce domaine pour leur similarité avec la matrice extracellulaire (Partie I.1).<sup>57</sup> Néanmoins, afin de favoriser l'attachement et la prolifération cellulaire sur (ou dans) le matériau, la présence d'épitopes particuliers peut être nécessaire. L'approche multi-composé peut permettre l'exposition de ces motifs bio-fonctionnels de manière homogène au sein du gel en ne perturbant que peu sa structure.<sup>164</sup> Surtout, la modulation de propriétés biologiques des gels multi-composés de ce type ne nécessite que de modifier les proportions entre chaque constituant là où les matériaux formés à partir d'un seul peptide bio-conjugué nécessiteraient de revoir le design moléculaire ou les conditions de préparation.<sup>428</sup>

Un exemple d'hydrogel de type peptide/peptide fonctionnalisé a déjà été décrit plus haut concernant le co-assemblage du peptide Q<sub>11</sub> avec son dérivé Q<sub>11</sub>-RGD (Tableau I-2), qui forment des hydrogels potentiellement intéressants pour de la culture cellulaire 2D ou 3D.<sup>163</sup>



**Figure I-19.** Représentation schématique de la stratégie consistant à associer un peptide et son dérivé fonctionnalisé afin d'introduire une fonction supplémentaire au sein d'un hydrogel peptidique

De nombreux hydrogels multi-composés peptide/peptide-motif biologique ont été reportés à partir de gélifiants connus de la famille des peptides RADA16 et EAK16 notamment (Tableau I-1, Partie I.1.c). Ainsi, le mélange de ces peptides avec leurs équivalents greffés de motifs

peptidiques biologiques divers (allant du motif d'adhésion cellulaire RGD à des motifs plus longs de 8 acides aminés tels que SKPPGTSS et PFSSTKT capables d'interagir avec les cellules de la moelle osseuse,<sup>436</sup> à 15 pour KLTWQELYQLKYKGI, un ligand agoniste du facteur de croissance VEGF) a été réalisé pour former des hydrogels bio-fonctionnalisés. Les recherches ont permis de montrer un certain potentiel de ces matériaux co-assemblés, notamment au départ de dérivés de RADA-16 pour favoriser la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire *in vitro*,<sup>211,437-440</sup> l'angiogenèse, ou le développement de cardiocytes *in vivo*.<sup>205,441</sup> Des systèmes multi-composés à partir de dérivés de EAK-16 ont également été proposés avec des gels permettant l'attachement d'anticorps, pour le traitement de tumeurs cancéreuses<sup>442,443</sup> ou la cytopoïèse de lymphocytes T *in vivo*.<sup>444,445</sup>

Peptides	Séquence	Stratégie	Ref.
Q <sub>11</sub> + Q <sub>11</sub> -RGD	Ac-QQKFQFQFEQQ-NH <sub>2</sub> + Ac-GGRGDSGGGQQKFQFQFEQQ-NH <sub>2</sub>	Bio-fonctionnalisation par co-assemblage	163
FEKII + FEKII-18	FEFEFKFK + FEFEFKFK- <b>GG</b> -FKFKFEFE	Réticulation	425
SA5N + SA21	SFFSF-NH <sub>2</sub> + SFFSF- <b>GVPGVGVPGVG</b> -SFFSF-NH <sub>2</sub>	Réticulation	446
Lys-Q <sub>11</sub> + Cys-Q <sub>11</sub>	Ac-GGKSGSGQQKFQFQFEQQ-NH <sub>2</sub> + Ac- <b>CSGSGQQKFQFQFEQQ</b> -NH <sub>2</sub>	Réticulation	163
Fmoc-(3F)FD + Fmoc-(3F)FR	<b>Fmoc</b> -(3F)FD + <b>Fmoc</b> -(3F)FR	Mélange de peptides aromatiques	429
L-Ac-(FKFE) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> + D-Ac-(FKFE) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	L-Ac-FKFEFKFE-NH <sub>2</sub> + D-Ac-FKFEFKFE-NH <sub>2</sub>	Mélange d'énantiomères	447
MAX1 + DMAX1	VKVKVKVKV <sup>D</sup> PPTKVKVKVKV-NH <sub>2</sub> + VKVKVKVKV <sup>L</sup> PPTKVKVKVKV-NH <sub>2</sub>	Mélange d'énantiomères	448
ZDFD-NH-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> + ZFKFK-NH-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	Cbz- <b>ZDFD</b> -NH-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> + Cbz- <b>ZFKFK</b> -NH-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	Mélange de peptides de charges opposées	449

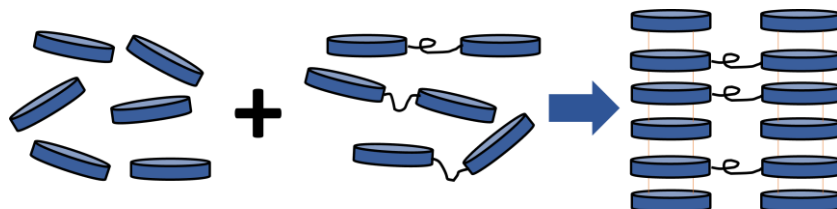
**Tableau I-2.** Couples de peptides proposés dans le cadre de la formulation d'hydrogels supramoléculaires multi-composés et stratégies illustrées.

D'autres systèmes de ce type, développés à partir d'autres séquences peptidiques, ont également montré leur intérêt pour la culture de cellules osseuses par exemple.<sup>450</sup> Certains chercheurs ont poussé plus loin ce type de stratégie en proposant des mélanges de plus de deux composés bio-fonctionnalisés : Jung *et al.* (2011)<sup>451</sup> ont établi un plan d'expérience multifactoriel permettant l'étude de l'influence de trois peptides dans un hydrogel à visée biomédicale, testant des formulations contenant un à quatre composés en proportions diverses.

Enfin, bien que cette stratégie soit essentiellement utilisée pour intégrer des motifs bio-fonctionnels, elle peut également être envisagée pour introduire des groupements réactifs ou encore des sondes fluorescentes.<sup>452</sup> L'avantage des co-assemblages peptidiques mis en avant par ces exemples est la possibilité de générer facilement de nouveaux gels fonctionnels sans devoir constamment concevoir de nouvelles molécules à la fois actives et gélifiantes : il suffit d'associer un peptide déjà connu pour ses propriétés de gélification avec ce même peptide fonctionnalisé. Néanmoins cette approche a montré ses limites lorsque la fonctionnalisation vient perturber l'assemblage. Dans le cadre de l'intégration de groupes fonctionnels volumineux il est parfois nécessaire de modifier la partie peptidique gélifiante en lui adjoignant un bras espaceur (« *spacer* », en anglais) par exemple.<sup>205,452</sup>

### ***1.3.c.ii Générer des points de jonctions par réticulation du réseau supramoléculaire***

Les propriétés mécaniques des gels sont directement liées à leur structure interne.<sup>150,154,155</sup> En particulier, dans le cas des systèmes fibrillaires, la morphologie des fibres mais surtout la densité du réseau et le nombre de points de jonction sont des facteurs importants influençant la force des gels. Ainsi, des stratégies visant à améliorer la réticulation des hydrogels peptidiques ont été développées.



**Figure I-20.** Représentation schématique de la stratégie consistant à associer un peptide et son dérivé plus long comportant deux séquences de ce même peptide, séparées par un bras afin d'apporter une réticulation entre les assemblages.

Le co-assemblage d'un peptide avec un système plus long comportant deux séquences de ce même peptide séparées par un bras espaceur est une approche particulièrement intéressante (Figure I-20). Par exemple Boothroyd *et al.* (2014)<sup>425</sup> ont associé le peptide FEKII et son dérivé FEKII18 (Tableau I-2) afin de former des hydrogels multi-composés. Les observations effectuées en microscopie TEM indiquent que les deux composés se co-assemblent pour former un seul type de fibres dont le réseau présente de nombreuses jonctions (fagots, ou « *bundles* » en anglais). Cette structure réticulée explique les propriétés mécaniques du gel, plus élevées que pour FEKII seul ( $G' \approx 2000$  Pa pour le mélange à 28 % molaires en FEKII18,

contre  $G' \approx 70$  Pa seulement pour le composé FEKII seul, comparés à même concentration totale  $C = 20$  mg/mL). De plus, cette force est modulable en modifiant le ratio entre FEKII et FEKII18 : des pourcentages molaires entre 2 et 28 % en FEKII18 permettent d'atteindre des modules élastiques compris entre 300 et 2000 Pa. Dans le cadre du développement de supports de culture cellulaire, cette stratégie a permis à Scelsi *et al.* (2019)<sup>446</sup> d'effectuer simplement du criblage parmi différents gels contenant des proportions variables de SA5N et SA21 (Tableau I-2), aux propriétés mécaniques distinctes pour la culture de fibroblastes. Leur objectif prochain sera d'évaluer la pertinence de ces gels multi-composés pour la culture d'autres types cellulaires, cherchant ainsi à offrir un système versatile dont les propriétés seront facilement adaptables en fonction des besoins.

Une autre approche proposée afin de moduler la réticulation d'un réseau multi-composé fait intervenir un bras réticulant externe. Par exemple, les peptides Lys-Q<sub>11</sub> et Cys-Q<sub>11</sub> (Tableau I-2) forment un hydrogel multi-composé au réseau *self-sorted*.<sup>163</sup> Ils présentent chacun une fonction réactive : amine primaire pour Lys-Q<sub>11</sub> et fonction thiol pour Cys-Q<sub>11</sub>. Ainsi, à l'ajout d'un bras bifonctionnel *N*-maléimidopropionamido-(PEG)<sub>12</sub>-succinimide portant un acide carboxylique activé (capable de réagir avec une amine pour former un amide) et une fonction maléimide (capable de former une liaison soufre-carbone avec un thiol), une réticulation covalente s'effectue, ayant pour conséquence une nette rigidification du gel : le module élastique  $G'$  passe ainsi d'un peu plus de 50 kPa à plus de 100 kPa. Cette réticulation n'est en revanche pas réversible.

Si nous étendons cette discussion aux nucléopeptides, l'utilisation de systèmes multi-composés pour effectuer la réticulation d'un hydrogel n'est clairement pas sans intérêt. Déjà discutée ci-avant (voir Partie I.2.d et schéma (c), Figure I-9), l'utilisation de brins d'ADN capable de former des « ponts » entre les fibres du réseau peptidique a été reportée par DiMaio *et al.* (2017).<sup>133</sup> Ici encore, l'augmentation des points de contacts au sein du réseau fibrillaire entraîne une amélioration des propriétés mécaniques des hydrogels (en présence du brin d'ADN, le module élastique de l'hydrogel passe de 140 à 250 Pa).

La modulation des propriétés mécaniques des gels peut par conséquent s'effectuer facilement par ce type d'approche multi-composé employant une réticulation inhérente ou externe au système.

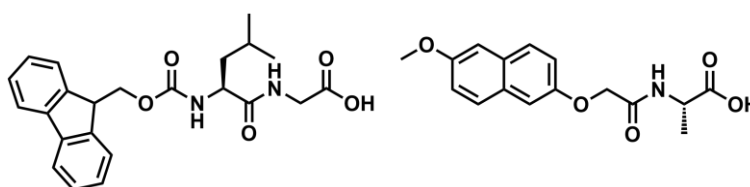
### ***1.3.c.iii Mélanges de peptides aromatiques***

Parmi les modifications de peptide réalisées afin de favoriser l'auto-assemblage, l'ajout de groupements aromatiques est probablement parmi les plus fréquentes.<sup>121,130,432</sup> Dans le cadre de la formulation de gels multi-composés, la présence de ces groupements favorise les interactions entre composés de natures différentes et permet la plupart du temps de former des co-assemblages (bien que quelques systèmes *self-sorted* soient également reportés)<sup>366</sup> entre des peptides plutôt différents par ailleurs. De fait, cette démarche permet assez aisément de combiner des propriétés de peptides au sein d'un même hydrogel.

Ainsi, avec le même objectif que la stratégie peptide/peptide fonctionnalisé, il est possible d'introduire des motifs bio-fonctionnels au sein du gel sans perturber le mécanisme d'assemblage.<sup>383</sup> Plusieurs auteurs ont par exemple reporté des mélanges Fmoc-peptide<sub>1</sub> + Fmoc-peptide<sub>2</sub> où, soit l'un des deux composés est connu pour former des gels (Fmoc-FF généralement) et l'autre apporte la bio-fonctionnalisation (Fmoc-RGD,<sup>453</sup> Fmoc-GFFRGD, Fmoc-GFFGER, Fmoc-DDIKVAV,<sup>428</sup> Fmoc-X avec X = R, K, S ou D),<sup>454,455</sup> soit les composés portent tous les deux des motifs bio-fonctionnels.<sup>383,385,388</sup> A nouveau, la modulation du ratio permet d'influencer l'exposition des motifs bio-fonctionnels afin de trouver les conditions idéales pour former des matériaux bioactifs. Un exemple intéressant d'hydrogel multi-composé de ce type a été proposé par Liyanage *et al.* (2015)<sup>429</sup> comprenant les peptides fluorés Fmoc-(3F)FD et Fmoc-(3F)FR ne portant ni l'un ni l'autre de motifs biologiquement intéressants (Tableau I-2). Pourtant, les auteurs ont montré que les gels issus du co-assemblage de ces deux composés (à ratio 1:1 et 3:2, notamment) sont capables de promouvoir l'adhésion cellulaire. En effet, l'intégrine des cellules, protéine reconnaissant normalement le site de liaison de la fibronectine, a été démontrée comme étant en interaction avec la structure du co-assemblage. Cela s'explique par le fait que la présence au sein des fibres du gel multi-composé des acides aminés arginine (R) et acide aspartique (D) de manière contigüe a permis l'exposition d'un analogue supramoléculaire du motif RGD, reconnaissable par l'intégrine.<sup>213</sup> Cette étude a, d'une part, apporté des éléments de compréhension concernant la reconnaissance du motif RGD par les cellules, et d'autre part, ouvert la voie vers de nouveaux designs de gélifiants moléculaires co-assemblés pour des applications biomédicales. Ainsi, diverses applications sont proposées pour ces gels multi-composés à partir de peptides aromatiques, allant de la culture et l'encapsulation de fibroblastes,<sup>385,428,453</sup>

de chondrocytes,<sup>455</sup> ou de myoblastes,<sup>383</sup> à l'encapsulation de cellules neuronales dans un gel injectable pour de la thérapie cellulaire régénérative,<sup>388</sup> en passant par la formation de supports pour la régénération de tissus osseux.<sup>454</sup>

Outre les propriétés biologiques, l'approche multi-composé est un moyen de moduler facilement les propriétés mécaniques de gels peptidiques aromatiques.<sup>120,169,432,456,457</sup> Cette modulation peut avoir notamment un intérêt dans la cadre de la culture de cellules souches où des gels de modules viscoélastiques différents peuvent provoquer la différenciation des cellules en types distincts.<sup>354</sup> Le mélange de peptides aromatiques permet également de combiner certaines propriétés des gels « parents » au sein d'un même hydrogel (thixotropie,<sup>117</sup> chélation de métaux,<sup>458</sup> sensibilité à l'environnement<sup>459</sup>). La formation d'hydrogels intelligents (dont l'intérêt a été souligné plusieurs fois au fil de ce chapitre) est notamment possible, avec pour exemple notable le couple de peptides aromatiques proposé par Fuente-Caparrós *et al.* (2019)<sup>366</sup> (Figure I-21) dont le gel multi-composé est thermosensible. Ce gel présente en particulier deux températures de transition ( $T_{m1} \approx 40$  °C et  $T_{m2} \approx 65$  °C) et la capacité à se régénérer après refroidissement, mais selon un parcours thermodynamique différent donnant lieu à un gel aux propriétés encore différentes. Ce type de comportement serait selon les auteurs prometteur pour des applications de libération contrôlée de composés.



**Figure I-21.** Structures moléculaires du couple de composés formant des hydrogels multi-composés, développés par Fuentes-Caparrós *et al.* (2019).<sup>366</sup>

Pour conclure sur les hydrogels peptidiques aromatiques multi-composés, l'utilisation de ce type de design permet d'obtenir des gels aux propriétés contrôlées et à forts potentiels dans le domaine biomédical. La présence des groupements aromatiques favorise le co-assemblage en stabilisant par interactions de  $\pi$ -stacking les structures formées, et en facilitant la rencontre des composés lors de l'assemblage. En effet, certains auteurs ont montré que la cinétique et le mode d'assemblage de ces systèmes sont fortement influencés par la nature de la partie aromatique (richesse en électron, forme des orbitales moléculaires, encombrement stérique).<sup>118,123,429</sup>

### ***1.3.c.iv Mélanges de peptides de stéréochimies différentes***

Bien que les peptides et protéines naturelles soient composés d'acides aminés de la série L, l'utilisation d'acides aminés de la série D a permis aux chercheurs d'ouvrir la voie vers de nouvelles structures peptidiques gélifiantes intéressantes (voir Introduction générale). En effet, dans le cadre de l'auto-assemblage supramoléculaire, des configurations de peptides différentes peuvent impliquer la formation de nanostructures distinctes et donc des propriétés différentes.<sup>162,460,461</sup> L'idée de systèmes supramoléculaires multi-composés mettant en présence des couples de peptides énantiomères n'est pas nouvelle et entraîne en théorie la formation de feuillettes  $\beta$  ondulés (« *rippled  $\beta$ -sheets* » en anglais) une morphologie d'assemblage qui pourrait donner lieu à des gels.<sup>462,463</sup> Pourtant cette stratégie a assez peu été employée, s'avérant parfois délétère pour les assemblages.<sup>464,465</sup>

Swanekamp *et al.* (2012)<sup>447</sup> ont effectué le mélange du peptide amphipathique ionique L-Ac-(FKFE)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> avec son stéréoisomère D-Ac-(FKFE)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>. Chacun des deux peptides est capable de s'auto-assembler en rubans hélicoïdaux lévogyres pour L-Ac-(FKFE)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> et en rubans hélicoïdaux dextrogyres pour D-Ac-(FKFE)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, de dimensions quasi identiques (diamètres  $d = 8.3$  nm et  $d = 8.2$  nm, respectivement, hélices de pas  $p \approx 19$  nm pour les deux, bien que leurs sens soient contraires). En revanche, lorsqu'ils sont mis en présence, ces peptides se co-assemblent de manière spécifique, c'est-à-dire que leur répartition au sein des structures mixtes est régulière, (voir ci-avant, Partie 1.3.b.iii) alternant feuillettes de L-Ac-(FKFE)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> et D-Ac-(FKFE)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>. L'hydrogel multi-composé résultant présente des propriétés améliorées : la présence du composé L-Ac-(FKFE)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> induit une meilleure résistance du gel à la protéolyse et sa rigidité est plus élevée que celles des gels mono-composés « parents » ( $G' \approx 2600$  Pa pour le co-assemblage, contre  $G' \approx 1900$  Pa et  $2000$  Pa pour les gels de L-Ac-(FKFE)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> et D-Ac-(FKFE)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, respectivement).<sup>466</sup>

L'utilisation d'acides aminés de la série D a également été étudiée pour des peptides formant une épingle  $\beta$ . Nagy *et al.* (2011)<sup>448</sup> ont caractérisé un mélange du peptide MAX1 (Partie 1.1.c et Tableau I.1) et de son dérivé DMAX1 (Tableau I-2) qui forment des hydrogels aux propriétés mécaniques bien plus élevées que celles des composés seuls (modules élastiques presque quadruplés). De plus, l'évolution du module élastique en fonction du ratio de chaque composé présente une corrélation quadratique dont la parabole est centrée sur 1 :1, montrant la stœchiométrie de l'interaction entre MAX1 et DMAX1 à l'origine de la synergie observée.



L'interaction favorable entre les couples de peptides énantiomères accentue la stabilité des structures formées par co-assemblage, entraînant l'amélioration des propriétés des hydrogels multi-composés, par comparaison aux mono-composés.

### ***1.3.c.v Structures moléculaires portant des charges complémentaires***

Comme expliqué précédemment, le mécanisme de co-assemblage se fonde sur une interaction favorisée des composés mis en présence entre eux, plutôt qu'avec les molécules de même nature. Une dernière stratégie mise en œuvre cherche à favoriser l'interaction entre composés de natures différentes par un design rationnel des molécules mises en jeu, introduisant par exemple une complémentarité de charges.

Des couples de composés présentant des charges complémentaires ont par conséquent été conçus pour la formulation de gels multi-composés. Dans la majorité des cas, les structures supramoléculaires se forment par co-assemblage des peptides de charges opposées (le *self-sorting* de ce type de système reste assez rare),<sup>467</sup> favorisé par l'association en paires d'ions. Surtout, en plus de promouvoir les interactions entre composés de natures différentes, la présence d'une charge globale sur ces peptides défavorise l'auto-assemblage par répulsion électrostatique entre les molécules du même type.<sup>468</sup> Si ce type de stratégie a déjà été proposé pour des systèmes formant des structures de type superhélices<sup>353,416</sup> la majorité concerne des peptides s'assemblant en feuillets  $\beta$ .

Les couples de peptides de charges opposées reportés s'appuient sur des motifs peptidiques déjà connus : FF,<sup>387</sup> famille Q<sub>11</sub><sup>116,420</sup> et les peptides amphipathiques ioniques. Ces derniers sont particulièrement adaptés pour concevoir des peptides complémentaires étant donnés les acides aminés chargés déjà présents dans leurs séquences alternées (Partie I.1.c). Des couples comportant un peptide amphipathique positif (alternant acides aminés apolaires et acides aminés chargés positivement) et un peptide amphipathique négatif (alternant acides aminés apolaires et acides aminés chargés négativement) ont ainsi été reportés.<sup>172,174,175</sup> Les acides aminés positifs les plus répandus dans ces designs sont la lysine (K), l'arginine (R) et l'ornithine (O) (un acide aminé non protéinogène) tandis que les acides aminés négatifs employés sont souvent le glutamate (G) et l'aspartate (D). Ainsi, les séquences de peptides amphipathiques ioniques complémentaires sont conçues de telle manière que lorsque les composés se co-assemblent en feuillets  $\beta$  antiparallèles (à l'instar de ce qui est observé pour

les assemblages mono-composés), les chaînes latérales de charges opposées soient bien en correspondance.

Une étude systématique par modélisation dynamique moléculaire a été effectuée par Seroski *et al.* (2020)<sup>468</sup> sur des couples d'hendécapeptides portant 2, 4 ou 6 charges opposées afin d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes d'assemblages ayant lieu dans ces systèmes. Selon ces travaux, plus le nombre de charge est élevé, plus le co-assemblage est rapide et plus la propension des peptides à l'auto-assemblage diminue. Les assemblages formés sont plutôt de type spécifique avec alternance régulière des peptides de natures différentes.<sup>469</sup>

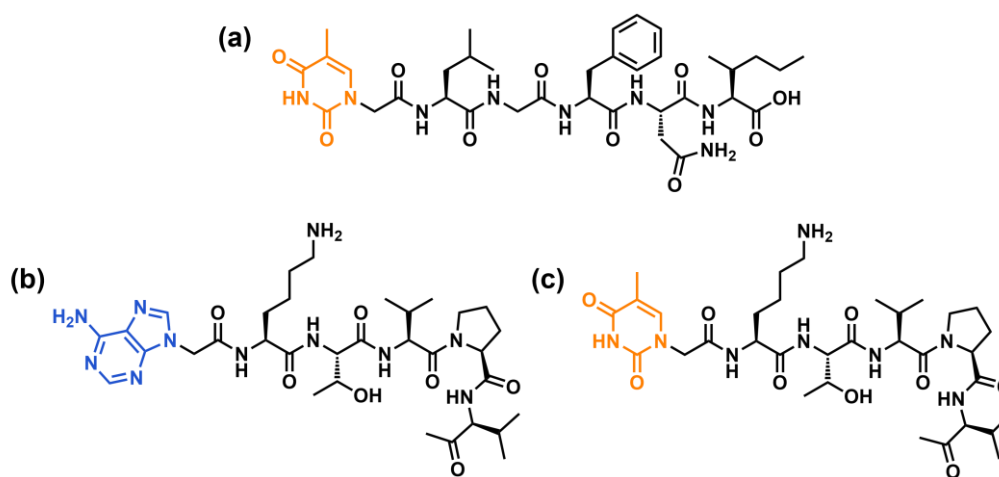
Concernant la longueur des séquences peptidiques, la majorité des peptides aux charges complémentaires reportés présentent au moins huit acides aminés afin de stabiliser au mieux les structures de type feuillets  $\beta$ . Néanmoins, des systèmes plus courts sont possibles, comme l'ont attesté Tena-Solsona *et al.* (2014)<sup>449</sup> avec les dérivés peptidiques ZDFD-NH-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> et ZFKFK-NH-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> (Tableau I-2). Ces deux composés, incapables de gélifier seuls, forment un hydrogel par co-assemblage à pH = 7. De manière intéressante, ZDFD-NH-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> et ZFKFK-NH-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> forment respectivement des gels en milieu acide et en milieu basique conférant à leur hydrogel multi-composé une sensibilité au pH particulière : ce mélange forme un gel à tous les pH, mais ses propriétés se modifient en fonction de l'appauvrissement du système co-assemblé en ZDFD-NH-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> en milieu basique et en ZFKFK-NH-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> en milieu acide (conditions pour lesquelles ceux-ci se solubilisent). Aussi, cette approche a été étendue à d'autres dérivés peptidiques, en particulier aux peptides amphiphiles,<sup>173,419,426,470,471</sup> peptides modifiés connus pour donner lieu à des hydrogels supramoléculaires mono-composés.

### ***1.3.c.vi Nucléopeptides portant des bases nucléiques complémentaires***

Comme présenté Partie I.2.d, des hybrides peptides/acides nucléiques ont montré leur intérêt dans le cadre de la formulation d'hydrogels supramoléculaires mono-composés. Dans quelques cas seulement, les chercheurs ont mis à profit la capacité naturelle des bases nucléiques à interagir par liaisons hydrogène spécifiques (appariements de Watson-Crick notamment) pour former des gels multi-composés à partir de nucléopeptides aux bases complémentaires.

Ainsi, certains groupes de chercheurs ont examiné l'effet de systèmes multi-composés nucléopeptidiques s'appuyant sur la complémentarité des bases nucléiques. Dans la majorité

des cas s'observe une synergie entre les nucléopeptides complémentaires, allant de l'amélioration des propriétés mécaniques des gels,<sup>335,347</sup> à l'existence même de l'hydrogel.<sup>151,320</sup> En effet, les composés Thymine-LGFNI et Adénine-KTTPV ((a) et (b), Figure I-22, respectivement), dont les parties peptidiques sont inspirées de domaines protéiques connus pour interagir ensemble fortement, ne sont capables de former un gel que si les bases nucléiques qu'ils portent sont complémentaires (adénine + thymine) alors que le mélange de Thymine-LGFNI et Thymine-KTTPV (thymine + thymine, (a) et (c) Figure I-22) échoue à former un hydrogel.



**Figure I-22.** Structures moléculaires des nucléopeptides étudiés par Yuan et al. (2015)<sup>320</sup> dans le cadre de la formulation d'hydrogels supramoléculaires multi-composés.

Dans le cas des travaux de Li *et al.* (2011)<sup>346</sup> et de Baek *et al.* (2019),<sup>347</sup> les nucléopeptides étudiés ((a) et (b), Figure I-10, respectivement) sont capables de former des hydrogels seuls. Néanmoins, le mélange des composés portant des bases nucléiques complémentaires donne des hydrogels multi-composés aux modules viscoélastiques plus élevés que ceux des hydrogels mono-composés. Par exemple, le gel multi-composé associant Thy-FF et Adé-FF forme un gel au module élastique ( $G' = 18\ 000$  Pa) bien supérieur au gel de Thy-FF seul ( $G' = 2,9$  Pa). Les auteurs de cette étude ont ensuite effectué des « *mismatches* », c'est-à-dire qu'ils mélangent des nucléopeptides dont les bases ne sont pas complémentaires (thymine + guanine ou thymine + cytosine, par exemple). Les gels formés dans ces cas présentent des modules élastiques plus faibles ( $G' \approx 2000$  Pa, et  $G' \approx 30$  Pa) ce qui souligne l'intérêt d'associer les bases complémentaires. Baek *et al.* (2019) s'appuie quant à eux sur la modélisation moléculaire pour justifier que cette synergie est bien due à une interaction spécifique de type Watson-Crick entre les nucléobases.

Enfin, Freeman *et al.* (2018),<sup>322</sup> dont les travaux ont déjà été discutés Partie I.2.d, ont donné un autre exemple de cette stratégie, en associant des peptides amphiphiles greffés par des brins d'ADN (10 nucléotides) complémentaires capables de former des « ponts » interfibrilles afin d'augmenter la réticulation des gels et leurs propriétés mécaniques (c, Figure I-9).

Les systèmes multi-composés de ce type, associant des nucléopeptides portant des bases nucléiques complémentaires afin de favoriser la formation ou la réticulation des hydrogels supramoléculaires résultants, sont aujourd'hui encore rare. Néanmoins, les quelques exemples reportés démontrent le potentiel indéniable d'une telle approche pour former des hydrogels nucléopeptidiques présentant des propriétés nouvelles grâce à la synergie de leurs constituants.

### ***1.3.c.vii Conclusion***

Ainsi différentes stratégies ont été développées afin de générer des hydrogels supramoléculaires peptidiques multi-composés aux propriétés intéressantes. Le choix du design moléculaire des deux (ou plus) peptides mis en présence est crucial et doit être raisonné afin de correspondre aux attentes en termes de propriétés. En particulier, le choix de systèmes complémentaires (par des charges opposées, des liaisons hydrogène spécifiques, des systèmes aromatiques) permet de favoriser un comportement de co-assemblage plutôt que de *self-sorting*. Aux travers de nombreux exemples, nous avons montré que le co-assemblage permet de combiner les propriétés des gels « parents » au sein du gel multi-composés, d'y intégrer des fonctions d'intérêt (bio-fonctionnalisation notamment) et d'améliorer ses propriétés mécaniques par un effet de synergie. En outre, le ratio entre les deux composés est un paramètre clé du co-assemblage, qui donne aux chercheurs la possibilité d'adapter finement les propriétés des hydrogels peptidiques multi-composés aux besoins des applications souhaitées.

## **1.4 Conclusion**

Pour conclure, les hydrogels supramoléculaires peptidiques sont des matériaux de grand intérêt dans le cadre du développement de nanomatériaux et en nanotechnologie, mais ils s'avèrent tout particulièrement adaptés pour des applications dans le domaine biomédical. Leur forte teneur en eau, leur biocompatibilité, leur faible immunogénicité, leurs propriétés mécaniques et leur sensibilité aux stimuli environnementaux sont autant d'atouts qui font de ces gels un sujet central dans le développement de biomatériaux aux propriétés optimisées et

parfaitement contrôlées. De nombreuses structures peptidiques gélifiantes ont été reportées, allant des systèmes directement inspirés de la nature aux peptides amphipathiques ioniques conçus par design rationnel afin de contrôler finement l'auto-assemblage. La meilleure compréhension du lien structure/propriété, acquise au fil des années, permet de plus en plus aux scientifiques de concevoir des hydrogels supramoléculaires aux propriétés adaptés aux applications visées.

Pourtant, les possibilités de structures moléculaires de peptides gélifiants constitués uniquement d'acides aminés naturels sont limitées et c'est la raison pour laquelle les chercheurs se sont tournés vers des modifications avantageuses, générant ainsi de nouvelles classes de molécules gélifiantes dérivées des peptides. Parmi celles-ci, les nucléopeptides se sont avérés particulièrement prometteurs. Ces hybrides peptides/acides nucléiques, par leur appartenance à deux grandes familles de biomolécules, possèdent à la fois les propriétés structurales et fonctionnelles des peptides et des acides nucléiques. Ces derniers confèrent notamment aux nucléopeptides la possibilité d'interagir avec l'ADN ou l'ARN naturels, ainsi que des capacités de structuration particulières liées aux nombreuses possibilités d'interaction des bases nucléiques, par liaisons hydrogène spécifiques ou  $\pi$ -stacking aromatique notamment. Ainsi, l'intérêt de nombreuses structures nucléopeptidiques, conçues par greffage d'une partie acide nucléique sur un peptide par des stratégies diverses, a été démontré pour de multiples applications (biotechnologies, effet thérapeutique, délivrance de biomolécules), dont la formulation d'hydrogels supramoléculaires. Ces gels sont pour le moment assez peu rapportés dans la littérature malgré leur potentiel certain. Le développement de nouveaux nucléopeptides gélifiants au design raisonné, et la caractérisation multi-échelle des hydrogels formés permettrait par conséquent d'améliorer la compréhension des mécanismes régissant l'auto-assemblage et la gélification de tels systèmes, ouvrant le champ des applications possibles.

Aussi, la demande en nouveaux matériaux aux propriétés nouvelles et sur mesures a mené les chercheurs à considérer la formulation de gels de plus en plus modulables, facilement adaptables. C'est dans ce cadre que les systèmes supramoléculaires multi-composés ont vu le jour, offrant une démarche simple à mettre en œuvre pour modifier les propriétés mécaniques, photo-physiques ou biologiques des gels. Ainsi, l'approche multi-composé a été particulièrement intéressante dans le cadre de la formulation de gels supramoléculaires. Que

l'assemblage se fasse selon un mode de *self-sorting* ou de co-assemblage, les gels résultants présentent souvent les propriétés combinées de leurs gels « parents » et, dans certains cas, de nouvelles propriétés liées à une synergie entre les constituants. A nouveau, le design rationnel des systèmes est crucial afin d'obtenir des gels peptidiques bio-fonctionnalisés idéaux pour la culture ou l'encapsulation cellulaire, des gels peptidiques « intelligents » sensibles à des stimulations particulières ou des gels aux propriétés mécaniques choisies par variation adéquate du ratio entre les composés.

L'étude d'hydrogels supramoléculaires hybrides peptides/acides nucléiques multi-composés se place ainsi à la confluence des recherches concernant la conception de nouvelles structures gélifiantes bio-inspirées, la formulation d'hydrogels originaux aux propriétés intéressantes et modulables, et la compréhension fine des interactions régissant les assemblages supramoléculaires multi-composés.



# Chapitre II : Composés hybrides peptide/acide nucléique modifiés par un PNA en N-terminal : Synthèse, formulations et caractérisations multi-échelles d'hydrogels mono-composés

## II.1 Introduction

Comme discuté dans le chapitre précédent (Partie I.1, Chapitre I), les hydrogels peptidiques sont au cœur de multiples travaux de recherche et offrent de nombreuses applications. La synthèse de molécules gélifiantes « sur mesures », permettant d'obtenir *de novo* des propriétés physiques et/ou physico-chimiques particulières et ciblées, occupe une place centrale parmi les enjeux et objectifs actuels.<sup>104–106,166</sup> Pourtant, cette volonté se heurte à une réelle limitation scientifique. En effet, la compréhension des liens entre la structure moléculaire du gélifiant, son mode d'assemblage supramoléculaire, les objets nano- et microscopiques formés ainsi que les caractéristiques du matériau gel est encore loin d'être acquise, et dépend grandement des systèmes étudiés et des conditions expérimentales choisies.<sup>49,83,220</sup> Cette problématique de la relation structure/propriétés reste ouverte, et nous nous efforçons dans ce manuscrit à y apporter contribution.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la première partie de ce travail de thèse, discuté tout au long de ce chapitre. L'objectif initial a été de concevoir et de synthétiser des composés originaux hybrides peptide/acide nucléique aux propriétés nouvelles, capables de former des hydrogels dans des conditions qui se veulent biocompatibles, notamment en travaillant à pH physiologique contrôlé par l'utilisation de solutions tampons. Après un travail préliminaire afin de déterminer les conditions optimales – et parfaitement contrôlées – de formulation, les hydrogels formés ont été caractérisés en s'appuyant sur une étude multi-échelle. Cette démarche nous a ainsi permis de comprendre dans quelle mesure et de quelle manière l'introduction d'une base nucléique dans la séquence d'un peptide gélifiant modifie ses propriétés de l'échelle (supra)moléculaire à l'échelle macroscopique en passant par l'échelle microscopique.



## II.2 Design moléculaire des nucléopeptides de l'étude et choix des références

Le design des nucléopeptides, construits à partir d'une séquence peptidique fonctionnalisée par une partie acide nucléique a pour objectif de combiner des caractéristiques propres aux deux familles de biomolécules. Comme expliqué Partie I.2 (Chapitre I), les nucléopeptides forment une classe de molécules d'importance grandissante notamment dans le domaine biomédical,<sup>136–138,300</sup> mais leur utilisation pour former des hydrogels reste à ce jour peu explorée.<sup>133,140,313,314,316,319,335,347,350</sup> Notre démarche concernant le design de nouveaux nucléopeptides gélifiants a été de s'appuyer sur une séquence d'acides aminés connue pour s'auto-assembler et former des hydrogels, et d'utiliser la partie acide nucléique plutôt comme modulateur, capable d'apporter de potentielles interactions supplémentaires.<sup>347</sup> Cette approche offre un double avantage en permettant d'une part d'évaluer l'impact de l'introduction d'un acide nucléique au sein d'une séquence peptidique sur l'assemblage et sur les propriétés des hydrogels formés, et, d'autre part, de comparer les propriétés obtenues à celle d'un peptide aux caractéristiques déjà connues et reportées.

### II.2.a Choix de la partie peptidique

Parmi les peptides capables de s'auto-assembler, les peptides amphipathiques (c'est-à-dire, comportant dans leur séquence une alternance d'acides aminés hydrophobes et d'acides aminés hydrophiles) sont des plus pertinents pour former des hydrogels,<sup>86,203</sup> comme discuté précédemment (Partie I.1.c, Chapitre I). Les peptides de ce type sont connus pour s'assembler en structures feuilletés  $\beta$  dans l'eau, où les interactions polaires de leurs chaînes latérales viennent faciliter la reconnaissance intermoléculaire en plus des liaisons hydrogène du squelette peptidique. Les peptides ioniques, portant des charges sur leurs chaînes latérales polaires, sont d'autant plus concernés.<sup>155</sup>

Ainsi, le peptide FEFKFK (Phe-Glu-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Lys), déjà présenté dans le chapitre précédent (Partie I.1.c, Chapitre I), est un octapeptide amphipathique formé d'acides aminés naturels sans groupements protecteurs ni modifications, alternant dans sa séquence des phénylalanines (hydrophobes, aromatiques) et soit des acides glutamiques (hydrophiles, chargés négativement à pH neutre) soit des lysines (hydrophiles, chargées positivement à pH neutre). Il appartient donc à une classe particulière de peptides amphipathiques, dits « peptides ioniques auto-complémentaires »,<sup>202,204</sup> où les charges électrostatiques sont disposées de manière à diriger l'assemblage supramoléculaire pour former des systèmes en

feuilletés  $\beta$  antiparallèles. Les groupements latéraux chargés facilitent la formation de gels et apportent une sensibilité à la force ionique<sup>218</sup> et aux changements de pH.<sup>49</sup> Néanmoins, la charge globale de FEFEFKFK reste neutre ce qui est également un avantage dans le cadre de l'auto-assemblage puisqu'elle assure une faible répulsion entre les entités colloïdales et favorise donc leurs rencontres.<sup>173,217</sup> Aussi, FEFEFKFK est un peptide plutôt court comparé à d'autres peptides amphipathiques fréquemment reportés (par exemple RADA16 et EAK16<sup>203</sup> de 16 acides aminés ou encore MAX1<sup>192,193</sup> et MAX8<sup>197</sup> avec 20 acides aminés, voir Partie I.1.c, Chapitre I) ce qui assure un temps et un coût de synthèse moindre.<sup>155</sup> De plus, la capacité du peptide FEFEFKFK à former des hydrogels a été démontrée<sup>220,226</sup> et a fait l'objet de plusieurs études ces dernières années. Différentes conditions de formulation ont ainsi été reportées, démontrant le pouvoir gélifiant de cet octapeptide à différents pH et différents tampons, comme présenté dans le Tableau II-1. Notamment, y sont reportés les conditions de préparation (température  $T_{sol}$  et temps  $t_{sol}$  de solubilisation, type d'agitation le cas échéant, le solvant aqueux, le pH d'étude, variant des conditions acides pH = 2 - 3 pour Tang *et al.* (2014)<sup>228</sup> à plus basiques pH = 9.3 - 9.6 pour Wan *et al.* (2016),<sup>230</sup> ainsi que la concentration critique de gélification (CCG), si déterminée). Par exemple, à pH 7, celle-ci se situe entre 3.4 et 27 mM selon le mode de préparation. Les gels et assemblages supramoléculaires ont été pour la plupart caractérisés par diffusion de neutrons aux petits angles (SANS), microscopie (TEM ou AFM notamment) ou spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF). Des mesures de rhéométrie ont également été menées mais se limitent généralement à des balayages en fréquences, permettant de déterminer les modules viscoélastiques des hydrogels.

L'intérêt de FEFEFKFK dans des applications biologiques a également été prouvé, comme décrit dans la dernière colonne du Tableau II-1, dans le cadre de la délivrance de médicaments,<sup>228</sup> la culture cellulaire (chondrocytes<sup>229</sup> et cellules du nucleus pulposus bovines<sup>230</sup>; chondrocytes et cellules mésenchymateuses de lapins<sup>231</sup>; ostéoblastes,<sup>232</sup> fibroblastes<sup>233</sup> et cellules mésenchymateuses humaines<sup>234</sup>) voire l'ingénierie tissulaire.<sup>230,231,234</sup> Encore plus récemment, le peptide FEFEFKFK a été appliqué à l'encapsulation de cellules progénitrices cardiaques pour la thérapie cellulaire<sup>235</sup> et à la bio-impression de tissu osseux pour la reconstruction craniomaxillofaciale.<sup>236</sup> Il est, dans ces deux exemples, formulé avec d'autres composés (un second peptide similaire RGDPSFEFEFKFK dans le premier cas, des microparticules de phosphate de magnésium amorphe dans le second cas).

Ces multiples exemples mettent en évidence le caractère biocompatible des hydrogels supramoléculaires de FEFEFKFK et sa capacité à promouvoir l'adhésion et la prolifération de cellules.<sup>229</sup>

Certaines conditions de préparation proposées paraissent quelque peu fastidieuses à mettre en œuvre, notamment des temps de solubilisation longs (3 h pour Mujeeb *et al.* (2013),<sup>229</sup> 1 h puis 12 à 24 h en deux temps pour Castillo Diaz *et al.* (2016)<sup>234</sup> par exemple) à température > 80 °C dans la majorité des cas. Les protocoles de préparation sont peu précis sur les temps d'agitation par exemple (les temps proposés sont souvent adjoints de la mention « jusqu'à solubilisation complète »)<sup>166,220,225,227,228</sup> rappelant la difficulté à obtenir des hydrogels peptidiques homogènes.<sup>83</sup> Les données de caractérisation obtenues souffrent d'être difficilement comparables entre elles (par les conditions de préparation, le pH d'étude, la nature du solvant ou la concentration de travail) ce qui explique par exemple les divergences de CCG, mais démontrent bien le potentiel de la structure FEFEFKFK, tant en sa capacité de gélifiant que dans le cadre d'applications biologiques.

Références	Conditions de préparation	Solvant aqueux	pH	Mesures effectuées et applications proposées le cas échéant
Mohammed <i>et al.</i> , (2007) <sup>220</sup>	T <sub>sol</sub> = 90 °C t <sub>sol</sub> = 10 - 20 min	Eau deutérée sans ajustement du pH	6 - 7	CCG ≈ 7.5 mM SANS
Boothroyd <i>et al.</i> , (2008) <sup>225</sup>	T <sub>sol</sub> = 90 °C t <sub>sol</sub> = 10 - 20 min	Eau sans ajustement du pH	6 - 7	CCG ≈ 15.4 mM TEM
Saiani <i>et al.</i> , (2009) <sup>226</sup>	T <sub>sol</sub> = 90 °C	Eau mQ sans ajustement du pH	-	CCG ≈ 5 mM SANS, AFM et TEM
Mujeeb <i>et al.</i> , (2013) <sup>229</sup>	T <sub>sol</sub> = 90 °C t <sub>sol</sub> = 3 h	Eau mQ ajustée par NaOH 0.5 M	7	CCG ≈ 3.4 mM TEM, cryo-SEM, rhéologie Application : culture cellulaire 2D et 3D (chondrocytes bovines)
Boothroyd <i>et al.</i> , (2013) <sup>227</sup>	T <sub>sol</sub> = 80 °C t <sub>sol</sub> = 10 - 20 min	Eau mQ ajustée par NaOH 1 M	7	CCG ≈ 27.3 mM TEM, rhéologie, IRTF et SAXS
Castillo Diaz <i>et al.</i> , (2014) <sup>232</sup>	Vortex et centrifugation, T <sub>sol</sub> = 90 °C – t <sub>sol</sub> = 2 h ; puis après ajustement du pH : T <sub>sol</sub> = 90 °C – t <sub>sol</sub> = 10 - 12 h.	dH <sub>2</sub> O ajustée par NaOH 1 M et PBS	pH neutre	Application : culture cellulaire (ostéoblastes humains)

Références	Conditions de préparation	Solvant aqueux	pH	Mesures effectuées et applications proposées le cas échéant
Szkolar <i>et al.</i> , (2014) <sup>233</sup>	Agitation douce	PBS ajusté par NaOH	pH neutre	Application : encapsulation de cellules (Fibroblastes humains : lignée C-013-5C adulte)
Tang <i>et al.</i> , (2014) <sup>228</sup>	Vortex et sonication : $t_{sol} = 5 - 30$ min	Eau grade HPLC sans ajustement du pH	2 - 3	Rhéologie, IRTF Application : délivrance de médicament (lidocaïne, flurbiprophène)
Castillo Diaz <i>et al.</i> , (2016) <sup>234</sup>	Vortex et centrifugation (4000 min <sup>-1</sup> ), $T_{sol} = 90$ °C – $t_{sol} = 1$ h ; puis après ajustement du pH : $T_{sol} = 90$ °C $t_{sol} = 12 - 24$ h	ddH <sub>2</sub> O ajustée par NaOH 1 M et PBS	-	Rhéologie Applications : culture cellulaire (hMSCs) et support d'ingénierie tissulaire 3D (différenciation en ostéoblastes)
Wan <i>et al.</i> , (2016) <sup>230</sup>	$T_{sol} = 80$ °C – $t_{sol} = 2$ h ; puis après ajustement du pH : $T_{sol} = 80$ °C – $t_{sol} = 12$ h	dH <sub>2</sub> O ajustée par NaOH 1 M et PBS 10 X	9.3 - 9.6	Rhéologie, thixotropie Application : culture cellulaire (bNPCs) et support d'ingénierie tissulaire
Gao <i>et al.</i> , (2017) <sup>166</sup>	Vortex et sonication	Eau grade HPLC ajustée par NaOH 1 M	3	6.8 < CCG < 13.6 mM TEM, rhéologie, IRTF et SANS
Li <i>et al.</i> , (2019) <sup>231</sup>	$T_{sol} = 80$ °C – Vortex et sonication	ddH <sub>2</sub> O ajustée par NaOH	7	Rhéologie, SEM, Applications : culture cellulaire (chondrocytes de lapins et rBMSCs) et support d'ingénierie tissulaire (différenciation en chondrocytes et ostéoblastes)

**Tableau II-1.** Etudes de la littérature concernant la caractérisation des hydrogels formés à partir de l'octapeptide FEFEKFK de 2007 à 2021.

Par conséquent, la capacité de FEFEKFK à former des hydrogels a déjà été prouvée, les structures supramoléculaires que ce peptide peut former et son mode d'assemblage sont connus dans diverses conditions expérimentales. Cela nous donne un point de comparaison non négligeable lors de l'étude de composés nucléopeptidiques formés à partir de cette séquence d'acides aminés. Ce gélifiant, par sa biocompatibilité et sa biodégradabilité promet également un intérêt pour nos composés dans le cadre d'application biologiques. Aussi, rappelons que des nucléopeptides formés à partir d'une séquence peptidique alternant acides

aminés hydrophobes et acides aminés chargés n'ont encore jamais été étudiés à notre connaissance pour former des hydrogels (Partie I.2.d, Chapitre I) et ces structures originales ouvrent de nouvelles possibilités en matière d'assemblage supramoléculaire.

### II.2.b Choix de la partie acide nucléique

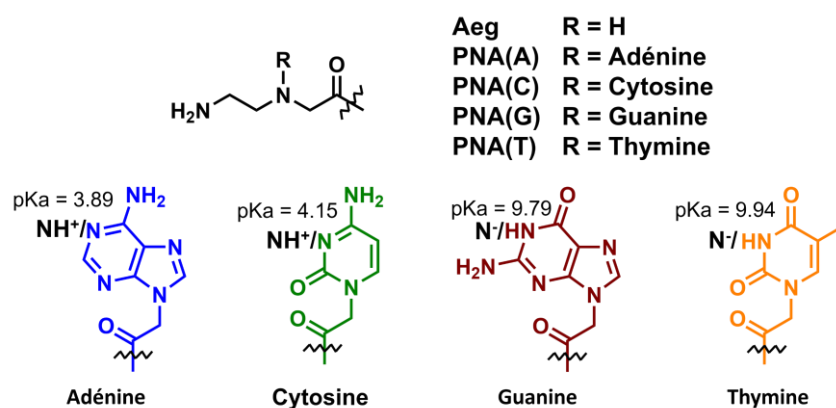
Comme présenté dans la Partie I.2.a du Chapitre I, les acides nucléiques sont déjà utilisés en nanotechnologies<sup>79,274,276,339</sup> voire pour la formation d'hydrogels supramoléculaires.<sup>80,146,269,285</sup> Des composés hybrides sont également reportés dans la littérature,<sup>4,346</sup> formés par greffage d'une partie acide nucléique sur des molécules organiques comme par exemple des dérivés aromatiques,<sup>144</sup> du cholestérol,<sup>472</sup> des dérivés alkyles,<sup>287,473,474</sup> des acides gras,<sup>475</sup> des sucres,<sup>476</sup> ou comme dans notre étude, des peptides. Dans tous ces exemples, la partie acide nucléique apporte aux molécules ses capacités de structurations particulières (nombreuses possibilités d'interactions par liaisons hydrogène, stacking aromatique)<sup>48</sup> et permet de viser des applications biologiques par sa biocompatibilité et sa possibilité à interagir avec l'ADN ou l'ARN du vivant.<sup>299</sup>

Ainsi, les bases nucléiques (ou nucléobases, à savoir adénine, cytosine, guanine, thymine et uracile) peuvent être introduites dans ces molécules, sous différentes formes,<sup>4,131</sup> notamment de ribonucléosides (voire d'ARN) ou de désoxyribonucléosides (voire d'ADN) qui sont des structures naturellement existantes, ou encore sous forme de PNA (acide nucléique peptidique) un dérivé synthétique peptidique d'acide nucléique. Les PNA, déjà décrits précédemment dans la Partie I.2.a du Chapitre I, possèdent, pour rappel, un squelette (aminoéthyl)glycine qui leur confèrent une structure proche de celle des peptides (Figure II-1). Ils sont parmi les analogues de l'ADN les plus intéressants<sup>136,248,249</sup> et présentent de nombreux avantages comparés aux acides nucléiques naturels :

- Le squelette peptidique des PNA est neutre contrairement au squelette monophosphate de l'ADN ou de l'ARN. Il n'y a donc pas de répulsion électrostatique lors de la formation de duplexes ADN/PNA ou PNA/PNA qui sont ainsi plus stables que les duplexes ADN/ADN.<sup>136,262,329,477</sup>
- Les PNA sont difficilement dégradés par les nucléases ou protéases (qui ne reconnaissent pas ces molécules synthétiques) ce qui leur confère une meilleure stabilité *in vitro* et *in vivo*.<sup>249,258,259</sup>

- Les PNA sont chimiquement stables dans une plus grande gamme de températures et de pH. Notamment, ils résistent à la dépurination, élimination d'une purine qui peut avoir lieu en milieu acide pour l'ADN ou l'ARN.<sup>136,246,247,258</sup>
- La synthèse d'oligomères de PNA ou l'ajout d'un PNA à une séquence peptidique se réalise simplement par couplages peptidiques standards, un atout non négligeable pour la synthèse d'hybrides peptides/acides nucléiques.<sup>246,247,262</sup>

Grâce à ces différents avantages, les PNA s'avèrent plus que prometteurs dans le cadre d'applications biologiques en biologie moléculaire ou en génomique fonctionnelle, pour la détection de séquences d'ADN particulière, la délivrance de médicaments, pour de la thérapie antigène et antisens par exemple.<sup>136,246,247,249,258,261</sup> Dans le cadre des nanotechnologies, l'utilisation de PNA promettrait des architectures supramoléculaires plus robustes que l'ADN ou l'ARN grâce à sa meilleure stabilité chimique, son squelette non chargé et la force de ses duplexes notamment.<sup>246,262</sup>



**Figure II-1.** Structure moléculaire des groupements PNA étudiés, et pKa associé aux couples acides/bases principaux des nucléobases.

C'est donc pour leur intérêt biologique et nanotechnologique, leurs atouts en termes de stabilité chimique et enzymatique ainsi que la possibilité de réaliser la synthèse « en ligne » des PNA avec les peptides que nous avons décidé d'introduire les bases nucléiques sous la forme d'un PNA en position N-terminale de notre séquence peptidique.

### II.2.c Choix du design des nucléopeptides

Ainsi, pour la formation de composés originaux hybrides peptides/acides nucléiques, nous avons choisi une séquence peptidique déjà connue dans le cadre de la formation d'hydrogels et d'applications biologiques, à laquelle est greffée un acide nucléique sous forme de PNA. Afin de souligner l'intérêt de cette partie acide nucléique et de comprendre finement son effet sur la capacité d'assemblage des nucléopeptides, nous avons choisi d'étudier des composés portant chacun une des quatre bases nucléiques de l'ADN (adénine, cytosine, guanine et thymine). Notons que cette approche était peu mise en œuvre dans la littérature au début du projet et reste loin d'être systématique aujourd'hui, avec seulement quelques cas dans le cadre de la synthèse de nucléopeptides hydrogélifiants.<sup>321,346,347</sup>

Notre étude comporte par conséquent quatre composés nucléopeptidiques dont le design part de la structure purement peptidique FEFEFKFK en substituant la phénylalanine N-terminale par PNA(A), PNA(C), PNA(G) ou PNA(T). Sont ainsi formés les composés purines PNA(A)-EFEFKFK et PNA(G)-EFEFKFK, et les composés pyrimidines PNA(C)-EFEFKFK et PNA(T)-EFEFKFK, dont la structure est détaillée Figure II-2.

Nous avons fait le choix de non pas adjoindre le PNA à la séquence de l'octapeptide mais plutôt d'effectuer la substitution de la phénylalanine afin de conserver une taille de molécule – les quatre nucléopeptides ont des masses molaires  $M$  comprises entre 1225 et 1266  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (voir masses exactes Tableau II-2, Partie II.3) donc proches de celle de FEFEFKFK ( $M = 1121 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), – et un équilibre d'hydrophobicité similaire à celle de FEFEFKFK (temps de rétention en HPLC proches, voir Tableau II-2, Partie II.3). La substitution, par un autre groupement, de l'acide aminé hydrophobe N-terminal d'un peptide amphipathique est une approche qui a déjà été proposée dans le but de moduler les propriétés des auto-assemblages formés.<sup>86</sup>

Le PNA est introduit en N-terminal dans la séquence (plutôt qu'au sein de la séquence ou en C-terminal) afin de favoriser les interactions interfibrillaires faisant intervenir les bases nucléiques.<sup>146</sup> En outre, nous avons décidé de laisser son amine N-terminale, tout comme l'acide carboxylique C-terminal, sous formes libres sans modifications, comme c'est le cas pour FEFEFKFK dans les études le concernant (voir Tableau II-1).

### II.2.d Choix des composés de référence pour l'étude

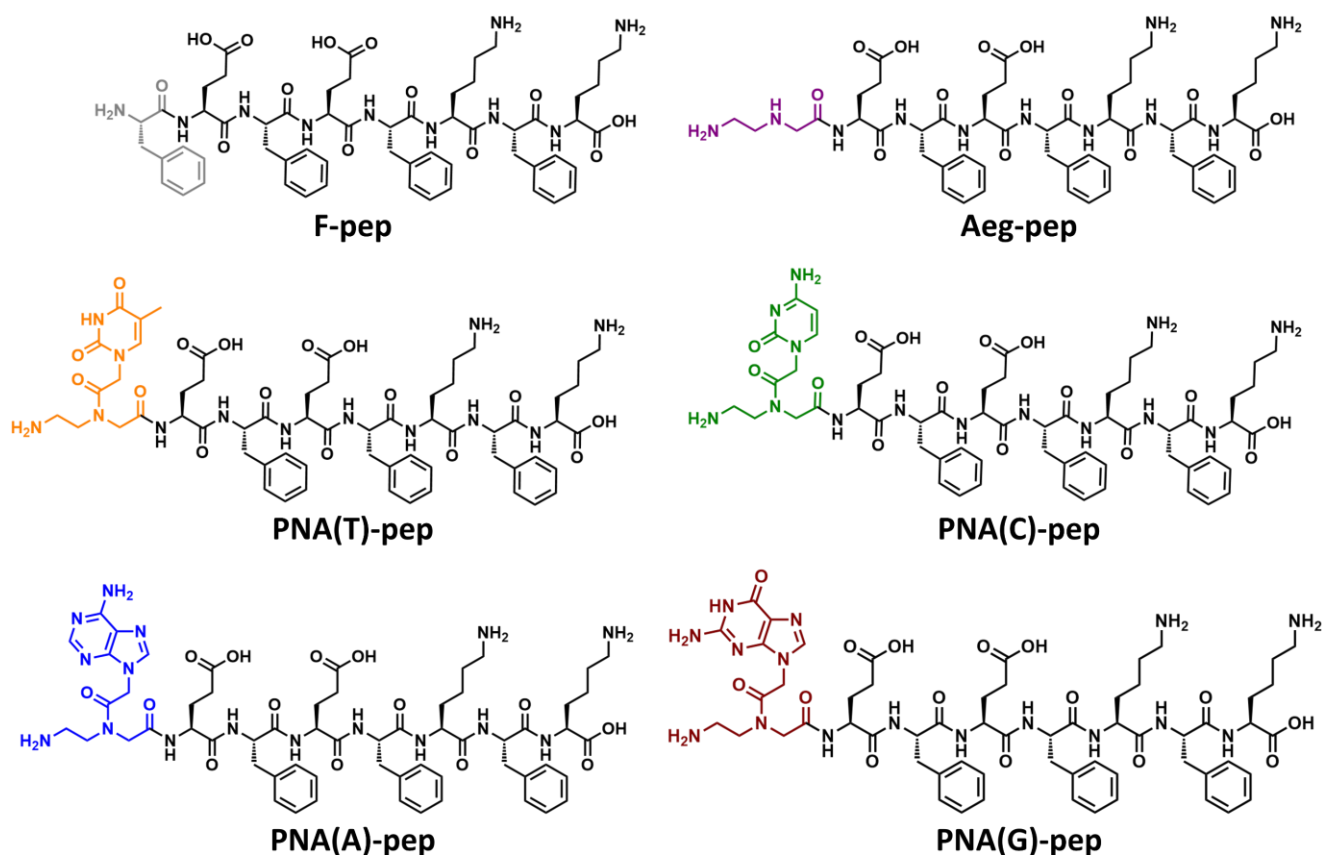
Afin d'être pertinent d'un point de vue scientifique, il est nécessaire de comparer les propriétés des nucléopeptides à des composés de référence. Ainsi, le peptide parent FEFEFKFK, s'avère être une référence évidente de l'étude. Comme évoqué ci-avant dans la Partie II.2.a, il a été reporté de nombreuses fois dans la littérature scientifique, ce qui permet une bonne comparaison de nos résultats avec ceux déjà reportés.

Les PNA introduits sont composés d'un bras peptidique portant la base nucléique. Dans le but d'identifier exactement les effets des bases nucléiques en décorrélant l'impact de ce bras PNA et le rôle des nucléobases sur la structure, il est intéressant d'utiliser également comme référence un bras ne comportant pas de base nucléique. Ainsi, Aeg-EFEFKFK, possédant un bras N-(2-aminoethyl)glycine libre, sans base azotée (Figure II-1), permettra de mettre en évidence l'impact de la base nucléique sur la structure en comparant les propriétés induites par sa présence ou son absence.

Par conséquent, six composés ont été synthétisés et étudiés (Figure II-2) :

- quatre composés nucléopeptidiques portant chacun un PNA différent en position N-terminale, à savoir PNA(A)-EFEFKFK, PNA(C)-EFEFKFK, PNA(G)-EFEFKFK, ou PNA(T)-EFEFKFK arborant ainsi chacun une des quatre bases nucléiques, adénine, cytosine, guanine et thymine, respectivement. Ils seront par la suite notés dans ce manuscrit PNA(A)-pep, PNA(C)-pep, PNA(G)-pep et PNA(T)-pep, et parfois regroupés sous le nom PNA(X)-pep.
- deux molécules de référence, le peptide déjà reporté dans la littérature, FEFEFKFK (noté par la suite F-pep), et le peptide Aeg-EFEFKFK (noté par la suite Aeg-pep).



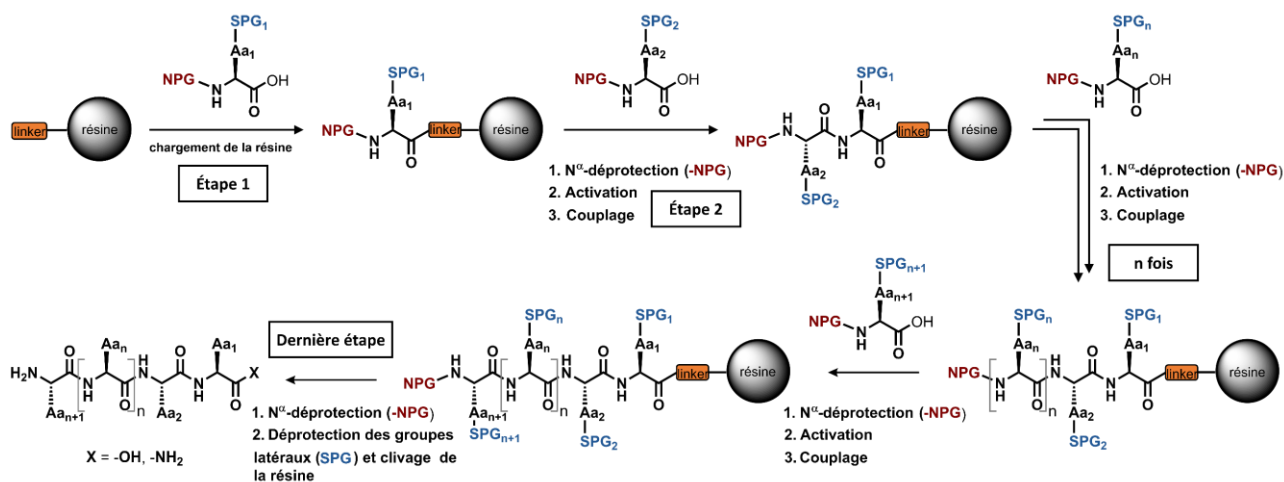


**Figure II-2.** Structures moléculaires des six peptides/nucléopeptides étudiés.

### II. 3 Synthèse des composés peptidiques et nucléopeptidiques par synthèse peptidique sur support solide (SPPS)

La synthèse des composés de l'étude passe d'abord par une synthèse peptidique standard pour former la partie peptidique des composés PNA(X)-EFEFKFK et de Aeg-EFEFKFK (fragment -EFEFKFK), et entièrement l'octapeptide FEFEFKFK. Différentes méthodes de synthèse existent<sup>329,478-481</sup> et nous avons fait le choix de la synthèse peptidique sur phase solide (SPPS), des plus répandues pour former des peptides gélifiants.<sup>86,89,169,192,193,218,229,356,482-484</sup> Cette technique a l'avantage de permettre la réalisation de l'ensemble des couplages, séquentiellement, dans un même réacteur. La SPPS se déroule comme décrit schématiquement Figure II-3.<sup>485</sup> En pratique, le premier acide aminé de la séquence est attaché par liaison covalente sur un support solide – la plupart du temps une bille de résine polymère forme la phase solide – (étape 1, Figure II-3), puis l'ajout des acides aminés de la séquence se fait un par un, du C-term au N-term. A chaque étape, le groupement protecteur en position N-terminale (NPG pour « N<sup>α</sup>-protecting group ») de l'acide aminé n est retiré, puis l'acide aminé n+1 est ajouté pour effectuer le couplage peptidique entre son acide

carboxylique activé et l'amine  $n$  (étape  $n$ , Figure II-3). Lorsque la séquence entière est synthétisée (dernière étape), le peptide est clivé de son support et les fonctions de ses chaînes latérales sont déprotégées. Le peptide brut est ensuite purifié par précipitation, cristallisation ou méthodes chromatographiques.



**Figure II-3.** Déroulement de la synthèse sur support solide (SPPS) d'un peptide de  $n+1$  acides aminés. Etape 1: Chargement de la résine, Etapes 2 à  $n+1$ : Couplage des acides aminés, Dernière étape: Clivage de la résine. NPG = groupe  $N^\alpha$ -protecteur,  $SPG_i$  = groupe protecteur de la chaîne latérale de l'acide aminé  $i$ . Adapté de Toldra et al. (2021).<sup>485</sup>

Il existe différentes voies de SPPS, en fonction des protections choisies pour les acides aminés. Nous avons sélectionné ici la stratégie Fmoc/ $t$ Bu (où l'amine N-terminale des acides aminés est protégée par un groupement Fmoc et leurs chaînes latérales par des dérivés de  $t$ Bu), pour sa facilité de mise en œuvre et pour ses réactifs de dangerosité moins grande comparée à celle d'autres stratégies.<sup>479</sup> Pour former le fragment (-EFEFKFK) et le peptide FEFEFKFK, les acides aminés (protégés) utilisés ont donc été : Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH et Fmoc-Glu( $O^t$ Bu)-OH. Les conditions complètes de synthèse peptidique sont décrites Partie V.1.a, Chapitre V (« Partie expérimentale »). Brièvement, la synthèse a été effectuée sur des résines Wang greffées de Fmoc-Lys(Boc) afin de produire 400  $\mu$ mol de chaque composé. Pour chaque acide aminé ajouté, un double couplage utilisant 6 eq. d'acide aminé, 5 eq. d'activateur (HBTU) et 10 eq. de NMM dans la DMF est effectué (2 x 40 min) ; les déprotections des groupements Fmoc sont réalisées par une solution de pipéridine 20 % (v/v) dans la DMF (3 x 15 min).

Le couplage du PNA se déroule ensuite de la même manière que les couplages peptidiques (un des principaux avantages d'utiliser les PNA,<sup>247,262</sup> comme rappelé précédemment, Partie

II.2.a). Les PNA sont introduits sous forme Fmoc, avec leurs bases nucléiques protégées si nécessaire : Fmoc-PNA(A)(Bhoc)-OH, Fmoc-PNA(C)(Bhoc)-OH, Fmoc-PNA(G)(Bhoc)-OH, Fmoc-PNA(T)-OH ou Fmoc-Aeg(Boc)-OH. Le couplage s'effectue alors sur les fragments -EFEFKFK déjà synthétisés (et toujours liés à la phase solide) en utilisant 4 eq. de Fmoc-PNA/Fmoc-Aeg, 3.5 eq. d'activateur (HBTU) et 7.5 eq. de NMM en DMF/NMP (double couplage, 2 x 3h). Le clivage final des composés PNA(A)-pep, PNA(C)-pep, PNA(G)-pep et PNA(T)-pep, Aeg-pep et F-pep ainsi synthétisés est ensuite réalisé en milieu acide (TFA/TIPS/eau, 92.5/5/2.5, v/v). Les conditions de couplage des PNA ont été optimisées par la suite, et sont décrites plus en détail dans la Partie V.1.a, Chapitre V (« Partie expérimentale »).

Les six composés ont ensuite été purifiés par HPLC semi-préparative en phase inverse sur colonne C<sub>18</sub>. Les conditions de purification pour ces composés sont optimisées, de la solubilisation des échantillons bruts aux gradients d'élution des solvants. Les composés subissent ensuite une double lyophilisation qui assure leur déshydratation complète. Les six composés sont alors obtenus avec une pureté supérieure à 95 % et un rendement compris entre 50 et 62 % (voir Tableau II-2).

Composé	Rendement (%)	Masse HRMS [M+H] <sup>+</sup> / (masse théorique) (m/z)	Temps de rétention LC-MS (min)
F-pep	58.7	1121.5541 / (1121.5666)	25.25
Aeg-pep	59.0	1074.5606 / (1074.5619)	23.84
PNA(A)-pep	62.2	1249.6067 / (1249.6113)	24.11
PNA(C)-pep	59.2	1225.5967 / (1225.6000)	23.71
PNA(G)-pep	59.8	1265.6011 / (1265.6062)	24.28
PNA(T)-pep	50.3	1240.5958 / (1240.5997)	24.34

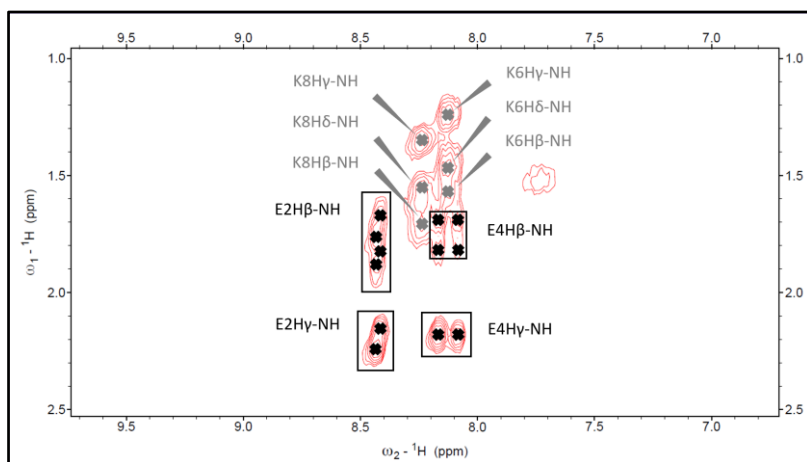
**Tableau II-2.** Rendements de synthèses et principaux résultats de la caractérisation chimique de tous les peptides/nucléopeptides étudiés (chromatogrammes et détails de HRMS, Section SI.II.1, en annexe)

#### II.4 Caractérisation chimique des composés synthétisés

Les caractérisations primaires des composés par LC-MS, HRMS, et RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et 2D – COSY, NOESY, ROESY, TOCSY en DMSO-*d*<sub>6</sub>) sont réalisées. Les masses obtenues en HRMS ainsi que les temps de rétention mesurés en LC-MS sont regroupés dans le Tableau II-2 (les chromatogrammes sont disponibles en Section SI.II.1 des annexes). Ces mesures confirment la structure chimique des composés, avec une bonne corrélation des masses obtenues en HRMS, et une bonne attribution des signaux en RMN (l'attribution complète est disponible en

Section SI.II.1 des annexes). La LC-MS confirme que les différents composés ont une hydrophobicité proche : leur temps de rétentions varie autour de 24 - 25 min dans les conditions d'élution choisies (voir Tableau II-2).

De plus, l'attribution des signaux de RMN a mis en évidence une caractéristique structurale intéressante pour les composés nucléopeptidiques. En effet, pour l'ensemble des composés PNA(X)-pep, il est possible d'observer, notamment de manière flagrante sur leurs spectres 2D TOCSY, un dédoublement des signaux des acides aminés N-terminaux (Glu<sub>2</sub>, Phe<sub>3</sub>, Glu<sub>4</sub>) qui n'est pas visible pour F-pep. Par exemple, deux groupes de signaux en RMN <sup>1</sup>H sont attribuables au Glu<sub>2</sub> de PNA(G)-pep : un premier groupe  $\delta(\text{NH}) = 8.45$  ppm,  $\delta(\text{H}_\alpha) = 4.24$  ppm,  $\delta(\text{H}_{\beta 1}) = 1.83$  ppm,  $\delta(\text{H}_{\beta 2}) = 1.67$  ppm et  $\delta(\text{H}_\gamma) = 2.17$  ppm ; et un second groupe  $\delta(\text{NH}) = 8.48$  ppm,  $\delta(\text{H}_\alpha) = 4.33$  ppm,  $\delta(\text{H}_{\beta 1}) = 1.91$  ppm,  $\delta(\text{H}_{\beta 2}) = 1.75$  ppm et  $\delta(\text{H}_\gamma) = 2.23$  (voir Figure II-4 et Section SI.II.1, en annexe). Une telle particularité indique la présence de deux conformations qui, au vu des acides aminés affectés, sont induites localement par la partie PNA. En fait, l'existence en solution de ces deux formes pourrait être expliquée par la capacité de l'amine tertiaire centrale du bras N-(2-aminoéthyl)glycine à adopter deux conformations distinctes, plaçant la partie PNA sur une face ou l'autre du nucléopeptide, ou par l'existence de rotamères de la base nucléique.<sup>486</sup> Il s'agit de deux conformères et non de stéréoisomères, les groupements *αeg*PNA étant achiraux.<sup>258,262</sup> Ces conformations sont obtenues pour des nucléopeptides sous forme monomérique, étant données les conditions de mesures, c'est-à-dire, dilués en solvant DMSO,<sup>487,488</sup> et ne présentent donc pas de leur structure une fois assemblés.



**Figure II-4.** Mise en évidence du dédoublement de signal des Glu<sub>2</sub> et Glu<sub>4</sub> (E2 et E4) sur le spectre RMN TOCSY du composé PNA(G)-pep (attribution complète Section SI.II.1, en annexe).

Ainsi, la caractérisation chimique par LC-MS, HRMS et RMN a permis de confirmer le succès de la synthèse des composés PNA(X)-pep, Aeg-pep et du peptide F-pep. Tous les composés ont des masses molaires comprises entre 1074 et 1266 g·mol<sup>-1</sup> et des hydrophobies proches (d'après les temps de rétention en LC-MS), deux arguments en faveur de notre choix de références comme expliqué précédemment.

## **II.5 Formulation des hydrogels : choix des conditions et premières observations macroscopiques**

### **II.5.a Choix des conditions de formulation des hydrogels**

Afin d'évaluer les propriétés gélifiantes des composés, des tests de gélification ont été effectués dans des conditions variées de concentration en peptides/nucléoptides, puis de pH. Dans un premier temps, la concentration critique de gélification (CCG) a été déterminée. Généralement, la technique utilisée dans le but d'évaluer la capacité de gélification de composés est la méthode dite d'inversion de tube (« *tilted tube test* », en anglais)<sup>5</sup> qui consiste à retourner le contenant de l'échantillon à tester pour définir si, au bout d'un temps donné et dans les conditions de formulation choisies, celui-ci forme un gel ou non. Ainsi, si le mélange est capable de supporter son propre poids à l'inversion – nous utiliserons le terme anglais de « *self-supporting* » – alors il peut être considéré comme un gel ; s'il s'écoule vers le bas, il s'agit d'un liquide. Cette méthode, plutôt qualitative, ne donne pas un résultat absolu puisque le volume de formulation, la nature et le diamètre du contenant peuvent l'influencer ; le choix du temps d'observation est également un point crucial,<sup>5,489</sup> bien que rarement spécifié dans la littérature. En revanche, cette méthode trouve toute sa place dans le cadre d'une étude comparative comme celle présentée ici.

Concrètement, le protocole mis au point pour la formulation des hydrogels de l'étude est le suivant : les composés sous forme de lyophilisats sont directement pesés dans des flacons HPLC, la poudre est concassée manuellement à la spatule, pour parfaire sa dispersion, puis solubilisée dans un tampon. Après avoir évalué différents tampons, nous avons fait le choix de formuler les hydrogels en tampon Tris.HCl 1 M à pH = 7.4, pH physiologique, ainsi rigoureusement contrôlé. Le Tris (tris(hydroxyméthyl) aminométhane) est un tampon zwitterionique qui fait partie des standards utilisés en biologie et biochimie,<sup>490-492</sup> et est donc choisi ici dans l'optique d'applications biologiques futures. De plus, il a déjà été utilisé dans la

littérature en tant que tampon aqueux pour la formation d'hydrogels supramoléculaires à base de peptides amphipathiques chargés.<sup>493,494</sup>

Ensuite, les échantillons sont agités à 70 °C pendant le temps nécessaire à leur solubilisation et leur homogénéisation, un temps défini  $t_{sol} = 5$  min conservé identique pour la préparation de tous les hydrogels. Enfin, les échantillons sous forme liquide sont laissés à refroidir à température ambiante afin d'observer leur gélification ou non au cours du temps (voir Partie V.1.b, Chapitre V « Partie expérimentale »). A l'instar de ce qui avait été proposé par certains groupes dans la littérature (voir Tableau II-1, dans la Partie II.2.a)<sup>228,231,233</sup> nous avons testé des méthodes de préparation avec solubilisation des lyophilisats par sonication ou agitation sans grand succès – l'homogénéité des échantillons n'était que difficilement atteinte – pour finalement opter pour une formulation par voie thermique. Cette technique (« *thermal way* » ou « *heating-cooling method* », en anglais),<sup>168,169,495</sup> effectuée directement dans les conditions choisies de tampon et de pH, se distingue du « *solvent-switch* » – où le peptide est solubilisé préalablement dans un autre solvant souvent organique miscible avec l'eau (HFIP, DMSO, acétone, éthanol, méthanol, etc...)<sup>496-498</sup> – et de l'« *acid-switch* »<sup>230,335,350,484</sup> qui formule le peptide en milieu acide avant d'ajuster le pH pour provoquer la gélification. Ces deux dernières méthodes de préparation souffrent souvent d'un manque de reproductibilité et d'inhomogénéité des échantillons<sup>499</sup> ce qui pourrait influencer la structure d'assemblage en créant des proto-structures, c'est pourquoi nous les avons écartées.<sup>49,149,500-502</sup>

### **II.5.b Etude du comportement de gélification des composés en fonction du pH**

Même si pour cette étude il a été choisi de travailler dans des conditions biocompatibles (pH = 7.4), une cartographie des propriétés de gélification en fonction du pH (entre 2 et 12) a été réalisée afin de proposer une caractérisation plus exhaustive de ces systèmes (voir Tableau II-3 et photos des gels Figure SII-1 en annexe).

Ainsi, F-pep forme des gels à pH acide (2 - 3) et à pH  $\geq 7.4$  probablement formés d'objets différents dans chaque cas. Les autres composés montrent quant à eux un domaine continu de gélification allant des pH les plus acides à un milieu plus ou moins basique. En effet, si Aeg-pep et PNA(C)-pep ne gélifient que jusqu'à pH = 7.4 inclus, PNA(T)-pep forme un gel jusqu'à pH = 10, et PNA(A)-pep et PNA(G)-pep jusqu'à pH = 11. Ce comportement est révélateur d'un effet de la modification apportée à la structure peptidique par l'introduction d'une base nucléique. En effet, la présence de chaînes latérales dont la charge dépend du pH

(acide glutamique pKa = 4.25, lysine pKa = 10.53)<sup>177</sup> induit une certaine sensibilité au pH des peptides amphipathiques chargés comme F-pep.<sup>218,227,494</sup> Par conséquent leur capacité d'auto-assemblage, directement liée à leur équilibre hydrophilie/hydrophobie, est également dépendante du pH. La substitution de la phénylalanine par un PNA déplace le point isoélectrique des composés, comparé à celui de F-pep – les bases nucléiques sont capables de se protoner ou déprotoner en fonction du pH (voir ci-avant, Figure II-2)<sup>486</sup> – ce qui influence également le comportement d'assemblage vis-à-vis du pH.<sup>154</sup>

Composé	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6.5	pH 7.4	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11	pH 12
F-pep	G <sub>o</sub>	G <sub>o</sub>	S	S	S	G <sub>o</sub>	G <sub>o</sub>	G <sub>o</sub>	G <sub>o</sub>	G <sub>o</sub>	G <sub>t</sub>
Aeg-pep	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	S	S	S	S	S
PNA(A)-pep	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>o</sub>	G <sub>o</sub>	G <sub>o</sub>	G <sub>o</sub>	G <sub>o</sub>	G <sub>o</sub>	S
PNA(C)-pep	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	S	S	S	S	S
PNA(G)-pep	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>o</sub>	G <sub>o</sub>	G <sub>o</sub>	G <sub>o</sub>	G <sub>o</sub>	G <sub>o</sub>	G <sub>o</sub>	G <sub>o</sub>	S
PNA(T)-pep	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	G <sub>t</sub>	S	S

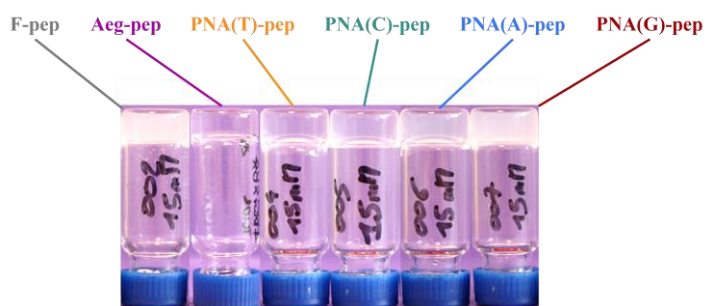
**Tableau II-3.** Récapitulatif des résultats du test d'inversion de tube ("tilted tube test") pour tous les peptides/nucléopeptides, étudiés à différents pH (G<sub>t</sub> = gel translucide, G<sub>o</sub> = gel opalescent, S = solution), après 24 h.

Ces premières observations ont permis de remarquer des disparités entre les hydrogels formulés. En fonction de la nature de la base nucléique portée par chaque nucléopeptide, leur comportement de gélification vis-à-vis du pH se trouve modifié. En effet, la gamme de pH où les composés forment des gels est plus étendue dans le cas des composés purines (PNA(A)-pep et PNA(G)-pep) que pyrimidine (PNA(T)-pep et de PNA(C)-pep).

### II.5.c Etude du comportement de gélification en fonction de la concentration des composés

En parallèle, les composés ont été étudiés sur une gamme de concentrations de 1 à 20 mM (voir photos Figure SII-2, en annexe), choisie en accord avec les études reportées sur ce type d'hydrogels peptidiques<sup>493,503-505</sup> et la formulation de gels de F-pep.<sup>231,234</sup> Les CCG identifiées entre 10 et 15 mM nous ont fait sélectionner 15 mM en tant que concentration de travail, alliant contraintes techniques (gélification de tous les composés dans un temps raisonnable) et économie de composés. A 15 mM, il a alors été possible, avec la méthode d'inversion de tube, d'évaluer un temps de gélification apparent pour chaque gel (Tableau II-4). Les gels se forment ainsi avec des cinétiques apparentes diverses : le peptide F-pep est le

plus rapide à gélifier, en moins de 2 min, suivi par les deux composés purines (PNA(G)-pep et PNA(A)-pep) en seulement 4 min. Les nucléopeptides PNA(T)-pep et PNA(C)-pep sont plus lents à former des hydrogels et la gélification la plus lente est celle de Aeg-pep.



**Figure II-5.** Aspect des gels de peptides/nucléopeptides à 15 mM en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

Visuellement, leur aspect macroscopique est clairement différent, comme décrit Tableau II-4 (voir également les photos des gels, Figure II-5). Les gels des composés pyrimidines (PNA(T)-pep et PNA(C)-pep) ainsi que celui de Aeg-pep sont translucides et paraissent particulièrement faibles. PNA(A)-pep et PNA(G)-pep quant à eux, forment des gels opaques, c'est-à-dire troubles et légèrement blancs, mais homogènes. Le gel de F-pep est très trouble également. Cette différence d'aspect entre les gels est un indice de structures internes différentes en fonction du composé.<sup>335</sup>

Composé	Temps de gélification apparent	Aspect du gel
F-pep	< 2 min	Gel opalescent faible
Aeg-pep	9 min	Gel translucide faible
PNA(A)-pep	4 min	Gel opalescent fort
PNA(C)-pep	8 min	Gel translucide faible
PNA(G)-pep	4 min	Gel opalescent fort
PNA(T)-pep	6,5 min	Gel translucide faible

**Tableau II-4.** Aspects des gels et temps apparents de gélification de tous les peptides/nucléopeptides, étudiés à 15 mM en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

La cartographie des propriétés de gélification des composés étudiés ainsi réalisée a permis d'une part d'obtenir de nombreuses informations sur la formation des différents hydrogels dans différentes conditions de préparation, de pH et de concentration. Nous avons, d'autre part, pu définir clairement les conditions de formulation qui seront gardées tout au long des



expériences de caractérisation, à savoir une concentration  $C = 15 \text{ mM}$  dans un tampon Tris.HCl ( $1 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7.4$ ), avec une gélification induite par voie thermique. Néanmoins, dans certains cas et en raison des contraintes imposées par certaines techniques (état imposé de l'échantillon, saturation du signal, sensibilité des capteurs, etc...), ces conditions ont été adaptées de manière justifiée, en connaissance des limites que ces conditions différentes peuvent impliquer pour l'interprétation.

## II.6 Caractérisation mécanique des gels par rhéologie

Avec pour objectif de caractériser, cette fois d'une manière quantitative, les propriétés mécaniques des gels, différentes expériences de rhéométrie ont été conduites. La rhéologie permet d'étudier les matériaux viscoélastiques tel que les gels, par la mesure, notamment en mode oscillatoire comme ici, de leurs modules viscoélastiques à savoir le module de stockage  $G'$  (lié au comportement solide) et le module de perte  $G''$  (lié au comportement fluide). Dans le cas où  $G' > G''$ , l'échantillon peut être considéré comme un solide viscoélastique qui, dans notre cas, caractérisera la présence d'un état gel<sup>3,26,506</sup> ; à l'inverse lorsque  $G' < G''$ , il s'agit d'un liquide viscoélastique. Plus ces deux valeurs  $G'$  et  $G''$  sont élevées, plus le gel est fort ; plus  $G'$  est élevé comparé à  $G''$ , plus le caractère solide du gel est accentué. Ainsi, en pratique, la mesure de rhéométrie s'effectue à l'aide d'un rhéomètre (Figure SII-3, en annexe) dont la géométrie – ici de type Couette, conçue sur mesures pour faciliter techniquement les mesures de cette étude – va plonger dans l'échantillon, appliquer une contrainte ou une déformation oscillatoire paramétrée, et par un système de couple mécanique, mesurer en parallèle la réponse du matériau.

Lors de cette étude, les paramètres des expériences de rhéologie présentés ci-après ont nécessité un certain travail d'optimisation, avec:

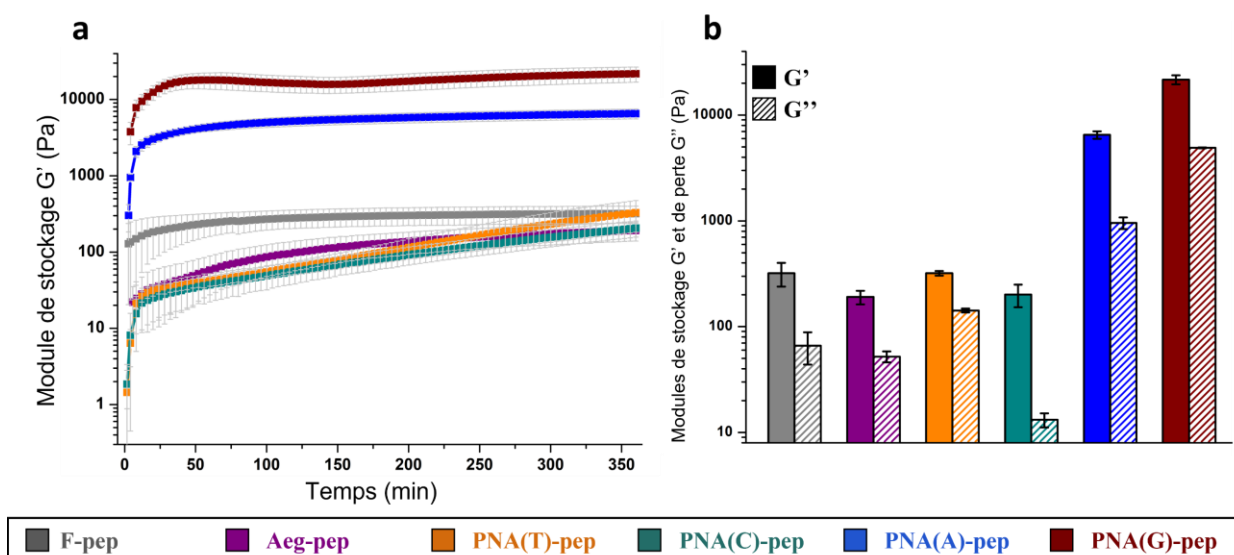
- un protocole précis de formulation des hydrogels et de mise en place des expériences pour des mesures des plus reproductibles,
- le choix des valeurs de travail de fréquence et de contrainte qui doivent se situer dans le domaine de linéarité des gels pour assurer la justesse des mesures. Elles influent également sur la reproductibilité, le rapport signal/bruit et la résolution en temps des mesures.

- le fait de choisir d'imposer la déformation ou la contrainte en fonction des caractéristiques des gels afin que la mesure n'influence pas le processus de gélification. En effet, une contrainte imposée sur un gel faible en formation peut gêner sa prise en masse, tout comme une déformation imposée sur un gel trop solide peut mener à sa déstructuration.

Aussi, ces paramètres ont été choisis de manière à pouvoir étudier par rhéométrie l'ensemble des hydrogels des six composés dans les mêmes conditions de mesure malgré leurs caractéristiques relativement disparates : les conditions optimales pour mesurer un gel n'étaient pas forcément celles à sélectionner pour un autre.

### II.6.a Cinétique de formation des hydrogels par balayage en temps

Le balayage en temps est une expérience de rhéométrie qui suit la formation du gel en fonction du temps, à température, fréquence de travail et déformation oscillatoire fixées. Il permet de comparer les modules viscoélastiques des différents gels de manière continue en fonction du temps. Pour des raisons d'optimisation technique, cette expérience est planifiée sur 6 h de vieillissement des gels (Figure II-5 et Figure SII-4, en annexe), puis complétée par des mesures ponctuelles qui donnent des données de cinétique longue (jusqu'à 8 jours environ, voir Figure SII-5, en annexe).



**Figure II-6.** Rhéogrammes des balayages en temps (a) et report des modules de stockage ( $G'$ ) et de perte ( $G''$ ) après 6 h (20 °C) pour les gels de peptides/nucléopeptides (b), étudiés à 15 mM en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

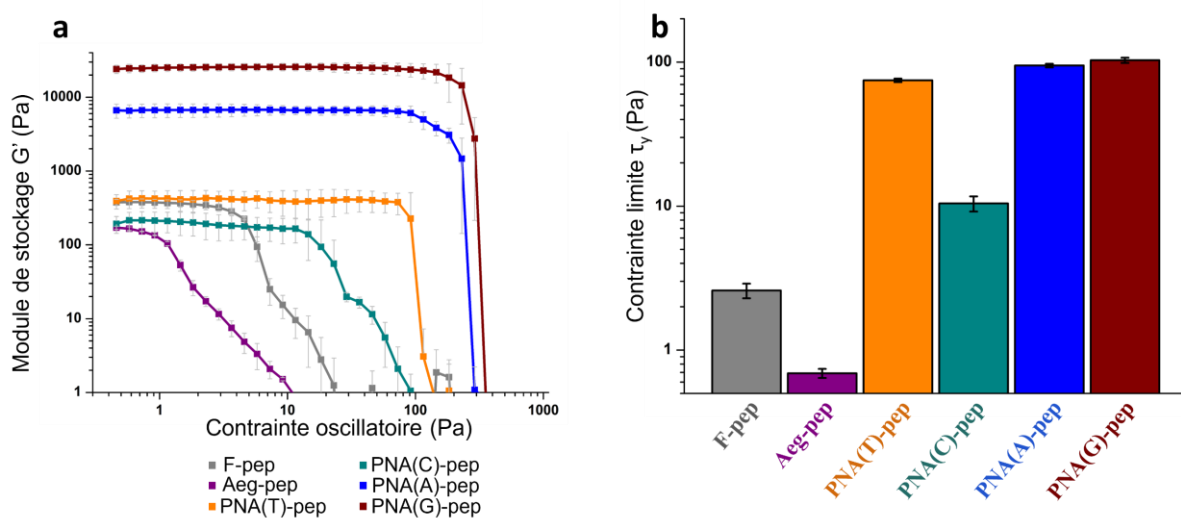
Comme observé sur les rhéogrammes (a, Figure II-5), le processus de gélification débute immédiatement sans temps de latence et ce, pour tous les composés, alors que les modules viscoélastiques des hydrogels étudiés diffèrent en fonction du gélifiant. Ainsi, le module élastique du gel de Aeg-pep (en violet, b, Figure II-5) atteint  $G' = 191$  Pa après 6 h de cinétique là où le peptide naturel F-pep (en gris, b, Figure II-5) forme un gel de  $G' = 320$  Pa, montrant que l'absence du groupement aromatique porté par la phénylalanine n'est pas préjudiciable à la gélification. Parmi les gels nucléopeptidiques, nous pouvons clairement distinguer deux groupes : d'un côté, les composés incorporant une pyrimidine (cytosine ou thymine) qui, au bout de 6 h, forment des gels de modules viscoélastiques situés dans la même gamme que Aeg-pep et F-pep (avec  $G' = 319$  Pa et  $201$  Pa pour PNA(T)-pep et PNA(C)-pep, respectivement). En revanche, les courbes montrent une cinétique lente et les gels continuent à se rigidifier pour atteindre des valeurs élevées de module élastique après 8 jours (Figure SII-5, en annexe), avec  $G' = 28800$  Pa et  $G' = 7251$  Pa, respectivement. D'un autre côté, les gels de composés purines PNA(A)-pep (en bleu, b, Figure II-5) et PNA(G)-pep (en bordeaux, b, Figure II-5) forment après 6 h des gels forts ( $G' = 6512$  Pa et  $G' = 21650$  Pa, respectivement) relativement plus stables dans le temps que leurs homologues pyrimidines. Après 8 jours, ces valeurs de modules élastiques s'élèvent à  $5984$  Pa pour PNA(A)-pep et  $40403$  Pa pour PNA(G)-pep (Figure SII-5, en annexe). Ce suivi à plus d'une semaine montre une très bonne stabilité des hydrogels au cours du temps, et il est à noter que ces échantillons conservent leur structure gel au-delà d'un an.

En comparant la rigidité des gels nucléopeptidiques obtenus avec la littérature, il s'avère que le composé PNA(G)-pep rivalise avec les meilleurs hydrogels peptidiques reportés jusqu'alors : par exemple,  $G' \approx 20$  kPa (pour le peptide Ac-LIVAGD),<sup>507</sup>  $G' \approx 20$  kPa (pour Ac-ILVAGK-NH<sub>2</sub>),<sup>508</sup>  $G' = 35.5$  kPa (pour Ac-GLYGGYGV-NH<sub>2</sub>)<sup>503</sup> et  $G' \approx 40$  kPa (pour D(I)FNK(I)),<sup>504</sup> à concentrations identiques.

### **II.6.b Résistance des hydrogels à la contrainte mécanique**

Dans un second temps, nous avons déterminé la résistance à la contrainte mécanique des hydrogels (a, Figure II-7). Pour cela, une expérience de balayage en contrainte a été réalisée. Il s'agit d'une mesure de l'évolution des modules viscoélastiques des gels en fonction de contraintes imposées (d'intensités croissantes) par la géométrie, à température, fréquence de travail et temps de vieillissement fixés. Ce test permet de déterminer le domaine linéaire

viscoélastique des gels – gamme de contraintes pour lesquelles les effets de la mesure sur la structure sont réversibles – et incidemment, la limite de ce domaine à savoir la contrainte de cassure du gel,  $\tau_y$ . Outre des modules viscoélastiques de grandeurs différentes, les hydrogels ont des résistances à la contrainte variées, comme observé sur la Figure II-7. La présence de la base nucléique améliore grandement cette résistance : de  $\tau_y = 10.4$  Pa pour PNA(C)-pep à  $\tau_y = 74.7$  Pa, 94.7 Pa et 103 Pa pour PNA(T)-pep, PNA(A)-pep et PNA(G)-pep respectivement, alors que ces valeurs chutent à  $\tau_y = 2.6$  Pa pour F-pep et  $\tau_y = 0.7$  Pa pour Aeg-pep. La partie PNA est donc bénéfique à la structure interne des hydrogels puisqu'elle améliore à la fois leur force et leur résistance à la contrainte mécanique.

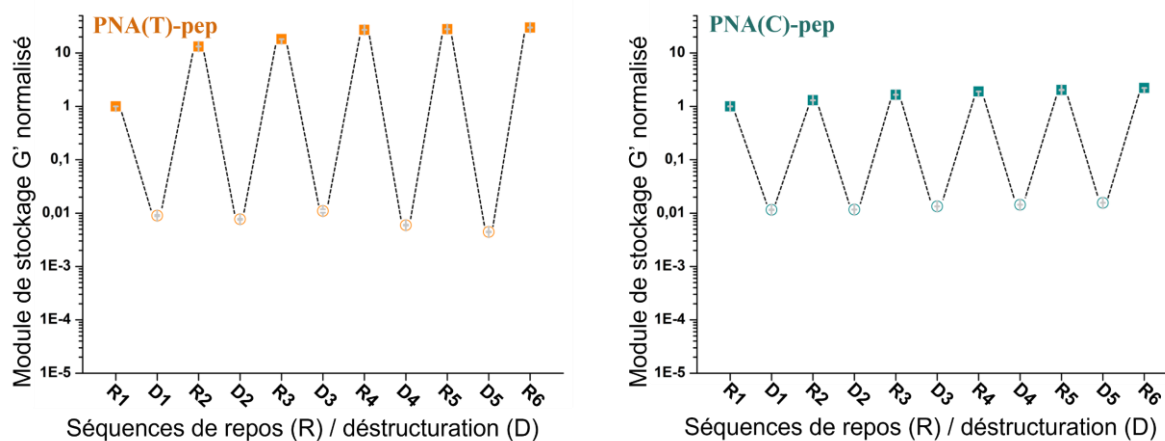


**Figure II-7.** Balayages en contrainte pour tous les gels de peptides/nucléopeptides (a) et contraintes limites ( $\tau_y$ ) du domaine linéaire viscoélastique (b), étudiés à 15 mM en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

De plus, après déstructuration mécanique des gels, il a été remarqué, pour PNA(C)-pep et PNA(T)-pep uniquement, une capacité à reformer le gel, c'est-à-dire une propriété de thixotropie (voir Figure II-8 et Figure SII-6 et SII-7, en annexe).<sup>197,509–511</sup> En effet, ces hydrogels peuvent subir des cycles de forte déformation ( $\gamma = 200$  %, 5 min) et recouvrer leurs pleines propriétés mécaniques lors des phases de repos ( $\gamma = 0.5$  %, 30 min) même après 5 cycles répétant ces deux étapes. Par exemple, le gel de PNA(C)-pep (à droite, Figure II-8) voit son module élastique chuter d'un facteur 100 lors de la phase de déstructuration (D1) puis retrouver sa valeur initiale après un temps de reformation (R2), valeur atteinte à nouveau après plusieurs cycles (R6).

La thixotropie est une caractéristique liée à la structure interne des gels : l'application d'une forte contrainte affecte les points de jonction et les nano-objets les plus grands, dissociant

ainsi le réseau fibrillaire soutenant l'hydrogel, mais, dans le cas de systèmes thixotropes comme pour PNA(C)-pep et PNA(T)-pep, des domaines fibrillaires plus petits se conservent et sont capables de régénérer la structure du gel une fois celui-ci mis au repos.<sup>197,509,512</sup> Ce type de propriété des gels, parfois référés comme « mécano-sensibles » ou « autoréparants » (« *mechanoresponsive* » et « *self-healing* » en anglais),<sup>78,380</sup> est souvent recherchée pour mettre en valeur le caractère injectable d'un hydrogel<sup>174,184,347,511,512</sup> – le gel, liquéfié sous la pression de la seringue, recouvre sa forme de gel solide viscoélastique après passage au travers de l'aiguille. Ce gel peut ainsi être injecté, chargé en agent thérapeutique (médicaments, cellules ou anticorps par exemple), directement *in vivo* de manière localisée.<sup>98</sup> La thixotropie s'avère ainsi utile dans le cadre d'applications biomédicales : libération contrôlée de médicaments,<sup>174,350</sup> pansements gels<sup>511</sup> ou ingénierie tissulaire<sup>197,212,512</sup> par exemple.



**Figure II-8.** Mise en évidence du caractère thixotrope des hydrogels de PNA(T)-pep (à gauche) et PNA(C)-pep (à droite), formulés à 15 mM en Tris.HCl (1 M, pH 7.4)), selon des cycles alternant phases de déstructuration (D1 à D5) et de repos (R1 à R6). Méthode de construction des courbes à partir des données brutes présentée Figure SII-6, en annexe.

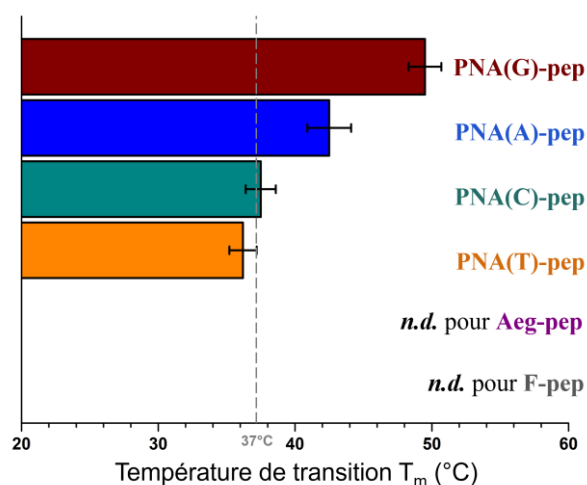
Les hydrogels nucléopeptidiques ont de meilleures résistances à la contrainte que leurs homologues formés par le peptide F-pep ou par Aeg-pep. Ce comportement mécanique diffère également en fonction de la nature du PNA porté : les gels purines (PNA(A)-pep et PNA(G)-pep) sont plus résistants que les gels pyrimidines (PNA(C)-pep et PNA(T)-pep) avec la même hiérarchie que celle observée pour leurs valeurs de modules viscoélastiques. Les gels les plus forts sont ainsi également les plus résistants à la contrainte mécanique. De plus, les gels pyrimidines présentent une capacité intéressante de thixotropie, absente dans le cas des autres hydrogels formulés. Les différences observées ici concernant les propriétés

mécaniques des gels indiquent que les structures internes sous-jacentes sont différentes en fonction du nucléopeptide.<sup>154,155</sup>

### II.6.c Comportement des hydrogels en température

D'après ces premières expériences de rhéologie, la présence de la base nucléique greffée sous forme de PNA en position N-terminale a un effet positif sur les propriétés mécaniques des gels formés. En particulier, la présence de purines (adénine ou guanine) augmente à la fois la cinétique de formation des gels, leurs modules viscoélastiques, ainsi que leur résistance à la contrainte mécanique.

Afin de comprendre l'influence des bases nucléiques sur la stabilité thermique des hydrogels, des expériences de rhéométrie par balayages en température ont été réalisés. Des gels déjà formés (après 6 h de vieillissement) ont subi une rampe linéaire de températures de 20 °C à 85 °C, à fréquence et déformation fixées. Les rhéogrammes indiquent une baisse des modules viscoélastiques, signe d'une déstructuration liée à la température, hormis pour F-pep et Aeg-pep qui ne semblent pas réagir dans cette gamme. Pour les composés portant une base nucléique, la température caractéristique de transition de l'état gel à l'état proche du liquide viscoélastique ( $T_m$ ) est alors définie graphiquement (voir les rhéogrammes des balayages en température Figure SII-8, en annexe). Les valeurs sont reportées Figure II-9. Ainsi, les gels de PNA(T)-pep et PNA(C)-pep présentent respectivement des  $T_m = 36.2$  °C et  $37.5$  °C, valeurs plus faibles que pour les composés PNA(A)-pep et PNA(G)-pep dont les températures de transition sont  $T_m = 42.5$  °C et  $49.5$  °C, respectivement.



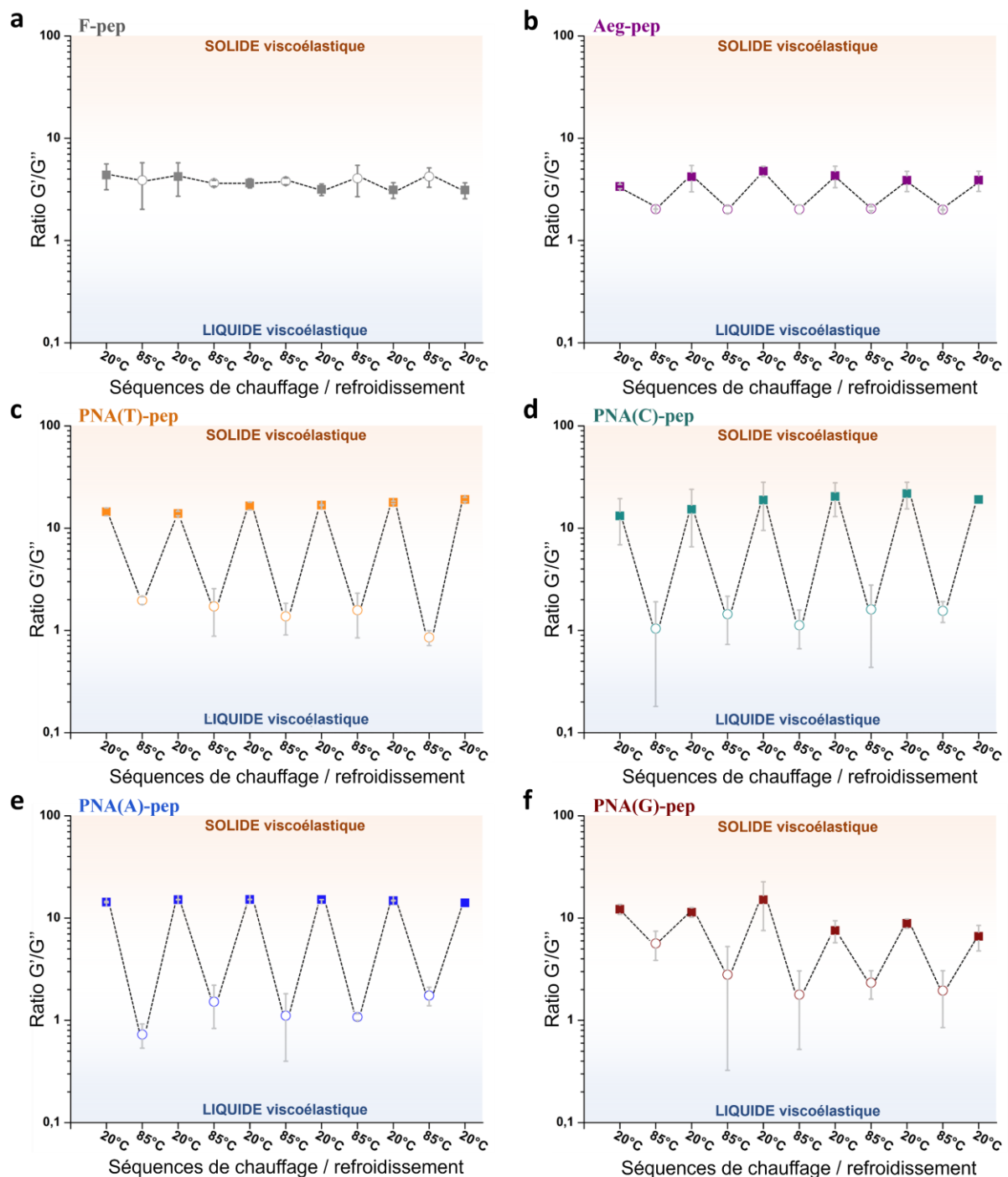
**Figure II-9.** Températures de transition gel/sol  $T_m$  déterminées par rhéologie pour les gels de peptides/nucléopeptides, étudiés à 15 mM en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4).

L'existence de cette température de transition a un intérêt certain du point de vue des applications. En effet, le fait que ces hydrogels nucléopeptidiques soient sensibles à un stimulus thermique, fait d'eux des hydrogels intelligents (« *smart hydrogels* » en anglais) au même titre que des hydrogels dont la structure est sensible à la force ionique, à la présence de certains composés, à l'exposition lumineuse à certaines longueurs d'ondes, à un champ magnétique ou à un courant électrique. Les propriétés mécaniques de ces gels peuvent être ainsi modulées en fonction de leur environnement.<sup>29,37,53,56,156,513,514</sup> Dans le cas de gels thermosensibles, la transitions gel-sol permet par exemple de libérer des composés (agents thérapeutiques, colorant) à une température donnée.<sup>515</sup>

En outre, les hydrogels formés par les composés PNA(A)-pep et PNA(G)-pep ont encore des modules viscoélastiques corrects à 37 °C (PNA(A)-pep :  $G' = 481$  Pa et PNA(G)-pep :  $G' = 6509$  Pa) ce qui laisse entrevoir de possibles applications biomédicales. En effet, ces modules suffisent pour permettre la suspension de cellules (conditions nécessaires :  $G' > 10 \cdot G''$  et  $G' > 100$  Pa d'après Haines-Buttericks *et al.* (2007)<sup>197</sup> et Hule *et al.* (2008)).<sup>516</sup>

De plus, lors de ces études thermiques, il a été remarqué que, suite à la déstructuration des hydrogels PNA(X)-pep à haute température (85 °C), si les gels étaient laissés à refroidir à température ambiante, ils étaient capables de reformer des gels *self-supporting*. Par conséquent, avec pour objectif d'éprouver cette propriété des gels, une série d'expériences de rhéométrie de régénération thermique est mise en place. Concrètement, les échantillons subissent des cycles répétés de chauffage/refroidissement induisant la déstructuration/restructuration des systèmes. Les résultats de ces expériences montrent que la présence de la base nucléique fait émerger cette capacité de régénération avec une conservation des propriétés viscoélastiques des hydrogels même après cinq cycles, comme décrit plus haut (Figure II-10 et voir Figure SII-9, en annexe). Il s'agit d'une caractéristique rare parmi les hydrogels peptidiques<sup>83,100,373,510</sup> souvent décrite de manière qualitative plus que quantitative comme ici. Pourtant, cette propriété offre des perspectives intéressantes en termes d'applicabilité de ces gels : il est possible de les liquéfier pour y incorporer des agents thérapeutiques (médicaments, cellules, anticorps)<sup>517,518</sup> puis de les injecter *in vivo* pour qu'ils régélifient *in situ*<sup>72,519</sup> (bien que l'injection à chaud puisse être une limitation)<sup>520</sup> ; il est également possible de mouler les gels ou de faire du dépôt de gel multi-couche<sup>521</sup> afin de

contrôler finement la morphologie de la surface, ce qui peut être utile dans le cadre de la culture cellulaire, pour le contrôle spatial de la croissance *in vitro*.<sup>55,349</sup>



**Figure II-10.** Evaluation de la capacité de régénération thermique des gels de tous les peptides/nucléopeptides étudiés, à 15 mM en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4), selon plusieurs cycles de chauffage/refroidissement. La chute du ratio  $G'/G''$ , caractéristique des propriétés mécaniques de chaque hydrogel, est indicative d'une fluidification du gel (transition gel/sol) tandis que l'augmentation de cette valeur démontre la régélification de l'échantillon. Méthode de construction des courbes à partir des données brutes présentée Figure SII-9 en annexe.

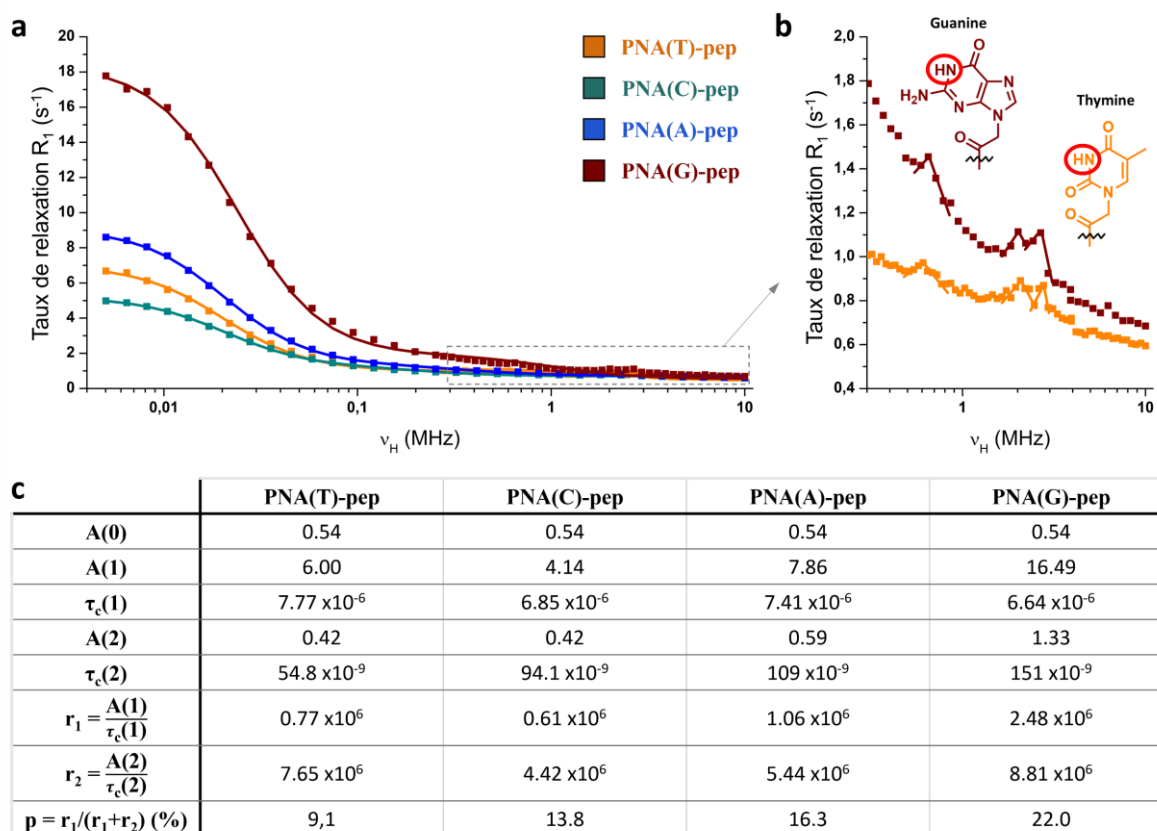


Pour conclure sur cette partie, nous avons démontré par des mesures rhéologiques que la modification de la séquence peptidique (F)EFEFKFK par l'incorporation d'un acide nucléique a un effet indéniable sur les propriétés mécaniques des hydrogels. Les nucléopeptides PNA(X)-pep présentent des modules viscoélastiques plus élevés, de meilleures résistances à la contrainte, une capacité de régénération thixotropique pour certains, et une capacité de régénération thermique pour tous. Aussi, l'apport de chaque base est différent en fonction de sa nature : les composés portant une purine (PNA(A)-pep et PNA(G)-pep) forment des gels plus forts et résistants par rapport aux composés pyrimidines (PNA(C)-pep et PNA(T)-pep).

## II.7 Caractérisation du milieu structurel interne des hydrogels par relaxométrie RMN

Afin de comprendre l'origine des caractéristiques des gels observées à l'échelle du matériau comme étudiées par la rhéologie, nous nous sommes intéressés de plus près à la structure mésoscopique des hydrogels, c'est-à-dire à une échelle capable de faire le lien entre observations microscopiques et comportements macroscopiques. A cette fin, nous avons étudié le comportement et l'état de l'eau, principal constituant de ces hydrogels, (> 98% en masse) par relaxométrie RMN. Cette technique utilise un champ magnétique et mesure la relaxation  $R_1$  (inverse du temps de relaxation  $T_1$ ) des protons de l'eau à différentes valeurs de fréquence de Larmor  $\nu_H$ . Ainsi, les spectres de relaxométrie peuvent être déconvolués en Lorentziennes, sous la forme  $R_1(\nu_H) = A_0 + \sum_i \frac{A_i}{1+(2\pi\nu_H\tau_c(i))^2}$ , où chacune d'entre elles est caractérisée par son amplitude  $A_i$  et son temps de corrélation  $\tau_c(i)$ , et représente le comportement d'une population de molécules d'eau particulière. Les spectres de relaxométrie pour les gels de chacun des composés étudiés – formulés dans les mêmes conditions que lors des mesures de rhéologie – sont ainsi réalisés (points, a, Figure II-11). La modélisation adéquate (lignes continues, a, Figure II-11) correspond à deux Lorentziennes et met alors en évidence deux populations de molécules d'eau aux comportements distincts pour tous les gels de nucléopeptides PNA(X)-pep. Il est à noter que les données liées aux gels de Aeg-pep et F-pep n'ont pas pu être correctement modélisées par des systèmes Lorentziens ce qui peut signifier que l'état mésoscopique de leurs gels, à savoir le système dynamique solvant/réseau de gélifiant est d'un type différent de ceux des nucléopeptides PNA(X)-pep. Par conséquent, l'analyse des deux Lorentziennes ( $L_1$  et  $L_2$ ) permet d'extraire les paramètres de relaxation des deux populations de molécules d'eau au sein des hydrogels (c, Figure II-11) :

- les amplitudes  $A_1$  et  $A_2$  représentent la proportion de molécules d'eau dans chacune des populations 1 ou 2.
- les temps de corrélations  $\tau_c(1)$  et  $\tau_c(2)$  sont caractéristiques du mouvement des molécules d'eau des populations 1 et 2 au sein des gels.



**Figure II-11.** Profils relaxométriques (NMRD  $^1H$ , présentant le taux de relaxation longitudinal  $R_1$  en fonction de la fréquence de Larmor  $\nu_H$ ) obtenus pour les gels de composés PNA(X)-pep (a), étudiés à 15 mM en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4). Les points de mesures sont indiqués sur le graphique, ainsi que les courbes issues de la modélisation dans chaque cas (somme des Lorentziennes  $L_1 + L_2$  dont les grandeurs caractéristiques sont résumées en (c)). Détail des profils relaxométriques soulignant la présence de pics quadrupolaires pour PNA(G)-pep et PNA(T)-pep, et structures de la guanine et de la thymine où sont mis en évidence les groupement imino et imido, respectivement, (b).

De ce fait, la première population, observée aux basses fréquences, avec les mêmes ordres de grandeur de  $\tau_c(1)$  ( $\tau_c(1) \sim 7 \times 10^{-6}$  s) pour chacun des gels (c, Figure II-11) représente des molécules d'eau aux mouvements contraints, en interaction avec le réseau de gélifiant. La seconde population, à hautes fréquences, correspond à des molécules d'eau plus libres. Pour cette seconde population, les temps de corrélation  $\tau_c(2)$  sont plus élevés dans le gel de

PNA(G)-pep ( $\tau_c(2) = 151 \times 10^{-9}$  s), suivi de PNA(A)-pep ( $\tau_c(2) = 109 \times 10^{-9}$  s), puis PNA(T)-pep ( $\tau_c(2) = 55 \times 10^{-9}$  s) et PNA(C)-pep ( $\tau_c(2) = 94 \times 10^{-9}$  s). Cela signifie que PNA(G)-pep et PNA(A)-pep forment des réseaux globalement plus contraignants pour la phase liquide que les composés PNA(T)-pep et PNA(C)-pep. De plus, les rapports  $p = \frac{r(1)}{r(1)+r(2)}$  avec  $r(i) = \frac{A(i)}{\tau_c(i)}$ , qui prennent en compte à la fois les amplitudes et les temps de corrélations des lorentziennes, apportent des informations quant à la répartition des molécules d'eau entre les deux populations : plus cette valeur est élevée, plus grande est la proportion d'eau dans l'état 1, à savoir de l'eau contrainte. A nouveau, les gels de PNA(G)-pep et PNA(A)-pep présentent la plus grande proportion d'eau contrainte (avec  $p = 22\%$  et  $p = 16\%$ , respectivement), devant PNA(C)-pep et PNA(T)-pep. Il est intéressant de mettre ces grandeurs en relation avec la force des gels observée en rhéologie (Partie II.6.a) : les gels aux modules viscoélastiques les plus élevés, à savoir les composés portant une purine, sont formés des réseaux les plus contraignants pour les molécules d'eau, là où les composés pyrimidines restreignent moins la phase liquide et donnent des hydrogels moins forts. Ces différences pourraient trouver leur origine dans des différences de morphologies structurales internes, avec par exemple la présence d'un réseau plus dense dans le cas des composés purines. Ces résultats montrent un lien entre l'état contraint de l'eau au sein des gels et leur force d'une manière qui semble intuitive, mais n'ont, à notre connaissance, jamais été reportés pour des hydrogels peptidiques.

En observant les courbes de relaxométrie à plus haute fréquence, il est intéressant de remarquer la présence de pics caractéristiques à 0.6, 2.0 et 2.7 MHz pour les gels de PNA(G)-pep et PNA(T)-pep (b, Figure II-11). Ils correspondent aux pics quadripolaires de l'azote, provenant d'une résonance avec le champ, de l'interaction dipôle-dipôle d'un noyau de spin  $\frac{1}{2}$  (ici le proton  $^1\text{H}$ ) et d'un noyau quadripolaire (de spin  $\geq 1$ , ici  $^{14}\text{N}$ ,  $I = 1$ ) dans la liaison N-H par exemple. Ces pics ne sont ni visibles dans le cas de Aeg-pep ou F-pep bien qu'ils aient des N-H dans leurs squelettes peptidiques – le signal proviendrait donc des bases nucléiques – ni dans le cas de PNA(C)-pep ou PNA(A)-pep pour lesquels les protons liés à l'azote sur la cytosine ou l'adénine (amines primaires) sont trop labiles. En revanche, le proton imino de la guanine, ainsi que le proton imido de la thymine (entourés en rouge, b, Figure II-11) sont moins labiles et peuvent générer des pics quadripolaires. Toutefois, ces signaux ne sont visibles que si le système N-H est suffisamment contraint (dans le cas contraire, le mouvement

brownien du système moyenne les contributions et lisse les pics). Cela signifie donc que, dans le cas de PNA(T)-pep et PNA(G)-pep – et probablement pour les autres nucléopeptides par extrapolation – la base nucléique se trouve dans une conformation bloquée. Ainsi, ces données indiquent que les bases nucléiques ne sont pas entièrement libres, nous permettant de supposer qu’elles sont incluses dans les structures supramoléculaires formées, participant à l’auto-assemblage supramoléculaire.

Ainsi, la relaxométrie RMN nous a permis de mettre en évidence que la structure du réseau constituant les hydrogels des composés PNA(X)-pep est différente de celle des références F-pep et Aeg-pep. Également, les gels de nucléopeptides les plus forts (PNA(G)-pep et PNA(A)-pep) sont aussi ceux qui contraignent le plus les molécules d’eau, démontrant un lien entre propriétés mécaniques et liberté du solvant au sein du gel.

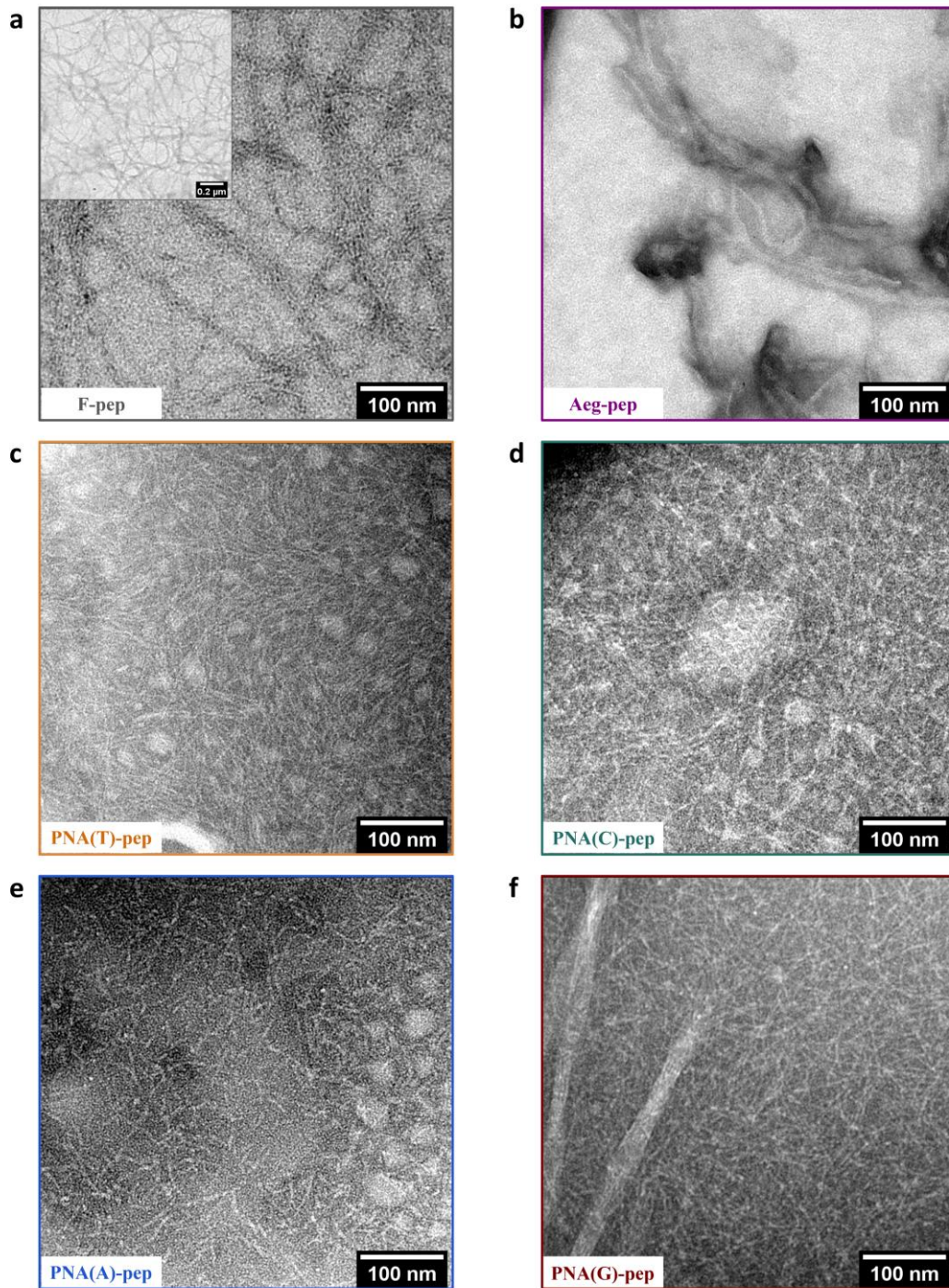
## **II.8 Observation des microstructures constituant les hydrogels, par microscopie électronique à transmission**

Afin de déterminer la morphologie microscopique des hydrogels et les nano-objets issus de l’auto-assemblage des composés étudiés, des expériences par microscopie TEM ont été menées. A partir des images obtenues pour chacun des six composés étudiés (Figure II-12) il est possible d’obtenir des grandeurs caractéristiques des nano-objets formés (longueurs de fibres  $L$ , diamètres de section  $d$ ). Ainsi, nous observons que le peptide naturel F-pep s’assemble sous forme de grandes fibres peu denses ( $L > 1 \mu\text{m}$ ,  $d > 30.5 \pm 4.5 \text{ nm}$ , a, Figure II-12). Par conséquent, son réseau fibrillaire comporte des pores de grandes tailles et forme ainsi un gel peu solide comme observé en rhéologie, avec une faible résistance à la contrainte (Partie II.6.b). Le composé Aeg-pep forme quant à lui des assemblages fibrillaires peu déterminés et assez disparates ( $L$  entre 10 nm et 500 nm) de faible diamètre ( $d = 12.3 \pm 4.5 \text{ nm}$ , b, Figure II-12) qui peuvent à nouveau être reliés aux faibles propriétés mécaniques observées en rhéométrie et au faible signal mesuré en relaxométrie RMN (Figure II-11).

Dans le cas des nucléopeptides PNA(X)-pep, la TEM montre des réseaux de petites fibres denses et enchevêtrées. Les composés PNA(G)-pep et PNA(A)-pep forment les fibres de plus grandes tailles ( $L > 1 \mu\text{m}$  avec  $d = 5.1 \pm 0.2 \text{ nm}$ , et  $L > 100 \text{ nm}$  avec  $d = 4.9 \pm 0.6 \text{ nm}$ , respectivement, Figure II-12) dont la densité implique une porosité moindre et donc une constriction des molécules d’eau élevée (comme observé en relaxométrie). Aussi, sont observés par endroits des objets de dimensions supérieures issus de la coalescence de fibres

( $d = 28.4 \pm 0.3$  nm pour PNA(G)-pep et  $44.0 \pm 1.7$  nm pour PNA(A)-pep, (c) et (e), Figures SII-10, en annexe). Le grand nombre de points de jonction et l'enchevêtrement des fibres impliquent des réseaux fibrillaires solides et, à l'échelle macroscopique, des hydrogels aux modules viscoélastiques élevés comme observés en rhéométrie (Partie II.6).<sup>335</sup> La formation de gels plus faibles par les composés PNA(T)-pep et PNA(C)-pep, s'explique également par les structures microscopiques observées en TEM : des fibres de plus faibles diamètres ( $d = 4.6 \pm 0.4$  nm pour PNA(T)-pep, et  $d = 2.5 \pm 0.3$  nm pour PNA(C)-pep, Figure II-12) constituant un réseau dense, mais dont la solidité est altérée par la présence de nanostructures sphéroïdales d'environ 25 nm de diamètre. Ce sont probablement des objets de ce type qui viennent diminuer les propriétés viscoélastiques de ces gels : la structure de l'hydrogel de PNA(C)-pep présente des agrégats encore plus imposants (de 100 à 250 nm de diamètre, (d), Figure SII-10, en annexe) et se trouve être le plus faible de la série des PNA(X)-pep.

Aussi, la présence à l'échelle microscopique de fibres de tailles réduites pour l'ensemble des systèmes nucléopeptidiques peut expliquer l'existence d'une température de déstructuration des hydrogels, et la capacité de régénération thermique observées à l'échelle macroscopique (Partie II.6.c). En effet, ce type d'assemblage supramoléculaire est vraisemblablement moins stable physiquement et plus dynamique que les grandes fibres observées pour le peptide F-pep par exemple. La présence de fibres plus petites au sein de la structure microscopique rendrait les processus de désassemblage/réassemblage du système supramoléculaire sous l'effet de changement de températures beaucoup plus faciles et donc réversibles.

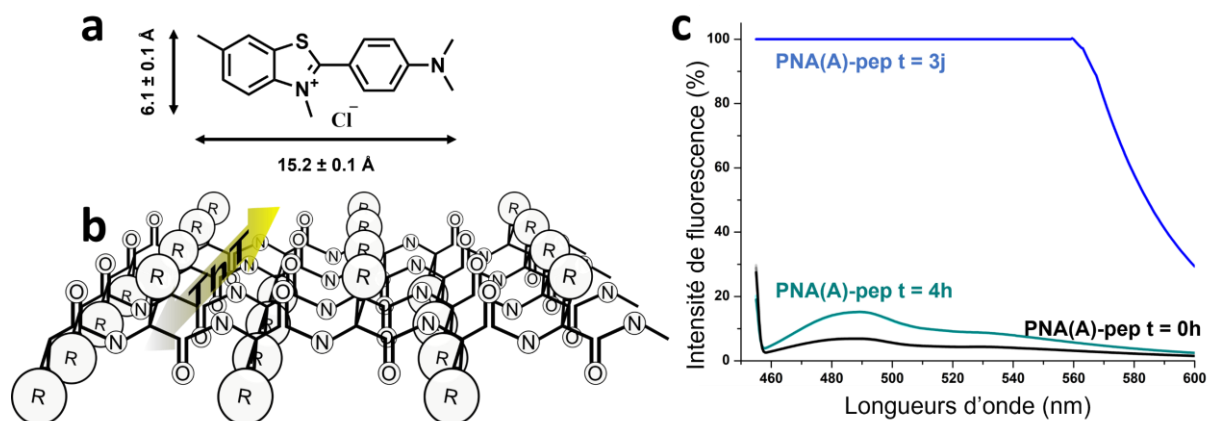


**Figure II-12.** Images TEM pour tous les peptides/nucléopeptides étudiés, en grandissement  $\times 38000$  (et insert pour F-pep,  $\times 6600$ ) et contrastées négativement à l'acide phosphotungstique (voir Partie V.1.e, Chapitre V « Partie expérimentale »).

Ainsi, l'ajout de la base nucléique à la séquence peptidique modifie la morphologie des objets nano- et microscopiques formés par auto-assemblage, induisant la présence de petites fibres très entremêlées, contrastant avec les systèmes peu denses observés dans le cas de Aeg-pep et F-pep, et renforçant ainsi la structure des hydrogels formés. De plus, la base nucléique portée par le groupement PNA influence cette structure, ce qui explique la diversité de propriétés mécaniques induites à l'échelle macroscopique.

## II.9 Suivi de la cinétique de formation des fibrilles par fluorescence de la Thioflavine T

Outre la morphologie du réseau fibrillaire microscopique, la cinétique de formation des assemblages supramoléculaires est une donnée clé pour la compréhension des systèmes étudiés. C'est pourquoi des expériences de cinétique suivies par fluorescence de la Thioflavine T (ThT) ont été menées. Cette technique, mise au point notamment pour étudier la fibrillation des  $\beta$ -amyloïdes impliquées dans certaines maladies neuro-dégénératives (Parkinson, Alzheimer ou encore les maladies à prions),<sup>522-524</sup> utilise la ThT, un sel de benzothiazole (a, Figure II-13). Cette molécule, non fluorescente lorsqu'elle est libre en solution, exhibe une transition de fluorescence ( $\lambda_{ex} = 450$  nm,  $\lambda_{em} = 485$  nm) lorsque sa configuration est bloquée (pas de relaxation possible), notamment lorsque la ThT est en interaction avec des structures protéiques en feuillets  $\beta$  (b, Figure II-13).<sup>522</sup> En effet, la molécule se place perpendiculairement aux brins du feuillets  $\beta$  (soit ici transversalement au sens d'élongation des fibrilles) et nécessite l'assemblage d'au moins trois à quatre brins pour assurer une interaction stable.<sup>525</sup> De fait, la mesure de fluorescence en fonction du temps sur un échantillon contenant de la ThT et des systèmes capables de s'auto-assembler en feuillet  $\beta$  permet de suivre la cinétique de formation des structures supramoléculaires, l'intensité de fluorescence dans le milieu étant proportionnelle au nombre de molécules de ThT en interaction et donc au nombre de brins de type  $\beta$ .<sup>526</sup> Ainsi, le suivi par fluorescence de la ThT est une technique fréquemment utilisée dans le cadre de l'étude de l'auto-assemblage de structures peptidiques formant des assemblages de types feuillets  $\beta$ .<sup>221,483,487,527-530</sup>



**Figure II-13.** Structure de la Thioflavine T (ThT) (a) et schéma de l'intercalation de la ThT dans un assemblage de type feuilletts  $\beta$  (b). Spectre d'émission de fluorescence ( $\lambda_{ex} = 448 \text{ nm}$ ) pour un échantillon de PNA(A)-pep ( $C = 5 \text{ mM}$ ) en présence de ThT ( $C_{ThT} = 100 \text{ }\mu\text{M}$ ) à  $t = 0 \text{ h}$  (noir),  $t = 4 \text{ h}$  (cyan) et  $t = 3 \text{ j}$  (bleu) montrant l'intérêt d'utiliser cette sonde de fluorescence pour le suivi cinétique de la formation des assemblages des nucléopeptides étudiés (c). Le spectre de fluorescence de la ThT seule ( $C_{ThT} = 100 \text{ }\mu\text{M}$ ) est superposé à la courbe noire.

### II.9.a Choix des conditions expérimentales

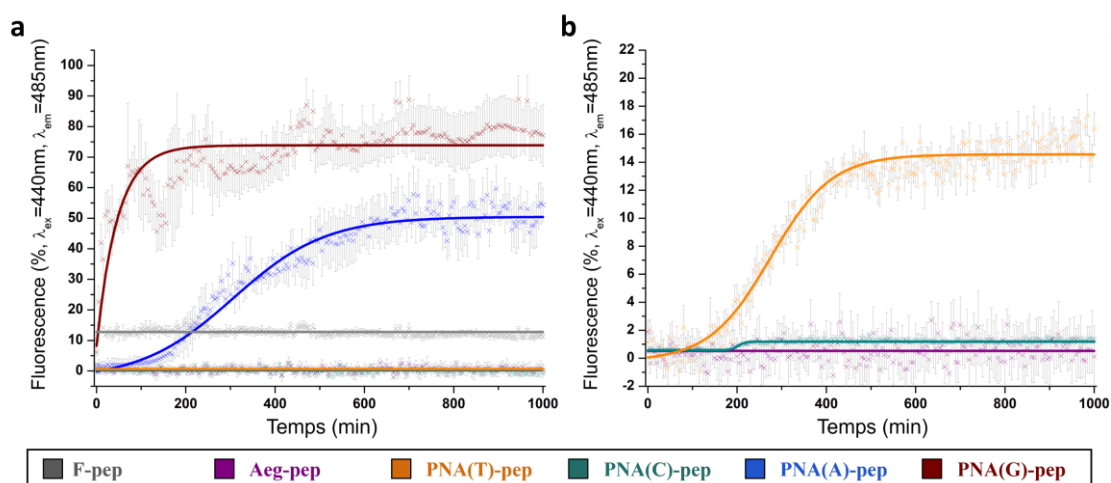
Concernant l'étude de nos gels, nous avons dans premier temps cherché et optimisé les conditions expérimentales afin de pouvoir effectuer des mesures en suivi cinétique. Les premiers tests ont été effectués en cuve (des dépôts en plaques 96-puits ont été utilisées par la suite, voir Partie V.I.f, Chapitre V, « Partie expérimentale ») permettant notamment de constater la fluorescence de la ThT en présence des composés étudiés, signe d'un assemblage de type feuillet  $\beta$  (c, Figure II-13). Ensuite, ont été choisies les concentrations en peptide/nucléopeptide dans les échantillons étudiés – car il est impossible d'étudier les gels directement à  $15 \text{ mM}$  pour deux raisons : d'une part la turbidité de certains gels lorsqu'ils se forment biaiserait les mesures optiques par diffusion de la lumière et d'autre part, les cinétiques macroscopiques observées en rhéologie étaient déjà trop rapides pour être distinguées. Une dilution permettrait de ralentir les cinétiques d'assemblage pour pouvoir les étudier correctement, et par conséquent, une concentration de  $5 \text{ mM}$  a été choisie, permettant d'effectuer des mesures dans de bonnes conditions expérimentales, adaptées au spectromètre de fluorescence, et de comparer la formation d'assemblages entre les différents composés. Après des essais d'optimisation à différentes concentrations en ThT, dans des gammes cohérentes avec la littérature ( $50 \text{ }\mu\text{M} - 500 \text{ }\mu\text{M}$ , données non montrées),<sup>221,483,526,528–530</sup> la concentration de travail a été sélectionnée, avec  $C_{ThT} = 100 \text{ }\mu\text{M}$ . Les cinétiques finales



ont ensuite été mesurées par spectrofluorimétrie sur plaques 96 puits, en quintuplicats, avec des paramètres de mesures optimisés. Seul point qui n'a pu être résolu, certains systèmes arborant une fluorescence beaucoup plus intense que les autres, la gamme d'intensités de fluorescence était trop large pour pouvoir utiliser les mêmes paramètres de mesure pour tous les échantillons. C'est pourquoi deux sets d'expériences, utilisant deux sensibilités différentes de détecteur (réglage de la tension du photomultiplicateur, PMT), ont dues être menées en parallèle.

### II.9.b Etat fibrillaire des systèmes en auto-assemblage

Les courbes de fluorescence présentées (a, Figure II-14) montrent que les intensités de fluorescence les plus fortes sont obtenues pour PNA(G)-pep ( $I = 73.8 \%$ , Tableau II-5) et PNA(A)-pep ( $I = 50.3 \%$ ) à la fin du plateau, ce qui est cohérent avec le réseau observé en TEM de fibres denses et nombreuses. Le composé F-pep présente une intensité de fluorescence plus faible ( $I = 12.8 \%$ ), liée à son état fibrillaire plus clairsemé.



**Figure II-14.** Suivi de la cinétique de formation des assemblages supramoléculaires pour tous les peptides/nucléopeptides étudiés à 5 mM en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4), par fluorescence de la ThT ( $\lambda_{ex} = 440 \text{ nm}$  and  $\lambda_{em} = 485 \text{ nm}$ ) en fonction du temps (PMT = 800 V), (a). Afin d'améliorer la détection du signal pour les échantillons de Aeg-pep, PNA(C)-pep et PNA(T)-pep, les mêmes mesures sont réalisées à sensibilité plus élevée (PMT = 1000 V), (b).

Les échantillons de PNA(T)-pep, PNA(C)-pep et Aeg-pep ont nécessité l'augmentation du PMT du détecteur (b, Figure II-14) pour pouvoir observer un signal exploitable. Alors, outre la fluorescence observée pour Aeg-pep qui est très faible ( $I = 0.52 \%$ , Tableau II-5), probablement en lien avec son réseau fibrillaire peu dense et peut-être la prépondérance d'autres types d'assemblages que des systèmes  $\beta$ , le composé PNA(T)-pep induit une fluorescence plus

intense que PNA(C)-pep ( $I = 17.1\%$  contre  $I = 1.18\%$ ). Nous pouvons émettre l'hypothèse que si ces deux systèmes interagissent moins avec la ThT que les composés nucléopeptidiques portant des purines, cela peut être dû à la présence des agrégats observés en TEM, dont la structure non ordonnée et non feuilletés  $\beta$  ne permettrait pas la fixation de la Thioflavine T.

### II.9.c Cinétique de formation des fibres

Les cinétiques de formation des assemblages sont variées – et peuvent être comparées indépendamment de l'intensité de fluorescence – allant des systèmes les plus rapides avec PNA(G)-pep ( $k_{app} = 64.6\text{ h}^{-1}$ , Tableau II-5) comme observé macroscopiquement (voir temps de gélification apparents, Tableau II-4, Partie II.5.c) et PNA(A)-pep ( $k_{app} = 7.78\text{ h}^{-1}$ ) aux plus lents avec PNA(T)-pep ( $k_{app} = 3.13\text{ h}^{-1}$ ) et PNA(C)-pep ( $k_{app} = 1.00\text{ h}^{-1}$ ). Aussi, l'auto-assemblage des nucléopeptides présente un temps de latence (également appelé « *lagtime* » en anglais,  $t_{lag}$ , Tableau II-5), qui est lié à la phase non fluorescente de nucléation primaire des fibrilles, indicateur également de la vitesse de formation des systèmes. Notons ici que la même hiérarchie que précédemment est observée (voir résultats de rhéologie, Partie II.6 et de relaxométrie RMN, Partie II.7): PNA(G)-pep ( $t_{lag} < 1\text{ min}$ ) < PNA(A)-pep ( $t_{lag} = 75\text{ min}$ ) < PNA(T)-pep ( $t_{lag} = 88\text{ min}$ ) < PNA(C)-pep ( $t_{lag} = 179\text{ min}$ ). Il apparaît donc que les assemblages nucléopeptidiques produisant les hydrogels les plus forts sont aussi les plus rapides à se former ( $k_{app}$  plus élevés) et présentant les temps de latence ( $t_{lag}$ ) les plus faibles.

	<b>F-pep</b>	<b>PNA(A)-pep</b>	<b>PNA(G)-pep</b>	<b>PNA(C)-pep</b>	<b>PNA(T)-pep</b>	<b>Aeg-pep</b>
$I$ (%)	<b>12.74</b> $\pm 1.04$	<b>50.30</b> $\pm 4.82$	<b>73.8</b> $\pm 9.36$	<b>1.18</b> $\pm 0.25$	<b>17.05</b> $\pm 1.14$	<b>0.52</b> $\pm 1.89$
$t_{lag}$ (min)	<b>&lt; 1</b>	<b>75.0</b> $\pm 6.0$	<b>&lt; 1</b>	<b>178.9</b> $\pm 1.1$	<b>87.9</b> $\pm 5.4$	<i>n.d.</i>
$k_{app}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	<i>n.d.</i>	<b>7.78</b> $\pm 0.55$	<b>64.58</b> $\pm 3.62$	<b>1.00</b> $\pm 0.12$	<b>3.13</b> $\pm 0.13$	<i>n.d.</i>

**Tableau II-5.** Intensités de fluorescence maximales ( $I$ ), lagtimes ( $t_{lag}$ ) et constantes de vitesse apparentes ( $k_{app}$ ), pour tous les peptides/nucléopeptides, étudiés à 5 mM en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4) à 25 °C.

L'étude de la fibrillation par suivi de fluorescence de la ThT a donc permis de souligner la présence d'assemblages de type  $\beta$  pour nos composés – sans quoi l'expérience serait restée sans succès – ce qui est un comportement classique de ce type de gélifiant<sup>186</sup> déjà reporté pour F-pep par Mujeeb *et al.* (2013).<sup>229</sup> De plus, cette étude a apporté des données cinétiques fines sur la formation des fibrilles initiant les réseaux supramoléculaires pour chacun des

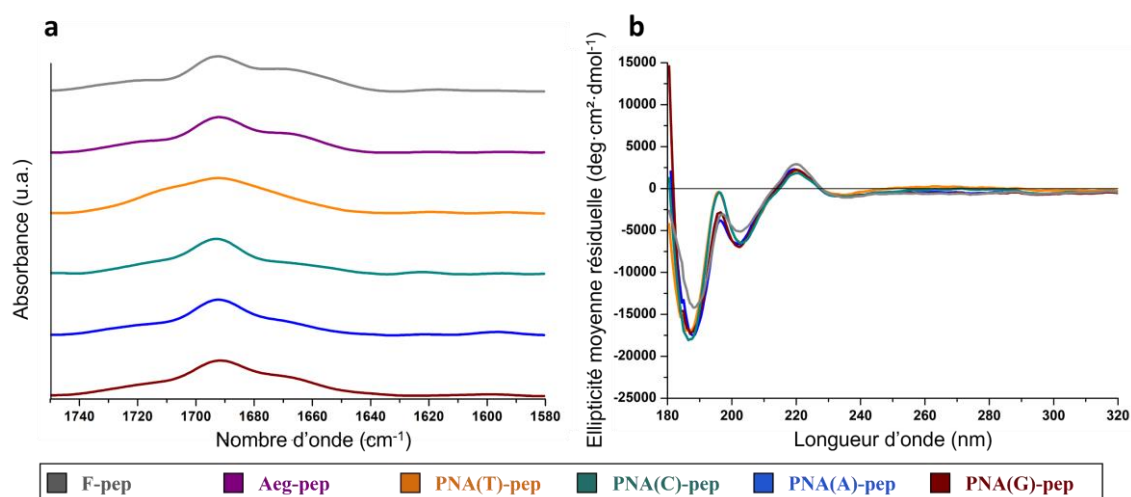
composés, mettant en évidence que, pour ces hydrogels, ceux dont la cinétique de formation est la plus rapide (PNA(G)-pep, PNA(A)-pep) sont ceux dont les modules viscoélastiques sont à termes les plus élevés. Enfin, les résultats obtenus viennent corroborer les observations par TEM (Partie II.8) confirmant la présence de fibres denses et nombreuses pour tous les gels nucléopeptidiques et allant dans le sens de la présence d'autres types d'assemblages pour Aeg-pep, PNA(C)-pep et PNA(T)-pep.

## **II.10 Identification de la structure secondaire de l'assemblage supramoléculaire par spectroscopie infrarouge et dichroïsme circulaire**

Dans l'optique de déterminer la nature plus précise des assemblages et des interactions à l'échelle supramoléculaire, les composés ont été étudiés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) d'une part, et par dichroïsme circulaire (CD) d'autre part, qui sont deux techniques de spectroscopie complémentaires permettant de caractériser la structure secondaire de protéines et peptides. Elles sont parfaitement adaptées dans le cas des peptides/nucléopeptides de cette étude pour la caractérisation des assemblages supramoléculaires qu'ils forment. L'IRTF, et notamment l'observation des bandes amide I, liées à la vibration d'élongation des liaisons carbonyles des amides et visibles pour l'ensemble des composés, donne des informations sur la conformation du système peptidique.<sup>531-533</sup> Le dichroïsme circulaire, quant à lui, est une technique fréquemment utilisée pour l'étude de biomolécules<sup>534-536</sup> qui met en évidence les structures chirales ; dans le cas des protéines et des peptides, certaines caractéristiques des spectres dichroïques sont spécifiques aux hélices  $\alpha$ ,  $\beta$ -turn, feuillet  $\beta$  ou pelote aléatoire.<sup>537</sup> En effet, ces structures induisent une absorption différentielle de la lumière circulairement polarisée gauche ou droite, mesurable par dichroïsme circulaire. Il est important de noter que dans notre cas, le tampon Tris.HCl utilisé pour la formulation des hydrogels est incompatible avec les mesures de dichroïsme circulaire – les ions chlorures absorbent fortement en dessous de 200 nm et quenchent le signal<sup>535</sup> – ce qui a nécessité d'adapter nos conditions opératoires: les échantillons sont préparés dans une solution de NaF à la concentration qui aurait été choisie pour Tris.HCl. En l'absence de tampon, le pH est ajusté par du NaOH pour atteindre pH = 7.4.

## II.10.a Etude de la structuration des composés en conditions déstructurantes

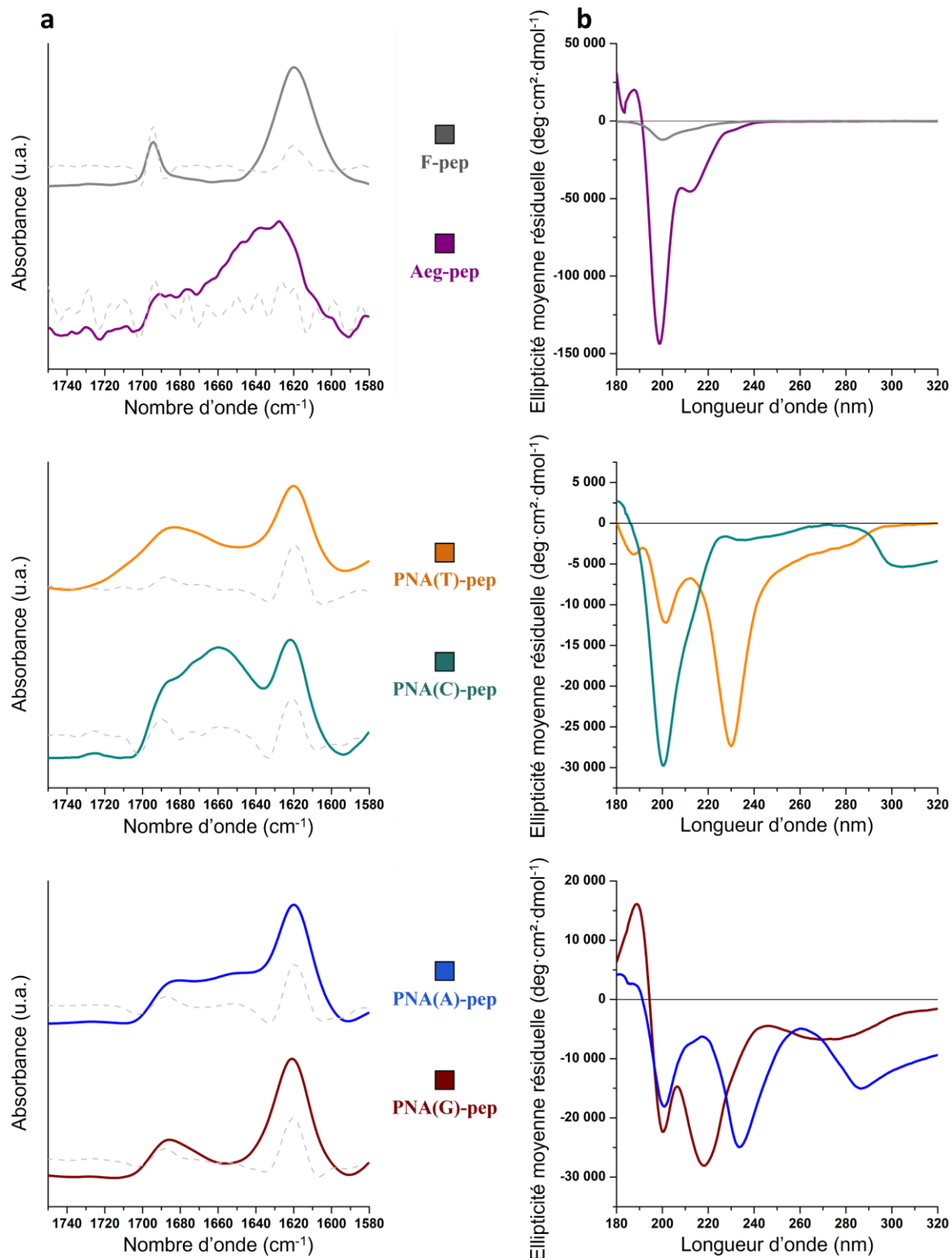
Dans un premier temps, les composés ont été étudiés sous forme monomérique, libres en solution. Dans le cas de l'IRTF, ils ont été dissouts dans le DMSO qui, grâce à sa capacité de solvataion, permet d'observer les peptides/nucléopeptides sous forme non assemblée.<sup>487,488</sup> Dans ces conditions, les spectres mesurés pour tous les composés portent une bande amide I centrée sur  $\sim 1690\text{ cm}^{-1}$ , unique et assez large (a, Figure II-15), ce qui est révélateur d'un état peu structuré.<sup>538</sup> Une observation similaire est faite en dichroïsme circulaire (b, Figure II-15), où les composés très dilués ( $C = 75\ \mu\text{M}$ ) présentent sur leurs spectres des caractéristiques hybrides entre pelote aléatoire (bande négative  $\sim 188 - 190\text{ nm}$ ) et structuration de brin  $\beta$  (bande négative  $\sim 200 - 205\text{ nm}$ ).<sup>535</sup> En outre, les profils dichroïques des six composés sont presque superposables donc les peptides/nucléopeptides ont, en état de monomère, des comportements conformationnels proches, probablement induits par leurs parties peptidiques identiques.



**Figure II-15.** Spectres IRTF de la région amide I pour tous les peptides/nucléopeptides à 15 mM en DMSO (a) et spectres de dichroïsme circulaire pour tous les peptides/nucléopeptides à très faible concentration ( $C = 75\ \mu\text{M}$ ) en solution de NaF (0.1 M, pH 7.4), (b).

### II.10.b Etude de la structuration des assemblages peptidiques/nucléopeptidiques

En revanche, lorsque les composés s'auto-assemblent, une structure ordonnée émerge, induisant une modification des spectres IRTF acquis en ATR directement sur des hydrogels (a, Figure II-16) : la bande amide I subit un déplacement vers les plus basses énergies, lié à une stabilisation des structures (par ailleurs, moteur de l'assemblage supramoléculaire). Cette bande centrée sur 1619 - 1620  $\text{cm}^{-1}$  ainsi qu'une nouvelle bande à 1691 - 1696  $\text{cm}^{-1}$  sont caractéristiques d'un assemblage de type feuillet  $\beta$  antiparallèles<sup>531</sup> pour les six composés étudiés, et notamment très marqué dans le cas de F-pep, comme c'est le cas pour la plupart des peptides ioniques auto-complémentaires.<sup>203</sup> Des spectres dichroïques sont également enregistrés pour caractériser l'état auto-assemblé des peptides/nucléopeptides (b, Figure II-16) : les mesures sont effectuées sur des échantillons à 10 mM, soit suffisamment concentrés pour que les structures observées soient cohérentes avec l'état réel des composés dans les gels à 15 mM, mais assez dilués pour éviter la saturation du signal.<sup>122</sup> Aussi, afin d'éviter la saturation, la cuve optique utilisée était la plus fine possible (cuve « sandwich » de chemin optique  $l = 0.1$  mm, voir Partie V.1.h, Chapitre V « Partie expérimentale ») mais cela n'a néanmoins pas permis la mesure à 15 mM. Outre la structuration des composés qui peut être dépendante de la concentration, un changement de concentration ou de longueur optique est théoriquement sans conséquence sur les données finale de CD qui sont converties en ellipticité moyenne par résidu, ou MRE (« *mean residual ellipticity* » en anglais, voir Partie V.1.h, Chapitre V « Partie expérimentale »).<sup>539</sup>



**Figure II-16.** Spectres IRTF de la région amide I pour des gels de tous les peptides/nucléopeptides étudiés, à 15 mM en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4), (a), et spectres de dichroïsme circulaire pour tous les peptides/nucléopeptides à 10 mM en solution de NaF (0.67 M, pH 7.4), (b). Les dérivées secondes des spectres IRTF, mettant en évidence les bandes principales, sont tracées dans chaque cas en pointillés.

Les spectres de F-pep et Aeg-pep montrent alors un minimum à 212 - 215 nm correspondant à la transition électronique  $n-\pi^*$  de groupes amides impliqués dans un feuillet  $\beta$ <sup>534-537,540</sup> et un effet Cotton négatif donnant une bande aux alentours de  $\approx 200$  nm, lié à la transition  $\pi-\pi^*$  des phénylalanines en interactions de  $\pi$ -stacking.<sup>118,541-543</sup> La structure de type feuillets  $\beta$  est également confirmée pour PNA(G)-pep qui présente deux minima, l'un à 200 nm et l'autre à 218 nm, et un maximum à 189 nm (transition  $\pi-\pi^*$  des amides).<sup>122,535,544</sup> Pour PNA(A)-pep et PNA(T)-pep la signature globale est similaire hormis le fait que le minimum à 218 nm est déplacé vers les plus hautes longueurs d'onde, à 233 nm, manifestation probable d'un assemblage certes de type feuillets  $\beta$ , mais « twisté ». <sup>346,545,546</sup> Enfin, dans le cas de PNA(C)-pep, la contribution à 200 nm (transition  $\pi-\pi^*$  des phénylalanines), clairement prédominante, semble indiquer que les interactions hydrophobes de  $\pi$ -stacking dirigent l'assemblage dans ce système, ce qui peut expliquer la présence d'objets microscopiques de faible organisation tels les agrégats observés en TEM (Partie II.8). Par ailleurs, pour ce gel, l'IRTF abonde dans ce sens, avec une bande large et peu résolue entre 1630 - 1680  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>547</sup>

### **II.10.c Contribution des bases nucléiques à la structure secondaire**

Bien que les PNA ne présentent habituellement pas de signal en CD dans la gamme de longueurs d'onde liée aux acides nucléiques ( $> 240$  nm)<sup>548,549</sup> lorsqu'ils sont libres en solution,<sup>331</sup> comme observé précédemment en conditions diluées (voir b, Figure II-15, Partie II.10.c), il est intéressant de remarquer que les quatre nucléopeptides PNA(X)-pep montrent une bande supplémentaire, négative, au-delà de 250 nm. Ce phénomène indique clairement un certain degré d'organisation des bases nucléiques et l'implication des PNA dans l'assemblage supramoléculaire.

Ainsi, les expériences d'IRTF menées en parallèle du CD montrent que l'auto-assemblage du peptide F-pep s'effectue sous forme de feuillets  $\beta$  antiparallèles, avec une contribution nette des phénylalanines qui interagissent entre elles par  $\pi$ -stacking. Pour les composés PNA(X)-pep, la présence de la base nucléique affecte la structure secondaire supramoléculaire, et ce de manière différente selon sa nature. En effet, alors que le composé PNA(G)-pep forme des assemblages de type feuillets  $\beta$  classiques, la présence de PNA(A) ou de PNA(T) provoque une déformation de la structure d'assemblage. Dans le cas de PNA(C)-pep la propension du nucléopeptide à interagir par  $\pi$ -stacking est bien supérieure aux autres

composés, ce qui semble diminuer sa capacité à s'organiser de manière ordonnée, expliquant la présence d'agrégats visibles en TEM (Partie II.8).

De manière intéressante, les spectres CD semblent indiquer que les bases nucléiques produisent des interactions supplémentaires au sein des structures supramoléculaires, ce qui pourrait expliquer les disparités entre les différents assemblages. L'interprétation faite autour des pics quadripolaires observés en relaxométrie RMN abondait dans ce sens également (Partie II.7). Cependant, afin de ne pas écarter trop vite l'hypothèse d'une modification locale de la structure, induite par les PNA, nous avons décidé de mener une étude structurale fine de la partie peptidique dans les assemblages, par RMN.

### **II.11 Etude de la structure fine des peptides/nucléopeptides en milieu assemblé, par RMN**

Les spectres RMN des peptides/nucléopeptides en solution dans le DMSO pour la caractérisation chimique (Partie II.4), ainsi que les spectres de dichroïsme circulaire en milieu très dilué (Partie II.10.c) ont donné des informations conformationnelles sur les composés « monomériques », c'est à dire dans des conditions où ceux-ci sont isolés, sans interactions. A contrario, l'objectif a ensuite été d'étudier cette structure individuelle de chaque peptide/nucléopeptide en interaction dans l'assemblage supramoléculaire.

#### **II.11.a Spectres RMN des composés en tampon Tris.HCl**

Des études de spectres RMN ( $^1\text{H}$ , COSY, TOCSY, NOESY, HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) des composés dans un tampon Tris.HCl deutéré à pH = 7.4 ont ainsi été réalisées. Les conditions choisies, notamment la concentration en composés C = 5 mM (voir Partie V.1.i, Chapitre V « Partie expérimentale), permet un état assemblé des peptides/nucléopeptides (état justifié par les cinétiques observées en suivi de la fluorescence de la ThT, voir Partie II.9) sans former de gel, dont l'état figé ne permettrait plus la mesure en RMN. Malgré cela, il n'a pas été possible d'obtenir des données pour F-pep, qui montrait une mauvaise stabilité en solution au cours du temps (formation de précipités).

Outre la caractérisation chimique des nucléopeptides en milieu tamponné, l'objectif de ces expériences était de mettre en évidence des caractéristiques d'assemblage, visibles sur les spectres RMN. En particulier, l'expérience de NOESY peut mettre en évidence certaines structures (repliements, interactions intermoléculaires), l'effet NOE se produisant entre protons proches spatialement ( $\approx 5 \text{ \AA}$ ).<sup>550</sup> Cependant, de tels signaux n'ont pas été détectés, ce

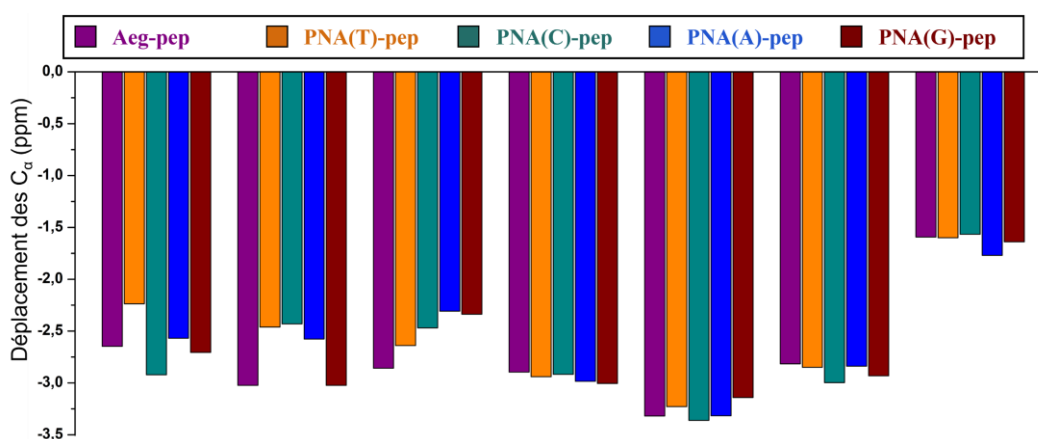


qui ne permet pas de conclure sur la conformation spatiale des nucléopeptides en auto-assemblage.

Également, en RMN  $^1\text{H}$ , les protons N-H imino et imido des bases nucléiques guanine et thymine, respectivement, sont des protons caractéristiques déblindés ( $> 10 \text{ ppm}$ )<sup>325,551-554</sup> qui ne sont très souvent observables que lorsqu'ils sont pris dans des liaisons hydrogène.<sup>552,555</sup> Ainsi, la présence de ces signaux en solvant aqueux donne une information sur l'implication de ces protons dans des liaisons hydrogène, notamment dans des appariements de type Watson-Crick. Dans notre cas, nous n'avons pas observé de tels signaux, ce qui laisse à penser que les bases nucléiques ne sont pas engagées dans ce type de liaisons (*données non présentées*).

### II.11.b Utilisation du « *NMR chemical shift index* »

Néanmoins, ces données de RMN collectées nous ont tout de même permis d'aller plus loin dans l'étude des assemblages, en particulier par l'utilisation de la méthode dite du « *NMR chemical shift index* » (CSI) appliquée aux carbones  $\text{C}_\alpha$ . Cette technique est communément utilisée pour identifier les éléments de structures secondaires dans les protéines en comparant les déplacements chimiques obtenus en RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , avec des valeurs de référence, relatives aux pelotes aléatoires.<sup>556-558</sup> Par exemple, un écart de déplacement chimique (« *shift* » en anglais) positif entre le signal du  $\text{C}_\alpha$  et la référence est en faveur d'une structuration hélice  $\alpha$ , tandis qu'un *shift* négatif signifie plutôt que la structure est de type feuillet  $\beta$ .



**Figure II-17.** Application du « *Chemical shift index* » (CSI) aux  $\text{C}_\alpha$  de chaque acide aminé, indiquant leur implication dans la structure feuillet  $\beta$ , pour les composés PNA(X)-pep et Aeg-pep en tampon Tris- $\text{d}_{11}$ -HCl (0.5 M, pH 7.4).

Dans le cas des composés étudiés, les valeurs de *shift* des signaux concernant les C $\alpha$  sont toutes négatives, ce qui confirme que tous les acides aminés constituant les peptides/nucléopeptides sont impliqués dans la structuration de type feuillets  $\beta$  (identifiée en CD et IRTF, voir Partie II.10.b). Aussi, s'il existe une petite variation entre les différents composés, notamment en N-terminal (-Glu-Phe-Glu-), celle-ci est trop peu significative (surtout pour une séquence aussi courte) ce qui dénote une structuration relativement similaire des parties peptidiques. La présence d'un PNA en N-terminal ne modifie pas la conformation de la partie peptidique. Ces données nous indiquent par conséquent que les différences de comportement d'assemblage observées entre les composés ne proviennent pas de différences dans la structure peptidique mais bien d'une implication de la partie acide nucléique. Les bases nucléiques ne semblant pas impliquées dans des liaisons hydrogène, tout porte à croire qu'elles interviennent dans la structure majoritairement grâce à des interactions de type  $\pi$ -stacking. En effet, ce type d'interactions entre les bases nucléiques joue un rôle important dans la stabilité des assemblages naturels formés par l'ADN ou l'ARN.<sup>144,146,559</sup>

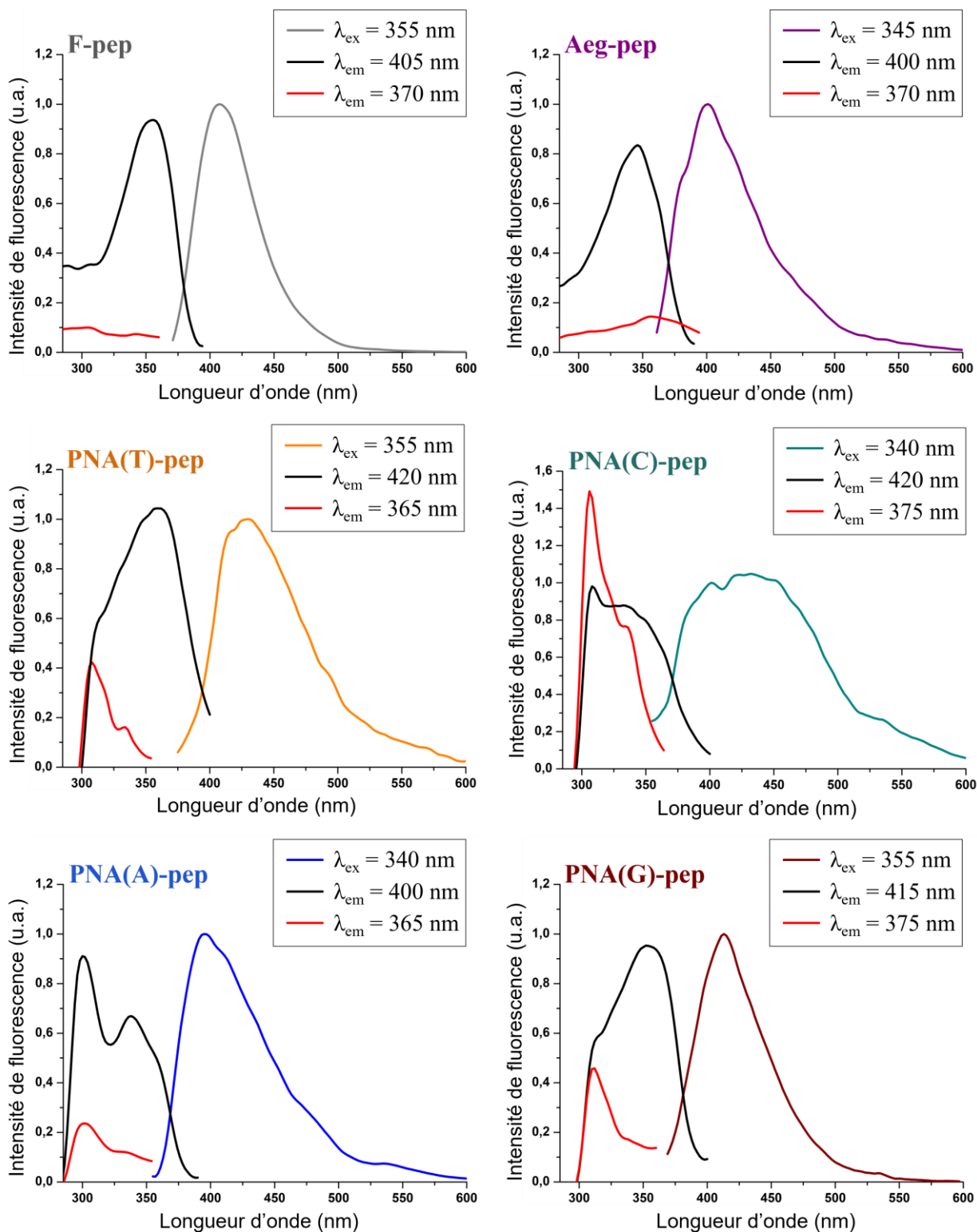
## **II.12 Mise en évidence des interactions de $\pi$ -stacking par spectrofluorimétrie**

### **II.12.a Analyse des spectres de fluorescence**

Afin d'évaluer les interactions de  $\pi$ -stacking présentes dans les assemblages supramoléculaires, une étude de la fluorescence des groupements aromatiques a été réalisée. En effet, les acides nucléiques, comme les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine, phénylalanine), sont des groupements fluorescents grâce à la conjugaison électronique de leurs cycles aromatiques<sup>560,561</sup> dont les propriétés de fluorescence dépendent également de leur environnement.

De fait, des spectres 3D émission-excitation ont été enregistrés pour chaque échantillon (composés à C = 5 mM dans le Tris.HCl, voir un exemple Figure SII-11, en annexe) avec pour objectif d'identifier des transitions de fluorescence liées aux interactions d'empilements aromatiques. Comme observé Figure II-18, les six composés étudiés présentent une unique bande d'émission de fluorescence entre 400 - 420 nm. Pour F-pep et Aeg-pep, les spectres d'émission mettent en évidence l'excitation correspondante : à  $\lambda_{ex}$  = 346 nm et à  $\lambda_{ex}$  = 356 nm, respectivement (en noir, Figure II-18). Cette transition peut être attribuée à l'énergie d'un excimère, état électronique excité lié au stacking des noyaux aromatiques des phénylalanines.<sup>498,562,563</sup> Dans le cas des nucléopeptides PNA(X)-pep, cette transition est

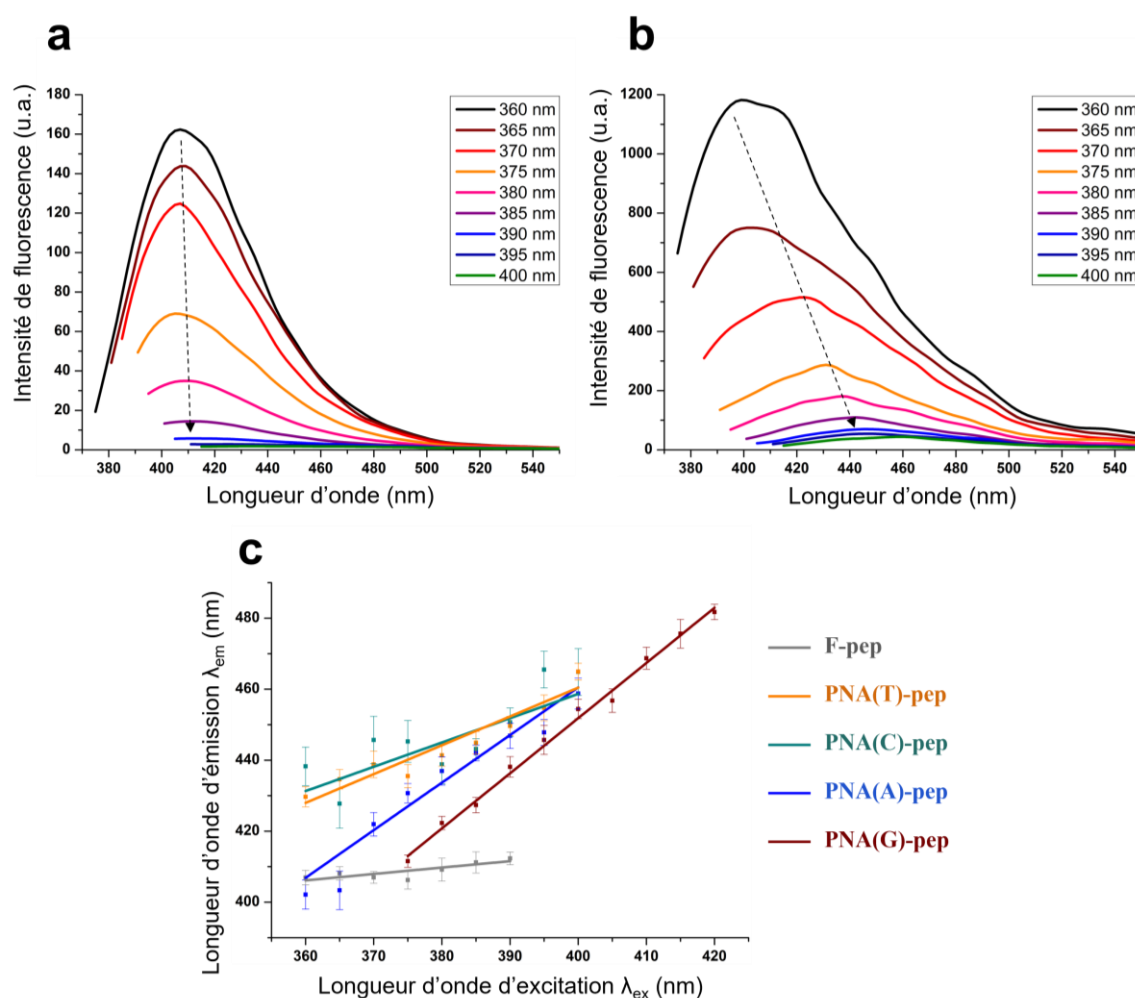
également observée, confirmant l'implication du  $\pi$ -stacking des phénylalanines dans les assemblages. Aussi, il est intéressant de noter que les spectres d'excitation des nucléopeptides montrent la présence d'une autre transition de fluorescence. Elle est repérée pour des excitations entre  $\lambda_{\text{ex}} = 302 \text{ nm}$  et  $308 \text{ nm}$  (en rouge, Figure II-18) avec une bande d'émission superposée à la bande des phénylalanines observée précédemment, bien qu'un peu plus basse en longueur d'onde ( $\lambda_{\text{em}} = 365 - 375 \text{ nm}$ ). Cette seconde transition de fluorescence, absente pour les composés F-pep et Aeg-pep, est donc caractéristique de la présence des PNA. Elle peut alors être attribuée aux interactions de  $\pi$ -stacking des bases comme déjà reporté par ailleurs.<sup>342</sup> Ces expériences en fluorescence apportent donc la preuve de l'existence de ces interactions au sein des structures supramoléculaires et permettent de mieux comprendre le rôle des bases nucléiques dans l'assemblage.



**Figure II-18.** Spectres de fluorescence en émission et en excitation pour tous les peptides/nucléopeptides, soulignant la bande d'émission principale (maximum entre 400 - 420 nm, en couleur) et la bande d'excitation correspondante (maximum entre 346 - 356 nm, en noir) attribuées à l'interaction de  $\pi$ -stacking des phénylalanines ainsi que, pour les composés PNA(X)-pep, la bande d'excitation supplémentaire (entre 302 - 308 nm, en rouge) attribuée à l'interaction entre les nucléobases.

## II.12.b Présence d'un effet de « *red-edge excitation shift* »

De plus, lors de l'analyse des spectres d'émission, nous avons remarqué un phénomène particulier de « *red-edge excitation shift* » (REES) pour les nucléopeptides PNA(X)-pep. Cette caractéristique, déjà décrite pour certains dérivés d'acides nucléiques,<sup>263,342</sup> produit un déplacement de la bande d'émission vers les grandes longueurs d'onde linéairement avec l'augmentation de la longueur d'onde d'excitation  $\lambda_{ex}$  comme présenté sur la Figure II-19. Le REES est un effet observé lorsque les systèmes fluorophores sont dans un environnement contraint ou très organisé, et provient d'une diminution de la vitesse de relaxation induite par le solvant, ce qui fait émerger des transitions dépendantes de l'énergie incidente.<sup>564-567</sup>



**Figure II-19.** Spectres d'émission montrant l'évolution de la bande d'émission de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation pour les composés F-pep (a) et PNA(A)-pep (b) (les autres spectres sont présentés Figure SII-12, en annexe) et, mise en évidence de la corrélation linéaire entre les longueurs d'onde d'émission et d'excitation, indicative d'un effet de REES pour les quatre nucléopeptides PNA(X)-pep, (c).

De fait, PNA(G)-pep présente le REES le plus important – identifié par la pente de régression linéaire la plus forte (c, Figure II-19) – suivi de PNA(A)-pep, PNA(T)-pep, PNA(C)-pep. Cela signifierait que les structures formées par PNA(G)-pep et PNA(A)-pep sont plus contraignantes que celles de PNA(T)-pep ou PNA(C)-pep, ce qui est en accord avec les observations précédentes, de relaxométrie RMN notamment (Partie II.7). Ces données indiquent donc que la base nucléique guanine se trouve dans un environnement plus contraint qu’adénine, thymine ou cytosine, un ordre que l’on peut rapprocher des propensions au  $\pi$ -stacking de chaque base : il a été montré, par des méthodes de modélisation notamment,<sup>568,569</sup> que le stacking des purines était plus stabilisant que celui des pyrimidines,<sup>80,347</sup> avec des énergies libres  $\Delta G_{\text{stack}}(\text{G/G}) = -1.65 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1} > \Delta G_{\text{stack}}(\text{A/A}) = -0.89 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1} > \Delta G_{\text{stack}}(\text{T/T}) = -0.57 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1} > \Delta G_{\text{stack}}(\text{C/C}) = -0.00 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ .<sup>570</sup> Aussi, cet ordre rappelle la hiérarchie observée tout au long de cette étude entre les nucléopeptides (par exemple en rhéologie, Partie II.6, en relaxométrie RMN, Partie II.7, ou encore en cinétique suivie par fluorescence de la ThT, Partie II.9.b), et nous pourrions donc expliquer les différences de propriétés entre les PNA(X)-pep par ces différences induites par la nature de la base nucléique à l’échelle des interactions moléculaires.

## II.13 Conclusion

Pour conclure, nous avons lors de cette étude synthétisé et caractérisé quatre composés originaux hybrides peptides/acides nucléiques, portant chacun une base nucléique (adénine, cytosine, guanine ou thymine) introduite sous forme de PNA : PNA(A)-pep, PNA(C)-pep, PNA(G)-pep et PNA(T)-pep. En comparant ces nucléopeptides avec l’octapeptide F-pep, déjà reporté dans la littérature, et Aeg-pep (ces deux derniers ne portant pas de base), nous avons souligné les différences de propriétés induites par la présence et la nature de la nucléobase, notamment en termes d’auto-assemblage et de formation d’hydrogels. A l’aide d’une étude multi-échelle, nous avons mis en évidence le rôle des bases nucléiques au sein de la structure d’assemblage.

La synthèse, purification et caractérisation chimique ont été effectuées avec succès, permettant d’obtenir des composés de pureté supérieure à 95% (Partie II.3). Après étude des conditions de formulation, des hydrogels à 15 mM en tampon aqueux Tris.HCl (1 M, pH = 7.4) ont été formés pour chacun des composés, présentant des disparités d’aspects et de propriétés macroscopiques (Partie II.5).

La structure moléculaire des quatre composés nucléopeptidiques diffère par la nature de la base nucléique (adénine, cytosine, guanine ou thymine), et se distingue de F-pep qui porte une phénylalanine et de Aeg-pep qui ne présente pas de système aromatique en position N-terminale. Si d'une part ces six molécules ont une structure secondaire similaire lorsqu'elles sont seules en solution (voir expériences de RMN, Partie II.4 et CD, Partie II.10.a), celle-ci se différencie lorsque les peptides/nucléopeptides s'engagent dans l'auto-assemblage. Alors, bien que la partie peptidique de tous les composés étudiés (c'est-à-dire le fragment -EFEFKFK) soit impliquée de la même façon dans l'assemblage (d'après la méthode CSI, Partie II.11.b), les parties PNA des nucléopeptides interagissent entre elles par  $\pi$ -stacking formant des interactions supplémentaires. Ainsi, celles-ci influencent d'une part la cinétique de l'auto-assemblage (voir suivi de la fluorescence de la ThT, Partie II.9) et d'autre part la structure supramoléculaire formée. En effet, en l'absence de groupement PNA comme c'est le cas pour F-pep, l'assemblage de peptides forme des feuilletts  $\beta$  antiparallèles (voir FTIR, Partie II.10). A l'échelle microscopique, le réseau fibrillaire qui se forme est constitué de grandes fibres éparses ce qui se traduit à l'échelle macroscopique par un gel opalescent, faible ( $G' = 320$  Pa, et  $\tau_y = 2.6$  Pa), non fusible ni thermoréversible (voir rhéologie, Partie II.6).

En présence d'une partie PNA, les interactions de  $\pi$ -stacking prennent plus d'importance parmi les interactions directrices de l'auto-assemblage (voir CD, Partie II.10), ce qui vient modifier la morphologie des objets formés, créant ainsi des fibres de petites tailles entremêlées en un réseau dense avec de nombreux points de jonction (voir observations de TEM, Partie II.8). C'est la nature de ce réseau, aux pores de tailles restreintes (voir expériences de relaxométrie RMN, Partie II.7), qui confère aux gels nucléopeptidiques leurs résistances à la contrainte élevées ( $\tau_y$  entre 10 et 100 Pa environ), leurs températures de transition gel-sol ( $T_m$  entre 35 – 50 °C), et une capacité de régénération thermique, caractéristiques des plus intéressantes pour l'applicabilité de tels hydrogels (voir rhéologie, Partie II.6).

Aussi, en fonction de la nature de la base nucléique et ce, probablement en lien avec les énergies de stabilisation des interactions de  $\pi$ -stacking dans chaque cas, les effets induits par la présence d'un PNA sont différents. Les composés portant une purine, la guanine (PNA(G)-pep) ou l'adénine (PNA(A)-pep), dont les énergies d'interactions par  $\pi$ -stacking sont les plus stabilisantes, présentent dans leur réseau des objets de dimension supérieure formés par la coalescence de fibres. Cela peut expliquer l'aspect de leurs gels – plus opalescents que ceux de PNA(C)-pep ou PNA(T)-pep – ainsi que leurs modules viscoélastiques très élevés avec  $G' \approx$

22 kPa et  $G' \approx 7$  kPa pour PNA(G)-pep et PNA(A)-pep, respectivement. Les structures d'assemblage de PNA(A)-pep et PNA(T)-pep sont, d'après les spectres de CD (Partie II.10.b), affectées par les interactions amenées par les bases nucléiques, et forment des systèmes de type feuillets  $\beta$  « twistés » ce qui induit peut-être une structure moins stable et donc des gels moins forts que pour PNA(G)-pep. En plus de cela, les composé PNA(C)-pep et dans une moindre mesure PNA(T)-pep forment des structures de faible organisation (comme vu en FTIR, Partie II.10.b), des agrégats qui viennent à nouveau affaiblir la structure de leurs hydrogels comparés à ceux des autres composés.

Composé	Interaction de stacking des nucléobases <sup>570</sup>	Assemblage	Structures microscopiques	Propriétés de gel	Aspect macroscopique
<b>Aeg-pep</b>	-	Stacking des Phe prédominant	Grandes fibres peu définies	Modules et résistance faibles	Gel translucide faible
<b>F-pep</b>	-	Feuillets $\beta$	Grandes fibres peu denses	Modules et résistance faibles	Gel opalescent faible
<b>PNA(A)-pep</b>	-0.89 kcal·mol <sup>-1</sup>	Feuillets $\beta$ twistés + Stacking des Phe	Petites fibres denses + grandes structures	Modules et résistance élevées	Gel opalescent fort
<b>PNA(C)-pep</b>	-0.00 kcal·mol <sup>-1</sup>	Stacking des Phe prédominant	Petites fibres denses + nombreux agrégats	Modules faibles résistance élevée Thermo-réversible Thixotrope	Gel translucide faible
<b>PNA(G)-pep</b>	-1.65 kcal·mol <sup>-1</sup>	Feuillets $\beta$ + Stacking des Phe	Petites fibres denses + grandes structures	Modules et résistance élevées	Gel opalescent fort
<b>PNA(T)-pep</b>	-0.57 kcal·mol <sup>-1</sup>	Feuillets $\beta$ twistés + Stacking des Phe	Petites fibres denses + agrégats	Modules faibles résistance élevée Thermo-réversible Thixotrope	Gel translucide faible

**Tableau II-6.** Récapitulatif des observations faites à différentes échelles soulignant le lien entre l'interaction de  $\pi$ -stacking des nucléobases à l'échelle intermoléculaire, les caractéristiques de l'auto-assemblage et du réseau fibrillaire formé, et les propriétés des hydrogels à l'échelle macroscopique.



En conclusion, les composés hybrides peptides/acides nucléiques présentés dans cette étude, capables de former des hydrogels aux caractéristiques diverses et aux propriétés intéressantes, sont la preuve de l'intérêt de l'introduction de bases nucléiques dans la structure primaire de peptides gélifiants. Mieux comprendre la manière dont les bases nucléiques affectent l'assemblage supramoléculaire et modulent les propriétés des hydrogels donne des pistes afin de guider le design raisonné de nouveaux nucléopeptides gélifiants pour faire émerger des propriétés physico-chimiques et mécaniques recherchées.

Les bases nucléiques portées par les composés PNA(X)-pep semblent interagir par  $\pi$ -stacking aromatiques dans la structure supramoléculaire au détriment d'interaction par liaisons hydrogène, une autre interaction qui aurait été possible. Dans notre cas, les hydrogels ont été formulés à partir d'un seul constituant ; autrement dit, chaque gel ne comportait qu'un seul type de nucléobase. Bien que la formation d'homodimères (entre nucléobases de même nature A/A, C/C, G/G, T/T) soit connue<sup>4,145,571</sup> (Partie I.2.a, Chapitre I), ces interactions sont en général moins favorables que l'association de Watson-Crick,<sup>572</sup> entre bases complémentaires cytosine avec guanine d'une part, ou thymine avec adénine d'autre part. Afin de favoriser ce type d'interactions, modifier les systèmes d'assemblage et explorer de nouvelles propriétés de gélification, nous avons considéré le mélange des composés PNA(X)-pep présentés dans cette Partie I, de manière complémentaire.





# Chapitre III : Formulations et caractérisations multi-échelles d'hydrogels multi-composés : étude de mélanges de nucléopeptides aux bases nucléiques complémentaires

## III.1 Introduction

Les mélanges de composés sont, comme présenté en Introduction générale (et Partie I.3 du Chapitre I), d'un intérêt grandissant dans le domaine de la matière molle. L'approche consistant à formuler des matériaux au départ de plusieurs composés est déjà très largement employée dans l'industrie, notamment dans le domaine des polymères ou encore des alliages pour ne citer que quelques exemples.<sup>157-160</sup> En particulier, pour la formulation d'hydrogels supramoléculaires, les systèmes multi-composés, c'est-à-dire constitués d'au moins deux composés différents, offrent de nouvelles possibilités quant aux propriétés accessibles, qui ne pourraient pas être obtenues sur des systèmes mono-composés, beaucoup plus limités.<sup>35</sup> Cette approche permet par exemple de moduler les propriétés physicochimiques et/ou mécaniques des gels formés, ou encore d'apporter de nouvelles propriétés, de bio-fonctionnalisation, par exemple. En effet, le mélange de deux composés permet, en fonction de la nature de chacun, d'obtenir un matériau combinant les propriétés des différents constituants. Ainsi, l'utilisation conjointe d'un gélifiant et du même gélifiant sur lequel a été greffée une molécule d'intérêt,<sup>102,205,450,453,573</sup> ou encore l'emploi de deux gélifiants différents A et B aux propriétés distinctes,<sup>90,409,411</sup> ont pu être reportés à de nombreuses reprises ces dernières années. Également, d'autres designs s'appuyant sur l'interaction entre les deux constituants pour voir émerger de nouvelles propriétés ont été proposés,<sup>105</sup> offrant soit un renforcement du système (effet synergique ou coopératif)<sup>169,457,493,574</sup> ou à l'inverse, sa dégradation (effet disruptif ou délétère).<sup>409,575</sup> Dans certains cas, ces mélanges entraînent l'apparition d'autres caractéristiques telles que la dépendance des propriétés mécaniques au pH<sup>430</sup> ou à la température,<sup>576</sup> la capacité de régénération thermique,<sup>373</sup> la sensibilité à la présence de composés chimiques<sup>357,364,388,577</sup> ou encore la modulation de la fluorescence.<sup>426</sup> Le mélange permet ainsi d'atteindre parfois des propriétés de gels inaccessibles dans le cadre de l'utilisation d'un seul composé.<sup>168,457</sup>

Dans le cas où les composés mélangés pour former le gel sont tous deux capables d'auto-assemblage, il est possible d'observer principalement deux types de comportement,<sup>168,176,357,365,396–398</sup> détaillés dans le Chapitre I et résumés ci-après:

- le « *self-sorting* », comportement où chaque composé va s'assembler indépendamment, formant des objets nano- voire microscopiques ne comportant qu'un seul type de composé (Partie I.3.b.ii, Chapitre I). La structure finale est alors souvent constituée de réseaux interpénétrés orthogonaux (peu d'interaction entre les deux), ce qui confère à ces gels multi-composés des propriétés des deux composés « parents ».<sup>393,402–404,578</sup>
- le co-assemblage, pour lequel les composés mélangés forment des structures d'assemblages supramoléculaires mixtes, c'est-à-dire comportant à la fois l'un et l'autre des composés (Partie I.3.b.iii, Chapitre I). Dans ce cas, les assemblages sont souvent différents des systèmes « parents », avec des cinétiques d'association et des morphologies d'objets à l'échelle nanoscopique différentes.<sup>120,169,357,381,384,398,416</sup>

Plusieurs groupes<sup>105,165,405</sup> ont remarqué que les composés ayant le même mode d'assemblage ou des structures moléculaires similaires ont tendance à réaliser du co-assemblage plutôt que du *self-sorting* (voir Partie I.3.b.iv, Chapitre I). En fonction des molécules gélifiantes choisies, il est ainsi possible d'atteindre l'un ou l'autre de ces comportements. C'est pourquoi, une démarche courante pour la formation de co-gels – gels formés par le co-assemblage de composés gélifiants – consiste en la mise en présence de deux composés (ou plus) qui sont soit similaires mais présentant une petite modification structurale (par exemple : substitution d'un acide aminé, ajout ou modification d'un groupement fonctionnel),<sup>176</sup> soit complémentaires, capables d'interagir spécifiquement par liaisons hydrogène<sup>32</sup> ou par interactions ioniques. Dans ce dernier cas, le design de composés gélifiants comportant une complémentarité en termes de charges électrostatiques permet en effet de former de nouveaux hydrogels.<sup>164,173,174</sup> Cette approche est notamment développée dans le Chapitre IV de ce manuscrit.

En parallèle, dans le développement d'hydrogels peptidiques multi-composés basés sur des systèmes complémentaires, l'utilisation de bases nucléiques a récemment été reportée. Dans leur étude publiée dans *Science* en 2018, les équipes de S.I Stupp et E. Luijten<sup>322</sup> ont mis au point des composés nucléopeptidiques complémentaires dont l'assemblage peut être modulé

dynamiquement en agissant sur la réticulation (« *cross-link* ») réversible du réseau de gélifiants. Ils proposent ainsi différents composés issus de la modification de peptides amphiphiles (chaîne aliphatique C<sub>16</sub> + dodécapeptide) capables de s'auto-assembler de manière intermoléculaire grâce notamment à la complémentarité de charges entre deux triades d'acides glutamiques et de lysines séparées ou non par un bras PEG de 2 ou 6 unités éthylène glycol (soit trois composés C<sub>16</sub>-(Val)<sub>3</sub>-(Ala)<sub>3</sub>-(Glu)<sub>3</sub>-(Lys)<sub>3</sub>, C<sub>16</sub>-(Val)<sub>3</sub>-(Ala)<sub>3</sub>-(Glu)<sub>3</sub>-PEG<sub>2</sub>-(Lys)<sub>3</sub> et C<sub>16</sub>-(Val)<sub>2</sub>-(Ala)<sub>2</sub>-(Glu)<sub>4</sub>-PEG<sub>6</sub>-(Lys)<sub>4</sub>). De manière intéressante, en remplaçant la triade de lysine en position C-terminale par une seule lysine greffée en N<sub>ε</sub> par un brin d'ADN (de 10 à 45 nucléotides), les auteurs démontrent la capacité des hybrides peptides amphiphiles/ADN ainsi formés à gélifier. En effet, ils analysent les caractéristiques de gels constitués du mélange de deux composés possédant la même séquence peptidique-PEG, mais des séquences d'ADN différentes et complémentaires. Alors que la partie peptide amphiphile pilote le processus d'assemblage principal, formant des objets fibrillaires comme elle le ferait en l'absence de la partie ADN, les séquences d'acides nucléiques induisent des interactions additionnelles interfibrilles. La présence de ces interactions spécifiques reposant sur la complémentarité des séquences d'ADN permet la formation de « ponts » entre les fibres (b, Figure I-9, Partie I.2.d, Chapitre I). Ces interactions interfibrilles, de *cross-link*, modifient le réseau fibrillaire en induisant notamment la formation de faisceaux (« *bundles* », en anglais). L'augmentation du nombre de points de jonctions entre les fibres complexifie la topologie du réseau fibrillaire et change les propriétés mécaniques du matériau gel (module élastique montant à G' = 18000 Pa, contre G' < 1000 Pa en l'absence des brins d'ADN réticulant).

Aussi, une démarche similaire a été proposée par DiMaio *et al.* (2017),<sup>133</sup> utilisant cette fois un brin d'ADN supplémentaire pour créer des jonctions entre les nucléopeptides. Par conséquent, les travaux de ce type en quantité grandissante montrent l'intérêt d'utiliser la complémentarité spécifique naturelle des acides nucléiques dans la recherche de nouveaux systèmes multi-composés gélifiants (Partie I.3.c.vi, Chapitre I).<sup>137,283,320,346,347,579</sup>

C'est dans ce contexte que nous avons émis l'hypothèse que les composés PNA(A)-pep, PNA(C)-pep, PNA(T)-pep et PNA(G)-pep proposés dans le chapitre précédent (Partie II.2, Chapitre II) et dont la capacité à gélifier a été démontrée, pourraient, en mélange, permettre de former de nouveaux hydrogels, possédant des caractéristiques nouvelles grâce à leurs

bases nucléiques complémentaires deux à deux. L'étude des systèmes multi-composés, c'est-à-dire dans notre cas comportant deux composés différents, formés d'une part de PNA(A)-pep + PNA(T)-pep et d'autre part de PNA(C)-pep + PNA(G)-pep a donc été réalisée en s'appuyant sur les données précédemment obtenues pour les composés seuls (Chapitre II). Pour rappel, les systèmes mono-composés ont démontré leur capacité à former des hydrogels aux caractéristiques intéressantes (thermosensibilité, thermoréversibilité, thixotropie) et aux propriétés mécaniques supérieures à celles de gels de référence de F-pep. De manière intéressante, les propriétés des matériaux obtenus sont dépendantes de la nature de la base nucléique choisie. En nous appuyant sur une étude multi-échelle, nous avons conclu que ces différences étaient induites par la présence des bases nucléiques, qui interagissent notamment par des interactions de  $\pi$ -stacking intermoléculaires, modifiant finement l'assemblage de type feuillets  $\beta$  à l'échelle supramoléculaire et entraînant la formation d'un réseau fibrillaire différent.

Dans ce chapitre expérimental, les objectifs sont par conséquent de discuter de l'effet du mélange des composés possédant des bases complémentaires sur la formation des hydrogels multi-composés. Nous avons ainsi étudié l'influence de cette approche sur les propriétés mécaniques des hydrogels et réalisé une analyse multi-échelle afin d'identifier le comportement d'interaction entre les nucléopeptides mis en présence et son impact sur l'assemblage supramoléculaire.

### **III.2 Formulation et observations macroscopiques de mélanges équimolaires des composés complémentaires**

Afin d'étudier les mélanges de PNA(A)-pep + PNA(T)-pep et PNA(C)-pep + PNA(G)-pep, les conditions de formulation des échantillons ont en premier lieu été sélectionnées de manière à favoriser l'interaction entre les composés mis en présence. Il a été choisi de travailler tout d'abord sur des mélanges 1 :1 molaires, afin de favoriser des assemblages stœchiométriques tel que l'appariement, canonique, de Watson-Crick.<sup>267</sup> Il s'agit de l'association de nucléobases la plus connue (Figure I.6, Partie I.2.a, Chapitre I), qui occupe une place centrale dans la complémentarité des duplexes d'ADN<sup>145</sup> et repose sur la formation de liaisons hydrogène (deux entre adénine et thymine, trois entre cytosine et guanine) associant de manière spécifique les bases nucléiques en présence. D'autres types d'appariements entre les nucléobases déjà décrits sont également possibles (par exemple : Hoogsteen, Hoogsteen

inversé, Watson-Crick inversé, formation d'homodimères ou de triplets, etc...<sup>144-146</sup> Alors que les systèmes mono-composés ne possédaient qu'une seule base nucléique, deux sont présentes dans ces systèmes multi-composés, et il est tout à fait envisageable que ces interactions puissent faire concurrence au mode d'assemblage déjà observé et discuté au long du Chapitre I.

Les hydrogels mono-composés précédemment étudiés étaient formulés dans le tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4) (Partie II.5, Chapitre II). Afin de pouvoir nous appuyer sur les données précédemment acquises, les mélanges ont été préparés dans les mêmes conditions de tampon et à pH physiologique. Concernant la concentration de travail, nous avons choisi de formuler les échantillons à une concentration totale  $C_T = 15$  mM, soit une concentration en chaque composé complémentaire de  $C = 7.5$  mM pour les mélanges équimolaires, ce qui assure également la pertinence de la comparaison avec les hydrogels mono-composés à 15 mM, soit la même quantité totale de nucléopeptides dans le milieu.

De plus, lors d'un mélange de composés, il faut s'assurer de l'homogénéité des échantillons afin d'éviter la création de domaines mono-composés qui pourraient biaiser la formation de structures.<sup>163</sup> C'est pourquoi les lyophilisats des deux composés complémentaires sont pesés dans le même flacon, puis leurs poudres mélangées à la spatule avant solubilisation dans le tampon Tris.HCl. Les échantillons sont ensuite chauffés 3 min à 70 °C et agités vigoureusement. Les solutions obtenues sont enfin laissées au repos à température ambiante.

A partir des quatre composés nucléopeptidiques PNA(X)-pep synthétisés, deux hydrogels équimolaires formés au départ de deux composés possédant des nucléobases complémentaires ont été formulés : le mélange de PNA(A)-pep et PNA(T)-pep noté par la suite {A+T} et le mélange de PNA(C)-pep et PNA(G)-pep noté par la suite {C+G}. Utilisant la méthode d'inversion de tube (« *tilted-tube test* »),<sup>5</sup> nous avons déterminé le temps de gélification apparent de ces gels, à savoir 5 min pour {A+T} contre seulement 2 min pour {C+G} qui forment des gels translucides pour le premier et plutôt opalescents pour le second (Figure III-1). Si {A+T} présente un temps de gélification apparent intermédiaire entre les deux gels mono-composés PNA(A)-pep ( $t_{s/g} = 4$  min) et PNA(T)-pep ( $t_{s/g} = 6,5$  min) le second mélange, {C+G}, est beaucoup plus rapide à se former que les composés seuls ( $t_{s/g} = 8$  min et  $t_{s/g} = 4$  min pour PNA(C)-pep et PNA(G)-pep, respectivement). Cela signifie que, si l'on remplace la moitié des molécules de PNA(G)-pep dans son gel à 15 mM, par des molécules de PNA(C)-pep, sa

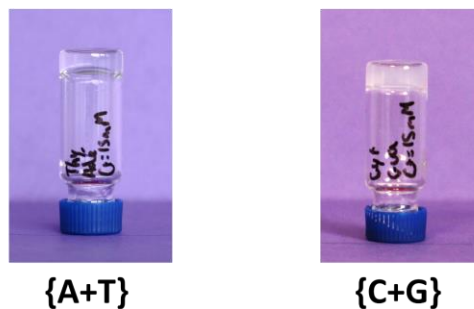


vitesse de gélification est doublée. Réciproquement, si l'on remplace la moitié des molécules de PNA(C)-pep par des molécules de PNA(G)-pep, sa vitesse de gélification est multipliée par un facteur quatre. Dans le cas du mélange {C+G} il est donc indéniable que le mélange des deux composés a un effet sur le phénomène de gélification. Pour {A+T}, il est plus difficile de conclure, du moins en suivant le même raisonnement que pour {C+G}.

**a**

Echantillon	Temps de gélification apparent $t_{s/g}$	Aspect du gel
{A+T}	5 min	Gel translucide
{C+G}	2 min	Gel opalescent

**b**



**Figure III-1.** Temps apparents de gélification (a) et aspects des hydrogels multi-composés {A+T} et {C+G} (b), étudiés à  $C_T = 15 \text{ mM}$  (1 :1), en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

Ces premières observations macroscopiques montrent que les hydrogels multi-composés présentent des aspects et des temps de gélification différents de leurs gels « parents ». A priori le mélange {C+G} montre une interaction coopérative des deux composés, et le mélange de PNA(A)-pep avec PNA(T)-pep ne montre en tout cas pas d'effet délétère sur la gélification.

### III.3 Caractérisations mécaniques des hydrogels multi-composés {A+T} et {C+G} par rhéométrie

Dans le but d'obtenir des données quantitatives concernant les propriétés viscoélastiques des hydrogels formés par les mélanges équimolaires complémentaires {A+T} et {C+G}, des expériences de rhéologie ont été réalisées.

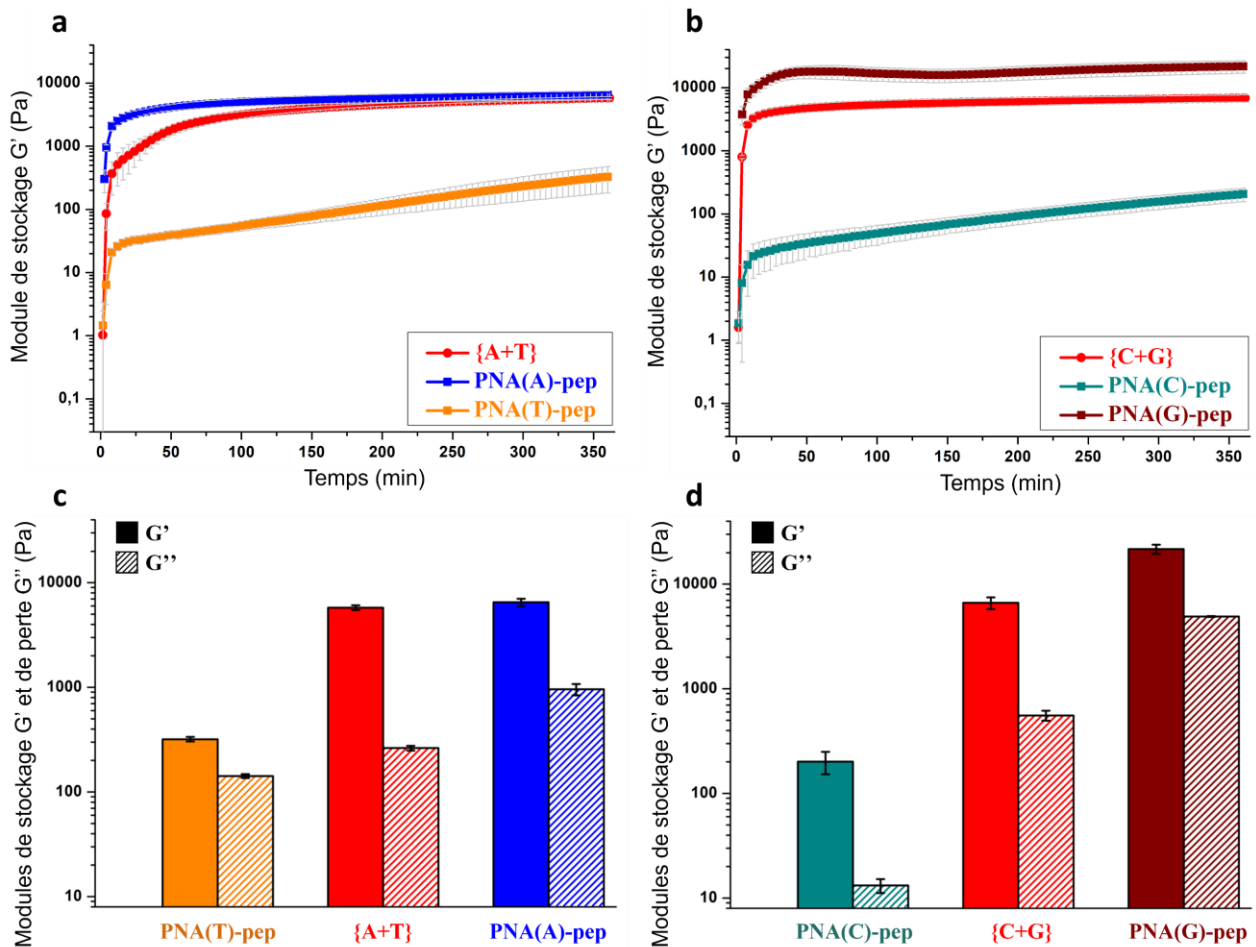
#### III.3.a Cinétique de formation des hydrogels

Des balayages en temps ont été effectués sur des gels {A+T} et {C+G}, dont les résultats sont reportés Figure III-2. Le rhéogramme de {C+G} (en rouge, b, Figure III-2) montre un gel à la formation rapide avec une vitesse de formation initiale  $V_0 = 585 \text{ Pa}\cdot\text{min}^{-1}$ , moins élevée que

celle du gel mono-composé de PNA(G)-pep ( $V_0 = 880 \text{ Pa}\cdot\text{min}^{-1}$ ) mais bien supérieure à celle de PNA(C)-pep ( $V_0 = 2.1 \text{ Pa}\cdot\text{min}^{-1}$ ) à même concentration totale. Aussi, le profil obtenu par balayage en temps pour {C+G} est similaire à ceux de PNA(G)-pep et PNA(C)-pep, présentant une phase de croissance rapide puis un plateau. Les modules quant à eux sont intermédiaires avec  $G' = 6794 \text{ Pa}$  ( $G'' = 559 \text{ Pa}$ , en rouge, d, Figure III-2) pour le mélange, contre  $G' = 201 \text{ Pa}$  ( $G'' = 13 \text{ Pa}$ ) pour PNA(C)-pep et  $G' = 21650 \text{ Pa}$  ( $G'' = 2135 \text{ Pa}$ ) pour PNA(G)-pep. De manière intéressante, l'hydrogel résultant de l'association de ces deux composés aux bases complémentaires ne présente pas des modules viscoélastiques plus élevés que le gel de PNA(G)-pep, hydrogel le plus fort mesuré parmi les mono-composés (Partie II.6.a, Chapitre II), ce qui aurait été signe d'un effet synergique flagrant. En revanche, ses modules viscoélastiques sont bien supérieurs à ceux du gel de PNA(C)-pep à 15 mM, avec un facteur multiplicatif supérieur à 30.

Concernant le mélange {A+T}, le profil (en rouge, a, Figure III-2) présente un épaulement à  $G' = 767 \text{ Pa}$  vers 17.5 min qui peut-être le signe de la formation d'un état structural intermédiaire. Deux hypothèses sont possibles : soit il s'agit d'un état structural intermédiaire dans lequel les deux composés interagissent mais forment deux structures mixtes de cinétiques de formations différentes,<sup>398,411,419,428</sup> soit les deux composés PNA(T)-pep ou PNA(A)-pep se structurent séparément avec des cinétiques différentes.

Les modules de {A+T} à 6 h de cinétique ( $G' = 5803 \text{ Pa}$  ;  $G'' = 263 \text{ Pa}$ , en rouge, c, Figure III-2) sont, tout comme pour {C+G}, intermédiaires entre les modules de PNA(A)-pep ( $G' = 6512 \text{ Pa}$ ,  $G'' = 532 \text{ Pa}$ ) et PNA(T)-pep ( $G' = 319 \text{ Pa}$ ,  $G'' = 16 \text{ Pa}$ ). Une synergie évidente qui se traduirait par une augmentation forte des modules viscoélastique du mélange comparé aux systèmes mono-composés n'est donc pas observée. Néanmoins, tout en gardant à l'esprit le caractère non-linéaire des modules viscoélastiques – un échantillon deux fois plus concentré en peptide ne sera pas forcément deux fois plus fort<sup>399</sup> – nous pouvons remarquer que le module viscoélastique du mélange {A+T} après 6 h est plus élevé que la moyenne arithmétique des modules des gels de PNA(A)-pep et PNA(T)-pep seuls à 15 mM (module théorique  $G' = 3416 \text{ Pa}$  obtenu en calculant la moyenne arithmétique des modules « parents »).

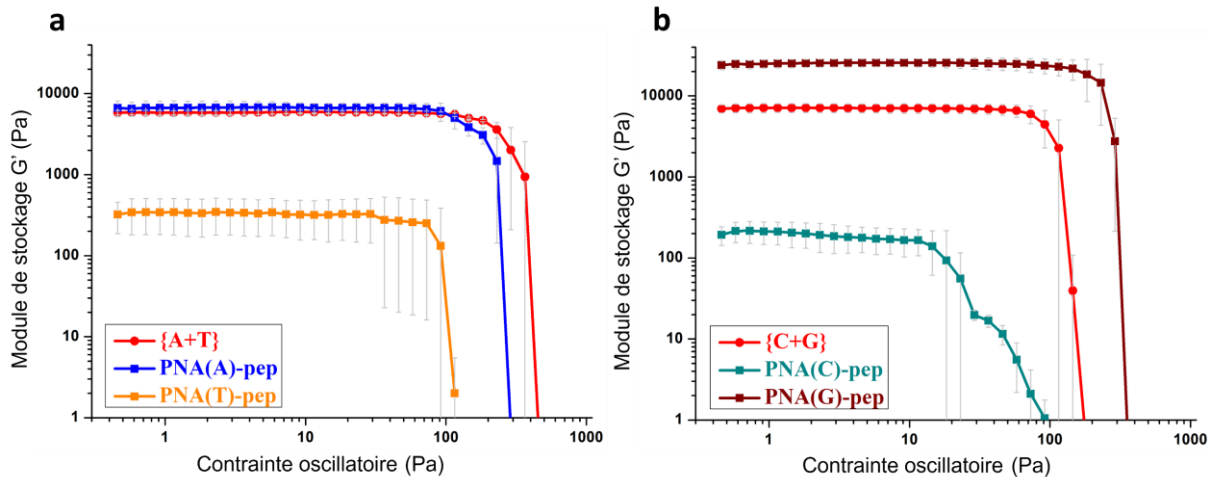


**Figure III-2.** Balayages en temps (a et b) et report des modules de stockage ( $G'$ ) et de perte ( $G''$ ) après 6 h (c et d) pour les hydrogels multi-composés {A+T} et {C+G} en comparaison avec les gels mono-composés de leurs constituants. Tous les gels sont étudiés à  $C_T = 15 \text{ mM}$  (1 :1), en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

Ainsi, les modules atteints par les deux gels multi-composés {A+T} et {C+G} pourraient indiquer un effet synergique de l'association des systèmes complémentaires sans être flagrant pour autant. Les rhéogrammes ont des profils similaires à ceux des gels mono-composés, ce qui serait signe d'un processus d'assemblage similaire. {A+T} présente néanmoins un léger épaulement qui pourrait signifier la formation de structures distinctes aux cinétiques différentes.

### III.3.b Résistance à la contrainte mécanique des hydrogels

Pour compléter la caractérisation mécanique des hydrogels {A+T} et {C+G}, des balayages en contrainte ont été réalisés à l'aide du rhéomètre (Figure III-3). Pour rappel, cette expérience permet d'identifier la contrainte limite  $\tau_y$  du domaine linéaire viscoélastique des gels (voir Partie II.6.b, Chapitre II), et d'observer leur cassure face à la contrainte mécanique imposée.



**Figure III-3.** Balayages en contrainte pour les hydrogels multi-composés {A+T} (a) et {C+G} (b) en comparaison avec les gels mono-composés de leurs constituants. Tous les gels sont étudiés à  $C_T = 15$  mM (1 :1), en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

Le profil correspondant au balayage en contrainte de {A+T}, en rouge (a, Figure III-3), est très similaire à celui de PNA(A)-pep (en bleu) à ceci près que la structure du gel multi-composé est légèrement plus résistante ( $\tau_y = 131$  Pa contre  $\tau_y = 94.7$  Pa) ce qui en fait l'hydrogel le plus résistant formulé jusqu'alors (le gel mono-composé PNA(G)-pep 15mM présentait un  $\tau_y = 103$  Pa, Figure II-7, Chapitre II). Cela peut paraître contre-intuitif d'avoir un gel aux modules viscoélastiques plus modestes mais avec une résistance à la contrainte élevée ; pourtant, ces deux grandeurs caractérisent des propriétés distinctes des matériaux :  $G'$  relève de la force du gel, sa cohérence solide, alors que  $\tau_y$  relève de son comportement sous contrainte mécanique externe.<sup>35,506</sup> Quoi qu'il en soit, les modules viscoélastiques tout comme la résistance à la contrainte sont inhérents à la structure interne des hydrogels et sont liés, dans le cas de réseaux fibrillaires (comme observés en TEM pour les gels de PNA(X)-pep, voir Partie II.8, Chapitre II), à la morphologie des fibres et à la densité de leur réseau.<sup>150,154</sup>

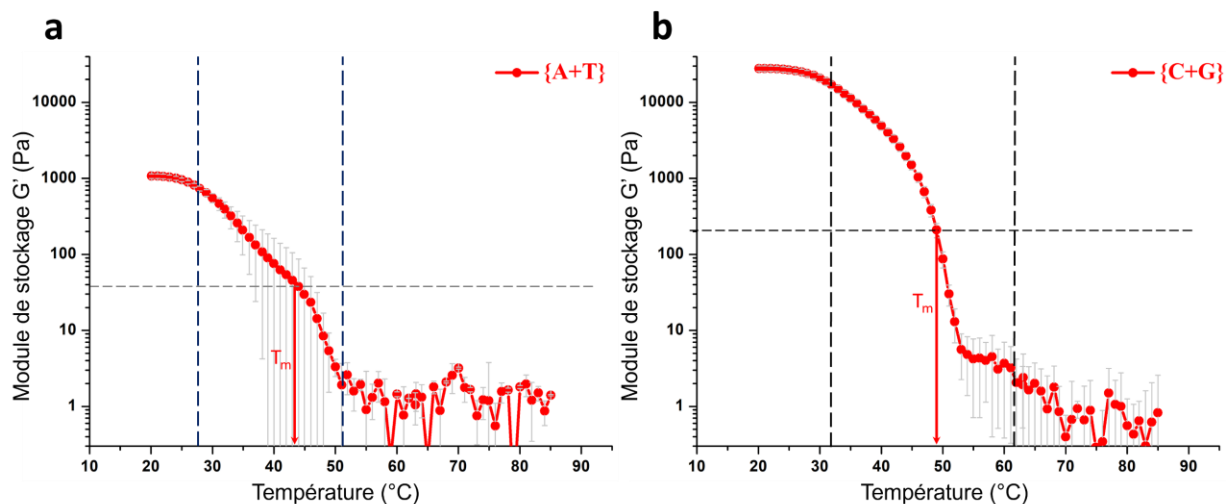
Le mélange {C+G} (en rouge, b, Figure III-3) forme un hydrogel dont la contrainte limite ( $\tau_y = 59$  Pa) est comprise entre celle du gel de PNA(C)-pep ( $\tau_y = 10.4$  Pa) (en vert, b, Figure III-3) et de PNA(G)-pep ( $\tau_y = 103$  Pa) (en bordeaux, b, Figure III-3). Ce gel apparaît ici encore comme un intermédiaire entre ses deux gels « parents ».

Là où le balayage en contrainte sur {C+G} ne donne pas beaucoup d'indices sur l'interaction entre les deux composés mélangés, {A+T} montre un effet bénéfique du mélange par une augmentation de sa résistance à la contrainte. Aucun des deux rhéogrammes ne présente de domaines linéaires multiples ; en effet, dans le cas de systèmes présentant différents types de structures, il n'est pas rare d'observer des domaines distincts où chaque cassure correspond à la résistance individuelle de différents objets microscopiques. Il semble donc que les gels multi-composés {A+T} et {C+G} soient homogènes à une certaine échelle de taille et ne se présentent pas sous la forme de réseaux *self-sorted* alternants (voir Partie I.3.b.ii, Chapitre I).

### III.3.c Comportement des hydrogels à la température

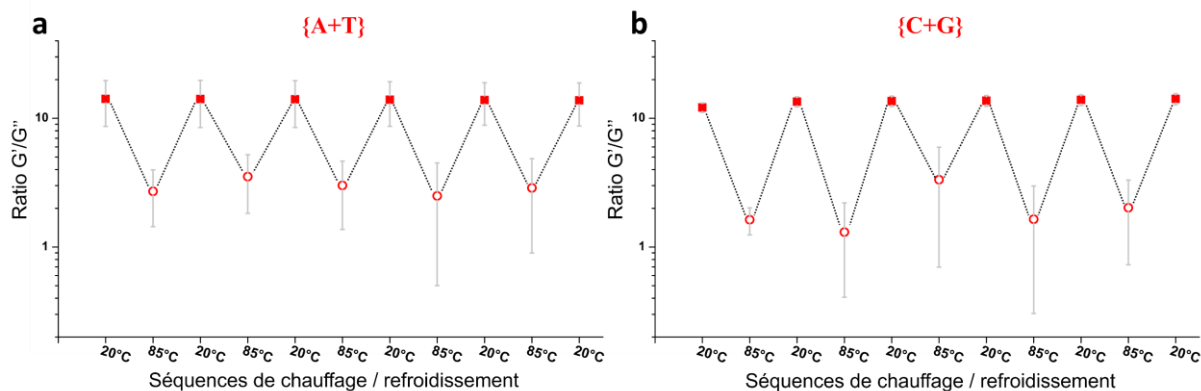
Pour déterminer le comportement en température des gels multi-composés {A+T} et {C+G}, ces derniers ont subi des tests rhéologiques de balayages en température. Leurs modules viscoélastiques ont alors été mesurés de 20 °C à 85 °C avec les mêmes paramètres que ceux utilisés pour les systèmes mono-composés (rampe de 5 °C·min<sup>-1</sup>, déformation imposée  $\gamma = 5 \cdot 10^{-3}$ , fréquence  $f = 1$  rad·s<sup>-1</sup>, voir Partie V.1.c et Partie V.2.b, Chapitre V « Partie expérimentale »).

Les rhéogrammes correspondant à ces expériences sont reportés Figure III-4 et montrent que les deux mélanges présentent une transition gel-sol, correspondant au passage de l'état gel (solide viscoélastique) à un état plus déstructuré, proche du liquide viscoélastique, comme définie dans la Partie II.6.c, Chapitre II. Cette transition s'observe sur les rhéogrammes par une chute du module de stockage  $G'$ , et il est ainsi possible de noter les températures associées  $T_m = 43.2$  °C et  $T_m = 48.9$  °C pour {A+T} et {C+G}, respectivement. Ces valeurs se situent dans la même gamme de températures que celles observées pour les mono-composés ( $36.2$  °C <  $T_m$  <  $49.5$  °C). Les profils de déstructuration sont également similaires à ceux observés pour les hydrogels de mono-composés. Cependant, les zones de transition sont plus étendues que pour les gels mono-composés (zones en pointillés sur la Figure III-4), pouvant indiquer une plus grande dispersion des tailles de nanostructures.



**Figure III-4.** Balayages en température pour les hydrogels multi-composés {A+T} (a) et {C+G} (b) étudiés à  $C_T = 15 \text{ mM}$  (1 :1), en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

Aussi, à l'instar des gels mono-composés de nucléopeptides (Partie II.6.c), les gels multi-composés {A+T} et {C+G} sont capables de se reformer après déstructuration thermique. Même après cinq cycles de chauffage/refroidissement – alternant phase à 80 °C et refroidissement jusqu'à 20 °C (rampe 5 °C·min<sup>-1</sup>) laissant 1 h les gels se reformer à cette température – les modules viscoélastiques des hydrogels multi-composés {A+T} et {C+G} sont retrouvés quasiment à l'identique, comme présenté Figure III-5. Cette capacité de régénération thermique est donc héritée des gels « parents », conservée malgré le mélange. Cette propriété, intéressante en termes d'applications (encapsulation d'agents thérapeutiques,<sup>517,518</sup> gel injectable *in vivo* pour une gélification *in situ*,<sup>72,519</sup> support à la topologie finement contrôlée pour de la culture cellulaire),<sup>55,349</sup> découle probablement de la structure interne des hydrogels, comme c'était le cas pour les systèmes mono-composés.



**Figure III-5.** Evaluation de la capacité de régénération thermique des hydrogels multi-composés {A+T} (a) et {C+G} (b) étudiés à  $C_T = 15 \text{ mM}$  (1 :1), en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4), selon plusieurs cycles de chauffage/refroidissement. La chute du ratio  $G'/G''$ , caractéristique des propriétés mécaniques de chaque hydrogel, est indicative d'une fluidification du gel (transition gel/sol) tandis que l'augmentation de cette valeur démontre de la régélification de l'échantillon. Méthode de construction des courbes à partir des données brutes présentée Figure SII-9, en annexe.

Ainsi, les expériences de rhéologie réalisées sur les mélanges équimolaires {A+T} et {C+G} montrent que ces gels multi-composés présentent des comportements similaires à ceux de leurs gels « parents » mono-composés respectifs. Leurs modules viscoélastiques  $G'$  et  $G''$  sont compris entre ceux des gels mono-composés, et la résistance à la contrainte de {C+G} se situe entre les contraintes limites des gels de PNA(C)-pep et PNA(G)-pep. Aussi, les températures de transitions gel-sol des mélanges sont du même ordre de grandeur que celles des gels mono-composés, et tous ces hydrogels multi-composés présentent la capacité de se régénérer après déstructuration thermique. Ainsi, l'effet du mélange de composés aux bases complémentaires s'avère non délétère, et il est même possible d'observer une amélioration de la résistance à la contrainte dans le cas de {A+T}.

Concernant la structure des gels multi-composés, les différentes expériences montrent qu'ils sont homogènes (pas de domaines aux contraintes limites  $\tau_y$  distinctes sur les balayages en contrainte, ni plusieurs transitions lors des balayages en température). Leurs structures internes semblent proches de celles des gels mono-composés « parents » étant donnée la similitude de leurs profils rhéologiques, toutes expériences de rhéométrie confondues. Le balayage en temps effectué sur le gel de {A+T} présente un épaulement, signe probable de la formation d'au moins deux structures aux cinétiques de formation différentes, mais ni les balayages en contrainte ni ceux en température ne montrent l'existence de structures

différenciables une fois le gel formé. Afin de compléter les informations à l'échelle macroscopique apportées par la rhéologie, d'autres techniques d'analyses plus spécifiques permettant d'étudier les assemblages à l'échelle micro- et nanoscopique ont été mises en œuvre par la suite. Elles ont notamment permis d'affiner et compléter nos hypothèses (voir ci-après).

#### **III.4 Formulations et observations macroscopiques de mélanges complémentaires à différents ratios**

Dans le cas des gels mono-composés, la modulation des propriétés peut passer par la modification de paramètres expérimentaux (par exemple : changement de pH, de température, de force ionique, etc...), ou tout simplement en modifiant la concentration en composé utilisée. Dans le cadre de systèmes comportant deux composés, un autre paramètre devient accessible, à savoir la proportion de chaque composé utilisée pour former le gel. Ainsi, tout en gardant la même concentration totale, c'est-à-dire la même quantité totale en molécules de gélifiants, il est possible de faire varier le ratio de l'un par rapport à l'autre et ainsi moduler finement les propriétés mécaniques et physico-chimiques du matériau.<sup>165,166</sup> Modifier ainsi la proportion entre chaque composé peut permettre de pousser le système en direction d'un mono-composé parent ou de l'autre, voire de faire apparaître de nouvelles caractéristiques induites par la présence de nouvelles morphologies de microstructures, spécifiques à certains ratios.<sup>162</sup> L'observation de l'évolution des propriétés des gels en fonction du ratio, par exemple leurs modules élastiques  $G'$ , donne des indices quant à l'interaction entre les deux composés. En effet, dans le cas d'un mélange qui formerait des systèmes *self-sorted*, c'est-à-dire des réseaux indépendants sans interactions, l'évolution des propriétés serait linéaire en fonction du ratio.<sup>165,399</sup> Dans le cas d'un effet délétère ou au contraire d'un effet synergique, la courbe présenterait un minimum ou un maximum, respectivement.<sup>457,580</sup> La variation du ratio de composé est donc une démarche qui a déjà été proposée dans le cadre de l'étude de systèmes multi-composés,<sup>165,382,457,580</sup> bien que les mélanges soient le plus souvent étudiés à un seul ratio, équimolaire ou non.<sup>163,447,455</sup>

Dans ce contexte, des hydrogels supplémentaires ont été formulés en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4) aux compositions 1 :3 et 3 :1, intermédiaires entre la composition stœchiométrique et les systèmes mono-composés. Ainsi, les quatre gels  $\{A+T\}_{1:3}$ ,  $\{A+T\}_{3:1}$ ,  $\{C+G\}_{1:3}$ ,  $\{C+G\}_{3:1}$  ont été préparés en conservant la concentration totale en nucléopeptides








gélifiants, soit  $C_T = 15$  mM, comme détaillé Tableau III-1. Ils ont vocation à être comparés aux gels mono-composés à 15 mM de PNA(A)-pep, PNA(T)-pep, PNA(C)-pep et PNA(G)-pep (représentant les extrêmes des gammes de ratio), et aux gels équimolaires {A+T} et {C+G} correspondant aux milieux des gammes.

Hydrogels	Composition	Concentration totale ( $C_T$ )
{A+T} <sub>1:3</sub>	PNA(A)-pep (3.75 mM) + PNA(T)-pep (11.25 mM)	15 mM
{A+T} <sub>3:1</sub>	PNA(A)-pep (11.25 mM) + PNA(T)-pep (3.75 mM)	15 mM
{C+G} <sub>1:3</sub>	PNA(C)-pep (3.75 mM) + PNA(G)-pep (11.25 mM)	15 mM
{C+G} <sub>3:1</sub>	PNA(C)-pep (11.25 mM) + PNA(G)-pep (3.75 mM)	15 mM






**Tableau III-1.** *Composition des hydrogels multi-composés formulés à différents ratios des composés nucléopeptidiques complémentaires.*

Tous ces mélanges nouvellement formulés sont capables de gélifier le tampon et ont des aspects similaires aux gels mono-composés : {A+T}<sub>1:3</sub> forme par exemple un gel translucide à l'instar de PNA(T)-pep, {A+T}<sub>3:1</sub> un gel opalescent comme l'est celui de PNA(A)-pep (Tableau (a), Figure III-6). {C+G}<sub>1:3</sub> et {C+G}<sub>3:1</sub> donnent lieu tous deux à des gels opalescents, du même aspect que leur gel « parent » de PNA(G)-pep (Tableau (b), Figure III-6). Tous les ratios de mélanges forment un gel en moins de 5 min (Figure III-6), c'est-à-dire plus rapidement que pour les gels mono-composés de PNA(T)-pep ( $t_{s/g} = 6,5$  min) et PNA(C)-pep ( $t_{s/g} = 8$  min) qui sont les plus lents à se former. Les temps de gélification de {C+G}<sub>1:3</sub> et {C+G}<sub>3:1</sub> de 3 min pour les deux sont légèrement inférieurs au temps de formation du gel mono-composé PNA(G)-pep ( $t_{s/g} = 4$  min), ce qui confirme que le mélange de PNA(C)-pep et PNA(G)-pep est favorable, en termes de cinétique de gélification. Les systèmes multi-composés, tous ratios confondus, sont donc capables de former des hydrogels dans les mêmes conditions que les composés seuls, avec des vitesses de gélification plus importantes.

**a**

Composé	PNA(A)-pep	{A+T} <sub>3:1</sub>	{A+T}	{A+T} <sub>1:3</sub>	PNA(T)-pep
Ratio A/T	1/0	0.75/0.25	0.5/0.5	0.25/0.75	0/1
Aspect des hydrogels					
Temps de gélification apparent $t_{s/g}$	4 min	3 min	5 min	5 min	6.5 min

**b**

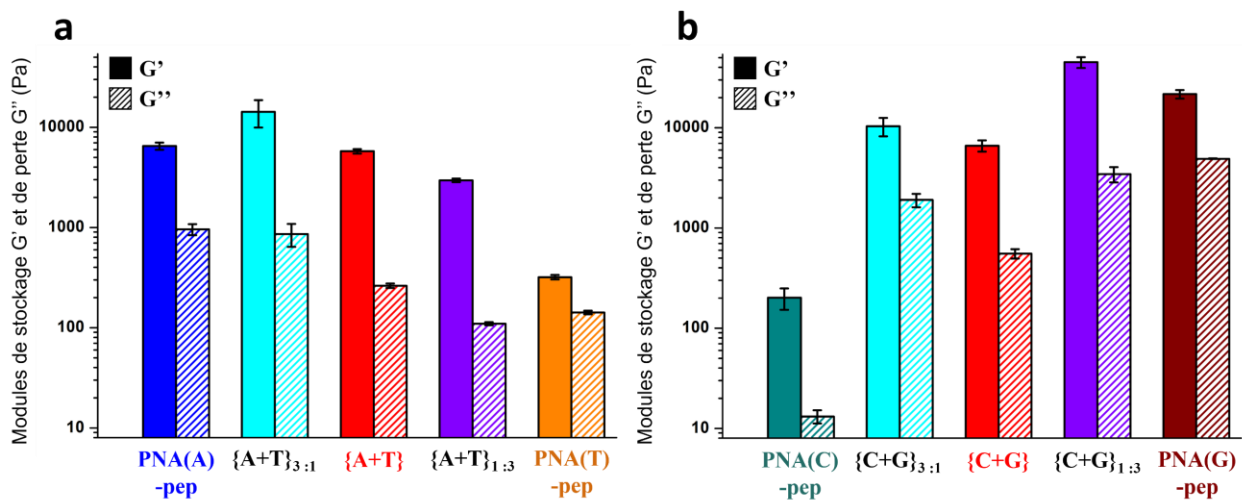
Composé	PNA(C)-pep	{C+G} <sub>3:1</sub>	{C+G}	{C+G} <sub>1:3</sub>	PNA(G)-pep
Ratio C/G	1/0	0.75/0.25	0.5/0.5	0.25/0.75	0/1
Aspect des hydrogels					
Temps de gélification apparent $t_{s/g}$	8 min	3 min	2 min	3 min	4 min

**Figure III-6.** Temps apparents de gélification et aspects des gels multi-composés de PNA(A)-pep + PNA(T)-pep (a) et de PNA(C)-pep + PNA(G)-pep (b) à différents ratios, incluant les gels mono-composés. Tous les hydrogels sont étudiés à  $C_T = 15$  mM, en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

### III.5 Caractérisations mécaniques des hydrogels multi-composés complémentaires à différents ratios

Dans le but d'évaluer leurs propriétés mécaniques, des mesures de rhéologie ont été réalisées sur les hydrogels multi-composés formulés à différents ratios. En premier lieu, des balayages en temps ont été effectués pour les hydrogels de mélanges aux ratios intermédiaires 1 :3 et 3 :1 dans les mêmes conditions que pour les autres hydrogels.

Ainsi, les profils en fonction du temps ne montrent pas de caractéristiques particulières, hormis le mélange  $\{A+T\}_{1:3}$  : le rhéogramme de cet hydrogel présente, à l'instar de  $\{A+T\}$  équimolaire, un épaulement ( $G' = 245$  Pa à 17.5 min). Les courbes des balayages en temps complets sont présentées en annexe ((a) et (b), Figure SIII-5 pour  $\{A+T\}_{1:3}$ ,  $\{A+T\}_{3:1}$  et (a) et (b), Figure SIII-6 pour  $\{C+G\}_{1:3}$  et  $\{C+G\}_{3:1}$ , respectivement) et les modules viscoélastiques après 6 h sont reportés Figure III-7. Ces valeurs sont, sur cette figure, mises en comparaison directe avec les modules des hydrogels mono-composés « parents » et des hydrogels multi-composés équimolaires correspondants, toujours à  $C_T = 15$  mM.



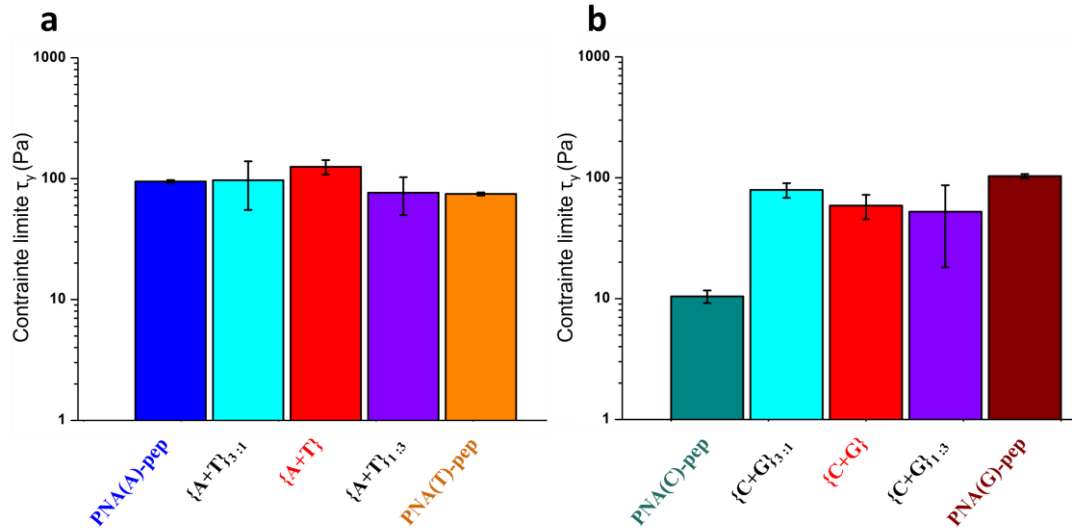
**Figure III-7.** Modules de stockage ( $G'$ ) et de perte ( $G''$ ) après 6 h pour des gels multi-composés de PNA(A)-pep + PNA(T)-pep (a) et de PNA(C)-pep + PNA(G)-pep (b) à différents ratios, incluant les gels mono-composés. Tous les hydrogels sont étudiés à  $C_T = 15$  mM, en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

Les modules élastiques des mélanges de PNA(A)-pep + PNA(T)-pep sont compris entre  $G' = 14296$  Pa ( $G'' = 863$  Pa) pour  $\{A+T\}_{3:1}$  et  $G' = 2955$  Pa ( $G'' = 110$  Pa) pour  $\{A+T\}_{1:3}$  comme présenté en (a), Figure III-7. D'une part, les hydrogels les plus riches en PNA(T)-pep sont les gels les plus faibles, à l'instar du gel parent de PNA(T)-pep ( $G' = 320$  Pa,  $G'' = 142$  Pa, en orange,

(a), Figure III-7). D'autre part, l'augmentation de la quantité de PNA(A)-pep dans le mélange améliore la force des gels avec, étrangement, un maximum pour le ratio  $\{A+T\}_{3:1}$  dont le module est plus élevé que celui du gel multi-composé équimolaire  $\{A+T\}$  ( $G' = 5803$  Pa,  $G'' = 263$  Pa, en rouge, (a), Figure III-7) et même également supérieur au  $G'$  mesuré pour le gel mono-composé de PNA(A)-pep ( $G' = 6512$  Pa,  $G'' = 532$  Pa, en bleu, (a), Figure III-7). Cette caractéristique montre la non-linéarité de l'évolution des modules viscoélastiques avec la composition du gel en chacun des nucléopeptides « parents » PNA(A)-pep et PNA(T)-pep.<sup>399</sup> Ces deux composés sont donc en interaction dans la structure interne des gels multi-composés<sup>580</sup> et forment, pour certains ratios, des matériaux aux modules viscoélastiques supérieurs.

Pour les mélanges de PNA(C)-pep + PNA(G)-pep, les modules les plus élevés sont observés pour  $\{C+G\}_{1:3}$  avec  $G' = 45027$  Pa et  $G'' = 3455$  Pa (en rouge, (b), Figure III-7), soit plus élevé que les modules du gel mono-composé de PNA(G)-pep, le plus fort observé jusqu'alors avec  $G' = 21650$  Pa et  $G'' = 2135$  Pa, en bordeaux sur la Figure III-7. Le mélange  $\{C+G\}_{3:1}$  ( $G' = 10381$  Pa,  $G'' = 1902$  Pa, en bleu clair, (b), Figure III-7) s'avère plus fort que le gel mono-composé de PNA(C)-pep ( $G' = 201$  Pa,  $G'' = 13$  Pa) mais également que le mélange équimolaire  $\{C+G\}$  ( $G' = 6627$  Pa,  $G'' = 556$  Pa, en rouge, (b), Figure III-7) ce qui montre le caractère non linéaire des propriétés mécaniques des gels en fonction de la proportion de PNA(C)-pep et de PNA(G)-pep. Ces observations sont indicatives de la présence d'une interaction entre ces deux composés comme dans le cas des mélanges de PNA(A)-pep et PNA(T)-pep.

Ensuite, les balayages en contrainte effectués sur ces gels multi-composés (d, Figure SIII-6) montrent des valeurs mesurées de contraintes limites  $\tau_y$  (Figure III-8) des hydrogels  $\{C+G\}_{1:3}$  et  $\{C+G\}_{3:1}$  différentes de celles observées pour les gels mono-composés de PNA(C)-pep ( $\tau_y = 10.4$  Pa) et PNA(G)-pep ( $\tau_y = 103$  Pa), mais également du gel équimolaire  $\{C+G\}$  pour lequel  $\tau_y = 59$  Pa. En effet,  $\{C+G\}_{1:3}$ , dont les modules viscoélastiques se sont montrés les plus élevés, présente la résistance à la contrainte la plus faible parmi ces mélanges ( $\tau_y = 30.5$  Pa), alors que la plus élevée est observée pour  $\{C+G\}_{3:1}$  ( $\tau_y = 96.5$  Pa). Les résistances à la contrainte des mélanges à différents ratios de PNA(C)-pep et de PNA(G)-pep sont certes comprises entre celles de leurs hydrogels « parents » mais ne présentent, à l'instar des modules viscoélastiques, pas un rapport linéaire.



**Figure III-8.** Contraintes limites ( $\tau_y$ ) du domaine linéaire viscoélastique issues des balayages en contrainte (voir Figure SIII-2 (a) et (b), SIII-5 (d) et SIII-6, en annexe), pour des gels multi-composés de PNA(A)-pep + PNA(T)-pep (a) et de PNA(C)-pep + PNA(G)-pep (b) à différents ratios, incluant les gels mono-composés. Tous les hydrogels sont étudiés à  $C_T = 15$  mM, en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

Les gels des mélanges de PNA(A)-pep et PNA(T)-pep montrent, à tous les ratios, des résistances à la contrainte élevées, parfois supérieures à celles des hydrogels de PNA(A)-pep seul et PNA(T)-pep seul à 15 mM ( $\tau_y = 94.7$  Pa et  $\tau_y = 74.7$  Pa, en bleu et orange, (a), Figure III-8, respectivement). Ainsi, le mélange équimolaire {A+T} forme le gel le plus résistant ( $\tau_y = 131$  Pa) suivi de {A+T}<sub>3:1</sub> ( $\tau_y = 98.4$  Pa) en rouge et en bleu clair, respectivement (Figure III-8). L'hydrogel le moins résistant, avec  $\tau_y = 71.0$  Pa, est obtenu pour {A+T}<sub>1:3</sub> (violet, Figure III-8). Cette hiérarchie n'est pas directement corrélée aux modules viscoélastiques observés : les gels les plus forts ne sont pas les plus résistants. En revanche, elle montre l'aspect favorable du mélange équimolaire comparé aux autres ratios dans le cas du couple PNA(A)-pep/PNA(T)-pep. A nouveau, l'évolution des propriétés mécaniques en fonction des ratios confirme une interaction des composés complémentaires mis en présence, au sein de la structure des hydrogels multi-composés.

Les propriétés mécaniques des gels des mélanges PNA(A)-pep/PNA(T)-pep d'une part, et de PNA(C)-pep/PNA(G)-pep d'autre part, présentent des différences en fonction de la proportion de l'un ou de l'autre des constituants. Aucune corrélation linéaire n'a pu être mise en évidence entre les modules viscoélastiques, les résistances à la contrainte mécanique et les ratios, si bien que certains gels multi-composés ont des caractéristiques plus intéressantes que les

systèmes mono-composés et réciproquement. La meilleure résistance à la contrainte concernant les mélanges de PNA(A)-pep/PNA(T)-pep est atteinte pour le système équimolaire, mais les meilleures propriétés mécaniques ne correspondent pas toujours au ratio 1: 1. Cette attente, liée à l'interaction en un pour un des bases nucléiques, n'est pas forcément justifiée puisqu'il est possible que des structures intermédiaires aux propriétés mécaniques distinctes se forment pour différents ratio en chaque composé, spécifiques aux mélanges PNA(A)-pep/PNA(T)-pep d'un côté et PNA(C)-pep/PNA(G)-pep de l'autre.<sup>399,580</sup> La présence de ces structures dans les gels multi-composés écarte l'hypothèse de systèmes complètement orthogonaux (*self-sorting*): les composés complémentaires mis en présence se co-assemblent au sein des hydrogels formés.

### **III.6 Formulation et observations macroscopiques : comparaison des mélanges équimolaires complémentaires {A+T} et {C+G} avec des mélanges équimolaires témoins contenant Aeg-pep**

L'étude des mélanges équimolaires complémentaires {A+T} et {C+G} a mis en évidence la différence des gels multi-composés avec les gels mono-composés. Ces gels multi-composés ont leurs caractéristiques propres – modules viscoélastiques et résistance à la contrainte différents de ceux des gels « parents », température  $T_m$  et capacité de régénération thermique similaires à celles observées pour les gels parents – mesurées par rhéométrie. Cette analyse a montré également l'homogénéité de la structure interne de ces hydrogels multi-composés et la possible synergie entre les nucléopeptides les constituant (ci-avant, Partie III.3). En comparant les caractéristiques d'hydrogels de mélanges PNA(A)-pep/PNA(T)-pep d'une part et PNA(C)-pep/PNA(G)-pep d'autre part à différents ratio – 0 %, 25 %, 50 %, 75 % et 100 % – et à concentrations totales fixées, nous avons confirmé l'existence d'une interaction entre les composés mis en présence.

A première vue, cette interaction ne semble pas privilégier le mélange équimolaire. Néanmoins, il faut prendre en compte que la comparaison en fonction de la proportion entre chaque constituant reflète deux effets difficiles à décorrélérer : lorsque le ratio est modifié, la quantité absolue en chaque composé est également modifiée. Or, il a été montré au Chapitre II que la capacité d'auto-assemblages des systèmes mono-composés PNA(A)-pep, PNA(C)-pep, PNA(G)-pep et PNA(T)-pep est dépendante de leur concentration. Les propriétés des hydrogels de mélanges complémentaires à différents ratios sont donc la résultante à la fois de

la diminution de la quantité absolue du premier composé et de la présence du second composé dans le système.

Par conséquent, afin de comprendre la nature de l'interaction entre les composés mis en présence dans les mélanges et surtout de mettre en évidence le rôle des bases nucléiques et l'intérêt de leur complémentarité, il est apparu nécessaire d'introduire des systèmes témoins, jouant le rôle de références.

Dans le Chapitre II, nous avons introduit le composé Aeg-pep, dont la structure est identique à celle des composés PNA(X)-pep étudiés, mise à part l'absence de base nucléique (Figure II-2, Chapitre II). Comme expliqué dans la Partie II.2.d (Chapitre II), c'est cette particularité qui nous a poussés à utiliser ce peptide modifié comme témoin des effets induits par la présence des bases nucléiques sur les propriétés des gels formés par les nucléopeptides. Ainsi, l'étude des assemblages formés par Aeg-pep, à toutes les échelles, a permis de mettre en évidence l'influence des bases nucléiques sur les assemblages.

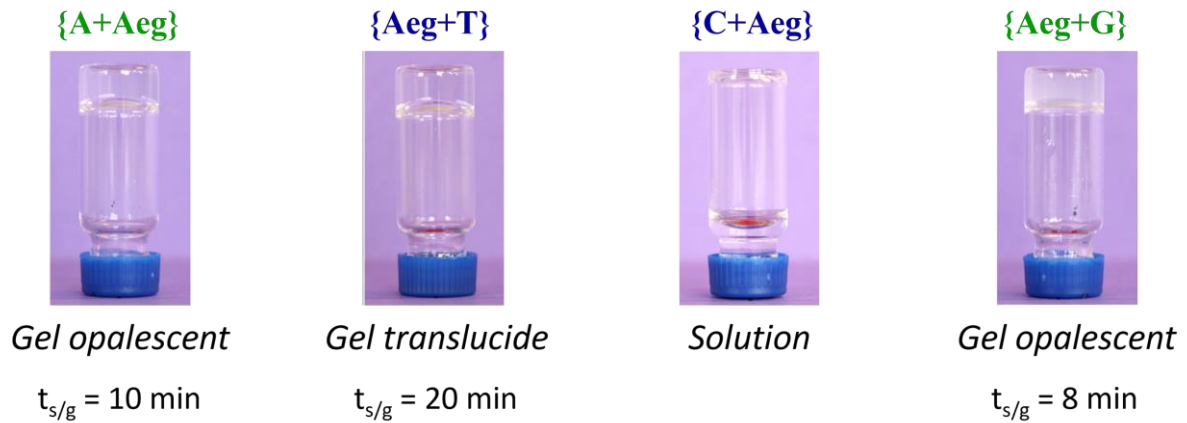
C'est pourquoi, de la même manière, nous avons choisi d'utiliser Aeg-pep comme substitut témoin dans l'étude des mélanges de composés. Quatre nouveaux systèmes ont alors été proposés :

- {A+Aeg}, équivalent de {A+T} sans la base thymine
- {Aeg+T}, équivalent de {A+T} sans la base adénine
- {C+Aeg}, équivalent de {C+G} sans la base guanine
- {Aeg+G}, équivalent de {C+G} sans la base cytosine

Ces quatre nouveaux mélanges témoins sont équimolaires (1 :1) et formulés à  $C_T = 15$  mM (7.5 mM + 7.5 mM) dans les mêmes conditions que les systèmes équimolaires complémentaires {A+T} et {C+G}, à savoir en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

Les mélanges de composés contenant Aeg-pep sont préparés selon le même protocole de formulation utilisé pour les mélanges équimolaires complémentaires {A+T} et {C+G}, ainsi que pour les systèmes mono-composés. Ainsi, les trois mélanges témoins {A+Aeg}, {Aeg+T} et {Aeg+G} forment des hydrogels *self-supporting* en moins de 20 min (Figure III-9) alors que {C+Aeg} ne donne pas de gel dans un temps d'observation raisonnable ( $\approx$  6 mois). Ces mélanges comportant pour moitié le composé Aeg-pep ne portant pas de base nucléique montrent tous des vitesses de gélification inférieures aux mélanges complémentaires {A+T} et

{C+G}, se traduisant par des temps de gélification  $t_{s/g}$  plus long. En particulier, {A+T}, dont  $t_{s/g} = 5$  min, est 2 fois plus rapide que {A+Aeg} et 4 fois plus rapide que {Aeg+T} dont les temps de gélification respectifs sont  $t_{s/g} = 10$  min et  $t_{s/g} = 20$  min. Également, {C+G} est 4 fois plus rapide que {Aeg+G} avec  $t_{s/g} = 2$  min pour le premier contre  $t_{s/g} = 8$  min pour ce dernier.



**Figure III-9.** Aspect des échantillons multi-composés témoins {A+Aeg}, {Aeg+T}, {C+Aeg} et {Aeg+G}, et temps de gélification apparents, le cas échéant. Tous les échantillons sont étudiés à  $C_T = 15$  mM (1 :1), en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

La formation des hydrogels multi-composés est donc favorisée en termes de cinétiques dans le cas où les bases nucléiques complémentaires sont en présences (c'est-à-dire {A+T} et {C+G}) contrairement aux mélanges témoins {A+Aeg}, {Aeg+T}, {C+Aeg} et {Aeg+G}.

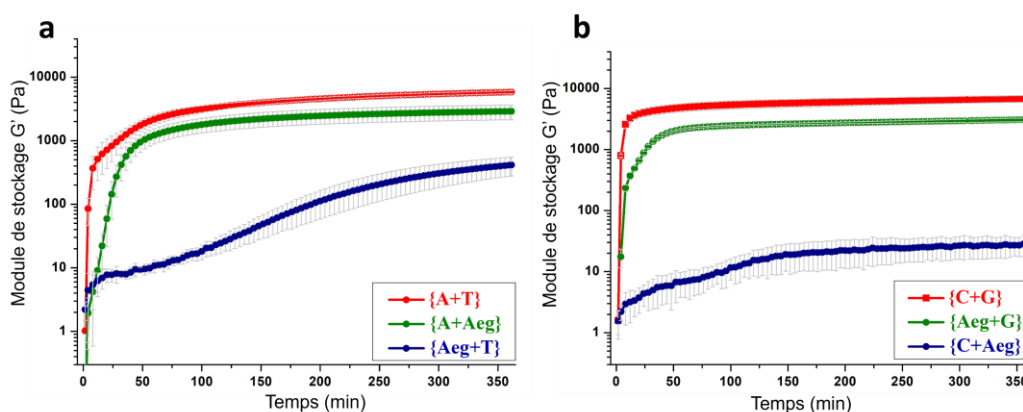
### III.7 Caractérisations mécaniques des hydrogels par rhéométrie : comparaison des mélanges équimolaires complémentaires avec les mélanges témoins

Après ces premières observations portant sur l'aspect des gels formés et leur vitesse apparente de gélification, des expériences de rhéologie ont été effectuées sur les gels témoins dans le but de quantifier l'impact de la complémentarité du mélange sur les propriétés mécaniques des hydrogels multi-composés.

#### III.7.a Cinétique de formation des hydrogels témoins par balayage en temps

Tout d'abord, des balayages en temps ont été réalisés sur les quatre nouveaux hydrogels {A+Aeg}, {Aeg+T}, {C+Aeg} et {Aeg+G} afin de quantifier leur cinétique de formation et d'évaluer leurs modules viscoélastiques  $G'$  et  $G''$  à 6 h pour les comparer avec {A+T} et {C+G} étudiés précédemment (Partie III.3.a) et tracés à nouveau Figure III-10 (en rouge, a et b, respectivement).



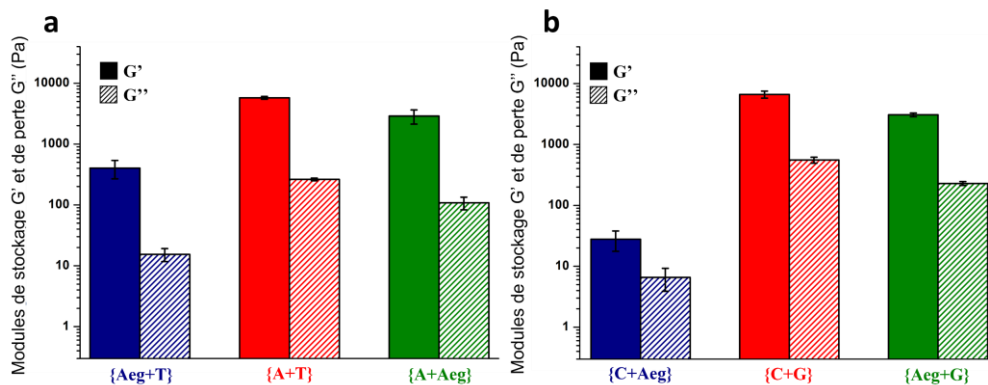


**Figure III-10.** Rhéogrammes des balayages en temps pour les hydrogels multi-composés {A+T}, {A+Aeg}, {Aeg+T} (a) et {C+G}, {C+Aeg} et {Aeg+G} (b). Tous les gels sont étudiés à  $C_T = 15 \text{ mM}$  (1 :1), en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

Les rhéogrammes des différents gels confirment les observations qualitatives faites sur les gels : leurs vitesses de formation sont différentes comme il est possible de le voir sur la Figure III-10. Les profils de gélification des composés témoins montrent des gels *a priori* moins forts et moins rapides à se former, comme c'est le cas par exemple de {Aeg+T} dont la courbe (en bleu, (a), Figure III-10) est bien en dessous de celle correspondant au gel de {A+T} (en rouge, (a), Figure III-10). En effet, si l'on compare les vitesses initiales de gélification  $V_0$ , le gel de {A+T} ( $V_0 = 82.5 \text{ Pa}\cdot\text{min}^{-1}$ ) est effectivement presque 100 fois plus rapide à se former que ses équivalents formés avec Aeg-pep {A+Aeg} ( $V_0 = 1.05 \text{ Pa}\cdot\text{min}^{-1}$ ) et {Aeg+T} ( $V_0 = 0.68 \text{ Pa}\cdot\text{min}^{-1}$ ). La présence de PNA(A)-pep et de PNA(T)-pep est donc bénéfique à la formation rapide du gel. Le même constat peut être fait pour le mélange {C+G} dont la vitesse de gélification  $V_0 = 585 \text{ Pa}\cdot\text{min}^{-1}$  est 10 fois supérieure à celle de {Aeg+G} ( $V_0 = 57.2 \text{ Pa}\cdot\text{min}^{-1}$ ), et 100 fois à celle de {C+Aeg} ( $V_0 = 0.44 \text{ Pa}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

Il est également intéressant de remarquer la présence d'un épaulement pour le mélange {Aeg+T} (en bleu, (a), Figure III-10), à  $24 \text{ min} \pm 4 \text{ min}$  ( $G' = 7.7 \text{ Pa}$ ). Jusqu'à présent, tous les épaulements remarquables correspondaient à des mélanges contenant au moins 50 % de PNA(T)-pep, à savoir {A+T} et {A+T}<sub>1:3</sub> et à présent {Aeg+T}, alors que le gel de PNA(T)-pep seul à 15 mM ne présente en revanche pas cette caractéristique. La présence d'un épaulement sur les balayages en temps est probablement liée à une structure intermédiaire induite par la présence de PNA(T)-pep qui se formerait en premier lieu.<sup>419,428</sup> Les expériences de balayage en temps ne permettent pas de conclure si ces structures sont de mêmes natures, bien

qu'ayant des temps caractéristiques similaires, autour de 20 min ( $t_{\{Aeg+T\}} = 24 \text{ min} \pm 4 \text{ min}$ ,  $t_{\{A+T\}} = 17.5 \text{ min} \pm 0.5 \text{ min}$ ,  $t_{\{A+T\}}_{1:3} = 17.5 \text{ min} \pm 0.5 \text{ min}$ ).



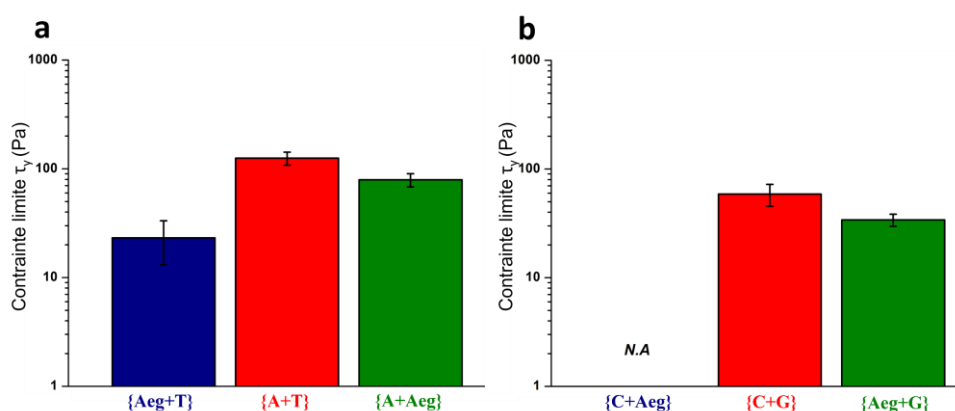
**Figure III-11.** Modules de stockage ( $G'$ ) et de perte ( $G''$ ) après 6 h pour des hydrogels multi-composés de {A+T}, {A+Aeg}, {Aeg+T} (a) et {C+G}, {C+Aeg} et {Aeg+G} (b). Tous les gels sont étudiés à  $C_T = 15 \text{ mM}$  (1 :1), en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

Lorsque les modules viscoélastique (après 6 h) des gels de multi-composés contenant le composé témoin Aeg-pep sont comparés avec ceux de {A+T} pour {A+Aeg} et {Aeg+T} (a, Figure III-11) et de {C+G} pour {C+Aeg} et {Aeg+G} (b, Figure III-11), les différences sont incontestables. Les hydrogels formés par les mélanges {C+Aeg} et {Aeg+G} ont des modules élastiques inférieurs ( $G' = 28.3 \text{ Pa}$  et  $G' = 3077 \text{ Pa}$ , respectivement) à celui de {C+G} ( $G' = 6794 \text{ Pa}$ ). La présence des bases complémentaires cytosine et guanine est donc bénéfique à la force du gel. Concernant le mélange {A+T} ( $G' = 5803 \text{ Pa}$ ), le mélange complémentaire est également plus intéressant par comparaison avec les mélanges témoins {A+Aeg} ( $G' = 2891 \text{ Pa}$ ) et {Aeg+T} ( $G' = 412 \text{ Pa}$ ). Dans les deux cas, les mélanges témoins {Aeg+T} et {C+Aeg}, contenant les composés pyrimidines, forment naturellement les hydrogels les plus faibles, à l'instar de leur gels « parents » (les gels mono-composés de PNA(T)-pep et PNA(C)-pep à 15 mM présentaient les modules viscoélastiques les plus faibles, Partie II.6.a, Chapitre II). Les gels témoins contenant une purine ({A+Aeg} et {Aeg+G}) présentent des modules élevés, comme les gels mono-composés de PNA(A)-pep et PNA(G)-pep, mais inférieurs à ceux des mélanges comportant les deux nucléotides complémentaires {A+T} et {C+G}.

Les balayages en temps indiquent par conséquent un effet synergique clair de la présence des bases complémentaires dans les mélanges {A+T} et {C+G} sur la vitesse de gélification et la force des gels.

### III.7.b Comparaison de la résistance à la contrainte mécanique des hydrogels témoins par balayage en contrainte

De la même manière que pour les systèmes mono-composés (Partie II.6.b, Chapitre II) et pour les mélanges à différents ratios (Partie III.5), des balayages en contrainte ont été réalisés sur les hydrogels des mélanges {A+Aeg}, {C+Aeg}, {Aeg+G}, {Aeg+T} afin de comparer leurs résistances à la contrainte à celles des gels équimolaires complémentaires {A+T} et {C+G}. Ces résistances limites  $\tau_Y$  sont reportées Figure III-12.



**Figure III-12.** Contraintes limites ( $\tau_Y$ ) du domaine linéaire viscoélastique issues des balayages en contrainte (voir Figure SIII-8, en annexe), pour les hydrogels multi-composés de {A+T}, {A+Aeg}, {Aeg+T} (a) et {C+G}, {C+Aeg} et {Aeg+G} (b). Tous les gels sont étudiés à  $C_T = 15$  mM (1 :1), en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

La contrainte limite du domaine viscoélastique avait été mesurée pour le mélange équimolaire complémentaire {C+G} à  $\tau_Y = 59.0$  Pa (Partie III.3.b et reporté en rouge, (b), Figure III-12). En l'absence de cette complémentarité des bases nucléiques portées par PNA(C)-pep et PNA(G)-pep, la résistance à la contrainte des hydrogels obtenus est moindre pour {Aeg+G} ( $\tau_Y = 30.6$  Pa, en vert, (b), Figure III-12) voire si faible que non mesurable dans les conditions expérimentales choisies, dans le cas du mélange {C+Aeg}. La même tendance s'observe dans le cas des gels de {Aeg+T} et {A+Aeg} dont les résistances limites, respectivement  $\tau_Y = 25.7$  Pa (en bleu, (a), Figure III-12) et  $\tau_Y = 73.3$  Pa (en vert, (a), Figure III-12) sont inférieures à celle mesurée pour le mélange {A+T} avec  $\tau_Y = 131$  Pa (en rouge, (a), Figure III-12). La résistance à la contrainte mécanique des hydrogels, caractérisée par rhéométrie, est donc plus élevée dans le cas des mélanges complémentaires que dans le cas des mélanges témoins où cette complémentarité des composés est absente.

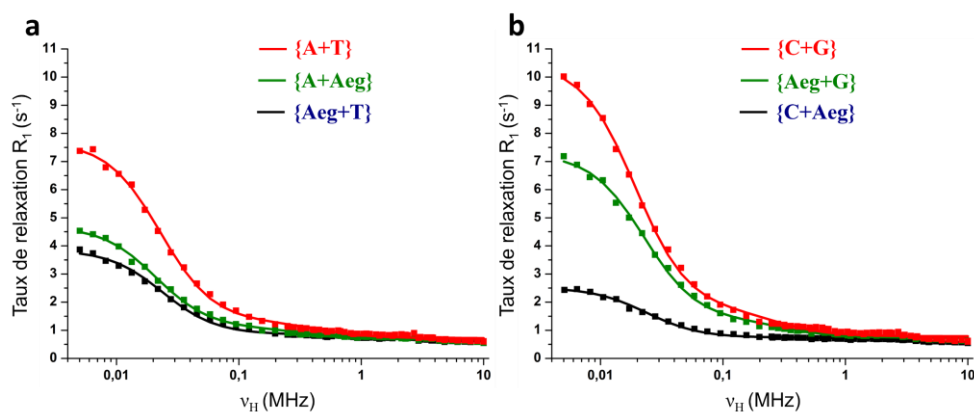
Ainsi, ces analyses rhéologiques ont permis de mettre en lumière le fait que la présence dans les hydrogels multi-composés de deux composés nucléopeptidiques portant des bases nucléiques complémentaires – adénine et thymine pour PNA(A)-pep/PNA(T)-pep ; cytosine et guanine pour PNA(C)-pep/PNA(G)-pep – s'avère fortement bénéfique en termes de propriétés mécaniques. D'une part, les gels équimolaires complémentaires sont 10 à 100 fois plus rapides à se former que les gels constitués d'un composé et de Aeg-pep (qui ne comporte pas la base complémentaire). D'autre part, {A+T} et {C+G} forment des gels significativement plus forts (aux modules élastiques les plus élevés), et plus résistants à la contrainte mécanique.

### **III.8 Caractérisation du milieu structurel interne des hydrogels multi-composés équimolaires par relaxométrie RMN**

L'existence d'un effet d'interaction entre les composés nucléopeptidiques complémentaires a été souligné par l'étude des mélanges à différents ratios, puis cet effet a été qualifié de synergique par la comparaison des hydrogels équimolaires complémentaires {A+T} et {C+G} avec des systèmes témoins.

Afin de comprendre les différences de propriétés mécaniques observées entre les hydrogels multi-composés, il convient d'étudier leurs structures à plus petite échelle. Ainsi, il est possible, grâce à la relaxométrie RMN, de considérer une échelle mésoscopique, intermédiaire entre le niveau macroscopique et l'échelle microscopique. Dans le cas des hydrogels mono-composés, cette technique avait permis de mettre en évidence des différences de comportement du solvant dans les réseaux fibrillaires formés par l'auto-assemblage des composés nucléopeptidiques (Partie II.7, Chapitre II). En effet, la relaxométrie RMN mesure les temps de relaxation  $T_1$  des protons des molécules d'eau constituant les gels, qui sont différents en fonction de leur environnement.<sup>581,582</sup>

Les six gels équimolaires {A+T}, {A+Aeg}, {Aeg+T} et {C+G}, {C+Aeg}, {Aeg+G} ont donc été étudiés dans les mêmes conditions ( $C_T = 15$  mM (1 :1), Tris.HCl (1 M, pH = 7.4)) que pour les analyses de rhéologie par relaxométrie RMN. Leurs profils de relaxométrie sont tracés Figure III-13.



**Figure III-13.** Profils relaxométriques (NMRD  $^1\text{H}$ , présentant le taux de relaxation longitudinal  $R_1$  en fonction de la fréquence de Larmor  $\nu_H$ ) obtenus pour les hydrogels multi-composés de {A+T}, {A+Aeg}, {Aeg+T} (a) et {C+G}, {C+Aeg} et {Aeg+G} (b), étudiés à  $C_T = 15 \text{ mM}$  (1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4). Les points de mesures sont indiqués sur le graphique, ainsi que les courbes issues de la modélisation dans chaque cas (somme des Lorentziennes  $L_1 + L_2$  dont les grandeurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau III-2)

Ces courbes représentent les taux de relaxation  $R_1 = 1/T_1$  en fonction de la fréquence de Larmor. Les valeurs brutes ont pu être modélisées par la somme de deux Lorentziennes ( $L_1 + L_2$ ), représentant deux populations de molécules d'eau. Le même modèle s'était avéré pertinent pour les hydrogels mono-composés (Partie II.7, Chapitre II), soulignant l'existence d'une part, à basse fréquence, d'une population de molécules d'eau contraintes et d'autre part, à haute fréquence, d'une population de molécules d'eau libres, présentes dans l'ensemble des gels étudiés. La lorentzienne à basse fréquence tout comme la lorentzienne à haute fréquence présentent deux grandeurs caractéristiques : leurs amplitudes  $A_1$  et  $A_2$  respectivement, directement liées à la proportion de molécules d'eau dans chaque état, et leurs temps caractéristiques  $\tau_c(1)$  et  $\tau_c(2)$ .

En comparant les temps de corrélation  $\tau_c(1)$  à basses fréquences des différents gels, seul celui du mélange {C+G} se démarque ( $\tau_c(1) = 7.34 \times 10^{-6} \text{ s}$ ), avec une valeur plus élevée que celles des autres gels qui sont comprises entre  $6.26 \times 10^{-6} \text{ s}$  et  $6.72 \times 10^{-6} \text{ s}$  (Tableau III-2). Les molécules d'eau de cette population ont donc un mouvement plus lent dans l'hydrogel de {C+G}, et sont donc plus contraintes par son réseau. La seconde population d'eau, plus libre, et dont la relaxation est modélisée par la seconde lorentzienne, présente des différences de temps de corrélation  $\tau_c(2)$  en fonction du gel étudié. A nouveau, le mélange complémentaire {C+G} possède un temps de corrélation plus élevé ( $\tau_c(2) = 7.8 \times 10^{-8} \text{ s}$ ) que pour les mélanges

témoins {C+Aeg} ( $\tau_c(2) = 5.0 \times 10^{-8}$  s) et {Aeg+G} ( $\tau_c(2) = 6.0 \times 10^{-8}$  s). La même observation est faite pour le mélange complémentaire {A+T} avec  $\tau_c(2) = 7.1 \times 10^{-8}$  s contre  $\tau_c(2) \approx 6.3 \times 10^{-8}$  s pour {A+Aeg} et {Aeg+T}. Les réseaux constituant les hydrogels contenant des composés complémentaires, c'est-à-dire {A+T} et {C+G}, présenteraient donc une meilleure capacité à contraindre les molécules d'eau du tampon.

	$A_1$ (s <sup>-1</sup> )	$A_2$ (s <sup>-1</sup> )	$\tau_c(1)$ (s)	$\tau_c(2)$ (s)	$p$
{A+T}	6.55	0.51	$6.48 \times 10^{-6}$	$7.07 \times 10^{-8}$	12.3 %
{A+Aeg}	3.72	0.33	$6.72 \times 10^{-6}$	$6.28 \times 10^{-8}$	9.6 %
{Aeg+T}	3.01	0.28	$6.54 \times 10^{-6}$	$6.25 \times 10^{-8}$	9.2 %
{C+G}	9.06	0.65	$7.34 \times 10^{-6}$	$7.79 \times 10^{-8}$	12.8 %
{Aeg+G}	6.13	0.46	$6.26 \times 10^{-6}$	$6.04 \times 10^{-8}$	11.3 %
{C+Aeg}	1.78	0.19	$6.70 \times 10^{-6}$	$4.95 \times 10^{-8}$	6.4 %

**Tableau III-2.** Paramètres des Lorentziennes  $L_1$  et  $L_2$  modélisant les profils relaxométriques obtenus pour les hydrogels multi-composés présentés Figure III-13, et caractérisées par des amplitudes  $A_1$  et  $A_2$  et temps de corrélations  $\tau_c(1)$  et  $\tau_c(2)$ . Le rapport  $p$  est calculé selon la formule  $p = \frac{r(1)}{r(1)+r(2)}$  avec  $r(i) = \frac{A(i)}{\tau_c(i)}$ . Plus de détails sont donnés Figure SIII-9, en annexe.

Ces données de relaxométrie permettent également d'obtenir des informations supplémentaires sur la répartition des molécules d'eau entre les deux types de population en comparant le poids des lorentziennes pour chaque gel: le calcul des rapports  $p = \frac{r(1)}{r(1)+r(2)}$  avec  $r(i) = \frac{A(i)}{\tau_c(i)}$  prend en compte à la fois les amplitudes et les temps de corrélations des lorentziennes. Ces valeurs, reportées dans le Tableau III-2, expriment ainsi la proportion d'eau sous forme liée dans chaque gel. Les gels de mélanges complémentaires {A+T} et {C+G} possèdent les plus grandes proportions d'eau liée ( $p = 12.8$  % et  $p = 12.3$  %, respectivement) par comparaison avec les autres hydrogels, confirmant l'analyse des temps de corrélation  $\tau_c(2)$ .

La relaxométrie RMN montre donc que les mélanges de composés complémentaires {A+T} et {C+G} forment des hydrogels dont les réseaux sont capables de contraindre les molécules d'eau du tampon de manière plus importante que les mélanges témoins en présence de Aeg-pep. Ce sont également les mélanges {A+T} et {C+G} qui donnent lieu aux gels les plus forts (Partie III.7). Nous pouvons émettre l'hypothèse que ces propriétés peuvent être reliées à l'instar de ce qui avait été observé pour les systèmes mono-composés (Partie II.7, Chapitre

II) : plus les hydrogels ont des capacités élevées à contraindre le solvant, plus leurs modules viscoélastiques sont élevés et donc plus leurs caractères de gels forts sont accentués.

L'étude des hydrogels par relaxométrie RMN apporte des informations à l'échelle mésoscopique, sur le comportement du solvant en interaction avec le réseau peptidique des constituant. Afin de caractériser le réseau gélifiant en lui-même, nous avons procédé à des expériences de diffusion des rayons X (SAXS) pour chacun des gels équimolaires.

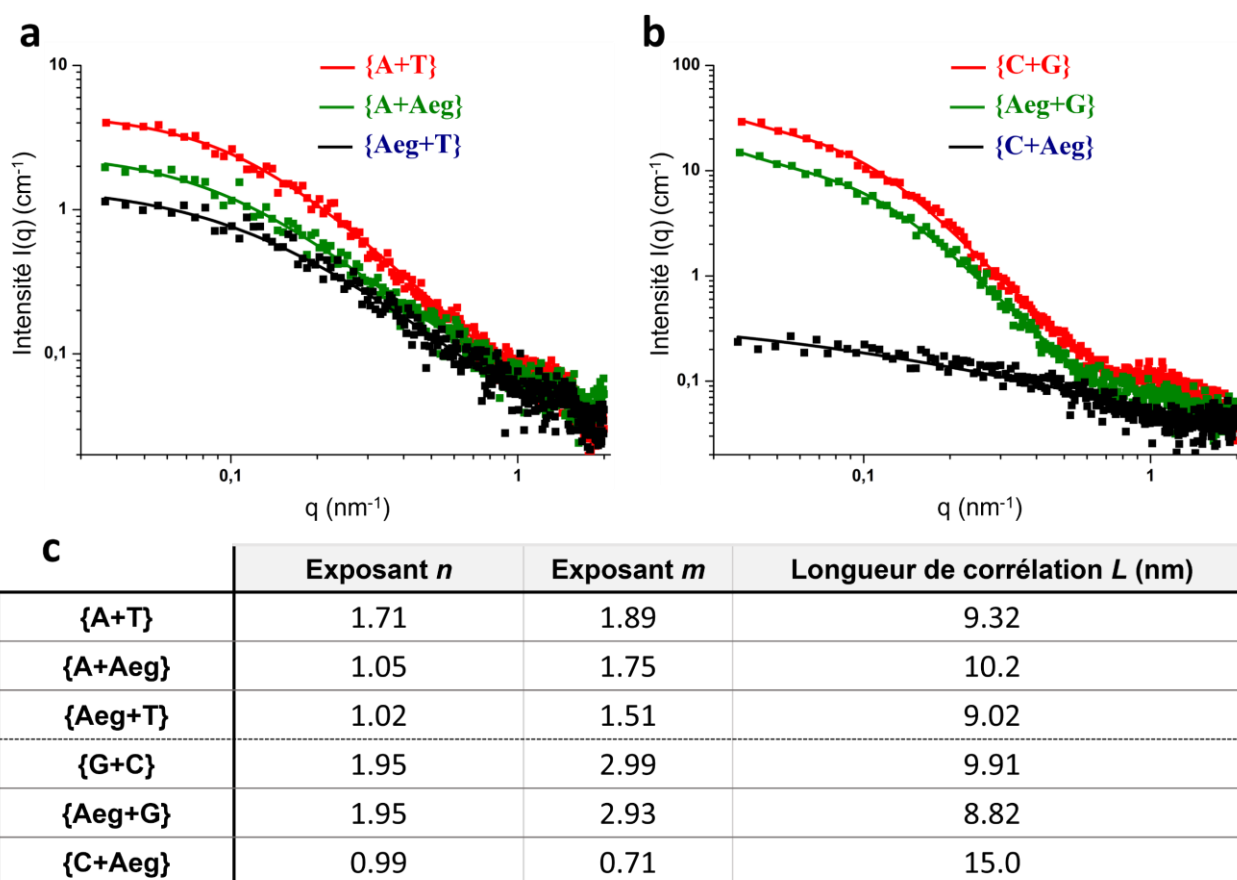
### III.9 Caractérisation du réseau fibrillaire des hydrogels multi-composés équimolaires par diffusion des rayons X (SAXS)

La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS, « *small angle X-ray scattering* ») est une technique permettant d'étudier la structure de systèmes nanoscopiques. Elle consiste en l'irradiation des échantillons par une lumière monochromatique dans le domaine de longueurs d'ondes des rayons X qui interagit avec les nuages électroniques des nano-objets présents, ce qui se traduit par la diffusion des rayons incidents. Ainsi, l'intensité diffusée aux petits angles en fonction d'un facteur spatial  $q$  (vecteur de diffusion  $q = 4 \cdot \pi \cdot \sin(\theta/2)/\lambda$  où  $\lambda$  est la longueur d'onde du rayon incident et  $\theta$  l'angle de diffusion), donne des informations sur la nature et la morphologie de ces structures nanométriques.<sup>10,583</sup> De plus, ces mesures sont applicables directement sur des échantillons à l'état gel, dans les mêmes conditions que la relaxométrie RMN ou que les expériences de rhéométrie.

Les six hydrogels étudiés ont donc été préparés à 15 mM en tampon Tris.HCl 1 M pH = 7.4, avant d'être transvasés dans des capillaires (voir détails Partie V.2.d, Chapitre V « Partie expérimentale ») pour subir des mesures de SAXS. Les résultats sont rapportés Figure III-14.

Les courbes ont dans l'ensemble le même type de profil en deux domaines, ce qui traduirait la présence de mêmes types de nano-objets formant les réseaux des gels étudiés ; seul le mélange {C+Aeg} montre un profil moins marqué. L'intensité de diffusion  $I$  mesurée pour cet hydrogel est la plus faible, ce qui signifie soit que le nombre d'objets diffusant dans ce gel est moins élevé – c'est-à-dire que le réseau est moins dense – soit que ces objets diffusent moins, sont plus petits que pour les autres gels. Les mélanges équimolaires complémentaires {A+T} et {C+G} présentent des intensités plus élevées ( $I = 4.0 \text{ cm}^{-1}$  et  $I = 29.1 \text{ cm}^{-1}$ , (a) et (b), Figure III-14, respectivement) que leurs mélanges témoins respectifs. Leurs gels seraient donc constitués de nanostructures plus à même de diffuser les rayons X : les nucléopeptides

complémentaires formeraient des fibres de plus grande taille ou un réseau fibrillaire plus dense.<sup>584</sup>



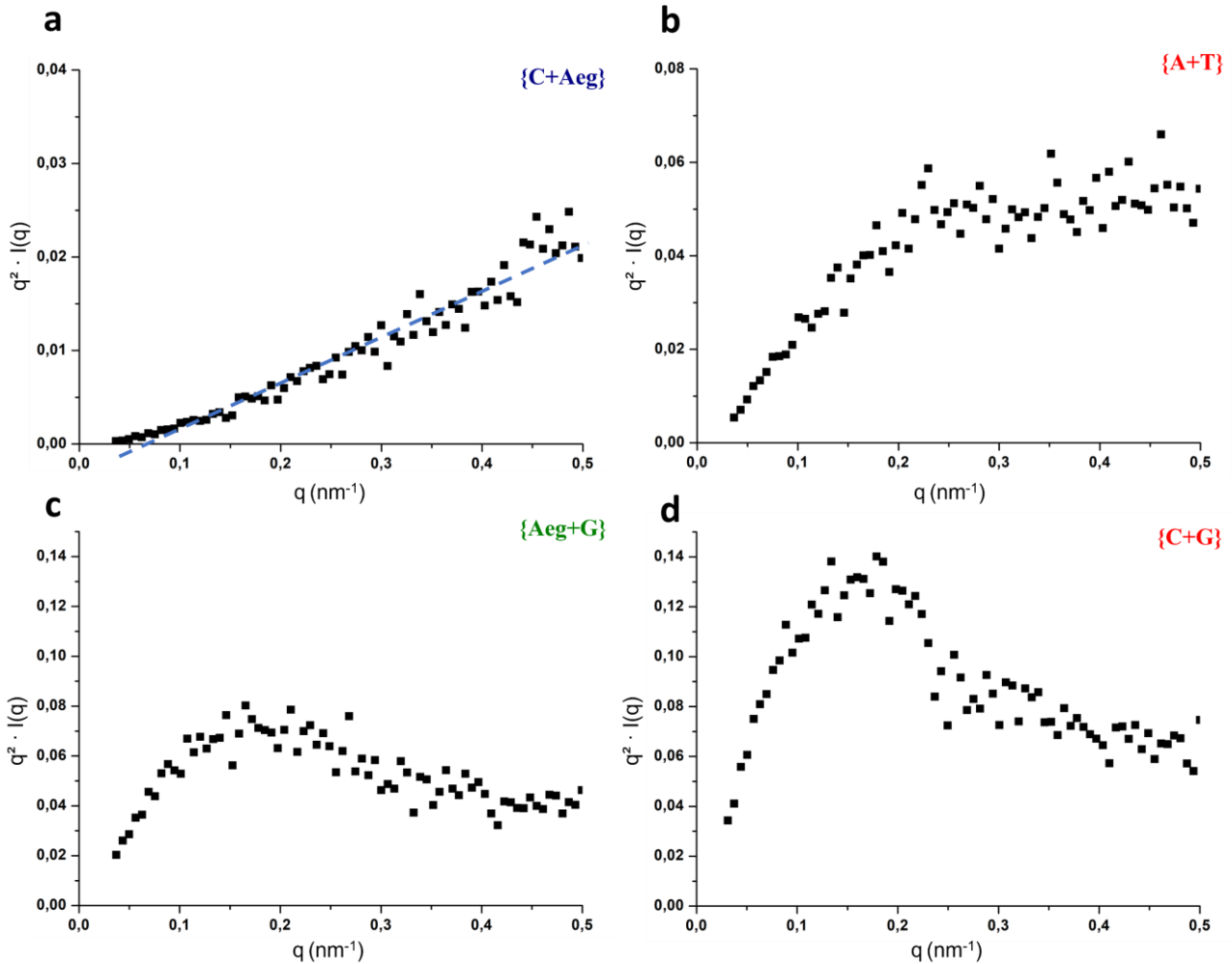
**Figure III-14.** Profils de diffusion SAXS (points expérimentaux et modélisations) obtenus pour les hydrogels multi-composés de {A+T}, {A+Aeg}, {Aeg+T} (a) et {C+G}, {C+Aeg} et {Aeg+G} (b), étudiés à  $C_T = 15$  mM (1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4). Les principaux paramètres utilisés du modèle « à deux longueurs de corrélation » sont reportés dans le tableau (c). L'ensemble des paramètres est disponible en annexe, Figure SIII-10.

Afin d'analyser plus en détail la nature de ces structures, il est possible d'exploiter les profils par une modélisation mathématique appropriée. En effet, il existe un modèle qui convient à nos données, proposé par Hammouda *et al.* (2004),<sup>585</sup> modèle dit « à deux longueurs de corrélation » de formule  $I(q) = \frac{A}{q^n} + \frac{C}{1+(qL)^m} + B$ . Il combine un terme du régime de Porod aux petits  $q$  et un terme Lorentzien représentant le comportement aux grands  $q$ .<sup>516,585,586</sup> Ce modèle a déjà montré sa pertinence lorsqu'il est appliqué aux hydrogels peptidiques<sup>516,587</sup> tout comme à d'autres systèmes similaires.<sup>588</sup> Ainsi, la modélisation la plus pertinente pour chaque gel de mélange équimolaire est représentée Figure III-14 (lignes continues, (a) et (b)) et les paramètres principaux associés aux modèles sont disponibles



Tableau (c) (Figure III-14, voir les paramètres complets des modèles en annexe, Figure SIII-10 et dans la Partie V.2.d, Chapitre V « Partie expérimentale »).

Le premier terme du modèle  $\frac{A}{q^n}$  correspond à la diffusion aux petits  $q$  et apporte ainsi des informations sur les structures des gels à l'échelle de la centaine de nanomètres. L'exposant  $n$  traduit notamment la dimension des objets formés :  $n = 0$  pour des objets globulaires (sphères par exemple),  $n = 1$  pour des structures unidimensionnelles (fibres rigides),  $n = 2$  pour des systèmes plans<sup>589,590</sup> et  $n = 3$  pour des volumes pleins. Des indices non-entier représentent des dimensions intermédiaires, de type fractales par exemple.<sup>175,591-593</sup> Dans le cas des mélanges {C+G} et {Aeg+G}, la modélisation est en accord avec les points expérimentaux pour  $n = 1.95$  ce qui correspond à des structures complexes entre la fibre rigide et les systèmes plans. Il s'agit probablement de réseaux fibrillaires de type chaînes gaussiennes<sup>516,585,586,590,594-596</sup> (c'est-à-dire formant un réseau d'enchevêtrements aléatoires caractérisé par des tailles de mailles et des longueurs de persistance suivant une dispersion gaussienne), interprétation qui peut être également étendue au mélange {A+T} avec  $n = 1.71$ , pour lequel le réseau serait un peu moins dense.<sup>586</sup> Ce choix d'assimiler cette valeur de  $n = 1.71$  à  $n = 2$  pour {C+G} et {Aeg+G} a été confirmé par la suite par les observations en microscopie TEM (ci-après, Partie III.10). Pour les autres hydrogels, à savoir les mélanges {A+Aeg}, {C+Aeg} et {Aeg+T},  $n \approx 1$  est caractéristique d'un système unidimensionnel, c'est-à-dire formé de fibres rigides.<sup>154,597</sup>



**Figure III-15.** Représentations de Kratky ( $q^2 \times I(q)$  en fonction de  $q$ ) issues des profils de diffusion SAXS (Figure III-14) obtenus pour les hydrogels multi-composés de {C+Aeg} (a), {A+T} (b), {Aeg+G} (c) et {C+G} (d), étudiés à  $C_T = 15$  mM (1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4). La courbe de Kratky de {C+Aeg} peut être modélisée par une régression linéaire (tirets bleus,  $a = 0.0491$ ,  $b = -0.0032$ ,  $r^2 = 0.9485$ ). Les représentations de Kratky pour les autres gels sont disponibles Figure SIII-11.

La courbe de Kratky ( $I(q) \times q^2$  en fonction de  $q$ , pour  $q$  petits) est une représentation particulière des données de diffusion SAXS qui permet de mettre en évidence d'autres caractéristiques morphologiques du réseau fibrillaire des gels. Ainsi, le tracé des courbes de Kratky pour les échantillons des gels multi-composés étudiés va dans le même sens que les modèles proposés plus haut, notamment pour {C+Aeg}, au profil linéaire correspondant à un système de fibres rigides (a, Figure III-15), ainsi que pour {A+T}, {C+G} et {Aeg+G}. Les profils obtenus pour ces derniers sont typiques de chaînes gaussiennes – phase croissante avec un plateau (b, Figure III-15 pour {A+T})<sup>586</sup> – avec même un pic marqué pour {Aeg+G} et {C+G} (c et

d, Figure III-15, respectivement), indicatif de systèmes tridimensionnels compacts, associés à de nombreux points de jonctions.<sup>598,599</sup>

Le premier terme du modèle à deux longueurs de corrélation, supporté par les tracés de Kratky, distingue deux types de structures formées par les mélanges : des réseaux complexes de chaînes gaussiennes dans le cas des mélanges complémentaires {A+T} et {C+G} ainsi que pour {Aeg+G} ; et des structures de fibres rigides peu denses dans le cas des autres mélanges {A+Aeg}, {C+Aeg} et {Aeg+T}.

La diffusion aux grands  $q$ , modélisée par le second terme  $\frac{C}{1+(qL)^m}$  rend compte de l'état local des nanostructures constituant les hydrogels. Ainsi, l'exposant  $m$  est indicateur de la compacité du système.<sup>516,587,591</sup> Les valeurs de  $m$  les plus élevées sont obtenues pour {C+G} ( $m = 2.99$ ), {Aeg+G} ( $m = 2.93$ ) et {A+T} ( $m = 1.89$ ), reflétant par conséquent un réseau plus compact pour les gels de ces mélanges.

La diffusion des rayons X aux petits angles met en évidence la composition structurale des hydrogels de mélanges équimolaires {A+T} et {C+G} ainsi que des mélanges témoins comportant Aeg-pep. Les mélanges complémentaires présentent ainsi des intensités de diffusion plus élevées que leurs mélanges témoins respectifs, signes de réseaux fibrillaires plus denses. La modélisation des données obtenues indique aussi que les systèmes complémentaires forment des objets de type chaînes gaussiennes et de compacité plus élevée. Ces morphologies sont associées aux réseaux capables de contraindre le plus l'eau (selon les expériences de relaxométrie RMN, Partie III.8) et aux hydrogels aux propriétés mécaniques les plus remarquables (selon les mesures de rhéologie, Partie III.7) faisant un lien entre l'état microscopique des hydrogels et leurs propriétés aux échelles supérieures.

### III.10 Observation des microstructures constituant les hydrogels multi-composés équimolaires par microscopie TEM

L'observation par microscopie TEM offre une approche complémentaire à la SAXS, afin de caractériser les structures microscopiques qui composent les gels équimolaires multi-composés identifiés précédemment. Ainsi, sont analysés par TEM des dépôts pour les deux mélanges équimolaires complémentaires {A+T} et {C+G} ainsi que pour les mélanges témoins {A+Aeg}, {Aeg+T}, {C+Aeg} et {G+Aeg}.

Les six échantillons présentent des morphologies fibrillaires distinctes. Pour les mélanges contenant PNA(A)-pep et/ou PNA(T)-pep, le réseau le plus dense est observé pour le mélange équimolaire complémentaire {A+T} (image (a), Figure III-16), en accord avec les données de relaxométrie RMN et de SAXS obtenues précédemment (Parties III.8 et III.9). Les fibres, de diamètre  $d = 6.0 \pm 1.3$  nm, sont fines comparées à celles rencontrées dans le mélange de {A+Aeg} ( $d = 9.1 \pm 1.4$  nm, image (c), Figure III-16) ou de {Aeg+T} ( $d = 11.2 \pm 2.8$  nm, image (e), Figure III-16), mais forment de très nombreux points de jonction : elles s'assemblent par endroits en faisceaux (« bundles », en anglais) de diamètre  $16.0 \pm 4.5$  nm qui augmentent la compacité du système (voir images complémentaires (a) et (b), Figure SIII-12, en annexe).<sup>322</sup> Il semble que le mélange des composés PNA(A)-pep et PNA(T)-pep induise un co-assemblage, c'est-à-dire que les fibres contiennent un mélange de chacun de ces deux composés, puisque d'une part nous ne remarquons pas la présence de domaines distincts au sein de l'échantillon, et d'autre part, les fibres formées ont un diamètre différent de celles observées précédemment en TEM pour les échantillons mono-composés ( $d = 4.9 \pm 0.6$  nm pour PNA(A)-pep et  $d = 2.5 \pm 0.3$  nm pour PNA(T)-pep, Figure II-12, Partie II.8, Chapitre II).<sup>90</sup> En comparaison, les échantillons témoins {A+Aeg} et {Aeg+T} comportent un réseau fibrillaire peu dense, plutôt en accord avec les données de SAXS (Partie III.9), ainsi que des objets autres que des fibres : de larges feuilletts (jusqu'à 800 nm de largeur) pour le premier et des structures de type bandes pour le second ( $d > 100$ nm, images (c) et (d), respectivement, Figure SIII-12 en annexe.). La densité et la régularité du réseau constituant le gel de {A+T} explique probablement ses meilleures propriétés mécaniques par rapport aux hydrogels témoins.

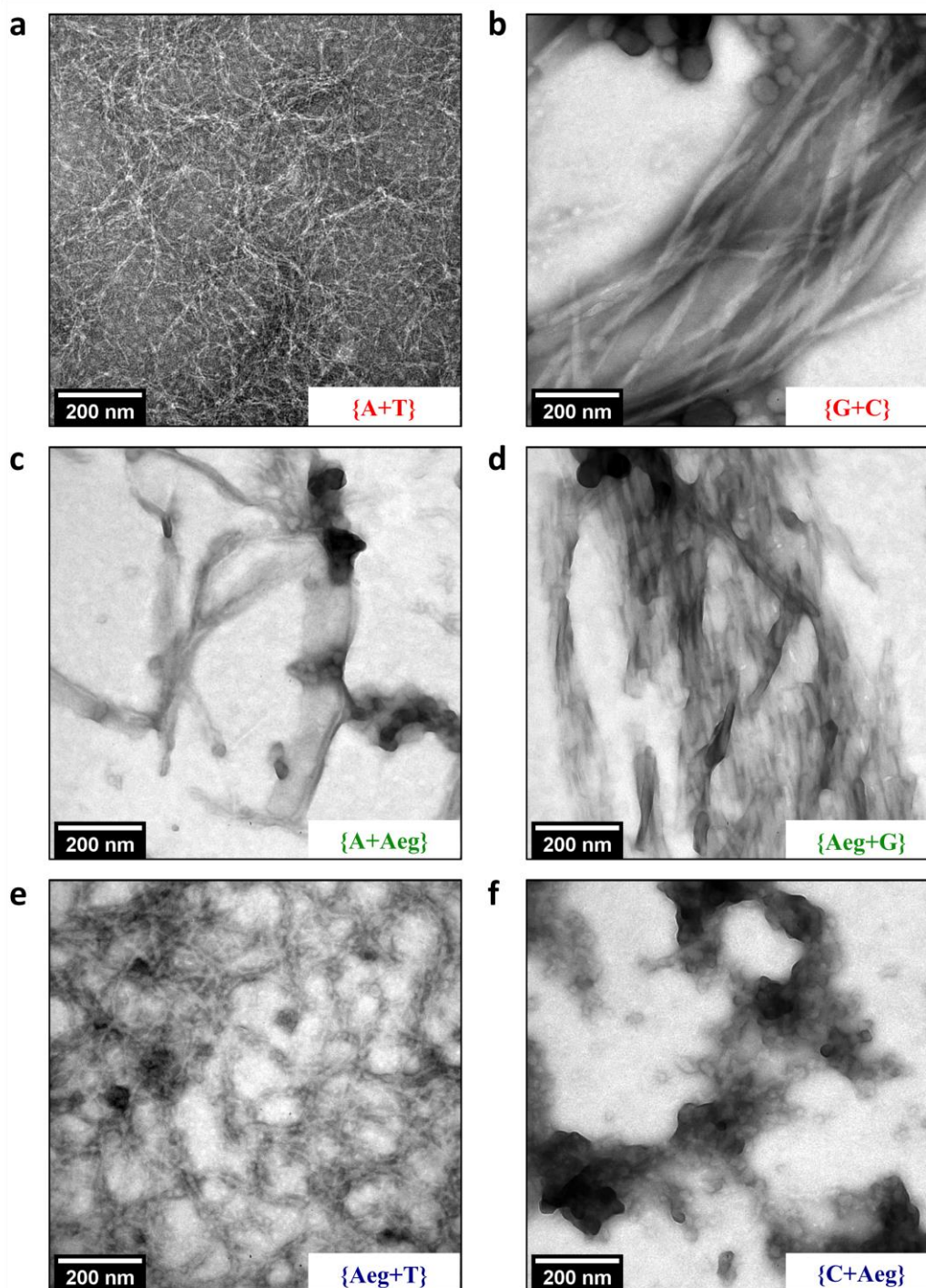
Concernant les mélanges comprenant PNA(C)-pep et/ou PNA(G)-pep, les fibres les plus épaisses sont cette fois issues de l'échantillon comportant les deux composés complémentaires {C+G} (image (b), Figure III-16), avec  $d = 28.7 \pm 7.8$  nm ce qui est bien

supérieur aux dimensions observées pour les nucléopeptides PNA(C)-pep et PNA(G)-pep seuls ( $d = 2.5 \pm 0.3$  nm et  $d = 5.1 \pm 0.2$  nm, respectivement, voir Figure II-12, Partie II.8, Chapitre II), argument en faveur d'un système co-assemblé.<sup>90</sup> Ces fibres flexibles correspondent bien au modèle « chaîne gaussienne » proposé à l'analyse des données de SAXS. Aussi, des bandes hélicoïdales sont observées, de pas  $167 \pm 18$  nm, allant parfois par deux comme c'est le cas sur l'image (f) de la Figure SIII-12, en annexe. La morphologie de ces objets est directement liée à la façon dont l'assemblage supramoléculaire est réalisé molécule à molécule,<sup>382</sup> et il EST possible que leur régularité soit liée à un assemblage ordonné de PNA(C)-pep et PNA(G)-pep au sein des hélices, qui pourrait éventuellement être dû à une interaction spécifique entre les deux composés. Toutefois, quelques bandes hélicoïdales ont également été identifiées pour le mélange {Aeg+G} (pas de  $115 \pm 10$  nm, image (e), Figure SIII-12, en annexes) qui ne comporte pas de nucléobases complémentaires, en plus de longs rubans ( $d = 14.2 \pm 3.3$  nm). Enfin, le mélange {C+Aeg} présente des structures peu définies d'aspect globulaire. Ces objets ne correspondent pas vraiment au modèle de fibres rigides avancé dans la partie précédente (Partie III.9), néanmoins la TEM corrobore la faible intensité de diffusion mesurée en SAXS : les deux techniques concluent sur la faible densité du réseau structural du gel de {C+Aeg}. Ainsi, l'hétérogénéité des nano-objets et la compacité moindre du réseau constituant les hydrogels des mélanges {Aeg+G} et {C+Aeg} expliqueraient leurs faibles propriétés mécaniques en comparaison au gel de {C+G}.

Les images de TEM mettent en évidence la diversité des structures microscopiques pour les six hydrogels multi-composés étudiés, en termes de morphologies et de tailles d'objets. Les gels équimolaires complémentaires {A+T} et {C+G} présentent des réseaux fibrillaires denses riches en jonctions, en accord avec les données de SAXS (Partie III.9) et de relaxométrie RMN (Partie III.8). Cela permet également d'expliquer la force des gels mesurée par rhéologie (Partie III.7).

Aussi, les caractéristiques des fibres laissent à penser que les composés PNA(A)-pep et PNA(T)-pep d'une part, et PNA(C)-pep et PNA(G)-pep d'autre part, s'assemblent ensemble (co-assemblage) dans une structure mixte plutôt que dans des structures narcissiques (*self-sorting*), cohabitant dans le gel, bien que cette hypothèse mérite de plus amples justifications.<sup>408</sup> Par conséquent, des mesures de spectres infra-rouge IRTF et de dichroïsme

circulaire ont été réalisées avec pour objectif d'identifier le mode d'assemblage des nucléopeptides dans les mélanges équimolaires.



**Figure III-16.** Images TEM obtenues pour les systèmes multi-composés de {A+T}, {A+Aeg}, {Aeg+T} (a, c, e) et {C+G}, {C+Aeg} et {Aeg+G} (b, d, f), en grandissement  $\times 11\,500$  et contrastées négativement à l'acide phosphotungstique (voir Partie V.2.e, Chapitre V « Partie expérimentale »).

### III.11 Caractérisation des assemblages supramoléculaires des mélanges équimolaires par spectroscopies IRTF et CD

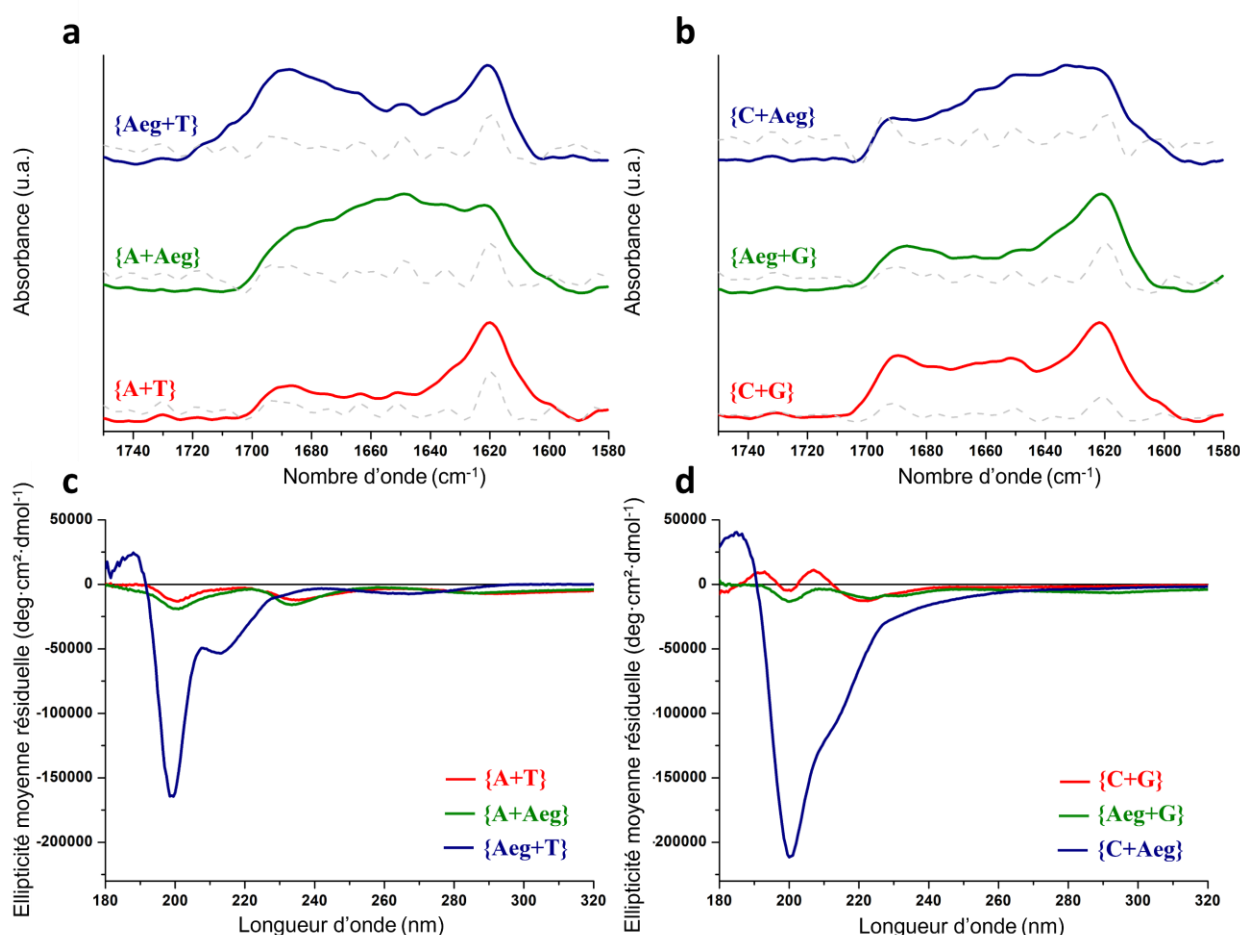
La spectroscopie infrarouge IRTF et le dichroïsme circulaire sont des techniques de choix pour étudier la structure secondaire des peptides et protéines, qui nous ont déjà permis d'analyser la structure des auto-assemblages formés dans le cas des hydrogels mono-composés (Partie II.10.b, Chapitre II). Des spectres IRTF ont été réalisés pour les six systèmes multi-composés sous forme gel ( $C_T = 15$  mM dans un tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4), voir Partie V.2.f, Chapitre V « Partie expérimentale »), ainsi que des spectres dichroïques. Les échantillons pour ces derniers ont en revanche été préparés à  $C_T = 10$  mM, en solution de NaF (NaF 0,67 M pH = 7.4, voir Partie V.2.g, Chapitre V « Partie expérimentale ») pour les mêmes raisons qu'évoquées au Chapitre précédent à propos des systèmes mono-composés en Partie II.10.b: la concentration doit être assez élevée pour assurer l'état assemblé que nous souhaitons étudier sans saturer le signal ni provoquer des effets de diffusion.<sup>408</sup>

#### III.11.a Identification de la structure secondaire des assemblages supramoléculaires

Comme pour les hydrogels mono-composés, les spectres IRTF des échantillons multi-composés présentent tous les six les deux bandes amide I liées à une structure de type feuillet  $\beta$  ( $1619 - 1622$   $\text{cm}^{-1}$ ) antiparallèles ( $1690 - 1693$   $\text{cm}^{-1}$ ),<sup>531</sup> comme observé sur les spectres (a) et (b) (Figure III-17). Cette analyse est corroborée par les spectres dichroïques présentés en (c) et (d) (Figure III-17). En effet, un profil de feuillet  $\beta$  marqué est remarqué pour les mélanges {Aeg+T} et {C+Aeg} avec une bande positive à 186 - 188 nm (transition  $\pi-\pi^*$  des amides) et une bande négative centrée sur 215 - 220 nm (transition électronique  $n-\pi^*$  des amides).<sup>122,348,535</sup> Cette dernière est déplacée vers de plus hautes longueurs d'onde ( $\approx 220 - 230$  nm) dans le cas de {Aeg+G} et {A+Aeg}, ainsi que pour les systèmes complémentaires {A+T} et {C+G}. Cette caractéristique, déjà rencontrée pour les auto-assemblages mono-composés de PNA(A)-pep et PNA(T)-pep par exemple (Partie II.10.b, Chapitre II), est indicative d'une structure de type feuillet  $\beta$  déformés, « twistés ».<sup>382,545,546</sup>

A l'instar des échantillons mono-composés, les six mélanges présentent une bande négative à 200 nm attribuée à la transition  $\pi-\pi^*$  des phénylalanines en interaction de  $\pi$ -stacking.<sup>118,541,542</sup> Dans le cas du mélange {C+G}, il est fort probable que cette bande de stacking se superpose à la bande positive très forte correspondant à une structure feuillet  $\beta$ , également centré sur 200 nm,<sup>382</sup> créant ce profil particulier à deux maxima positifs entre 190 nm et 210 nm (en rouge, d, Figure III-17). Notons que la bande  $\pi-\pi^*$  des phénylalanines est prédominante dans le cas

de {Aeg+T} et {C+Aeg}, traduisant l'importance des interactions hydrophobes dans ces assemblages ; les profils résultants sont ainsi très proches de celui mesuré pour Aeg-pep seul (b, Figure II-16), les trois échantillons ayant également en commun des objets peu définis (comme observés en TEM, Partie III.10, ci-avant et Partie II.8, Chapitre II) et dont la formation est probablement dirigée par ce type d'interactions hydrophobes. Leurs spectres IR respectifs vont dans le même sens, avec des bandes variées et larges entre 1630 - 1680  $\text{cm}^{-1}$  traduisant la présence de structures peptidiques peu ordonnées.<sup>547</sup> Ces mêmes bandes sont présentes dans une moindre mesure pour les autres échantillons {Aeg+G}, {A+Aeg} et {C+G}, alors que la signature spectrale de l'échantillon de {A+T} en est presque exempt. Cette remarque est en accord avec la structure observée en TEM pour ce dernier (image (a), Figure III-16, Partie III.10), à savoir des fibres bien définies et plutôt régulières.



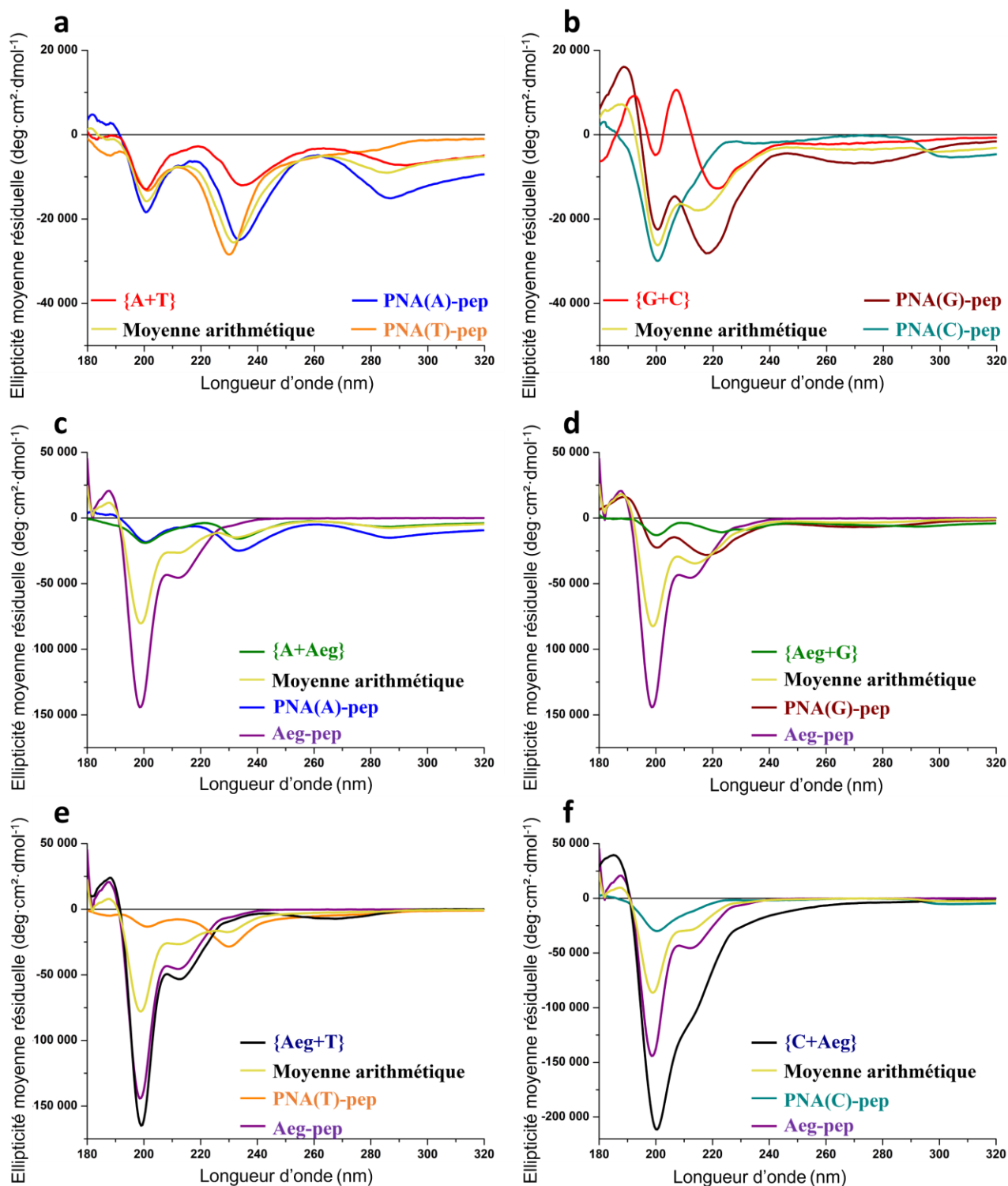
**Figure III-17.** Spectres IRTF de la région amide I pour les systèmes multi-composés {A+T}, {A+Aeg}, {Aeg+T} (a) et {C+G}, {C+Aeg} et {Aeg+G} (b), étudiés à  $C_T = 15 \text{ mM}$  (1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4). Les dérivées secondes mettant en évidence les bandes principales sont tracées dans chaque cas en pointillés. Spectres de dichroïsme circulaire pour les systèmes multi-composés {A+T}, {A+Aeg}, {Aeg+T} (c) et {C+G}, {C+Aeg} et {Aeg+G} (d), étudiés à  $C_T = 10 \text{ mM}$  (1 :1) en solution de NaF (0.67 M, pH 7.4).



Dans leur ensemble, les analyses par dichroïsme circulaire et spectroscopie IRTF montrent que les assemblages supramoléculaires des différents mélanges combinent des structures de type feuillets  $\beta$ , « twistés » dans certains cas comme pour les systèmes complémentaires {A+T} et {C+G}, ainsi que des interactions hydrophobes menées par les phénylalanines de la partie peptidique. Les disparités notées sur les images de microscopie TEM sont la conséquence d'une différence d'équilibre entre les deux types d'interaction selon les mélanges : par exemple, la prédominance du  $\pi$ -stacking hydrophobe conduit à la formation d'objets peu définis formant à l'échelle macroscopique des gels de faibles propriétés mécaniques comme c'est le cas pour {C+Aeg} et {Aeg+T}.

### III.11.b Identification du mode d'assemblage des systèmes multi-composés

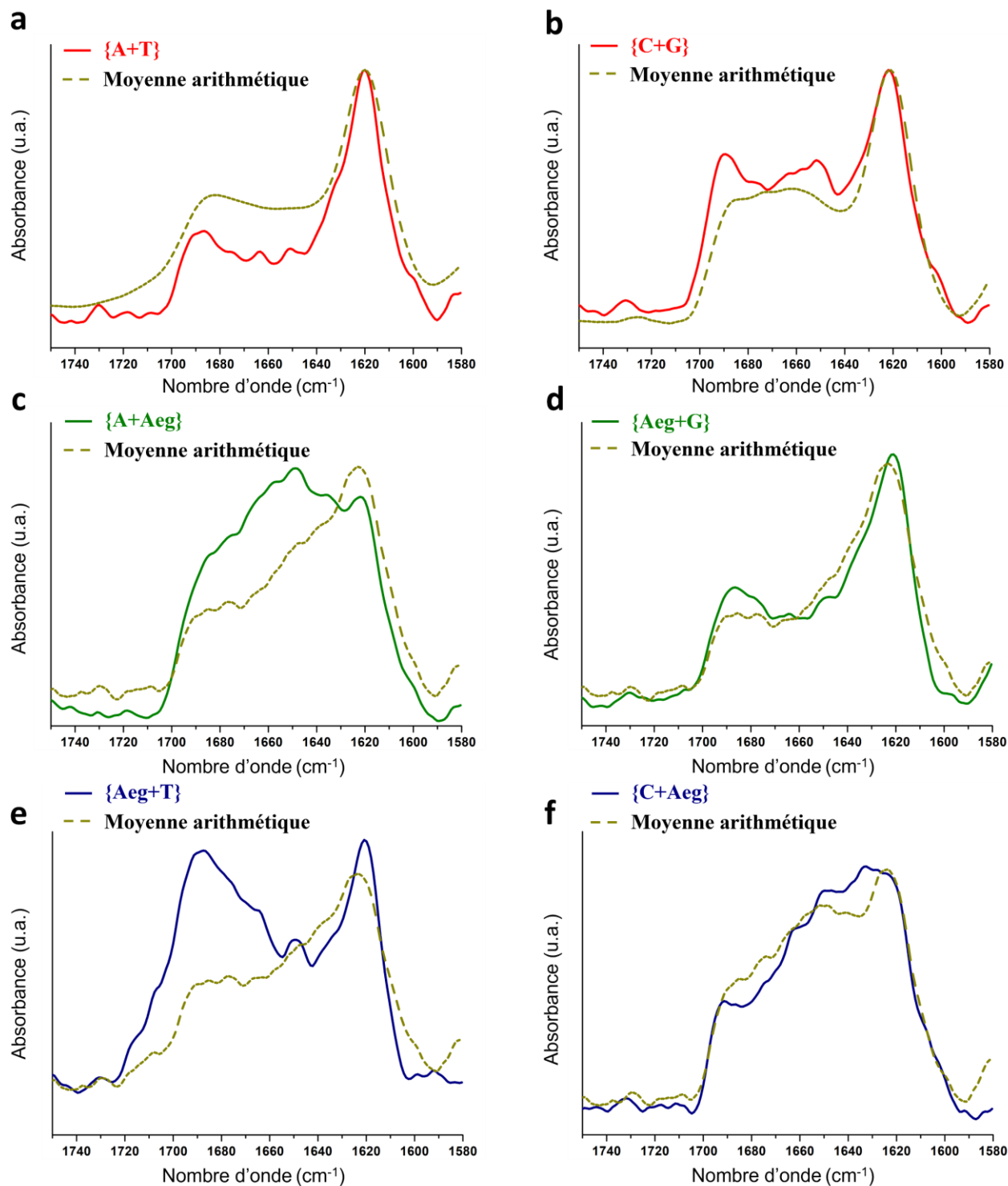
En plus de fournir des informations précieuses sur le type d'assemblage adopté par les systèmes multi-composés, les spectroscopies IRTF et de dichroïsme circulaire permettent d'obtenir des indications sur le mode d'assemblage entrepris par les systèmes en mélanges, c'est-à-dire savoir si les objets supramoléculaires formés sont la résultante d'un co-assemblage ou d'une ségrégation des composés (« *self-sorting* », voir Partie I.3.b, Chapitre I). En effet, dans ce dernier cas où les assemblages sont narcissiques, les spectres dichroïques tout comme les spectres IRTF enregistrés sont la somme algébrique des signaux obtenus pour les mono-composés.<sup>391,408,409</sup> C'est pourquoi des profils fictifs, correspondant aux moyennes arithmétiques calculées à partir des signaux mono-composés « parents » obtenus précédemment (Partie II.10.b, Chapitre II), ont été tracés Figure III-18 (en jaune, pour le dichroïsme circulaire) et Figure III-19 (en jaune pointillé, pour l'IRTF) pour chacun des mélanges. Par exemple, les spectres de {A+T} sont comparés avec la moyenne arithmétique des spectres des échantillons de PNA(A)-pep et PNA(T)-pep (a, Figure III-18 pour le CD et a, Figure III-19, pour l'IRTF). Cette comparaison directe est rendue possible par le fait que les conditions de mesure des hydrogels multi-composés sont les mêmes que celles des échantillons mono-composés.



**Figure III-18.** Spectres de dichroïsme circulaire pour les systèmes multi-composés  $\{A+T\}$ ,  $\{A+Aeg\}$ ,  $\{Aeg+T\}$  (a, c, e) et  $\{C+G\}$ ,  $\{C+Aeg\}$  et  $\{Aeg+G\}$  (b, d, f), étudiés à  $C_T = 10 \text{ mM}$  (1 : 1) en solution de NaF (0.67 M, pH 7.4). Sont également tracés pour comparaison, les spectres des échantillons mono-composés « parents » (PNA(X)-pep et Aeg-pep) et les moyennes arithmétiques entre ces spectres (en jaune).

Comme le montrent les spectres Figure III-18, les profils mesurés en dichroïsme circulaire sur les gels multi-composés sont clairement différents de la moyenne arithmétique des composés seuls avec, dans certains cas, des différences nettes en termes de signatures spectrales (comme pour {C+G}, {A+Aeg} ou {Aeg+G}, par exemple, (b), (c) et (d) Figure III-18, respectivement), ou d'intensités relatives des bandes (comme pour {Aeg+T} ou {C+Aeg}, par exemple, (e) et (f), Figure III-18, respectivement). La même analyse vaut pour les spectres IRTF (Figure III-19) pour lesquels le mélange {A+Aeg} montre plus de bandes entre 1630 - 1680  $\text{cm}^{-1}$  correspondant à des structures peu ordonnées, que le profil fictif par exemple (spectre (c), Figure III-19). Également, les profils de {A+T}, de {Aeg+G} et de {C+G} ((a), (b), (d), Figure III-19, respectivement) montrent quant à eux une signature de structures de type feuillets  $\beta$  antiparallèles plus marquée que dans le cas d'une simple superposition de signaux. Par conséquent, les spectres IRTF et CD réalisés pour les six mélanges ne sont pas en accord avec l'hypothèse de la séparation des composés. Ces études spectroscopiques nous indiquent que les nucléopeptides forment des co-assemblages mixtes comportant les deux composés mélangés.

Ainsi, les études par spectroscopie IRFT et dichroïsme circulaire mettent en évidence une structure d'assemblage principalement de type feuillets  $\beta$  antiparallèles pour l'ensemble des systèmes multi-composés. Les mélanges complémentaires {A+T} et {C+G} favorisent ce type d'interaction au détriment du  $\pi$ -stacking hydrophobe qui, lorsqu'il domine comme pour les mélanges {C+Aeg} et {Aeg+T}, donne lieu à des systèmes moins structurés entraînant la formation d'hydrogels moins forts du point de vue mécanique. Les informations complémentaires apportées par les deux techniques de spectroscopie permettent également d'écarter l'hypothèse de systèmes *self-sorted*, d'une ségrégation des composés au sein des mélanges. En d'autres termes, cela signifie que PNA(A)-pep et PNA(T)-pep, ainsi que PNA(C)-pep et PNA(G)-pep forment des co-assemblages au sein des gels de {A+T} et {C+G}, comme le présupposaient les observations de TEM, où les objets présentaient des caractéristiques homogènes, et distinctes des composés pris seuls (Partie III.10).



**Figure III-19.** Spectres IRTF de la région amide I pour les gels multi-composés de {A+T}, {A+Aeg}, {Aeg+T} (a, c, e, lignes pleines) et de {C+G}, {C+Aeg} et {Aeg+G} (b, d, f, lignes pleines) étudiés à  $C_T = 15 \text{ mM}$  (1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4), en comparaison avec la moyenne arithmétique des spectres des gels « parents » dans chaque cas (en jaune pointillés).

### III.12 Cinétique de formation des systèmes fibrillaires de mélanges équimolaires par suivi de la fluorescence de la Thioflavine T

Jusqu'à présent, la relaxométrie RMN, la SAXS, la TEM ainsi que les spectroscopies IRTF et CD nous ont apporté des informations complémentaires concernant la nature des structures – à l'échelle du réseau microscopique pour les premiers et concernant l'assemblage supramoléculaire pour les derniers – constituant les hydrogels multi-composés. Pour autant, seule la rhéologie, et particulièrement les balayages en temps (Partie III.7.a), nous a renseigné sur la cinétique de formation des gels, et ce, de fait, à l'échelle macroscopique. C'est pourquoi, afin d'analyser cet aspect des assemblages multi-composés à plus petite échelle, une étude de leurs cinétiques par suivi de la fluorescence de la Thioflavine T (ThT) a été conduite. Comme rappelé Partie II.9 (Chapitre II), cette molécule n'est pas significativement fluorescente lorsqu'elle est libre en solution, mais, en conformation bloquée au sein d'une association de brins  $\beta$ , elle présente une transition de fluorescence pour  $\lambda_{ex} = 450$  nm, et  $\lambda_{em} = 485$  nm.<sup>525</sup> Ainsi, l'étude de la fluorescence d'un système s'auto-assemblant en structure de type  $\beta$  en présence de la ThT rend compte de la cinétique d'assemblage, *via* la constante de vitesse apparente  $k_{app}$  et le temps de *lagtime*  $t_{lag}$  (lié à la nucléation primaire des fibres), mais également de la quantité relative de fibres grâce à l'intensité de fluorescence  $I_{max}$  qui est reliée au nombre de molécules de ThT en interaction.<sup>526</sup>

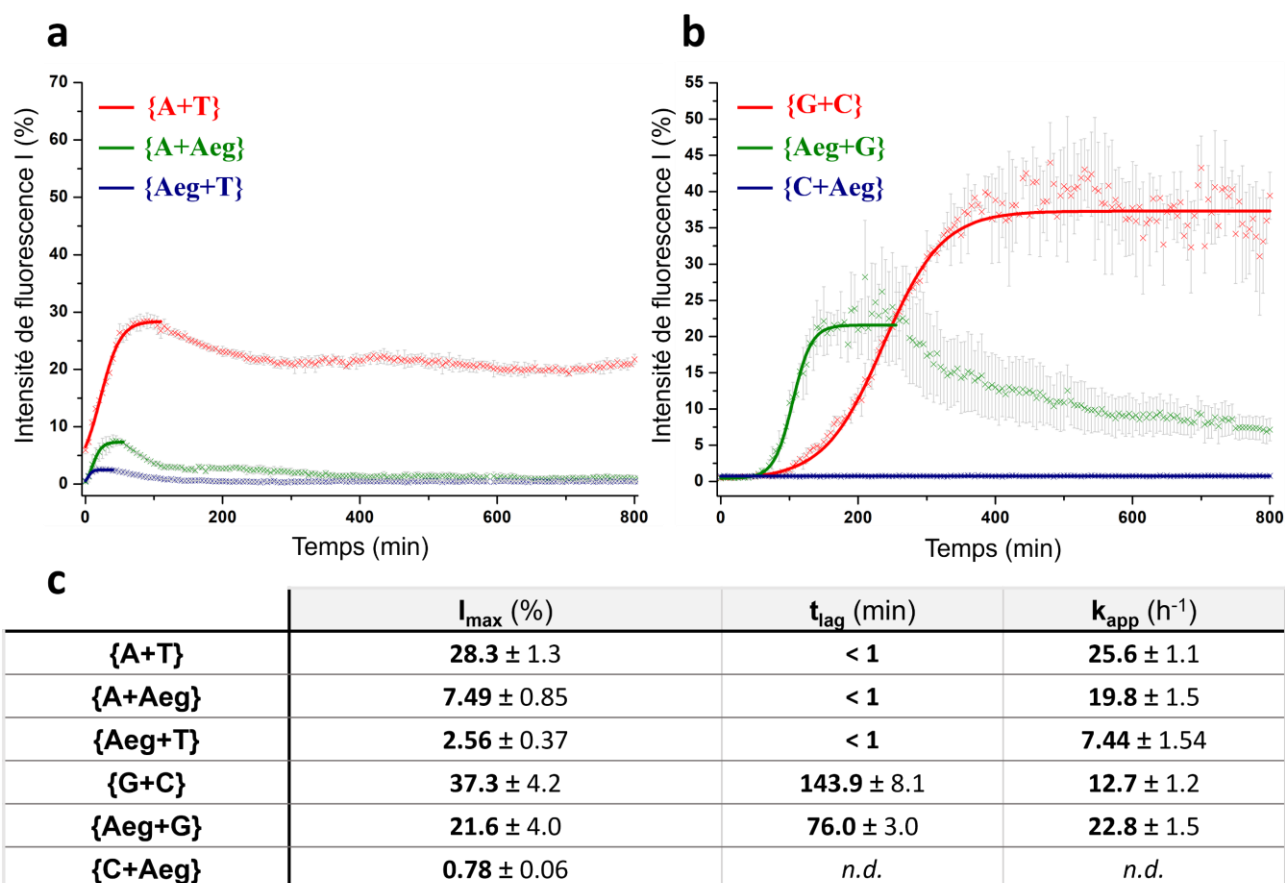
Dans le cas des systèmes mono-composés, l'utilisation de la Thioflavine T avait permis de souligner avec succès les différences dans la formation des protofibres de PNA(A)-pep, PNA(C)-pep, PNA(G)-pep et PNA(T)-pep (Partie II.9.b et II.9.c, Chapitre II). Les conditions pour ces échantillons (concentration en composé C = 15 mM et en ThT  $C_{ThT} = 100$   $\mu$ M) avaient été choisies de manière à concilier force du signal de fluorescence, absence de saturation du détecteur et cinétiques en temps raisonnables, tout en permettant une comparaison pertinente entre les différents composés (voir Partie V.2.h, Chapitre V « Partie expérimentale »). Dans le cas présent des systèmes multi-composés, suite à plusieurs tests d'optimisation, nous avons décidé d'effectuer les séries d'expériences concernant les mélanges contenant PNA(A)-pep et/ou PNA(T)-pep de manière distincte de celles des mélanges contenant PNA(C)-pep et/ou PNA(G)-pep. En effet, les mélanges {A+T}, {A+Aeg} et {Aeg+T} ont été préparés à  $C_T = 10$  mM (soit chaque composé à 5 mM), tandis que {C+G}, {C+Aeg} et {Aeg+G} ont été formulés à  $C_T = 5$  mM (soit chaque composé à C = 2.5 mM). Pour ces derniers, l'utilisation de concentration plus élevées se soldait par une saturation rapide du

détecteur rendant les analyses inexploitable. Dans les deux cas, la même concentration en ThT que celle utilisée pour les systèmes mono-composés a été employée ( $C_{ThT} = 100 \mu M$ ).

Ainsi, l'évolution de la fluorescence des échantillons a été suivie en fonction du temps et tracée Figure III-20 (a et b respectivement) pour les mélanges contenant PNA(A)-pep et/ou PNA(T)-pep, et PNA(C)-pep et/ou PNA(G)-pep respectivement.

L'échantillon {A+T}, réunissant les deux composés complémentaires PNA(A)-pep et PNA(T)-pep, montre une intensité de fluorescence  $I_{max} = 28 \%$  plus de trois fois supérieure à celle de l'échantillon témoin {A+Aeg} ( $I_{max} = 7.5 \%$ ) et dix fois plus élevée que celle de {Aeg+T} ( $I_{max} = 2.6 \%$ ). Cette tendance s'accorde avec les observations précédentes : l'IRTF montrait par exemple une plus grande propension de {A+T} à former des systèmes de type feuillets  $\beta$  comparé aux deux autres mélanges (Partie III.11.a). Aussi, la TEM et la SAXS indiquaient que le réseau de ce gel était le plus dense des trois, celui aux fibres les plus nombreuses donc plus riche en sites de liaisons pour la ThT, d'où une fluorescence plus intense.

Également, les courbes des mélanges contenant PNA(A)-pep et/ou PNA(T)-pep ne présentent pas de temps de latence (*lagtime*), et montrent des vitesses élevées de formation des assemblages, caractérisées par leurs constantes de vitesse apparente  $k_{app}$ . Avec  $k_{app} = 25.6 h^{-1}$ , l'échantillon {A+T} possède la vitesse de formation de fibre la plus rapide, contre  $k_{app} = 19.8 h^{-1}$  et  $k_{app} = 7.4 h^{-1}$  pour {A+Aeg} et {Aeg+T}, respectivement. En revanche, si les trois courbes atteignent un maximum dans les premiers temps de la cinétique (approximativement 20 min pour {Aeg+T}, 40 min pour {A+Aeg} et 90 min pour {A+T}), leurs fluorescences présentent un affaiblissement dans la seconde partie. Puisque la cinétique macroscopique suivie par rhéométrie (Partie III.7.a) ne montre pas ce type de caractéristique, cette variation d'intensité pourrait s'expliquer par une réorganisation des assemblages non délétère pour les propriétés mécaniques de l'hydrogel: coalescence de fibres, formation d'objets pour lesquels la ThT n'émettrait pas de fluorescence – hypothèse étayée par les images de TEM, riches en ce type de nano-objets (bandes et feuillets, notamment, Partie III.10).<sup>525,526</sup>



**Figure III-20.** Suivi de la cinétique de formation des assemblages supramoléculaires pour les systèmes multi-composés de {A+T}, {A+Aeg}, {Aeg+T} (a), étudiés à  $C_T = 10$  mM (1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4) et {C+G}, {C+Aeg} et {Aeg+G} (b), étudiés à  $C_T = 5$  mM (1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4), par fluorescence de la ThT ( $\lambda_{\text{ex}} = 440$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 485$  nm) en fonction du temps. Le tableau (c) récapitule intensités de fluorescence maximales ( $I$ ), lagtimes ( $t_{\text{lag}}$ ) et constantes de vitesse apparentes ( $k_{\text{app}}$ ), issus des cinétiques (a et b).

Parmi les mélanges contenant PNA(C)-pep et/ou PNA(G)-pep, il n'est détecté aucune fluorescence significative pour l'échantillon {C+Aeg} dans les conditions expérimentales choisies. Cette observation reste en accord avec les nano-objets peu définis formés par ce mélange, comme relevé en TEM ou en spectroscopie IRTF (Partie III.7.a et III.11.a, respectivement). En revanche, le mélange de composés {Aeg+G} et le mélange complémentaire {C+G} montrent tous deux une fluorescence intense. Ce dernier possède le  $I_{\max}$  le plus élevé,  $I_{\max} = 37\%$ , contre  $I_{\max} = 21\%$  pour {Aeg+G}, une hiérarchie cohérente avec les données de SAXS (Partie III.9). Les vitesses de formation des primo-assemblages, mises en évidence par les profils de fluorescence, montrent cependant la tendance inverse : {C+G} présente un *lagtime* plus long ( $t_{\text{lag}} = 144$  min) et une vitesse apparente moins rapide ( $k_{\text{app}} = 12.7 \text{ min}^{-1}$ ), soit un système supramoléculaire plus lent à s'assembler que pour {Aeg+G} ( $t_{\text{lag}} =$

76 min et  $k_{app} = 23 \text{ min}^{-1}$ ) alors que macroscopiquement, le gel de {C+G} se forme dix fois plus vite ( $V_0 = 585 \text{ Pa}\cdot\text{min}^{-1}$ ) que celui de {Aeg+G} ( $V_0 = 57.2 \text{ Pa}\cdot\text{min}^{-1}$ ) selon les données de rhéologie (c, Figure III-10, Partie III.7, ci-avant). Ceci peut s'expliquer par le fait que les objets formés dans le cas du mélange {Aeg+G} (de types rubans et fibres hélicoïdales, voir images de TEM (d), Figure III-16, Partie III.10), bien que rapides à se constituer, soient moins profitables mécaniquement à la structure macroscopique comparés aux grandes fibres denses de {C+G} (b, Figure III-16, Partie III.10).<sup>119,600</sup>

Aussi, il est intéressant de remarquer que les mélanges {C+G} et {Aeg+G} présentent des temps de latence (*lagtimes*) alors que ce n'est pas le cas des échantillons mono-composés de PNA(G)-pep (à  $C = 5 \text{ mM}$ , Partie II.9.c, Chapitre II ou même à  $C = 2.5 \text{ mM}$ , *résultats non présentés ici*). L'incorporation de deux composés au lieu d'un seul dans ces systèmes assemblés nécessiterait donc une phase de nucléation primaire plus longue. La formation d'assemblages multi-composés serait thermodynamiquement favorisée au détriment de structures mono-composées, plutôt cinétiquement avantageées. Aussi, le profil de fluorescence de {C+G} montre un seul plateau de fluorescence. L'assemblage présente donc une coopération des nucléopeptides complémentaires pour former les nanostructures, par opposition à un système « sergent-soldat » où un composé imposerait à l'autre son mode d'assemblage (voir Partie I.3.b.iii, Chapitre I).<sup>398,399,424</sup>

Le suivi de la fluorescence en présence de Thioflavine T a permis d'étudier la cinétique de formation des assemblages dans le cas de l'ensemble des échantillons multi-composés équimolaires étudiés. Hormis {C+Aeg}, tous ces mélanges présentent une émission de fluorescence en présence de ThT, confirmant une structure de type feuillets  $\beta$ . L'intensité de fluorescence, directement liée à la quantité de fibres formées, confirme que les mélanges complémentaires {A+T} et {C+G} présentent les densités fibrillaires les plus élevées. Dans le cas des mélanges contenant PNA(A)-pep et/ou PNA(T)-pep, le système le plus fort {A+T} est aussi le plus rapide à se former, sachant qu'aucun de ces mélanges ne présente de *lagtime*. Le comportement d'assemblage est différent dans le cas des mélanges contenant PNA(C)-pep et/ou PNA(G)-pep où les structures formées les plus rapidement ne produisent pas le système fibrillaire le plus intéressant mécaniquement ({Aeg+G} par exemple). La présence des deux composés induit dans ce cas une cinétique d'assemblage ralentie, nécessitant une phase de nucléation plus longue.<sup>483</sup>

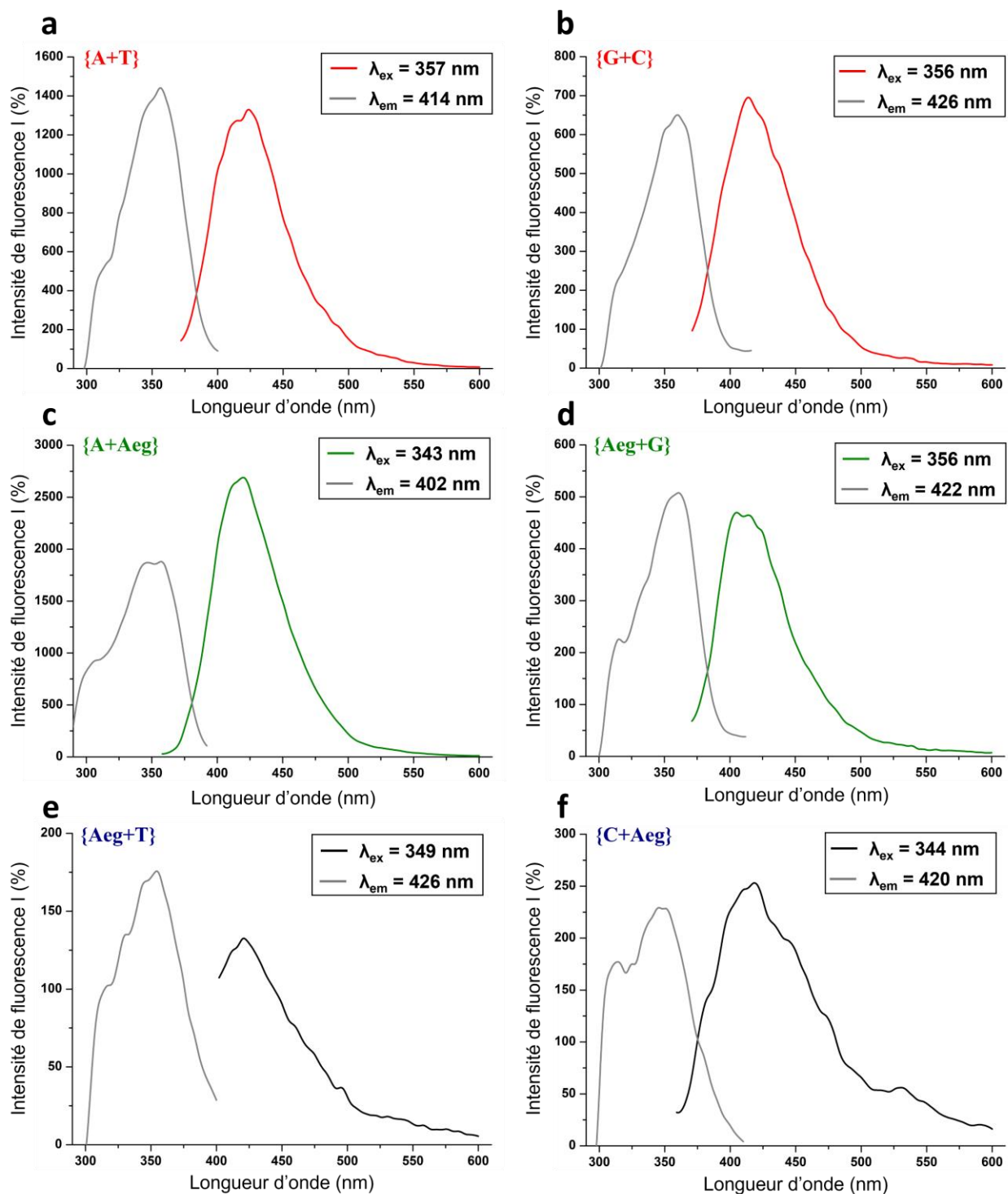


### III.13 Mise en évidence d'interactions de $\pi$ -stacking par spectrofluorimétrie

La présence des deux composés complémentaires, PNA(A)-pep et PNA(T)-pep d'une part pour {A+T}, PNA(C)-pep et PNA(G)-pep d'autre part pour {C+G}, a un effet indéniable sur les caractéristiques physiques des hydrogels formés que cela soit à l'échelle macroscopique (Partie III.7) ou microscopique (Partie III.10), mais également sur la cinétique de formation des structures supramoléculaires. Ces structures de type feuillets  $\beta$  montrent une déformation de la structure canonique, se traduisant sur les spectres de dichroïsme circulaire par un décalage de la bande caractéristique en direction des plus hautes longueurs d'ondes (Partie III.11.a). Lors de l'étude des systèmes mono-composés, une telle particularité a été observée pour certains échantillons (de PNA(A)-pep et PNA(T)-pep, voir Partie II.10.b, Chapitre II) et trouve son origine dans une interaction intermoléculaire supplémentaire induite par la présence des bases nucléiques : le  $\pi$ -stacking entre les nucléobases. En effet, l'étude des spectres de fluorescence sur les systèmes mono-composés avait permis de mettre en évidence une telle capacité d'association entre les bases (Partie II.12, Chapitre II). C'est pourquoi des expériences similaires de spectrofluorimétrie ont été réalisées sur les systèmes multi-composés.

#### III.13.a Analyse des spectres de fluorescence

Pour tous les échantillons, des spectres d'émission et d'excitation de fluorescence ont été mesurés alternativement afin d'identifier des transitions de fluorescence particulières (Figure III-21). A l'instar de ce qui avait été vu pour les systèmes mono-composés dans la Partie II.12 du Chapitre II, une bande d'émission principale située entre 398 et 418 nm se distingue pour une excitation entre 345 et 351 nm. Cette transition, correspondant à un déplacement de Stokes d'énergie  $E = 0.57 - 0.65$  eV, est attribuable à la fluorescence d'un exciton produit par l'interaction aromatique de phénylalanines<sup>498,562</sup> et se retrouve dans les spectres de chacun des mélanges équimolaires. Ce type d'interactions hydrophobes intermoléculaires avait déjà été mise en évidence par le dichroïsme circulaire (Partie III.11.a) et les données de fluorescence viennent corroborer ces interprétations.



**Figure III-21.** Spectres de fluorescence en émission et en excitation pour les systèmes multi-composés de {A+T}, {A+Aeg}, {Aeg+T} (a, c, e) et {C+G}, {C+Aeg} et {Aeg+G} (b, d, f), étudiés à  $C_T = 5$  mM (1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4), soulignant la bande d'émission principale (maximum entre 398 - 418 nm, en couleur) et la bande d'excitation correspondante (maximum entre 345 - 351 nm, en gris) attribuées à l'interaction de  $\pi$ -stacking des phénylalanines, ainsi que la bande d'excitation supplémentaire (épaulement entre 306 - 315 nm) attribuée à l'interaction entre les nucléobases.

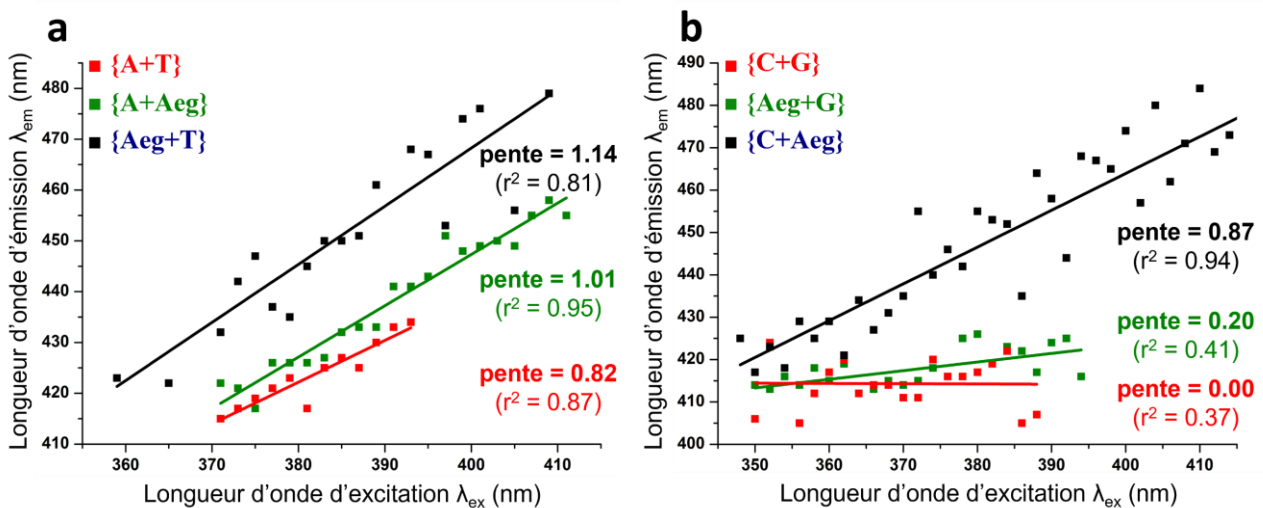
Une seconde transition, cette fois correspondant à des interactions de  $\pi$ -stacking entre nucléobases, a été repérée pour une excitation  $\lambda_{ex} = 306 - 315$  nm et une émission superposée à la bande identifiée précédemment,  $\lambda_{emi} = 398 - 418$  nm. Cette bande étant visible pour tous les mélanges, cela signifie que cette interaction entre base nucléique a lieu même dans les mélanges témoins. Puisque dans ces échantillons un seul composé porte une nucléobase (Aeg-pep n'en possédant pas), la présence de cette bande de fluorescence met en évidence l'existence d'interactions « homo-composé ». Par exemple, l'échantillon de {A+Aeg} comporterait des interactions adénine/adénine entre molécules de PNA(A)-pep, malgré la présence de Aeg-pep.

Dans le cas des mélanges complémentaires {A+T} et {C+G}, les combinaisons d'interactions possibles entre bases nucléiques sont multiples : adénine/adénine, adénine/thymine et thymine/thymine dans le premier cas, cytosine/cytosine, cytosine/guanine et guanine/guanine dans le second cas. Malheureusement, malgré le fait que l'énergie liée à ces différentes interactions ne soit pas la même (et donc qu'*a priori* les longueurs d'ondes caractéristiques de fluorescence soient différentes) il n'a pas été possible d'identifier exactement les transitions correspondant à chaque cas. Toutefois, nous pouvons supposer, en nous basant sur la largeur spectrale des bandes ( $\Delta\lambda = 64$  nm pour {A+T} et  $\Delta\lambda = 65$  nm pour {C+G}, mesurés à  $I = I_{max}/2$ , où  $I_{max}$  est l'intensité de fluorescence maximale atteinte en émission pour ces échantillons, voir Figure SIII-13, en annexe) et sur les conclusions précédentes des données de spectroscopies FTIR et CD effectuées qui sont clairement en défaveur de systèmes *self-sorted* (Partie III.11.b), que ces différentes configurations peuvent avoir lieu. L'énergie de stacking aromatique des bases entre elles n'est en tous cas pas défavorable aux interactions mixtes :  $\Delta G_{stack}(C+G) = -2.24$  kcal·mol<sup>-1</sup> plus favorable que  $\Delta G_{stack}(C+C) = -1.93$  kcal·mol<sup>-1</sup> mais moins stabilisant que  $\Delta G_{stack}(G+G) = -2.66$  kcal·mol<sup>-1</sup>;  $\Delta G_{stack}(A+T) = -2.25$  kcal·mol<sup>-1</sup> plus favorable que  $\Delta G_{stack}(T+T) = -1.82$  kcal·mol<sup>-1</sup> et presque tout autant que  $\Delta G_{stack}(A+A) = -2.41$  kcal·mol<sup>-1</sup>.<sup>570</sup>

En conclusion, la spectrofluorimétrie confirme l'existence d'interactions hydrophobes intermoléculaires menées par les phénylalanines. Les spectres de fluorescence mettent également en évidence la présence de  $\pi$ -stacking entre nucléobases, entre bases de même nature dans les mélanges témoins {A+Aeg}, {Aeg+T}, {C+Aeg} et {Aeg+G}, et possiblement entre bases complémentaires dans le cas des mélanges {A+T} et {C+G}.

### III.13.b Présence d'un effet de « red-edge emission shift » (REES)

En analysant de plus près les spectres d'émission de fluorescence, nous avons observé l'existence d'un effet de « *red-edge emission shift* » (REES), qui correspond à un décalage de la bande d'émission vers les grandes longueurs d'onde linéairement avec l'augmentation de la longueur d'onde d'excitation. L'origine de cet effet de REES a déjà été discuté Partie II.12.b (Chapitre II) pour les systèmes nucléopeptidiques mono-composés. Afin d'évaluer cet effet dans le cas des systèmes multi-composés, nous avons tracé l'évolution de la bande d'émission de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation, ainsi que les régressions linéaires correspondantes, Figure III-22.



**Figure III-22.** Mise en évidence de la corrélation linéaire entre les longueurs d'onde d'émission et d'excitation, indicative d'un effet de REES le cas échéant pour les systèmes multi-composés de {A+T}, {A+Aeg}, {Aeg+T} (a) et {C+G}, {C+Aeg} et {Aeg+G} (b), étudiés à  $C_T = 5$  mM (1 : 1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4). Les spectres dont sont issus ces maxima sont disponibles en annexe, Figure SIII-14.

Ainsi, pour le mélange {Aeg+T}, les longueurs d'ondes maximales de fluorescence passent de  $\lambda_{emi} = 423$  nm à  $\lambda_{emi} = 480$  nm pour des excitations imposées allant de  $\lambda_{ex} = 360$  nm à  $\lambda_{ex} = 408$  nm, soit une pente  $a = 1.14$ , obtenue par régression linéaire. Les mélanges {A+Aeg} et {A+T} présentent des REES moins marqués avec des pentes  $a = 1.01$  et  $a = 0.82$ , respectivement. Les mélanges contenant PNA(C)-pep et/ou PNA(G)-pep présentent quant à eux des effets de REES très distincts avec  $a = 0.87$  pour le mélange {C+Aeg} et  $a = 0.20$  pour {Aeg+G}. En revanche, aucun effet significatif de REES n'est détecté pour le mélange complémentaire {C+G}. En comparant ces sets de résultats, il apparaît que les effets REES les plus intenses sont observés

pour les échantillons comportant le composé Aeg-pep, alors que les plus faible correspondent aux mélanges complémentaires {A+T} et {C+G}. Pour rappel, ce phénomène s'observe dans le cas où les fluorophores sont en situation contrainte, ce qui empêche les relaxations dipolaires avec le solvant et génère des transitions de fluorescence dépendantes de l'énergie incidente. Dans le cas des systèmes multi-composés, les phénylalanines (fluorophores à l'origine du REES) sont impliquées dans l'organisation supramoléculaire, par interactions de  $\pi$ -stacking et hydrophobes. En particulier, les observations en IRTF et CD ont mis en évidence que ces interactions étaient prédominantes dans les mélanges en présence de Aeg-pep, notamment pour les systèmes {C+Aeg} et {Aeg+T} (Partie III.11.a). Il est donc raisonnable de proposer l'hypothèse que cette propension au  $\pi$ -stacking observée pour ces mélanges soit à l'origine d'un effet de REES plus prononcé. A l'inverse, il était noté pour le mélange {C+G} une prépondérance des assemblages de type feuillets  $\beta$  par rapport aux interactions de stacking, expliquant un effet de REES moindre, dû à un environnement moins contraint des noyaux aromatiques.

Les spectres de fluorescence réalisés en émission et en excitation ont ainsi montré l'existence d'interactions de stacking nucléobase/nucléobase au sein de la structure supramoléculaire, qui viennent s'ajouter aux associations de type feuillets  $\beta$  antiparallèles et au  $\pi$ -stacking des phénylalanines (mis en évidence dans les Parties précédentes III.11 et III.12). La propension des mélanges de composés à favoriser l'une ou les autres interactions module la capacité d'assemblage supramoléculaire, modifiant à la fois la vitesse de formation des objets (Partie III.12), leur morphologie (Partie III.10) et *in fine* les propriétés mécaniques des hydrogels (Partie III.7).

### **III.14 Étude de la structure fine des assemblages multi-composés complémentaires {A+T} et {C+G}, par RMN**

Jusqu'à présent les expériences menées ont permis d'identifier la manière dont les nucléopeptides interagissent entre eux pour former les structures constituant les hydrogels : assemblages de type feuillets  $\beta$  antiparallèles par liaisons hydrogène entre les squelettes peptidiques des composés, interactions de  $\pi$ -stacking entre les phénylalanines, interactions de  $\pi$ -stacking entre les nucléobases des PNA lorsqu'elles sont présentes. Etant donnée la propension des bases complémentaires adénine et thymine d'une part, et cytosine et guanine d'autre part à s'associer en paires spécifiques de Watson-Crick par liaisons hydrogène,<sup>145</sup> il

semble pertinent d'émettre l'hypothèse de l'existence de telles interactions dans le cas des mélanges complémentaires.

### **III.14.a Spectres RMN en tampon Tris.HCl**

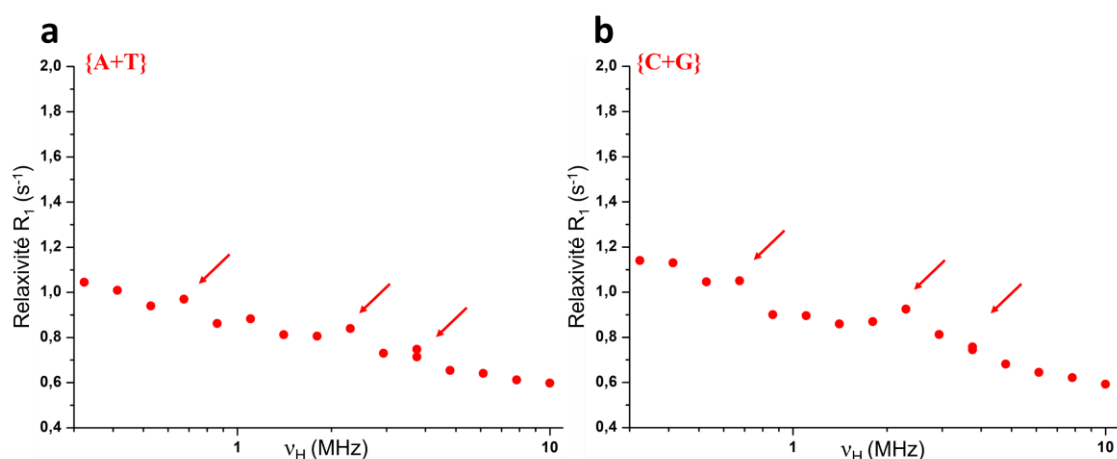
Pour vérifier cela, nous avons décidé dans un premier temps de réaliser des expériences de RMN (1D :  $^1\text{H}$ ) sur des échantillons de {A+T} et {C+G} avec pour objectif principal de mettre en évidence la présence de liaisons hydrogène faisant intervenir les bases nucléiques portées par les composés PNA(A)-pep, PNA(T)-pep, PNA(C)-pep et PNA(G)-pep. En particulier, les protons imino et imido des bases nucléiques guanine et thymine, respectivement, sont des protons caractéristiques déblindés ( $> 10$  ppm),<sup>325,551-554</sup> comme expliqué Partie II.11.a du Chapitre II, qui ne sont souvent observables que lorsqu'ils sont impliqués dans des liaisons hydrogène.<sup>552,555</sup> Par conséquent, dans le cas où ils seraient en interaction de liaisons hydrogène au sein des systèmes {A+T} et {C+G} étudiés, des signaux caractéristiques seraient donc apparents en RMN  $^1\text{H}$ . Or, nous n'avons pas observé de tels signaux sur les spectres pour le mélange {A+T}. Cela peut signifier l'absence d'interactions de liaisons hydrogène impliquant les bases nucléiques, mais aussi des conditions expérimentales non propices à l'observation : échantillons trop peu concentrés pour permettre l'interaction ; interactions immobilisées par l'assemblage supramoléculaire donc protons incapables de relaxer et d'être mesurés en RMN. Aussi, il n'a pas été trouvé pour {C+G} de conditions pour lesquelles la concentration en composés était suffisante pour permettre la mesure sans que le milieu ne gélifie et rende la mesure impossible.

Les spectres RMN réalisés pour des échantillons de mélanges équimolaires {A+T} et {C+G}, n'ont par conséquent pas pu révéler si les hydrogènes des bases nucléiques capables d'entreprendre des liaisons hydrogène étaient effectivement impliqués dans ce type d'interaction au sein des structures formées par PNA(A)-pep et PNA(T)-pep dans le premier cas et PNA(C)-pep et PNA(G)-pep dans le second. Sans confirmer l'existence de liaisons hydrogène, ces expériences n'infirmement néanmoins pas cette hypothèse.

### **III.14.b Identification de pics quadripolaires sur les spectres de relaxométrie RMN**

La relaxométrie RMN, méthode déjà proposée dans ce Chapitre en Partie III.8 pour l'étude du comportement des molécules d'eau au sein des hydrogels multi-composés, avait mis au jour, dans le cadre de l'étude des systèmes mono-composé (Partie II.7, Chapitre II) une résonance quadripolaire dans les cas des composés PNA(G)-pep et PNA(T)-pep. Celle-ci avait

alors lieu entre des protons et l'azote imido dans le cas de la guanine portée par ce premier, ou imino dans le cas de la thymine portée par ce second nucléopeptide (b, Figure II-11, Partie II.7, Chapitre II). Cette particularité se traduisait sur leurs spectres de relaxométrie respectifs par des pics dits « quadrupolaires » aux fréquences de Larmor 0.6, 2.0 et 2.7 MHz. La présence d'un tel phénomène avait permis de conclure que les bases nucléiques au sein des auto-assemblages constituant les hydrogels mono-composés étaient en conformation bloquée, et participaient donc à la structure. Or, puisque cette résonance quadrupolaire ne s'observe pas pour des couples azote/hydrogène où ce dernier est trop labile ou s'il est impliqué dans des liaisons hydrogène, la disparition des pics quadrupolaires peut être l'indice de l'existence de liaisons hydrogène.



**Figure III-23** Détail des profils relaxométriques soulignant la présence de pics quadrupolaires pour les gels multi-composés {A+T} (a), et {C+G} (b), mis en évidence par des flèches rouges. Ces données sont issues des mesures présentées Partie III.8 et Figure III-13, pour des gels étudiés à  $C_T = 15 \text{ mM}$  (1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4).

Les profils de relaxométrie des mélanges {A+T} (a, Figure III-23) et {C+G} (b, Figure III-23) montrent la présence de pics quadrupolaires aux fréquences caractéristiques 0.6, 2.0 et 2.7 MHz. Par conséquent, il existe dans ces hydrogels des bases nucléiques guanines ou thymines, respectivement, en conformations bloquées, et dont les hydrogènes ne sont pas impliqués dans des liaisons hydrogène. L'intensité des pics ne permet pas de réaliser une estimation quantitative sur la quantité d'hydrogène libre et n'écarte donc pas complètement l'existence d'interactions complémentaires entre les bases par le biais de liaisons hydrogène.

Pour conclure, bien que l'interaction entre les bases nucléiques par liaisons hydrogène spécifique soit thermodynamiquement favorable,<sup>601</sup> ni la spectroscopie RMN, ni la

relaxométrie RMN ne mettent clairement en évidence une telle interaction impliquant les bases nucléiques portées par les nucléopeptides. La partie PNA des composés semble plutôt participer à la structure par des interactions de  $\pi$ -stacking entre les bases nucléiques comme montré précédemment (Partie III.13).

### III.15 Conclusion

Pour conclure, nous avons étudié dans cette partie l'effet du mélange de composés complémentaires sur la formation d'hydrogels peptidiques. Les composés choisis sont des nucléopeptides PNA(X)-pep dont la synthèse et la caractérisation ont été développées au Chapitre II, capables de gélifier seuls un tampon aqueux à pH physiologique (gels mono-composés). Aussi, ils forment des couples complémentaires adénine + thymine et cytosine + guanine, dans le cas de PNA(A)-pep avec PNA(T)-pep et de PNA(C)-pep avec PNA(G)-pep, respectivement. Des hydrogels multi-composés ont ainsi été formulés à composition équimolaire et à concentration totale  $C_T = 15$  mM afin de comparer leurs propriétés mécaniques à celles des gels de mono-composés.

La caractérisation par rhéométrie a montré la conservation de certaines caractéristiques des hydrogels « parents », dont la thermoréversibilité ou les températures de transition gel-sol ( $T_m$ ), mais également l'amélioration de la résistance à la contrainte dans le cas du mélange {A+T} et la modulation par le mélange de certaines propriétés : vitesse de formation  $V_0$  et modules viscoélastiques aux valeurs intermédiaires à celles des hydrogels « parents ». Si les gels multi-composés montrent quelques indices d'un effet synergique entre les nucléopeptides mis en présence, il n'est pas observé une augmentation drastique de la force des gels, de leur résistance à la contrainte ou à la température par exemple.

Pour chacun des mélanges étudiés {A+T} et {C+G}, la variation des ratios de chaque composé a mis en évidence une modulation non linéaire des propriétés macroscopiques. Ces expériences de rhéométrie supplémentaires ont montré l'existence d'une interaction, d'une coopération indéniable entre les composés lors de la formation des hydrogels multi-composés. En revanche, la comparaison des systèmes équimolaires {A+T} et {C+G} avec les systèmes {A+T}<sub>1:3</sub>, {A+T}<sub>3:1</sub> et {C+G}<sub>1:3</sub>, {C+G}<sub>3:1</sub> (ratios 1 :3 ou 3 :1), ou même encore avec les systèmes mono-composés (représentant les cas limites de la variation de ratio, 1 :0 et 0 :1), n'a pas permis de conclure sur l'apport de la mise en présence des composés complémentaires, et le rôle des parties acides nucléiques complémentaires dans l'assemblage



supramoléculaire. C'est pourquoi nous avons introduit ensuite des mélanges équimolaires avec le composé de référence Aeg-pep. Ce dernier a permis de formuler des gels témoins {A+Aeg}, {Aeg+T}, {C+Aeg} et {Aeg+G} où une concentration totale en composés  $C_T = 15 \text{ mM}$  est assurée mais pour lesquels la quantité relative de nucléopeptide est la même que dans les mélanges {A+T} et {C+G}.

Ainsi, l'étude rhéométrique comparée de ces quatre mélanges témoins avec {A+T} et {C+G} a démontré l'amélioration des propriétés mécaniques en présence des deux composés complémentaires dans chaque cas. Les modules viscoélastiques des gels de {A+T} et {C+G} ainsi que leurs résistances à la contrainte se sont révélés supérieurs à ceux des gels de {A+Aeg} et {Aeg+T} pour le premier, {C+Aeg} et {Aeg+G} pour le second. Comme dans le cas des hydrogels mono-composés (Chapitre II), ces meilleures propriétés mécaniques sont liées à un réseau fibrillaire plus dense (comme observé en TEM Partie III.10), plus compact (comme observé en SAXS, Partie III.9), capable de retenir de plus grandes quantités de solvant (comme observé en relaxométrie RMN, Partie III.8). Aussi, la microscopie TEM a montré que les mélanges équimolaires complémentaires sont riches en « bundles », associations latérales de fibres, et sont plus homogènes, contrairement aux autres mélanges, dont {Aeg+T} ou {C+Aeg}, qui présentent de nombreux objets peu définis (Partie III.10).

D'après les données de spectroscopie infra-rouge IRFT et de dichroïsme circulaire (Partie III.11), les structures formées dans les gels de mélanges {A+T} et {C+G} sont principalement de type feuillet  $\beta$  antiparallèles, quoique selon un assemblage déformé (« *twisted* ») comme cela avait déjà pu être observé pour les systèmes mono-composés. De plus, ces assemblages sont mixtes, comportant à la fois l'un et l'autre des composés, les deux méthodes spectroscopiques écartant l'hypothèse de structures narcissiques (« *self-sorted* »). La cinétique de formation des fibrilles, suivie par fluorescence en présence de ThT, montre que la présence des composés complémentaires modifie la vitesse d'assemblage supramoléculaire. L'assemblage dans les systèmes {A+T} et {C+G} se fait par coopération des nucléopeptides complémentaires pour former des nanostructures mixtes.

Si l'interaction entre les bases nucléiques complémentaires par liaisons hydrogène n'a pas pu être démontrée malgré différentes études RMN (dont la relaxométrie du proton), l'existence d'interactions de  $\pi$ -stacking entre nucléobases a été déduite des expériences de spectrofluorimétrie.

Lors du mélange des nucléopeptides aux bases nucléiques complémentaires PNA(A)-pep et PNA(T)-pep d'une part et PNA(C)-pep et PNA(G)-pep d'autre part, ceux-ci se co-assemblent en structures supramoléculaires de types feuillets  $\beta$  antiparallèles avec parfois des interactions de  $\pi$ -stacking entre bases identiques (comme pour les systèmes mono-composés, Partie II.12, Chapitre II), mais aussi possiblement mixtes, entre bases complémentaires. Ces interactions, au cœur des modifications induites par la présence de la base nucléique sur la capacité d'assemblage comme conclu en fin du Chapitre II, induisent une modification des propriétés, que cela soit à l'échelle (supra)-moléculaire, à l'échelle microscopique ou à l'échelle de l'hydrogel. Sans elles, les propriétés, notamment physiques, des hydrogels restent médiocres comme l'en témoignent les mesures effectuées sur les systèmes témoins, où la complémentarité est absente.

Les mélanges de composé PNA(A)-pep et PNA(T)-pep d'une part et PNA(C)-pep et PNA(G)-pep d'autre part permettent par conséquent une modulation des propriétés observés pour les hydrogels mono-composés « parents », avec la possibilité de modifier le ratio de chaque composé afin d'augmenter la gamme de propriétés atteinte et de viser des caractéristiques particulières. Notre démarche multi-échelle a permis d'établir un lien entre le mode d'assemblage coopératif des composés, les structures microscopiques observées et les propriétés finales des matériaux multi-composés. Aussi, il est clair que cette manière d'interagir pour former les assemblages supramoléculaires est inhérente à la nature des composés choisis : les composés PNA(X)-pep présentent une structure quasi-identique, ce qui induit une propension au co-assemblage plutôt qu'au *self-sorting*.<sup>105</sup> Ils possèdent strictement la même partie peptidique, capable d'assemblage de type feuillets  $\beta$  en combinant liaisons hydrogène impliquant le squelette peptidique, interactions hydrophobes des phénylalanines latérales et interactions électrostatiques entre les résidus lysines et glutamates. Ces interactions sont donc non-spécifiques et ne favorisent aucun des deux modes d'association (narcissique ou co-assemblage). Les parties (PNA) qui diffèrent d'un composé à l'autre sont capables d'interactions par stacking hydrophobes, non spécifiques, et de liaisons hydrogène complémentaires spécifiques qui induisent habituellement la formation d'interactions latérales (et la création de « bundles » entre les fibres du réseau microscopique).<sup>322</sup> Dans le cas des mélanges effectués {A+T} et {C+G}, les interactions non spécifiques semblent prédominantes. La propension de chaque composé à s'assembler avec son complémentaire

(notamment par leur partie PNA) n'est pas assez favorisée par rapport à l'auto-assemblage ce qui permet, certes, de bénéficier des interactions stochastiques – d'où des hydrogels multi-composés aux propriétés intéressantes – mais de manière moins dirigée que ce qui pourrait être espéré.

C'est la raison pour laquelle, dans le Chapitre IV de ce manuscrit, nous nous sommes intéressés à la création de nouveaux composés nucléopeptidiques, conçus spécifiquement dans le but d'exacerber leurs caractères complémentaires, en proposant à la fois une complémentarité de la partie acide nucléique et de la partie peptidique, capables de former des hydrogels aux propriétés nouvelles et intéressantes.





# Chapitre IV : Vers de nouveaux systèmes multi-composés : Synthèse et formulation de composés nucléopeptidiques complémentaires

## IV.1 Introduction

La recherche de nouveaux composés bio-inspirés capables de gélifier les milieux aqueux a bénéficié ces dernières années de réelles avancées concernant notamment les liens entre structures moléculaires, capacités d'assemblage et propriétés des hydrogels supramoléculaires résultants. Bien qu'imparfaite, la compréhension de cette relation structure/propriétés a permis de mieux rationaliser la conception de nouvelles molécules gélifiantes aux propriétés optimisées et contrôlées.<sup>75,81-83,130,181</sup> Dans le cadre des hydrogels à base de dérivés de peptides (peptides aromatiques, amphiphiles, amphipathiques, hybrides peptides/sucres, nucléopeptides), la facilité de variation du design a donné lieu à de nombreuses séquences prometteuses dans le cadre des biomatériaux par exemple, et pour lesquelles chaque acide aminé, chaque substituant ou modification est choisi avec soin (Partie I.1, Chapitre I)

Comme présenté en Partie I.3 du Chapitre I, l'approche multi-composé appliquée au hydrogels supramoléculaires offre une ajustabilité fine de leurs propriétés, difficilement accessibles avec un composé gélifiant unique. Néanmoins, la rationalisation de tels systèmes est un réel défi pour les scientifiques à cause de leur complexité, induite par la présence de plusieurs équilibres dynamiques régissant les assemblages.<sup>105,121</sup> En effet, les modes d'assemblage (co-assemblage ou *self-sorting* notamment, voir Partie I.3, Chapitre I) diffèrent en fonction des méthodes de préparation des gels, mais également de l'affinité des molécules entre elles. En particulier, le co-assemblage, mécanisme d'assemblage qui entraîne la formation de structure mixtes (Partie I.3.b.iii, Chapitre I) est favorisé par la complémentarité des composés mis en présence, pour lesquels les interactions entre composés de même nature sont privilégiées sur les interactions homo-composées.<sup>105,176</sup>

Ainsi, nous avons proposé dans le Chapitre III de ce manuscrit, des couples de nucléopeptides capables de co-assemblage pour former des hydrogels supramoléculaires originaux (PNA(A)-pep + PNA(T)-pep et PNA(C)-pep + PNA(G)-pep) aux propriétés nouvelles, intéressantes et finement modulables.

Pourtant si la caractérisation de ces gels multi-composés formés a montré un effet synergique indéniable entre les nucléopeptides mis en présence, l'association des bases nucléiques complémentaires espérée par appariement de Watson-Crick s'est avérée ne pas être au cœur des mécanismes d'assemblages mis en jeu. En effet, nous avons démontré que le co-assemblage était principalement dirigé par la partie peptidique amphipathique -EFEFKFK et que la présence des bases nucléiques module les structures supramoléculaires formées en interagissant notamment par  $\pi$ -stacking. La partie peptidique semble donc prédominante sur la partie acide nucléique, ce qui n'est pas étonnant étant donné le ratio de 1 :7 existant entre elles. L'équilibre entre les deux parties constituant les nucléopeptides est difficile à atteindre mais permettrait une meilleure mise à profit des propriétés à la fois des peptides et des acides nucléiques.<sup>318</sup> En effet, le ratio acide nucléique/peptide que nous avons proposé s'avère plus faible que ce qui est reporté dans la littérature concernant les nucléopeptides formant des hydrogels : leurs designs moléculaires laissent parfois prédominer la partie acide nucléique,<sup>322</sup> et, lorsque la partie peptidique est mise en avant, cela se fait dans des proportions moins extrêmes que 1 :7 (les ratios 1 :2 et 1 :3 bases nucléiques/acides aminés étant les plus souvent reportés,<sup>140,316,318,346,347,350,352,602</sup> avec une seule occurrence d'un ratio 1 :7 pour former des hydrogels, à notre connaissance).<sup>319</sup>

L'objectif du travail de recherche reporté dans ce Chapitre IV a donc été de s'appuyer sur les observations faites sur les composés PNA(X)-pep afin de proposer de nouveaux designs moléculaires de nucléopeptides formant des couples complémentaires capables de gélifier les milieux aqueux. Nous avons exploré diverses stratégies, cherchant à accroître la capacité de co-assemblage des composés et permettre l'émergence de propriétés synergiques. Pour ce faire, nous avons décidé d'améliorer d'une part l'équilibre entre la partie acide nucléique et la partie peptidique au sein de la séquence et, d'autre part, d'accentuer la complémentarité des composés mis en présence. L'évaluation de la synergie et de la capacité de co-assemblage des composés proposés est établie dans un premier temps de manière plutôt qualitative (sorte de criblage ou « *screening* », en anglais) afin d'offrir des pistes futures pour la conception et la formulation de nouveaux hydrogels nucléopeptidiques multi-composés.

Nous présentons ainsi l'étude de plusieurs composés nucléopeptidiques complémentaires aux designs raisonnés, leurs synthèses, leurs purifications et l'évaluation de leurs capacités de

gélification en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4), conditions identiques à celles proposées pour les composés PNA(X)-pep, voir Partie II.5, Chapitre II.

## **IV.2 Composés aux parties peptidiques auto-complémentaires et aux parties PNA complémentaires**

### **IV.2.a Design moléculaire des nucléopeptides de l'étude**

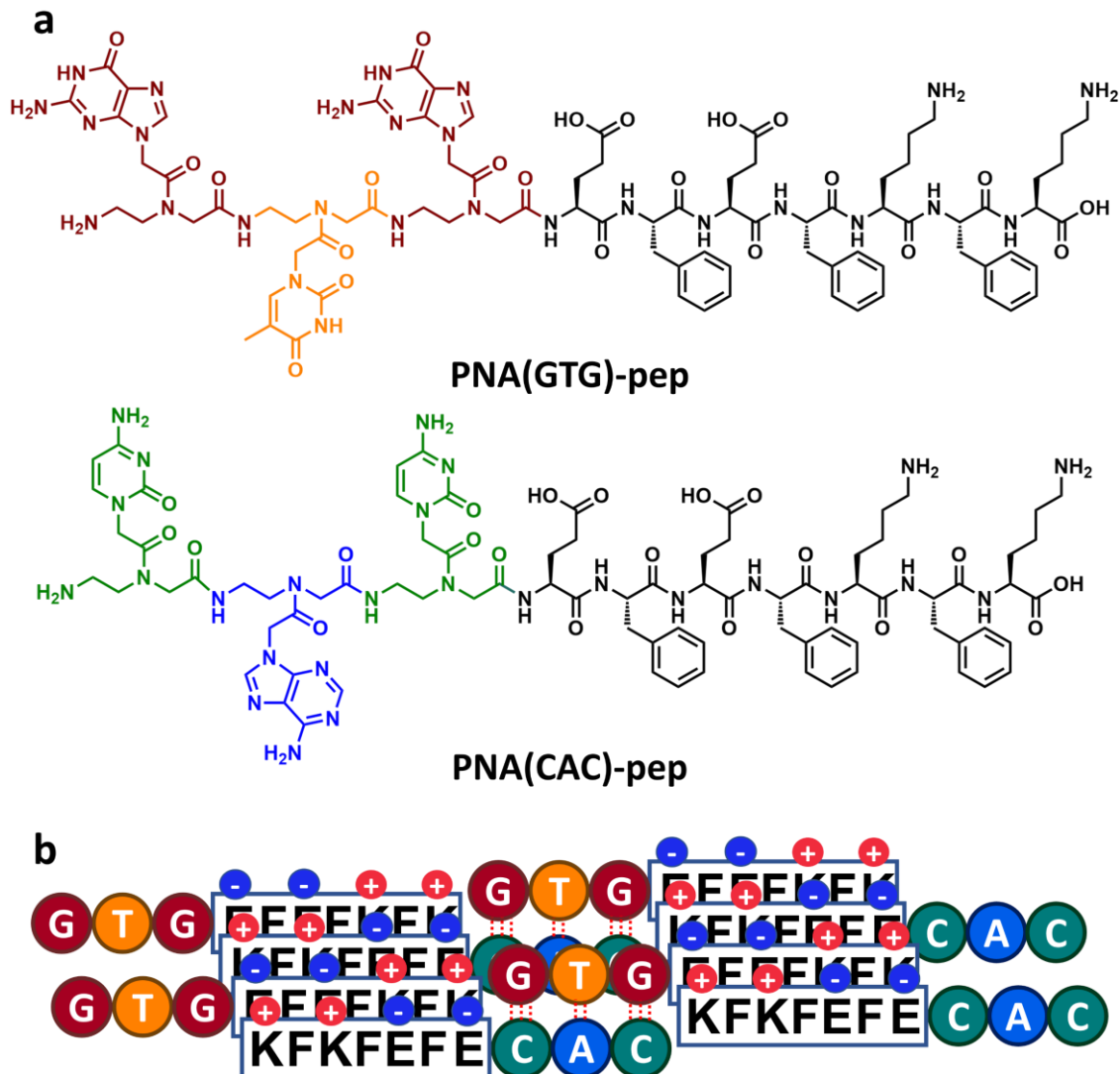
Les composés PNA(X)-pep sont constitués d'une partie acide nucléique comprenant un PNA, et d'une partie peptidique de sept acides aminés alternant phénylalanines hydrophobes et acides aminés chargés (lysines positivement et glutamates négativement). Cette partie peptidique amphipathique issue du peptide FEFKFK (voir Partie II.2.a, Chapitre II),<sup>229</sup> a été conçue de manière à favoriser l'auto-assemblage en feuillettes  $\beta$  antiparallèles (voir Figure I.4, Partie I.1.c, Chapitre I).

Afin de développer de nouveaux systèmes plus riches en acides nucléiques, notre première stratégie a été de conserver cette partie heptapeptidique (-EFKFK) mais en allongeant la chaîne de PNA N-terminale afin d'offrir de plus grandes possibilités d'interactions spécifiques entre composés et une meilleure complémentarité des nucléopeptides par liaisons hydrogène. En effet, afin notamment de favoriser ces dernières dont la spécificité favoriserait le co-assemblage, un nombre plus élevé de bases nucléiques dans la structure chimique des nucléopeptides semble judicieux. Assez peu de nucléopeptides comportant plus d'un seul PNA ont été reportés dans la littérature : par exemple, Guler *et al.* (2005)<sup>348</sup> introduisent sept PNA(T) pour permettre au nucléopeptide d'interagir spécifiquement avec un brin d'ADN polydésoxyadénine, Freeman *et al.* (2018)<sup>322</sup> et DiMaio *et al.* (2017),<sup>133</sup> dont les résultats respectifs sont exposés plus en détail Partie III.1 du Chapitre III, ont proposés des systèmes portant des chaînes de dix PNA pour interagir avec des brins d'ADN complémentaires. En revanche, les nucléopeptides plus petits reportés par Diaferia *et al.* (2021),<sup>340</sup> dont le composé PNA(GC)-FF déjà présenté Partie I.2.c et b, Figure I-8, sont certes capables de s'auto-assembler, mais ne forment pas de gels, et les interactions intermoléculaires au sein des assemblages supramoléculaires formés sont essentiellement de type  $\pi$ -stacking, et non des liaisons hydrogène entre bases complémentaires.

S'inspirant de ces exemples et cherchant un équilibre entre temps/coût de synthèse et promotion des interactions spécifiques, nous avons décidé d'étendre le nombre de bases nucléiques portées par les nouveaux nucléopeptides à trois bases (nombre que l'on retrouve



également dans la nature dans la reconnaissance des codons d'ARN lors de la traduction ribosomale).<sup>603</sup> Nous avons alors proposé les deux composés nucléopeptidiques PNA(GTG)-EFEFKFK et PNA(CAC)-EFEFKFK (a, Figure IV-1).



**Figure IV-1.** Structures moléculaires des nucléopeptides PNA(GTG)-pep et PNA(CAC)-pep étudiés(a) et représentation schématique du mode de co-assemblage hypothétique entre les deux composés (b). Sont mis en évidence un assemblage de type  $\beta$  antiparallèle entre les parties peptidiques (axe de la fibre colinéaire au point de vue présenté) et les interactions interfibrilles assurées par reconnaissance spécifique des séquences PNA.

Concernant la nature de la séquence de PNA nous avons fait le choix du couple GTG/CAC pour plusieurs raisons :

- Il s'agit d'un couple complémentaire palindromique qui permettrait des associations intermoléculaires par les parties PNA lorsque les nucléopeptides sont antiparallèles (b, Figure IV-1).
- L'association des deux séquences comporte une majorité de couples guanine-cytosine. Or, les duplexes d'acides nucléiques riches en couples G:C sont plus stables grâce au plus grand nombre de liaisons hydrogène qu'ils intègrent.<sup>144,266,603</sup> Le co-assemblage entre les deux nucléopeptides serait donc favorisé.
- Des purines et des pyrimidines sont réparties entre les deux séquences pour éviter une séquence ne comportant que des purines, qui risquerait d'être trop hydrophobe.

Dans la suite ce manuscrit, les nucléopeptides PNA(GTG)-EFEFKFK et PNA(CTC)-EFEFKFK seront simplement notés PNA(GTG)-pep et PNA(CTC)-pep.

#### **IV.2.b Synthèse et purification des composés PNA(GTG)-pep et PNA(CAC)-pep**

Les synthèses de ces deux nucléopeptides ont été menées en parallèle suivant des protocoles similaires. Dans un premier temps, la synthèse de la partie peptidique EFEFKFK a été réalisée par SPPS suivant la stratégie Fmoc/<sup>t</sup>Bu à l'instar de ce qui avait été fait pour les composés PNA(X)-pep (voir Figure II-3 et détails de la stratégie de synthèse, Partie II.3). Les conditions complètes de synthèse peptidique sont décrites Partie V.3.a du Chapitre V (« Partie expérimentale »). Brièvement, la synthèse a été effectuée sur des résines Wang greffées de Fmoc-Lys(Boc) afin de produire 100 µmol de chaque composé. Les acides aminés protégés utilisés sont les mêmes que pour les composés PNA(X)-pep, à savoir Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH et Fmoc-Glu(O<sup>t</sup>Bu)-OH. Pour chaque acide aminé ajouté, un double couplage utilisant 6 eq. d'acide aminé, 5 eq. d'activateur (HBTU) et 10 eq. de NMM dans la DMF est effectué (2 x 45 min) ; les déprotections des groupements Fmoc sont réalisées dans une solution de pipéridine 20 % en DMF (3 x 15 min).

L'ajout des PNA est réalisé de manière séquentielle à la suite de la synthèse purement peptidique, sur le fragment -EFEFKFK toujours lié à la phase solide. Le couplage des PNA sous forme Fmoc (Fmoc-PNA(A)(Bhoc)-OH, Fmoc-PNA(C)(Bhoc)-OH, Fmoc-PNA(G)(Bhoc)-OH ou Fmoc-PNA(T)-OH) se fait en utilisant 3.1 eq. de Fmoc-PNA, 3 eq. d'activateur, 3 eq. de DIPEA et 4.5 eq. de lutidine en DMF/NMP (double couplage). Cette étape est réalisée trois fois pour

chaque composé permettant d'ajouter les trois PNA de chaque séquence. Le clivage final des composés PNA(CAC)-pep, PNA(GTG)-pep ainsi synthétisés est ensuite réalisé en milieu acide (TFA/TIPS/eau, 92.5/5/2.5). Les conditions de couplage des PNA sont décrites plus en détail dans la Partie V.3.a du Chapitre V (« Partie expérimentale »).

Les composés sont ensuite purifiés par HPLC semi-préparative en phase inverse sur colonne C<sub>18</sub> grâce à des conditions de purification optimisées pour ces composés, de la solubilisation des échantillons bruts, aux gradients d'élution des solvants. Les composés subissent une double lyophilisation qui assure leur déshydratation complète. Les deux composés PNA(GTG)-pep et PNA(CAC)-pep sont alors obtenus avec des rendements de 66.2 et 63.0 %, respectivement (voir détails Section SI.IV.1 des annexes).

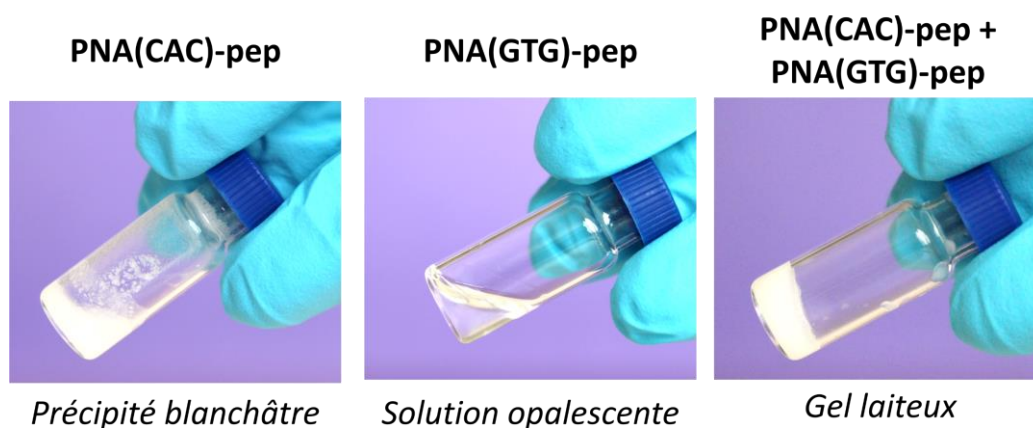
#### **IV.2.c Formulation des échantillons multi-composés et observations macroscopiques**

Les conditions de formulation de ces nouveaux systèmes multi-composés ont été choisies en accord avec le travail fait sur les composés PNA(X)-pep (tampon identique Tris.HCl (1 M, pH = 7.4), même protocole de formulation des échantillons, voir Partie II.5, Chapitre II), à fins de comparaison. Brièvement, pour les échantillons multi-composés, les lyophilisats de PNA(CAC)-pep et PNA(GTG)-pep sont pesés ensemble dans un flacon, mélangés et concassés mécaniquement à la spatule avant d'être solubilisés à chaud dans le tampon (70 °C). Les échantillons sont ensuite laissés reposer à température ambiante où s'observe la gélification, le cas échéant. Ainsi, des échantillons multi-composés en ratio 1:1 et à différentes concentrations totales (10, 15 et 30 mM) ont été préparés afin de déterminer la concentration critique de gélification CCG et les temps de gélification apparents le cas échéant (Tableau IV-1). La capacité de gélification de chaque système est évaluée par la méthode dite d'inversion de tube (« *tilted tube test* », en anglais)<sup>5</sup> déjà employée dans les Chapitres précédents (parties II.5, Chapitre II et III.2, Chapitre III).

Composition	Concentration totale $C_T$	Temps de gélification apparent $t_{s/g}$	Aspect de l'échantillon
PNA(CAC)-pep + PNA(GTG)-pep	10 mM	-	Solution translucide
	15 mM	-	Solution translucide
	30 mM	$\approx 2$ h	Gel laiteux

**Tableau IV-1.** Aspects et temps apparents de gélification le cas échéant, issus du test d'inversion de tube, d'échantillons multi-composés de PNA(CAC)-pep + PNA(GTG)-pep à un ratio de 1 :1, étudiés à différentes concentrations totales en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

Le mélange des nucléopeptides complémentaires PNA(CAC)-pep et PNA(GTG)-pep forme effectivement un gel d'aspect laiteux pour une concentration totale égale à 30 mM (Figure IV-2). En dessous de cette concentration, aucun hydrogel n'est obtenu. Les gels observés sont vraisemblablement issus d'un co-assemblage entre les deux composés PNA(CAC)-pep et PNA(GTG)-pep étant donné l'absence de gélification des composés seuls à la même concentration (PNA(CAC)-pep formant des précipités blanchâtres et PNA(GTG)-pep une solution opalescente, Figure IV-2). Les composés PNA(CAC)-pep et PNA(GTG)-pep pris seuls seraient donc incapables de former par auto-assemblages des nanostructures suffisamment stables pour former des gels à  $C = 30$  mM mais, en présence l'un de l'autre, des interactions supplémentaires probablement induites par leurs parties PNA permettrait la gélification.



**Figure IV-2.** Aspects des échantillons mono-composés (PNA(CAC)-pep et PNA(GTG)-pep) ainsi que multi-composés PNA(CAC)-pep + PNA(GTG)-pep à concentration totale de 30 mM en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

Concernant la cinétique de formation du gel multi-composé, le mélange à  $C_T = 30$  mM présente un temps de gélification apparent  $t_{s/g}$  (temps nécessaire pour que le gel supporte son propre poids à l'inversion) d'environ 2 h. Il est intéressant de remarquer que ce temps est très

supérieur à celui observé pour les mélanges PNA(A)-pep + PNA(T)-pep et PNA(C)-pep + PNA(G)-pep (5 min et 2 min, respectivement, Partie III.2, Chapitre III) l'auto-assemblage serait donc plus long à s'accomplir pour le couple de nucléopeptides arborant trois unités de PNA que pour ceux n'en portant qu'un seul. Cela peut s'expliquer par un mécanisme de co-assemblage présentant deux types d'évènements structurants : l'association par liaisons hydrogène spécifiques entre parties PNA des nucléopeptides complémentaires d'une part, et d'autre part, l'association des parties peptidiques (probablement par feuillet  $\beta$  antiparallèles à l'instar de ce qui est observé pour les peptides amphipathiques en général, et ce que nous avons relevé pour les composés PNA(X)-pep, Chapitre II et III). S'il est difficile de déconvoluer les deux effets sur l'assemblage des nucléopeptides,<sup>347</sup> il est possible que les interactions impliquant la partie PNA soient à l'origine de la vitesse de formation apparente plus lente des hydrogels multi-composés de PNA(CAC)-pep et PNA(GTG)-pep. L'association entre composés complémentaires est souvent présentée comme une étape cinétiquement déterminante du co-assemblage dans la littérature.<sup>32,162,578</sup> La CCG de 30 mM observée pour le système multi-composé PNA(CAC)-pep + PNA(GTG)-pep est également plus haute que pour les couples de PNA(X)-pep complémentaires qui étaient capable de gélifier à  $C_T = 15$  mM (Partie III.2, Chapitre III). A nouveau, la présence des chaînes de trois PNA modifient le comportement d'assemblage des composés, qui nécessitent une plus haute concentration pour sortir du tampon aqueux.

#### **IV.2.d Conclusions et discussion**

Nous avons synthétisé et purifié avec succès deux composés nucléopeptidiques comprenant des parties acides nucléiques (trois PNA) complémentaires l'une de l'autre, et des parties peptidiques amphipathiques identiques auto-complémentaires. Les essais de formulation ont montré que ces composés PNA(CAC)-pep et PNA(GTG)-pep étaient capable de former un gel multi-composé, probablement par co-assemblage, là où les systèmes mono-composés produisent un précipité et une solution translucide, respectivement. Ces résultats sont clairement l'indication d'une interaction des composés complémentaires conduisant à un effet synergique pour les propriétés mécaniques des gels résultants. Le nombre de trois PNA contre seulement un dans le cadre des nucléopeptides PNA(X)-pep étudiés précédemment (Chapitres II et III) paraît favoriser cette coopération, l'effet du mélange étant plus flagrant dans le cas de PNA(CAC)-pep et PNA(GTG)-pep que pour les composés PNA(X)-

pep. Ces résultats, encourageants, sont en cours d'étude et nous ont menés à envisager parallèlement d'autres designs moléculaires s'appuyant sur la complémentarité des composés.

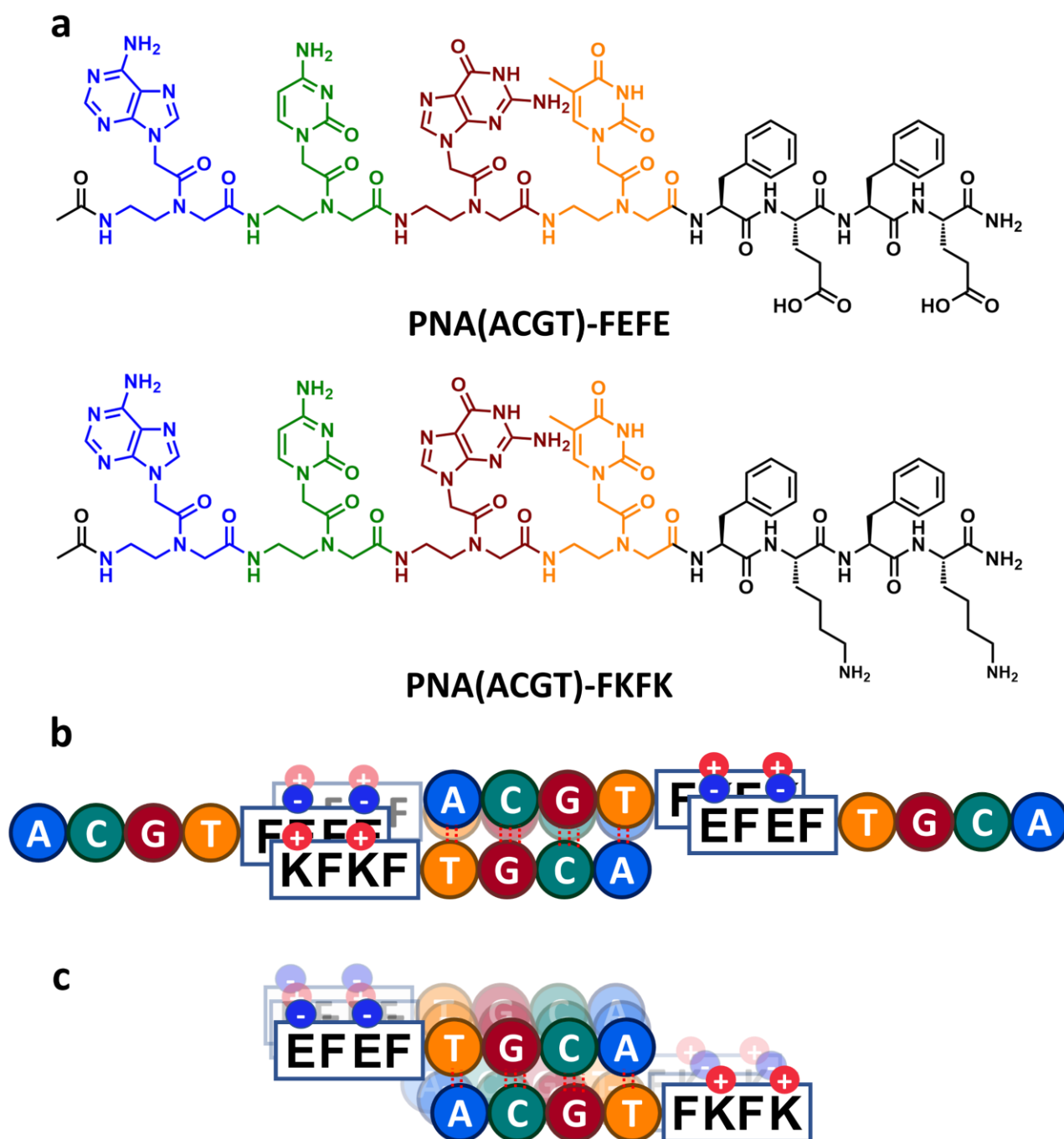
### **IV.3 Composés aux parties peptidiques auto-complémentaires et aux parties PNA complémentaires**

#### **IV.3.a Design moléculaire des nucléopeptides de l'étude**

Comme expliqué Partie I.3 du Chapitre I, les modalités d'assemblage supramoléculaire au sein des systèmes multi-composés sont régies par des équilibres entre différents états : non-assemblé, auto-assemblé (état qui, lorsqu'il prédomine, entraîne un mécanisme de *self-sorting*), co-assemblé, pour ne citer que les principaux (Figures I-12 et I-13, Chapitre I). La propension des systèmes à privilégier un état plutôt qu'un autre peut être contrôlée soit par des méthodes de formulation particulières, soit par un design moléculaire rationnel (voir Partie I.3.b.iv, Chapitre I). Suivant cette dernière approche, la conception de couples de composés complémentaires a été développée dans le cadre des hydrogels peptidiques, tout comme nucléopeptidiques (Partie I.3.c, Chapitre I). Cette stratégie a déjà montré son intérêt pour faire émerger une synergie entre les molécules, et de nouvelles propriétés (meilleures propriétés mécaniques,<sup>133,448</sup> propriétés optiques,<sup>356,394</sup> etc...). En particulier, la conception de dérivés peptidiques portant des charges opposées, présentée Partie I.3.c.v du Chapitre I a déjà montré son intérêt dans le cadre du développement d'hydrogels supramoléculaires.<sup>173,175,419,471,604,605</sup> Dans ce cas, la présence de charges opposées favorise le co-assemblage des peptides par association en paires d'ions tout en contrariant l'assemblage entre composés de même nature. En effet, ces derniers, étant de même charge, subissent la répulsion électrostatique ce qui rend l'auto-assemblage (et par conséquent le *self-sorting*) thermodynamiquement défavorable.<sup>468</sup> C'est la raison pour laquelle la majorité des systèmes de ce type proposés dans la littérature sont incapables de former des assemblages supramoléculaires seuls, ne formant des gels qu'en association avec leur complémentaire.<sup>162,168,419</sup>

Nous avons donc proposé deux nouveaux nucléopeptides, l'un au motif peptidique chargé positivement à pH neutre -FKFK (grâce aux lysines) et l'autre au motif peptidique chargé négativement -FEFE (grâce aux glutamates). Ces motifs peptidiques ne comportent cette fois que quatre acides aminés ce qui est plutôt court parmi les peptides amphipathiques ioniques<sup>81,218,221</sup> bien que des dérivés peptidiques courts (« *ultra-short peptides* », peptides de

moins de 7 acides aminés selon certains auteurs)<sup>130,214</sup> aient déjà montré leur intérêt pour former des gels supramoléculaires.<sup>89,130,169,214</sup>



**Figure IV-3.** Structures moléculaires des nucléopeptides PNA(ACGT)-FEFE et PNA(CAC)-FKFK étudiés (a) et représentations schématiques (b et c) de deux modes de co-assemblage hypothétiques entre les deux composés : (b) met en évidence un assemblage de type  $\beta$  antiparallèle tandis que (c) propose un assemblage de type  $\beta$  parallèle entre les parties peptidiques (l'axe de la fibre étant colinéaire au point de vue présenté). Dans les deux cas les interactions interfibrilles sont assurées par reconnaissance spécifique des séquences PNA.

Concernant la partie PNA, nous avons décidé d'allonger à nouveau la chaîne portant sa longueur à quatre PNA (ratio 1:1), avec une séquence auto-complémentaire afin de permettre des assemblages parallèles comme antiparallèles (b et c, Figure IV-3). Notre choix pour cette étude s'est donc porté sur les nucléopeptides Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub> dont les structures moléculaires sont décrites en (a), Figure IV-3. Afin de décorrélérer l'influence de la partie PNA sur le système multi-composé, nous avons synthétisé et purifié un couple de peptides témoins Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-FKFK-NH<sub>2</sub> en parallèle de la synthèse des nucléopeptides (voir structures moléculaires, Section SI.IV.1 des annexes).

#### **IV.3.b Synthèse et purification des composés PNA(ACGT)-FEFE et PNA(ACGT)-FKFK**

La synthèse de ces deux nucléopeptides a été réalisée de manière similaire à ce qui avait été fait précédemment (100 µmol, voir ci-avant Partie IV.2.b, et Partie II.3, Chapitre II) avec une synthèse SPPS en ligne de la partie peptidique puis de la partie PNA. Nous avons cependant travaillé cette fois avec une résine Rink en tant que phase solide (au lieu de Wang), qui permet après clivage d'obtenir une fonction amide en C-term. En effet, sans cette amidation du carboxyle C-terminal, le peptide porte une charge négative supplémentaire à pH neutre, influençant la charge globale. Nous avons également choisi d'acétyler les nucléopeptides en position N-terminale en fin de synthèse pour neutraliser la charge positive portée par l'amine libre à pH neutre. Ces deux modifications sont fréquemment reportées dans la littérature,<sup>86,503,507,508,510</sup> puisqu'elles permettent de séparer complètement les charges positives et négatives entre les peptides de charges opposées, ce qui peut favoriser l'assemblage.<sup>318</sup> Les peptides acétylés et amidés sont aussi plus résistants aux peptidases.<sup>606</sup> Après la synthèse des fragments FEFE et FKFK, le couplage des PNA est réalisé séquentiellement jusqu'à l'obtention des nucléopeptides PNA(ACGT)-FEFE et PNA(ACGT)-FKFK complets toujours greffés sur la résine. Les composés sont ensuite acétylés à l'aide d'une solution d'anhydride acétique (5 % dans la DMF) puis clivés de la phase solide en milieu acide, précipités dans l'éther glacé et séchés. Les conditions de ces étapes de synthèse sont détaillées dans la Partie V.3.b, Chapitre V (« Partie expérimentale »).

La purification des composés est effectuée par HPLC semi-préparative en phase inverse sur colonne C<sub>18</sub>. Après double lyophilisation, les deux nucléopeptides Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub> sont obtenus avec des puretés supérieures à 95 % (voir chromatogrammes, Section SI.IV.1 des annexes) et des rendements acceptables (27.1 et 19.7



%, respectivement). La faiblesse de ces rendements s'explique par les étapes de synthèse de PNA (quatre unités) et la difficulté à trouver des conditions de purification adéquates pour les deux nucléopeptides. Les étapes de synthèse et de purification de ces composés ont été optimisée durant cette étude et pourront donner lieu à de meilleurs rendements à l'avenir. La purification de ces composés est décrite plus en détails dans la Partie V.3.b, Chapitre V (« Partie expérimentale »).

La synthèse des peptides témoins Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-FKFK-NH<sub>2</sub> est réalisée dans les mêmes conditions. Ces composés sont obtenus après purification avec une pureté supérieure à 95 % et des rendements de 31.6 et 29.9 %, respectivement (voir détails Partie V.3.b, Chapitre V « Partie expérimentale », et chromatogrammes à la Section SI.IV.1 des annexes).

#### **IV.3.c Formulation des échantillons multi-composés et observations macroscopiques**

A nouveau, les conditions de formulation des échantillons ont été choisies identiques à celles proposées jusqu'alors : préparation en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4) suivant le même protocole que précédemment (Partie IV.2.c). Ainsi, un mélange Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub> + Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub>, à ratio 1 :1 a été réalisé à concentration totale C<sub>T</sub> = 30 mM. Cet échantillon ne produit pas de gel mais forme un précipité blanc insoluble (Figure IV-4). De la même manière, aucun des nucléopeptides formulés en échantillons mono-composés à la même concentration ne parvient à former un gel (Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub> donne lieu à une solution translucide tandis que Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub> précipite sous la forme d'agrégats blanc visibles à l'œil nu). L'association entre ces composés ne parvient pas dans nos conditions à faire naître un assemblage coopératif donnant lieu à une structure d'hydrogel. Concernant la raison de l'absence de gélification, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses. Soit les deux composés n'interagissent pas malgré leurs designs complémentaires. Dans ce cas, les nucléopeptides présentent le même comportement que lorsqu'ils sont en systèmes mono-composé : Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub> reste en solution tandis que Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub> est à l'origine des précipités observés. Soit, les deux nucléopeptides se co-assemblent mais ne forment pas de structures capables de donner lieu à des hydrogels, mais plutôt à des agrégats par exemple, comme ceux effectivement observés (il s'agirait d'un co-assemblage disruptif dans ce cas, voir Partie I.3.b.iii, Chapitre I).

**PNA(ACGT)-FEFE  
+ PNA(ACGT)-FKFK**



*Précipité blanc*

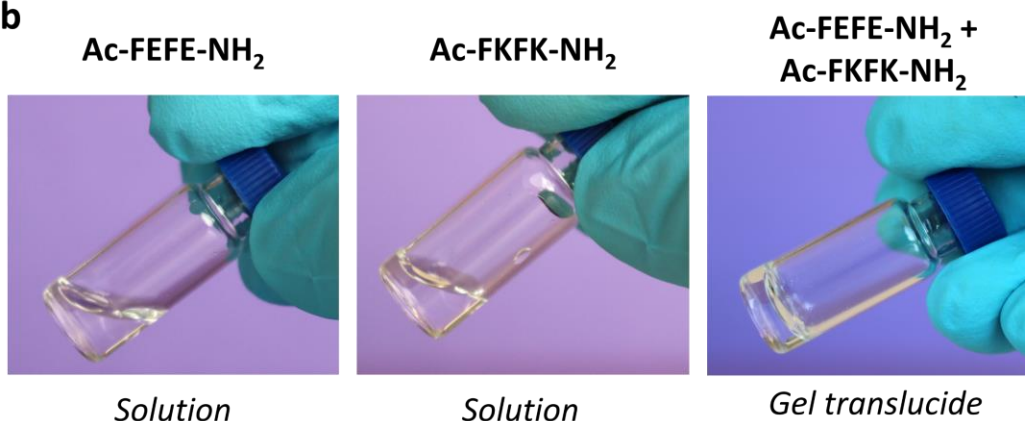
**Figure IV-4.** Aspect d'un échantillon multi-composé de Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub> + Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub>, préparé à un ratio de 1 :1 et une concentration totale de 30 mM en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

Avec pour objectif de comprendre l'influence de la partie PNA(ACGT) sur la capacité à former des hydrogels des nucléopeptides (et en particulier des hydrogels multi-composés), nous avons étudié le comportement de gélification des peptides témoins Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-FKFK-NH<sub>2</sub>. Seuls, ces composés sont incapables de former des gels mono-composés à 30 mM, ni même à 40 mM (b, Figure IV-5). En revanche, les systèmes multi-composés Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> + Ac-FKFK-NH<sub>2</sub> (1 :1) sont capables de gélifier le tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4) dans des temps raisonnables à plusieurs concentrations. En particulier, ils forment un gel translucide à concentration totale C<sub>T</sub> = 30 mM en un temps apparent de gélification d'environ 80 min, comme décrit dans le tableau a, Figure IV-5.

L'association des peptides aux charges complémentaires permet donc un comportement d'assemblage coopératif et une co-gélification. Pourtant, la synergie existant entre ces deux motifs peptidiques ne se transmet pas aux nucléopeptides Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub>. Il est alors possible que, dans le cas du mélange de ces deux nucléopeptides, la partie acide nucléique soit prédominante et s'avère délétère pour la structure du gel.

**a**

Composition	Concentration totale $C_T$	Temps de gélification apparent $t_{s/g}$	Aspect de l'échantillon
Ac-FEFE-NH <sub>2</sub> + Ac-FKFK-NH <sub>2</sub>	20 mM	≈ 4 j	Gel translucide
	30 mM	80 min	Gel translucide
	40 mM	17 min	Gel opalescent

**b**

**Figure IV-5.** Aspects des gels et temps apparents de gélification, issus du test d'inversion de tube, d'échantillons multi-composés de Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> + Ac-FKFK-NH<sub>2</sub>, préparés à un ratio de 1 :1 et étudiés à différentes concentrations totales (a). Aspects des échantillons mono-composés (Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-FKFK-NH<sub>2</sub>) ainsi que multi-composé Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> + Ac-FKFK-NH<sub>2</sub> à concentration totale de 20 mM (b). Tous les échantillons sont étudiés en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

#### IV.3.d Conclusions et discussion

Nous avons réussi à synthétiser et purifier deux composés nucléopeptidiques Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub>, comprenant chacun une chaîne identique de quatre PNA et une partie peptidique négative FEFE ou positive FKFK, respectivement. L'association de ces deux composés en proportions équimolaires au sein d'un échantillon multi-composé n'a pas donné lieu à un hydrogel. En revanche, en l'absence de la partie PNA, les peptides Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> + Ac-FKFK-NH<sub>2</sub> ont montré une capacité synergique de co-gélification. Ces observations semblent indiquer que la chaîne PNA auto-complémentaire PNA(ACGT) portée par les nucléopeptides est délétère pour la formation de gels. La partie PNA serait trop prédominante et perturberait l'assemblage normalement promu par la partie peptidique. Cet exemple montre bien la difficulté de trouver un équilibre entre les parties acides nucléiques et peptidiques au sein de la structure moléculaire des nucléopeptides.<sup>318</sup>

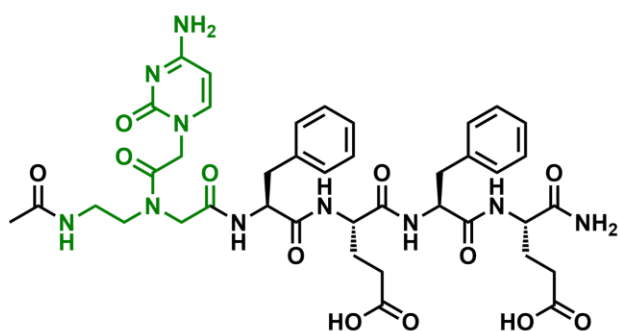
Cette étude a néanmoins prouvé l'intérêt de notre stratégie associant des composés de charges opposées pour former des hydrogels, bien qu'une nouvelle réflexion concernant la partie acide nucléique soit nécessaire.

#### **IV.4 Composés aux parties peptidiques complémentaires et aux parties PNA complémentaires**

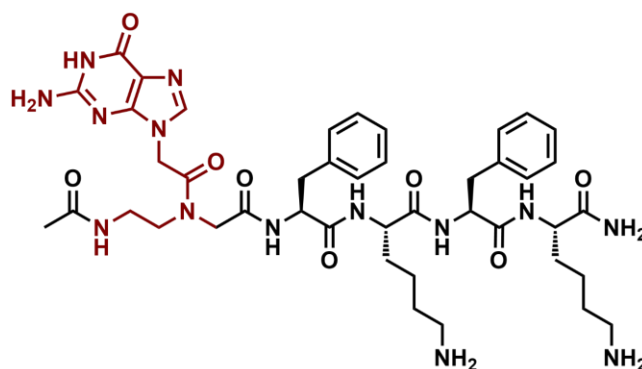
##### **IV.4.a Design moléculaire des nucléopeptides de l'étude**

Nous avons jusqu'à présent étudié des couples de composés constitués de parties peptidiques identiques auto-complémentaires et de parties PNA complémentaires d'une seule unité (PNA(A)-pep + PNA(T)-pep et PNA(C)-pep + PNA(G)-pep) ou de trois (PNA(CAC)-pep et PNA(GTG)-pep), ainsi que des composés aux parties peptidiques complémentaires mais aux parties PNA identiques auto-complémentaires (Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub>). Fort des observations réalisées pour ces différents systèmes, ainsi que des résultats encourageants obtenus pour les gels multi-composés témoins (Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> + Ac-FKFK-NH<sub>2</sub>), nous avons décidé de proposer de nouveaux nucléopeptides aux parties peptidiques complémentaires et aux parties acides nucléiques complémentaires également.

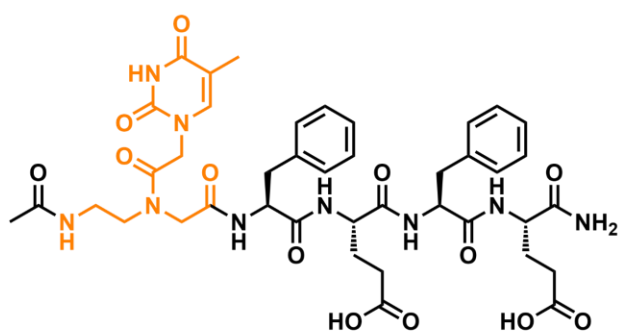
Ainsi, le composé Ac-PNA(A)-FKFK-NH<sub>2</sub> a été conçu pour interagir spécifiquement avec le composé portant la base complémentaire de l'adénine (c'est-à-dire la thymine) et une charge opposée, à savoir Ac-PNA(T)-FEFE-NH<sub>2</sub>. De la même manière, le couple Ac-PNA(C)-FEFE-NH<sub>2</sub>/Ac-PNA(G)-FKFK-NH<sub>2</sub> présente une double complémentarité, au niveau des bases nucléiques et de la partie peptidiques. Les structures moléculaires de ces quatre composés sont décrites Figure IV-6.



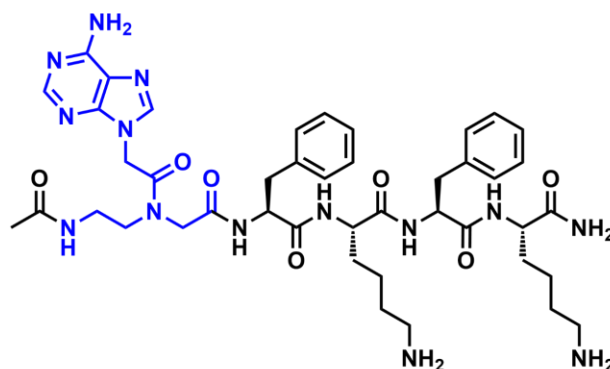
**Ac-PNA(C)-FEFE-NH<sub>2</sub>**



**Ac-PNA(G)-FKFK-NH<sub>2</sub>**



**Ac-PNA(T)-FEFE-NH<sub>2</sub>**

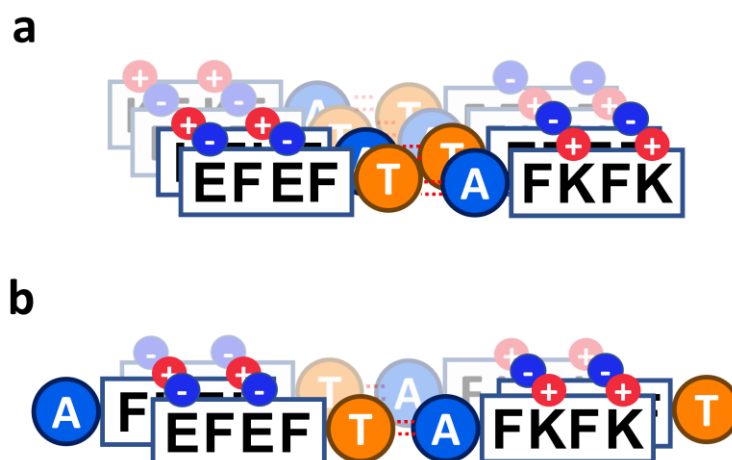


**Ac-PNA(A)-FKFK-NH<sub>2</sub>**

**Figure IV-6.** Structures moléculaires des nucléopeptides *Ac-PNA(C)-FEFE-NH<sub>2</sub>*, *Ac-PNA(G)-FKFK-NH<sub>2</sub>*, *Ac-PNA(T)-FEFE-NH<sub>2</sub>* et *Ac-PNA(A)-FKFK-NH<sub>2</sub>*.

Il est difficile de prédire le comportement d'assemblage de tels composés puisque des hydrogels multi-composés s'appuyant sur le couple de motifs FEFE/FKFK n'ont pas été reportés à notre connaissance. Des composés similaires ont néanmoins été proposés par Tena-Solsona *et al.* (2014), Cbz-FDFD-NH-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> (aux charges négatives) et Cbz-FKFK-NH-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> (aux charges positives), déjà discutés dans ce manuscrit Partie I.3.c.v du Chapitre I. Pour rappel, ces deux composés incapables de gélifier seuls, forment un hydrogel par co-assemblage à pH = 7. Les auteurs de cette étude proposent un assemblage de type feuillet  $\beta$  parallèle, qui peut nous inspirer pour les composés nucléopeptidiques que nous proposons (a, Figure IV-7). Il est également possible d'imaginer un assemblage antiparallèle qui pourrait favoriser les interaction interfibrilles et s'avérer intéressant pour les propriétés des systèmes supramoléculaires (b, Figure IV-7). Nous avons montré que les composés Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-FKFK-NH<sub>2</sub> étaient capables de co-gélifier (voir ci-dessus, Partie IV.3.c), donc l'objectif de l'étude des composés Ac-PNA(A)-FKFK-NH<sub>2</sub>, Ac-PNA(C)-FEFE-NH<sub>2</sub>, Ac-PNA(G)-FKFK-NH<sub>2</sub> et

Ac-PNA(T)-FEFE-NH<sub>2</sub> a été d'évaluer l'influence de la présence des bases complémentaires sur ce co-assemblage de peptides de charges opposées.



**Figure IV-7.** Représentations schématiques de deux modes de co-assemblage hypothétiques entre les deux composés Ac-PNA(A)-FKFK-NH<sub>2</sub> et Ac-PNA(T)-FEFE-NH<sub>2</sub> (les mêmes systèmes peuvent être imaginés pour le couple Ac-PNA(C)-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-PNA(G)-FKFK-NH<sub>2</sub>) : (a) met en évidence un assemblage de type  $\beta$  parallèle tandis que (b) propose un assemblage de type  $\beta$  antiparallèle entre les parties peptidiques (l'axe de la fibre étant colinéaire au point de vue présenté), dans les deux cas les interactions interfibrilles sont assurées par reconnaissance spécifique des bases nucléiques.

Par souci de clarté, les composés nucléopeptidiques Ac-PNA(A)-FKFK-NH<sub>2</sub>, Ac-PNA(C)-FEFE-NH<sub>2</sub>, Ac-PNA(G)-FKFK-NH<sub>2</sub> et Ac-PNA(T)-FEFE-NH<sub>2</sub> seront notés respectivement PNA(A)-pep<sub>(+)</sub>, PNA(C)-pep<sub>(-)</sub>, PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> et PNA(T)-pep<sub>(-)</sub> de façon à mettre en valeur la base nucléique portée et la nature de la charge de la partie peptidique des différents nucléopeptides.

#### IV.4.b Synthèse et purification des composés PNA(A)-pep<sub>(+)</sub>, PNA(C)-pep<sub>(-)</sub>, PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> et PNA(T)-pep<sub>(-)</sub>

La synthèse de ces quatre nucléopeptides a été effectuée à l'échelle de 600  $\mu$ mol, selon le même protocole que pour les composés précédents, par SPPS sur résine Rink, avec couplage séquentiel du fragment peptidique FEFE ou FKFK, puis couplage du PNA idoïne. Les conditions de couplage de ce dernier ont été légèrement optimisées, plusieurs essais ayant montré que la quantité de PNA pouvait être abaissée à 2.1 eq. sans perte de rendement. Brièvement, le couplage des PNA se fait en utilisant 2.1 eq. de Fmoc-PNA, 2 eq. d'activateur (PyBop), 3 eq. de DIPEA et 4.5 eq. de lutidine en DMF/NMP (double couplage). Les conditions complètes

concernant ces synthèses sont décrites Partie V.3.c, Chapitre V « Partie expérimentale ». Après acétylation, les nucléopeptides sont clivés en milieu acide, précipités dans l'éther et séchés.

Concernant la purification des composés, elle est effectuée par HPLC semi-préparative en phase inverse sur colonne C<sub>18</sub>. Le déroulement de ces purifications a été optimisé afin notamment d'identifier des conditions de solubilisation des échantillons bruts adaptées dans chaque cas, ainsi que les gradients d'élution optimaux. Les conditions de purification de ces composés sont détaillées Partie V.3.c, Chapitre V « Partie expérimentale ». Après double lyophilisation, les quatre nucléopeptides sont obtenus avec des puretés supérieures à 95 % (voir chromatogrammes, Section SI.IV.1 des annexes) et des rendements corrects voire bons (Tableau IV-2). La caractérisation par HRMS des composés PNA(A)-pep<sub>(+)</sub>, PNA(C)-pep<sub>(-)</sub>, PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> et PNA(T)-pep<sub>(-)</sub> confirme la structure chimique des composés avec une bonne corrélation des masses obtenues, résumées dans le Tableau IV-2.

Composé	Rendement (%)	Masse HRMS / (masse théorique) (m/z)
PNA(A)-pep <sub>(+)</sub>	47.5	[M+2H] <sup>2+</sup> 443.2499 (443.2457)
PNA(C)-pep <sub>(-)</sub>	66.4	[M+H] <sup>+</sup> 863.3494 (863.3691)
PNA(G)-pep <sub>(+)</sub>	43.1	[M+2H] <sup>2+</sup> 451.2520 (451.2440)
PNA(T)-pep <sub>(-)</sub>	66.8	[M+H] <sup>+</sup> 878.3563 (878.3688)

**Tableau IV-2.** Rendements de synthèses et analyse HRMS des quatre nucléopeptides discutés dans cette partie (informations détaillées en Section SI.IV.1 des annexes).

#### IV.4.c Formulation des échantillons multi-composés et observations macroscopiques

Dans un premier temps, nous avons étudié les systèmes multi-composés complémentaires équimolaires PNA(A)-pep<sub>(+)</sub> + PNA(T)-pep<sub>(-)</sub> (1 :1) et PNA(C)-pep<sub>(-)</sub> + PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> (1 :1). Ces mélanges de nucléopeptides sont réalisés en tampon Tris.HCl (1 M, pH =7.4), à l'instar des conditions choisies pour les autres systèmes étudiés. Le protocole de formulation des échantillons est le même que précédemment.

Ainsi, des essais à plusieurs concentrations totales (C<sub>T</sub>) sont menés, et les résultats des observations sont reportés dans le Tableau IV-3. Les mélanges sont capables, à concentration suffisante, de former des hydrogels opalescents et en un temps apparent court, inférieur à 12 min. Par exemple, à 20 mM, le mélange PNA(A)-pep<sub>(+)</sub> + PNA(T)-pep<sub>(-)</sub> gélifie en 5 min tandis que le mélange PNA(C)-pep<sub>(-)</sub> + PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> gélifie en 2 min. Ces temps de gélification sont

bien inférieurs à celui observé pour le mélange de peptides témoins Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> + Ac-FKFK-NH<sub>2</sub> à la même concentration totale (gel translucide pour  $t_{s/g} \approx 4$  j, voir Figure IV-5). La présence de bases nucléiques permettrait donc dans ce cas une accélération de la cinétique de formation des gels

Composition	Concentration totale $C_T$	Temps de gélification apparent $t_{s/g}$	Aspect de l'échantillon
PNA(A)-pep <sub>(+)</sub> + PNA(T)-pep <sub>(-)</sub>	15 mM	-	Liquide translucide
	20 mM	12 min	Gel opalescent
	30 mM	5 min	Gel opalescent
PNA(C)-pep <sub>(-)</sub> + PNA(G)-pep <sub>(+)</sub>	10 mM	-	Précipité hétérogène
	15 mM	2 min	Gel opalescent
	20 mM	2 min	Gel opalescent
	30 mM	1.25 min	Gel opalescent

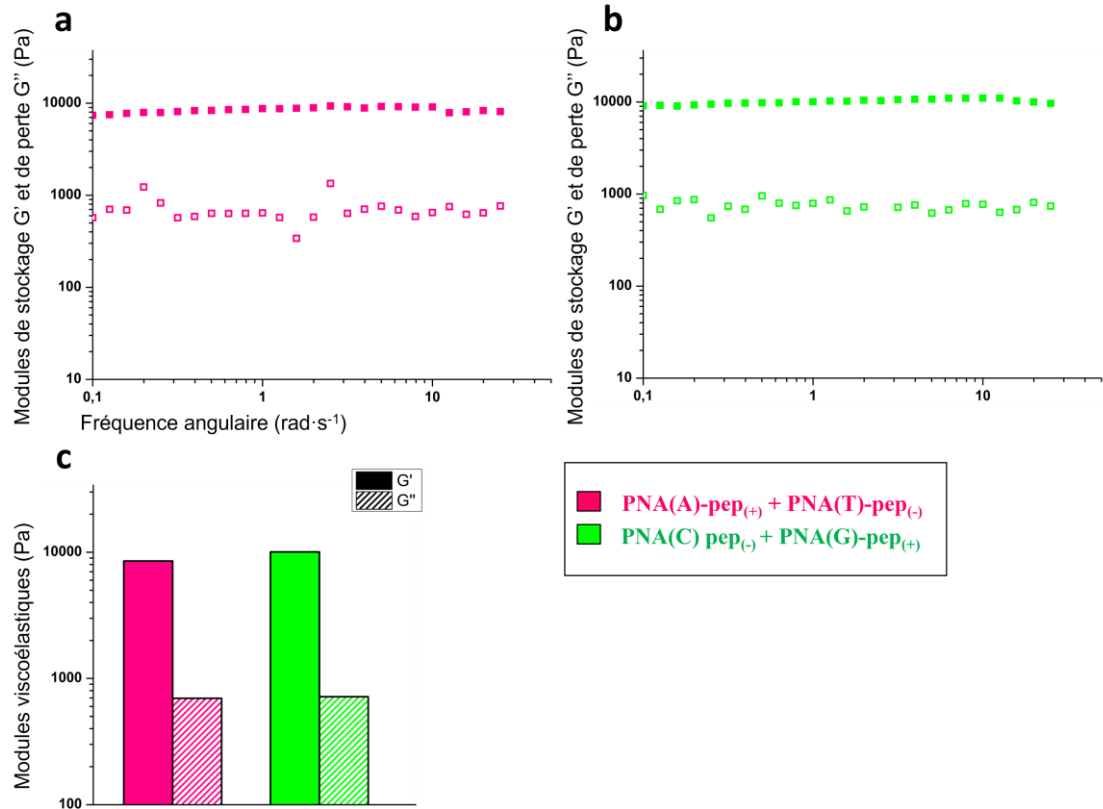
**Tableau IV-3.** Aspects des gels et temps apparents de gélification, issus du test d'inversion de tube, d'échantillons multi-composés de PNA(A)-pep<sub>(+)</sub> + PNA(T)-pep<sub>(-)</sub> et PNA(C)-pep<sub>(-)</sub> + PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> préparés à un ratio de 1:1, étudiés à différentes concentrations totales en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

En termes de force des gels, des essais préliminaires de rhéométrie ont permis d'évaluer les modules viscoélastiques des gels multi-composés à 20 mM. Des balayages en fréquences ont été effectués pour ces mélanges à  $t = 6$  h, dont les rhéogrammes sont tracés Figure IV-8.

Les gels de PNA(A)-pep<sub>(+)</sub> + PNA(T)-pep<sub>(-)</sub> et PNA(C)-pep<sub>(-)</sub> + PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> présentent des modules viscoélastiques relativement élevés, avec  $G' \approx 8500$  Pa ( $G'' \approx 700$  Pa) et  $G' \approx 10000$  Pa ( $G'' = 720$  Pa), respectivement. Le mélange témoin Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> + Ac-FKFK-NH<sub>2</sub>, qui se présente sous la forme d'un liquide à l'œil nu, est en réalité un solide viscoélastique selon la définition de rhéologie ( $G' > G''$ ), avec néanmoins de faibles modules  $G' = 20.9$  Pa et  $G'' = 10.6$  Pa (après 24 h, voir Figure SIV-1, en annexe). Le mélange des nucléopeptides PNA(A)-pep<sub>(+)</sub> et PNA(T)-pep<sub>(-)</sub> d'une part, et PNA(C)-pep<sub>(-)</sub> avec PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> d'autre part, permet de former des systèmes aux vitesses de gélification et aux propriétés mécaniques plus intéressantes que le mélange purement peptidique Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> + Ac-FKFK-NH<sub>2</sub>.

Dans un second temps, afin d'évaluer l'intérêt de l'approche multi-composés concernant les nucléopeptides PNA(A)-pep<sub>(+)</sub>, PNA(C)-pep<sub>(-)</sub>, PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> et PNA(T)-pep<sub>(-)</sub>, des échantillons mono-composés ont été formulés pour chacun d'eux en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).



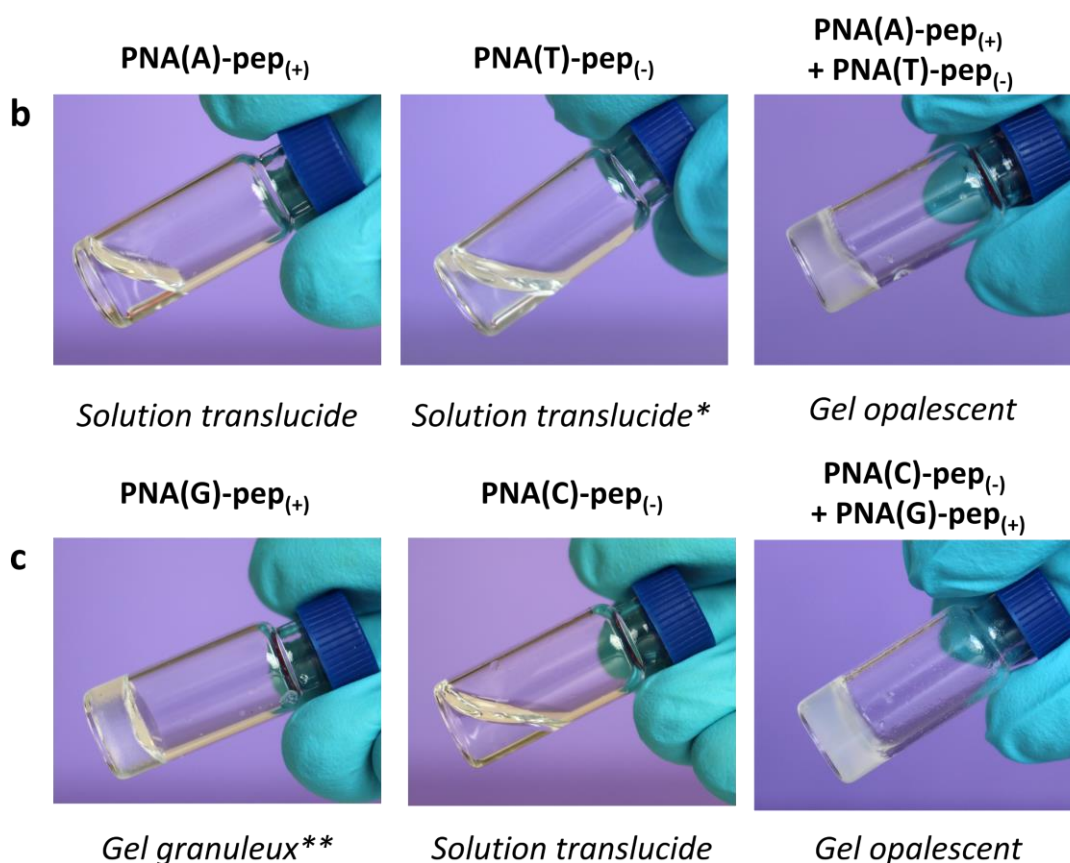


**Figure IV-8.** Rhéogrammes des balayages en fréquences pour PNA(A)-pep<sub>(+)</sub> + PNA(T)-pep<sub>(-)</sub> (a) et PNA(C)-pep<sub>(-)</sub> + PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> (b) ( $G'$ , symboles pleins et  $G''$ , symboles vides) et report des modules de stockage ( $G'$ ) et de perte ( $G''$ ) pour les hydrogels multi-composés (c), préparés à un ratio de 1 : 1 à concentration totale de 20 mM en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).

Seuls, ni PNA(A)-pep<sub>(+)</sub>, ni PNA(C)-pep<sub>(-)</sub>, ni PNA(T)-pep<sub>(-)</sub> ne parviennent à former des hydrogels dans les conditions d'étude, même à une concentration  $C = 20$  mM (Tableau a, Figure IV-9). En effet, à cette concentration à laquelle les gels multi-composés sont observés, PNA(A)-pep<sub>(+)</sub> et PNA(C)-pep<sub>(-)</sub> restent en solution, tout comme PNA(T)-pep<sub>(-)</sub>, qui, toutefois, précipite au bout de quelques jours sous forme d'agrégats blanchâtres (voir photographies b et c, Figure IV-9). En revanche, le composé PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> est capable de former des hydrogels opaques à 15 et 20 mM (Tableau a, Figure IV-9). Néanmoins, la cinétique de formation de ces gels mono-composés reste plus lente que celle du système multi-composé PNA(C)-pep<sub>(-)</sub> + PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> : à même concentration totale  $C_T = 20$  mM, le gel de PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> seul se forme en 17 min tandis que le système multi-composé met seulement 2 min à gélifier. Bien que le composé PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> soit capable d'auto-assemblage, le co-assemblage avec le composé de charge opposée et portant la base complémentaire cytosine, PNA(C)-pep<sub>(-)</sub>, apparaît indéniablement bénéfique pour le processus de gélification.

**a**

Composition	Concentration totale $C_T$	Temps de gélification apparent $t_{s/g}$	Aspect de l'échantillon
PNA(A)-pep <sub>(+)</sub>	20 mM	-	Liquide translucide
	30 mM	-	Liquide translucide
PNA(T)-pep <sub>(-)</sub>	20 mM	-	Précipités blancs
	30 mM	-	Précipités blancs
PNA(C)-pep <sub>(-)</sub>	15 mM	-	Liquide translucide
	20 mM	-	Liquide translucide
PNA(G)-pep <sub>(+)</sub>	15 mM	50 min	Gel opalescent
	20 mM	17 min	Gel opalescent



**Figure IV-9.** Aspects des échantillons et temps apparents de gélification le cas échéant, issus du test d'inversion de tube, d'échantillons mono-composés de PNA(A)-pep<sub>(+)</sub>, PNA(C)-pep<sub>(-)</sub>, PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> et PNA(T)-pep<sub>(-)</sub>, étudiés à différentes concentrations totales (a). Aspects des échantillons mono-composés (de PNA(A)-pep<sub>(+)</sub>, PNA(C)-pep<sub>(-)</sub>, PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> et PNA(T)-pep<sub>(-)</sub>) ainsi que multi-composés (PNA(A)-pep<sub>(+)</sub> + PNA(T)-pep<sub>(-)</sub> et PNA(C)-pep<sub>(-)</sub> + PNA(G)-pep<sub>(+)</sub>) à concentration totale de 20 mM (b et c). Tous les échantillons sont étudiés en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4). \*l'échantillon de PNA(T)-pep<sub>(-)</sub> forme des précipités blancs après quelques jours. \*\* voir photographie supplémentaire en Figure SIV-2, en annexe.

Concernant le couple PNA(A)-pep<sub>(+)</sub> + PNA(T)-pep<sub>(-)</sub>, la gélification du système multi-composé est indubitablement le résultat d'un co-assemblage entre les deux nucléopeptides complémentaires puisque sous forme mono-composée aucun des deux ne parvient à former de structures propices à la formation d'hydrogels.

#### **IV.4.d Conclusions et discussion**

La synthèse et la purification de quatre nouveaux nucléopeptides complémentaires deux à deux par leur PNA et leurs parties peptidiques de charges opposées (PNA(A)-pep<sub>(+)</sub> et PNA(T)-pep<sub>(-)</sub>, et PNA(C)-pep<sub>(-)</sub> et PNA(G)-pep<sub>(+)</sub>) a été réalisée avec succès. Des gels multi-composés ont été obtenus en tampon Tris.HCl à pH physiologique, en un temps court et à 20 mM, notamment. La comparaison des systèmes PNA(A)-pep<sub>(+)</sub> + PNA(T)-pep<sub>(-)</sub> et PNA(C)-pep<sub>(-)</sub> + PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> avec le couple Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> + Ac-FKFK-NH<sub>2</sub> nous a conduit à la conclusion que la présence des PNA complémentaires dans les structures moléculaires des nucléopeptides de chaque couple était clairement bénéfique à la formation d'hydrogels supramoléculaire. La comparaison de ces hydrogels multi-composés avec des échantillons mono-composés, préparés dans les mêmes conditions, a également permis d'affirmer la présence d'une interaction entre les composés mis en présence, voire d'une synergie de co-assemblage (co-gélification dans le cas de PNA(A)-pep<sub>(+)</sub> + PNA(T)-pep<sub>(-)</sub>, amélioration de la cinétique de formation dans le cas de PNA(C)-pep<sub>(-)</sub> + PNA(G)-pep<sub>(+)</sub>). Ces résultats préliminaires de formulation sont encourageants concernant le développement d'hydrogels supramoléculaires nucléopeptidiques multi-composés et nécessitent d'autres séries d'expériences actuellement en cours afin de comprendre, notamment, l'origine des propriétés synergiques observées, par une approche multi-échelle.

## IV.5 Conclusion

Pour conclure, nous avons dans cette partie exploré différents designs moléculaires afin de proposer des couples nucléopeptidiques capables de former des hydrogels par co-assemblage. Ainsi, nous avons synthétisé (et purifié) avec succès cinq couples de composés dont huit nucléopeptides et deux peptides, proposant des approches différentes en termes de complémentarité des parties acides nucléiques ou des parties peptidiques :

- PNA(CAC)-EFEFKFK et PNA(GTG)-EFEFKFK présentent des chaînes de trois PNA, complémentaires et palindromiques, et une chaîne heptapeptidique amphipathique ionique auto-complémentaire. La présence d'une chaîne PNA plus longue comparée aux composés PNA(X)-pep étudiés auparavant modifie le comportement d'auto-assemblage et de co-assemblage des composés. Ces derniers ont néanmoins montré une capacité synergique de co-gélification à concentration suffisamment élevée.
- Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub> comportent une chaîne auto-complémentaire de quatre PNA, et des chaîne tetrapeptidique amphipathique de charges opposées. Ces nucléopeptides ont été acétylés et amidés en N-terminal et C-terminal, respectivement, afin de limiter le nombre de charges portées par les composés. Lors de l'association de ces composés, la présence de la chaîne acide nucléique s'est trouvée délétère pour la formation d'hydrogels supramoléculaires.
- Ac-PNA(A)-FKFK-NH<sub>2</sub>, Ac-PNA(C)-FEFE-NH<sub>2</sub>, Ac-PNA(G)-FKFK-NH<sub>2</sub> et Ac-PNA(T)-FEFE-NH<sub>2</sub> se composent d'un unique PNA et d'une chaîne tétrapeptidique amphipathique portant des charges positives pour les composés purines et une charge négative pour les composés pyrimidines. Les systèmes multi-composés PNA(A)-pep<sub>(+)</sub> + PNA(T)-pep<sub>(-)</sub> et PNA(C)-pep<sub>(-)</sub> + PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> ont montré de meilleures capacités de gélification que le système associant les peptides complémentaires témoins Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-FKFK-NH<sub>2</sub>. Ces designs présentent un potentiel certain et des études plus approfondies sont en cours.

Les principaux résultats concernant les essais de formulation pour chacun des systèmes peptidiques et nucléopeptidiques proposés sont résumés dans le Tableau IV-4.

Composés	Comportement mono-composé	Comportement multi-composé	CCG (mM)	$t_{s/g}^*$
<b>PNA(CAC)-EFEFKFK</b>	Solution	Gel laiteux	30	≈ 2h
<b>PNA(GTG)-EFEFKFK</b>	Solution			
<b>Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub></b>	Solution	Précipité	-	-
<b>Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub></b>	Précipité			
<b>Ac-FEFE-NH<sub>2</sub></b>	Précipité	Gel translucide	20	≈ 4 jours
<b>Ac-FKFK-NH<sub>2</sub></b>	Solution			
<b>PNA(A)-pep<sub>(+)</sub></b>	Solution	Gel opalescent	20	5 min
<b>PNA(T)-pep<sub>(-)</sub></b>	Précipité			
<b>PNA(C)-pep<sub>(-)</sub></b>	Solution	Gel opalescent	15	2 min
<b>PNA(G)-pep<sub>(+)</sub></b>	Gel CCG = 15 mM $t_{s/g}^*$ = 17 min			

**Tableau IV-4.** Récapitulatif des couples de composés complémentaires proposés dans ce chapitre mettant en évidence leur comportement en formulations mono-composés ou multi-composés (ratio 1 :1). PNA(CAC)-pep, PNA(GTG)-pep, Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub> sont considérés à 30 mM tandis que Ac-FEFE-NH<sub>2</sub>, Ac-FKFK-NH<sub>2</sub>, PNA(A)-pep<sub>(+)</sub>, PNA(T)-pep<sub>(-)</sub>, PNA(C)-pep<sub>(-)</sub> et PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> sont considérés à 20 mM. Tous les échantillons sont étudiés en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4). \*temps apparents de gélification à  $C_T = 20$  mM sauf pour PNA(CAC)-pep + PNA(GTG)-pep où  $t_{s/g}$  est donné à  $C_T = 30$  mM.

Comme présenté précédemment, les systèmes multi-composés ont montré un grand potentiel dans le cadre du développement d'hydrogels supramoléculaires aux propriétés synergiques, nouvelles et finement modulables. Par la recherche de nouveaux designs de dérivés nucléopeptidiques complémentaires, nous avons interrogé les leviers du co-assemblage supramoléculaire de tels composés, montrant la difficulté d'établir un équilibre entre les différentes interactions possibles et d'atteindre l'état métastable qui caractérise les gels. Nous pensons que la conception raisonnée de tels systèmes, mettant en jeu des composés hybrides peptides/acides nucléiques, est une voie des plus intéressantes pour développer de nouveaux matériaux biocompatibles, stimulables et ajustables, répondant aux enjeux de demain dans le domaine des biomatériaux, des nanotechnologies ou des matériaux fonctionnels.



## Conclusion générale

Les hydrogels peptidiques supramoléculaires ont démontré un intérêt certain pour de nombreuses applications essentiellement dans le domaine du vivant, de l'encapsulation d'agents thérapeutiques à la culture cellulaire tridimensionnelle en passant par l'ingénierie tissulaire et la lutte contre les agents pathogènes. Cette grande sollicitation s'explique par les nombreux avantages des peptides (facilité de synthèse, grande modularité, biocompatibilité, faible immunogénicité) et les caractéristiques intéressantes des hydrogels qu'ils forment pour développer des biomatériaux : stabilité physique, ajustabilité de leurs propriétés par rationalisation du design moléculaire et caractéristiques physico-chimiques et mécaniques proches de celles des milieux biologiques (matériau viscoélastique, forte teneur en eau, nanostructure fibrillaire).<sup>57,82,87</sup> Pourtant, si les séquences peptidiques à partir des vingt acides aminés protéinogènes sont virtuellement en nombre infini, leur optimisation rationnelle atteint ses limites et les scientifiques sont à la recherche de nouveaux leviers capables d'augmenter les possibilités de design moléculaire afin d'ouvrir la voie vers de nouveaux hydrogels aux propriétés optimisées et contrôlées.

C'est dans ce contexte, présenté au Chapitre I de ce manuscrit de thèse, qu'ont été développés de nouveaux dérivés peptidiques, dont les hybrides peptides/acides nucléiques. Ces molécules au grand potentiel associent les caractéristiques structurales et fonctionnelles de deux familles importantes parmi les biomolécules : les peptides et les acides nucléiques. Les nucléopeptides ont clairement montré un intérêt réel dans de nombreux domaines d'applications (biologie moléculaire, biotechnologies,<sup>136</sup> biomatériaux,<sup>262,300</sup> catalyse biochimique<sup>137,139</sup>), et se sont avérés particulièrement pertinents et prometteurs pour le développement d'hydrogels supramoléculaires innovants. Suivant cette approche, nous avons tout d'abord mis au point une première série de quatre composés nucléopeptidiques originaux (PNA(X)-pep où X = A, C, G ou T) portant chacun une nucléobase différente (adénine, cytosine, guanine ou thymine) adjointe sous forme de PNA à une partie heptapeptidique - EFEFKFK inspirée du peptide FEFEFKFK déjà reporté dans la littérature (Chapitre II). Nous avons montré la capacité de ces composés à former des hydrogels aux propriétés intéressantes



(augmentation des modules viscoélastiques, meilleure résistance à la contrainte, régénération thermique, voir Chapitre II), modulées en fonction de la nature de la base nucléique incorporée. La caractérisation multi-échelle de ces gels a permis d'identifier les modalités d'assemblage des nucléopeptides et de mettre en évidence l'influence de la partie PNA sur les phénomènes d'assemblage, par comparaison avec des composés témoins dépourvus de bases nucléiques. L'incorporation des PNA à la structure peptidique a permis la formation d'interactions intermoléculaires supplémentaires impliquant les bases nucléiques (notamment par  $\pi$ -stacking), altérant ainsi l'assemblage supramoléculaire et la morphologie des nanostructures formées. A l'échelle microscopique, le réseau fibrillaire des hydrogels nucléopeptidiques présente de petites fibres très denses, des agrégats ou des fagots (« *bundles* »), dans certains cas bien différentes de celles formées par le peptide FEFKFK. Ce dernier forme d'ailleurs un hydrogel au réseau fibrillaire peu dense composé de grandes fibres, qui conduisent, entre autres, à un matériau possédant une faible résistance à la contrainte mécanique, et qui n'est pas thermoréversible.

Ainsi, ce travail a clairement mis en évidence l'intérêt et le potentiel de l'introduction des bases nucléiques au sein de la structure primaire des peptides gélifiants pour la mise au point d'hydrogels supramoléculaires mono-composés.

Également, la démarche multi-échelle utilisée pour l'analyse de ces systèmes nous a permis de mettre en évidence les liens entre la modification de la structure primaire, les interactions et assemblages supramoléculaires qu'elle induit, les nanostructures formées ainsi que les propriétés résultantes des gels à l'échelle macroscopique. Cette compréhension plus fine des liens structure/propriétés est indispensable pour la rationalisation du design moléculaire des composés gélifiants, permettant ainsi de mieux concevoir, *a priori*, de nouvelles molécules pour le développement de nouveaux gels aux propriétés sur mesures.

Par ailleurs, les domaines d'applications des hydrogels peptidiques (et nucléopeptidiques) supramoléculaires sont constamment à la recherche de matériaux nouveaux, présentant davantage d'ajustabilité et d'adaptabilité. Les gels doivent pouvoir présenter une large gamme de propriétés (mécaniques comme fonctionnelles) sans avoir à recourir à une modification du design moléculaire à chaque application nouvelle. C'est pour répondre à ce besoin que les hydrogels supramoléculaires multi-composés ont été développés. En particulier, le design de composés complémentaires s'est montré

singulièrement avantageux pour contrôler le co-assemblage supramoléculaire et former des gels aux caractéristiques contrôlées.

Dans la seconde partie de notre travail, nous nous sommes donc intéressés à la formulation de gels supramoléculaires multi-composés (Chapitre III), à partir des nucléopeptides PNA(X)-pep caractérisés antérieurement. Nous avons effectué les mélanges de composés arborant des bases nucléiques complémentaires PNA(A)-pep + PNA(T)-pep et PNA(C)-pep + PNA(G)-pep, formulant des hydrogels en conditions comparables à celles des gels de mono-composés. Nous avons ainsi montré que ces gels présentaient certaines caractéristiques communes avec leurs gels « parents » (par exemple : thermoréversibilité, températures de transition gel-sol), mais également des propriétés améliorées dans certains cas (dont la résistance à la contrainte dans le cas du mélange {A+T}). Surtout, l'approche multi-composés permet la modulation de certaines propriétés des gels, comme la cinétique de formation et les modules viscoélastiques, en faisant varier notamment le ratio entre chacun des composés. Si ces hydrogels montrent quelques indices d'un effet synergique entre les nucléopeptides mis en présence, nous n'avons pas observé d'augmentation drastique de la force des gels, de leur résistance à la contrainte ou à la température, par exemple. En les étudiant à différentes échelles, nous avons pu mettre au jour les modes d'assemblages des nucléopeptides complémentaires en présence, qui privilégient une organisation par co-assemblage, induisant des modifications de propriétés à l'échelle supramoléculaire, micro- et nanoscopique, comme le montrent les spectroscopies IRTF et CD ainsi que les observations TEM ou les mesures de SAXS. Comme dans les hydrogels mono-composés, les parties PNA des nucléopeptides en mélange semblent interagir principalement par interactions de  $\pi$ -stacking, au détriment des interactions hydrogène de type Watson-Crick. Quoiqu'il en soit, cette étude a confirmé d'une part l'intérêt de l'approche multi-composés dans le cadre de la formulation d'hydrogels nucléopeptidiques, et, d'autre part, la nécessité d'un design moléculaire rationnel afin de contrôler les modalités d'assemblage supramoléculaire et les propriétés résultantes.

Afin d'optimiser encore davantage ces systèmes multi-composés prometteurs, nous nous sommes concentrés sur la conception de nouveaux nucléopeptides complémentaires gélifiants, en explorant trois stratégies reposant sur des designs moléculaires distincts (Chapitre IV). L'idée centrale était de jouer sur l'équilibre entre la partie acide nucléique et la

partie peptidique au sein des nucléopeptides, mais également sur la complémentarité entre séquences PNA ou entre parties peptidiques.

Si les composés Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub>, présentant un équilibre entre la partie acide nucléique auto-complémentaire et les parties peptidiques de charges opposées, n'ont pas donné lieu à des gels, nous avons fait ressortir trois couples de nucléopeptides présentant des caractéristiques de co-assemblage intéressantes. Ainsi, les composés PNA(CAC)-EFEFKFK et PNA(GTG)-EFEFKFK constitués de chaînes de trois PNA, complémentaires et palindromiques, et d'une chaîne heptapeptidique amphipathique ionique auto-complémentaire, ont été synthétisés. La présence de la chaîne PNA modifie le comportement d'auto-assemblage et de co-assemblage de ces composés et entraîne un effet synergique de co-gélification à concentration suffisamment élevée. En parallèle, les couples Ac-PNA(A)-FKFK-NH<sub>2</sub> + Ac-PNA(T)-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-PNA(C)-FEFE-NH<sub>2</sub> + Ac-PNA(G)-FKFK-NH<sub>2</sub>, associant des nucléopeptides aux PNA complémentaires et aux parties peptidiques de charges opposées, ont également montré un comportement synergique de co-gélification à l'échelle macroscopique. Surtout, leurs capacités de gélification (dont les vitesses de gélification et les modules viscoélastiques) se sont avérées meilleures que celle du système associant les peptides complémentaires témoins Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> et Ac-FKFK-NH<sub>2</sub>, dépourvus de bases nucléiques. Ces deux dernières stratégies, des plus prometteuses, sont actuellement en cours d'étude pour générer de nouveaux hydrogels supramoléculaires nucléopeptidiques multi-composés mettant à profit tout le potentiel des gels peptidiques, des hybrides acides nucléiques/peptides et des systèmes multi-composés afin d'atteindre des propriétés inédites, contrôlées et prédictibles.

Pour conclure, les travaux menés au cours de cette thèse portant sur l'utilisation de dérivés nucléopeptidiques pour la formation d'hydrogels supramoléculaires mono- et multi-composés ont mis en exergue les éléments régissant l'assemblage ou le co-assemblage de tels composés et ce, à différentes échelles. Nous avons également souligné l'intérêt de ces systèmes pour moduler finement les propriétés des hydrogels par de petites modifications rationnelles de design moléculaire, ou par une approche faisant intervenir plusieurs composés conçus et choisis avec soin.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons proposé la synthèse et la purification optimisées de plusieurs séries de nucléopeptides d'intérêt, ainsi que la caractérisation de leurs hydrogels

tant à l'échelle des propriétés mécaniques que des caractéristiques structurales (interactions moléculaires, modalités d'assemblage, réseaux fibrillaires) pour certains d'entre eux. Ces gels, formés en tampon biologique à pH physiologique, pourraient présenter un réel intérêt en tant que biomatériaux, ou encore comme supports pour de la culture cellulaire par exemple, où leurs propriétés physico-chimiques, structurales et mécaniques (thermoresponsivité, régénération thermique, thixotropie, modules viscoélastiques compatibles avec la culture cellulaire, possibilité de modulation fine par les multi-composés) pourraient être indéniablement avantageuses (voir Partie V.4, Chapitre V).

Ainsi, il s'avère que la conception de nouveaux designs nucléopeptidiques pour la formation d'hydrogels supramoléculaires reste un domaine de recherche récent, ouvert et présentant un potentiel immense, où de nombreuses pistes restent à explorer.



## Chapitre V : Partie Expérimentale

### V.1 Hydrogels supramoléculaires mono-composés à partir des nucléopeptides PNA(X)-pep

Cette partie expérimentale concerne les synthèses et expériences du Chapitre II, concernant les systèmes mono-composés de PNA(X)-pep (X = A, C, G ou T), F-pep et Aeg-pep. Certains protocoles décrits sont adaptés de la publication sur ces travaux de 2020.<sup>148</sup>

#### V.1.a Peptide synthesis, purification, and chemical analyses

Molecular structures of the nucleopeptides PNA(A)-pep, PNA(C)-pep, PNA(G)-pep and PNA(T)-pep, and also F-pep and Aeg-pep are available on Figure II-2, Partie II.2.d, Chapitre II and at Section SI.II.1, in annexes. Compounds were synthesized at a 400  $\mu\text{mol}$ -scale both manually and on an automated ResPep XL synthesizer (Intavis AG) using a Fmoc/*t*Bu strategy and double couplings for each amino acid. Preloaded Wang-resin (0.70  $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , 200-400 mesh) was used. The standard experimental conditions for each coupling were: Fmoc-amino acid (6 eq.), 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium tetrafluoroborate (HBTU, 5 eq.), and 4-methylmorpholine (NMM, 10 eq.) in dimethylformamide (DMF) and *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP), coupling time = 40 min. Fmoc-PNA-G(Bhoc)-OH, PNA-A(Bhoc)-OH, Fmoc-PNA-C(Bhoc)-OH, Fmoc-PNA-T-OH and Fmoc-Aeg(Boc)-OH were introduced manually (3.0 eq.) using HBTU (3.0 eq.), NMM (6.0 eq.) in DMF and NMP (double coupling, 3 h, room temperature, 500 rpm). Fmoc-deprotection steps were carried out using a 20 % (v/v) piperidine solution in DMF (3  $\times$  15 min), and final cleavages were achieved using a trifluoroacetic acid/triisopropylsilane/water (92,5/5/2,5) (v/v) mixture (2 h). The crude peptides were precipitated from cold diethyl ether (-20 °C), centrifuged (3  $\times$  5000 rpm, 5 min) washed with cold diethyl ether and dried.

Then, compounds were dissolved in a solvent A/solvent B (75/25) mixture, sonicated, and purified by semi-preparative HPLC (Waters) equipped with a Nucleosil (Macherey-Nagel) 100-5 C<sub>18</sub> 250  $\times$  21 mm column using solvent A (95 % water, 5 % acetonitrile, 0.1 % trifluoroacetic acid) and solvent B (100 % acetonitrile, 0.1 % trifluoroacetic acid) with a 16-min linear gradient (0% to 40 % solvent B), followed by a 10-min isocratic elution (40 % B) and a 14-min linear gradient (up to 100 % B) with a UV detection at 214 nm. Resulting solutions were evaporated under reduced-pressure and double-freeze drying.

The purity of each peptide/nucleopeptide was evaluated by analytical reversed-phase HPLC (Shimadzu LCMS-2020, monitored by a Diode Array Detector SPD-M20A and Mass Spectroscopy Detector (Shimadzu) equipped with a Nucleosil (Macherey-Nagel) 100-5 C<sub>18</sub> 250 × 4.6 mm column using solvent A' (95 % water, 5 % acetonitrile, 0.1% formic acid) and solvent B' (100 % acetonitrile, 0.1 % formic acid) with a 15-min isocratic elution (100 % A') followed by a 15-min linear gradient (0 % to 60 % solvent B') and a 5-min linear gradient (60 % to 100 % B') with a UV detection at 214 nm. High resolution ESI-MS analyses were performed on a Bruker Daltonics MicroTOFQ mass spectrometer, and all the compounds were fully characterized by NMR <sup>1</sup>H, TOCSY, COSY, ROESY, NOESY performed in a Bruker Advance III 600 MHz instrument in DMSO-*d*<sub>6</sub> and analysed using TOPSPIN and Sparky software.

#### **V.1.b Mono-component samples preparation**

As a global procedure, the samples were prepared at 15 mM by dissolving each peptide or nucleopeptide in Tris.HCl (1 M, pH 7.4), deuterated Tris-*d*<sub>11</sub>.HCl (1 M, pH 7.4), NaF aqueous solution (0,67 M, pH 7.4) or DMSO. All buffers were prepared in deionized water (18.2 MΩ·cm). The glass vials containing the solutions were sealed and subsequently heated (heatgun, 5 min, 70 °C), allowing a complete dissolution of the starting powder. Samples were used directly (rheology and Thioflavin T fluorescence experiments) or stored 24 hours at room temperature before analysis.

#### **V.1.c Rheological characterizations**

Dynamic rheological measurements were performed on an AR2000 rheometer (TA Instruments) operating in oscillatory mode, equipped with a Peltier plate temperature control and a Couette geometry immersed inside the samples (Figure SII-3). Time sweep experiments were carried out at constant shearing strain using a 0.5 % strain amplitude and a 1 rad·s<sup>-1</sup> angular frequency during 360 min, 20 °C. Frequency sweep experiments were conducted at constant shearing strain using a 0.5 % strain amplitude for a range of 0.1 - 100 rad·s<sup>-1</sup>, at 20 °C. Stress sweep experiments were performed for a range of 0.46 - 1000 Pa applied stress at a 1 rad·s<sup>-1</sup> angular frequency, 20 °C. All measurements were repeated a minimum of three times. Temperature sweep experiments were conducted at constant shearing strain using a 0.5 % strain amplitude, a 1 rad·s<sup>-1</sup> angular frequency and a 1°C·min<sup>-1</sup> temperature gradient for a range of 20 °C - 85 °C. Melting temperature *T*<sub>m</sub> was determined as shown on Figure II-8.

Thermal recovery experiments were conducted at constant shearing strain using a 0.5 % strain amplitude, a 1 rad·s<sup>-1</sup> angular frequency applying five heating/cooling cycles. During each cycle, after a one-hour stabilization step at 20 °C, samples were heated up at 10 °C·min<sup>-1</sup> to reach 85 °C, followed by a 5-min stabilization time (in which no shear was applied). Then, samples were cooled down at 5 °C·min<sup>-1</sup> to reach 20 °C. The storage (G') and loss (G'') moduli reported were chosen at the end of each stabilization step. For thixotropy experiments, samples were first measured during one hour at 0.5 % strain amplitude, and then, five cycles alternating a 5-min period at high strain amplitude (200 %) to break the hydrogel followed by a 30-min resting time at 0.5 % strain amplitude were applied.

#### V.1.d Relaxometry

The <sup>1</sup>H NMR relaxometry experiments were performed with a Stelar SMARtracer fast-field-cycling relaxometer (Stelar company, Medda, Italy) in a 5 kHz - 10 MHz Larmor frequency range, at 25 °C in 5-mm NMR tubes. For all R<sub>1</sub> measurements, magnetization recovery curves were found to be monoexponential within the experimental errors. 32 different values of the static magnetic field were sampled, with a fixed acquisition field of 7.2 MHz (<sup>1</sup>H Larmor frequency). Pre-polarized measurements were done between 5 kHz and 4 MHz with a polarization duration varying between 0.7 and 1.5 s, depending on the sample, and at a <sup>1</sup>H frequency of 8 MHz, and non-polarized sequence was used between 4 MHz and 10 MHz. Field-switching time was 3 ms. For each B<sub>0</sub> value, R<sub>1</sub> were obtained from the magnetization monoexponential evolution as a function of the time, sampled with 16 values between 0.01 and 4 times the longitudinal relaxation time. 16 accumulations were used for all measurements and a recycle delay of 8 s was applied. Additional measurements were done in the 0.25 - 10 MHz Larmor frequency range for PNA(G)-pep and PNA(T)-pep. 32 different values of the static magnetic field were sampled in this range and 32 accumulations were used with a recycle delay of 8 s.

Experimental results were fitted by a combination of two Lorentzian functions L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub> through the equation:  $R_1(\nu) = A_0 + \frac{A_1}{(1+\tau_c(1)\nu)^2} + \frac{A_2}{(1+\tau_c(2)\nu)^2}$ . A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> are the amplitudes and τ<sub>c</sub>(1) and τ<sub>c</sub>(2) are the correlation times of the Lorentzian functions L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub>, respectively. A<sub>0</sub> is a constant.



### **V.1.e Transmission electron microscopy**

Transmittance Electron Microscopy (TEM) experiments were performed on a Philips CM200 electron microscope operating at 200 kV and fitted with CCD MSC 600 Gatan camera. Samples were prepared by placing a drop of each sample (1.5 mM in Tris.HCl (100 mM, pH 7.4)) on 200-mesh carbon-coated copper grids (CF-200-Cu-50) for 3 min. Then, excess fluid was removed by capillary action, and a drop of phosphotungstic contrasting agent (2% w/w in deionized water (18.2 M $\Omega$ -cm)) was deposited for 1 min. The excess was subsequently removed, and the grid was air-dried for 5 min before analysis. Collected data were analysed using Gatan DigitalMicrograph and Fiji software.

### **V.1.f Thioflavin T fluorescence**

Stock solutions of Thioflavin T (750  $\mu$ M) were prepared in deionized water (18.2 M $\Omega$ -cm), and the actual concentration was determined through UV-vis spectral analysis at 412 nm with the molar extinction coefficient  $\epsilon(412 \text{ nm}) = 36000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .<sup>525</sup> Samples were prepared mixing the ThT solution with peptide solutions (previously dissolved in Tris.HCl (1 M, pH 7.4)) to reach final concentrations [ThT] = 100  $\mu$ M and [peptide] or [nucleopeptide] = 5 mM. They were subsequently transferred into black 96-well microplates (150  $\mu$ L per well), protected with an optical adhesive film to avoid evaporation and the fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 485 \text{ nm}$ , response = 1 sec, excitation/emission bandwidth = 6 nm, sensitivity PMT = 800 or 1100 V, temperature = 25  $^{\circ}$ C) was measured during 1000 min (1 point each 5 minutes, orbital shaking (3 mm, 5 Hz)) with a Xenius SAFAS. Fluorescence emission at 485 nm was plotted as a function of time, and results were mean of three to four experiments. Data were fitted using a sigmoidal growth model.<sup>607</sup> Characteristic values were extracted from the graphs: the lag time  $t_{\text{lag}}$  and  $t_{50}$  corresponding to the time required to reach 5 % and 50 % of the maximum fluorescence intensity, respectively, and the apparent growth rate  $k_{\text{app}}$  calculated from the tangent at the inflexion point  $t_{50}$ .

### **V.1.g FTIR (IRTF)**

FT-IR (IRTF) measurements were carried out at room temperature on a Tensor27 spectrometer (Bruker) set to ATR mode, in a range of 4000 - 900  $\text{cm}^{-1}$  with a 2  $\text{cm}^{-1}$ -resolution. Peptides and nucleopeptides were analysed as crude powders, as 15 mM solutions in DMSO and as hydrogels in Tris.HCl buffer (see preparation protocol above, Partie V.1.b). Infrared spectra were recorded after a week and represent an average of 256 scans recorded in a

single-beam mode and corrected for the background. Data were analysed, smoothed (Savitzky-Golay, 2<sup>nd</sup> order, 9 points), and treated using the OPUS software and OriginPro 8.5.

#### **V.1.h Circular dichroism**

Circular dichroism spectra were recorded using a Chirascan Plus spectrophotometer (Applied Photophysics) at 20 °C. Diluted solutions were prepared by dissolving powders in an aqueous solution of NaF (5 mM in deionized water (18.2 MΩ·cm) adjusted to pH = 7.4 with NaOH) to nominal concentration [peptide] or [nucleopeptide] = 75 μM, or in an aqueous solution of NaF (50 mM in deionized water (18.2 MΩ·cm) adjusted to pH = 7.4 with NaOH) to nominal concentration [peptide] or [nucleopeptide] = 750 μM. Their spectra were measured between 180 - 350 nm (step = 1 nm, response = 0.5 s, bandwidth = 1 nm) averaged on three repetitions in a 1-mm-pathlength cuvette. Hydrogels were prepared in an aqueous solution of NaF (667 mM in deionized water (18.2 MΩ·cm) adjusted to pH = 7.4 with NaOH) to nominal concentration [peptide] or [nucleopeptide] = 10 mM following the preparation protocol. After two days, gels were deposited carefully inside a 0.1-mm-pathlength dismountable cuvette prior to be analysed. Their spectra were measured between 180 - 320 nm (step = 0.5 nm, response = 0.5 s, bandwidth = 1 nm) averaged on three repetitions. After background subtraction and smoothing (Savitzky-Golay, 2<sup>nd</sup> order, 9 points), all raw data ( $\theta$ , mdeg) were converted into mean residual ellipticity (MRE) according to the equation below:

$$MRE = \frac{\theta}{((n - 1) \times c \times d \times 10)}$$

Where MRE is in °·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>, d is the cuvette pathlength in cm, and c the molar concentration in mol·L<sup>-1</sup>.

#### **V.1.i NMR CSI (RMN)**

Peptide and nucleopeptides solutions at 5 mM were prepared by dissolving the freeze-dried powders in a solution of deuterated Tris-*d*<sub>11</sub>.HCl (0.5 M, pH 7.4) and 5% D<sub>2</sub>O, shaken at 70 °C during 3 min. After one night, samples were homogenized again by heating at 70 °C and transferred into 5mm-NMR tubes. Samples were then analysed by NMR (<sup>1</sup>H, COSY, NOESY, HSQC and HSQC-TOCSY) in a Bruker Advance III 400 MHz instrument and chemical shifts are obtained using TOPSPIN and Sparky software. The chemical shifts index method is applied based on literature data.<sup>556,557</sup> Due to solubility issues, no exploitable NMR signals are obtained for F-pep, even in more diluted conditions.

### **V.1.j Fluorescence**

Fluorescence assays were conducted using a FP-8300 spectrofluorometer (JASCO Corp.) on 5 mM samples in Tris.HCl buffer (1 M, pH 7.4). For each experiment 700  $\mu$ L of the samples were transferred into quartz cuvettes (1 cm-pathlength). Fluorescence spectra were obtained at 20 °C with a 3D measurements mode: excitation spectra were recorded from 250 to 400 nm (step = 2 nm) for an emission wavelength varying from 265 to 600 nm (step = 5 nm), and emission spectra were recorded from 265 nm to 600 nm (step = 1 nm) for an excitation wavelength varying from 250 to 400 nm (step = 5 nm). Scanning speed was set to 200 nm/min, response time to 1 s, emission bandwidth to 5 nm and excitation bandwidth to 1 nm. Data were processed and smoothed (Savitzky-Golay, 2<sup>nd</sup> order, 9 points) using OriginPro 8.5. The maximum of emission for the considered transition is spotted on each smoothed emission spectrum for all compounds when relevant. The associate wavelength was noted in order to draw a  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  plot. REES phenomenon was highlighted by a linear regression on concerned points.

### **V.2 Hydrogels supramoléculaires multi-composés à partir des nucléopeptides PNA(X)-pep**

Cette partie expérimentale concerne les expériences du Chapitre III, à propos des systèmes multi-composés à partir de PNA(X)-pep (X = A, C, G ou T). Certains protocoles décrits sont adaptés de la publication sur ces travaux de 2021.<sup>171</sup>

#### **V.2.a Multicomponent sample preparation**

As a global procedure, the multi-component samples were prepared at  $C_T = 15$  mM by weighting the powders according to the targeted ratio and mixing them mechanically before dissolution in Tris.HCl (1 M, pH 7.4) or in a NaF aqueous solution (0.67 M, pH 7.4) for CD experiments. All the buffers were prepared in deionized water (18.2 M $\Omega$ ·cm). As a standard procedure, the glass vials containing the solutions were sealed and subsequently heated (heatgun, 5 min, 70 °C), allowing a complete dissolution of the starting powder. Samples were used directly (rheology and Thioflavin T fluorescence experiments) or stored 24 hours at room temperature before analysis.

### V.2.b Rheological characterizations

Dynamic rheological measurements were performed on an AR2000 rheometer (TA Instruments) operating in oscillatory mode, equipped with a Peltier plate temperature control and a Couette geometry immersed inside the samples. All the measurements were repeated a minimum of three times. Time sweep experiments were carried out at constant shearing strain using a 0.5 % strain amplitude and a  $1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$  angular frequency during 360 min,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . The apparent rate constant  $k_{\text{app}}$  was calculated from the slope of  $G' = f(t)$  in the very first five minutes. Shoulders on the curves were identified as minima of the 1<sup>st</sup> derivatives, when relevant. Frequency sweep experiments were conducted at constant shearing strain using a 0.5 % strain amplitude for a range of  $0.1 - 100 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ , at  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Stress sweep experiments were performed for a range of  $0.46 - 1000 \text{ Pa}$  applied stress at a  $1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$  angular frequency,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . The limiting values of the linear viscoelastic region (*i.e.*, the yield point  $\tau_y$ ) correspond to the stress value at which the storage modulus loses 10 % of its maximal value). All the measurements were repeated a minimum of three times. Temperature sweep experiments were conducted at constant shearing strain using a 0.5 % strain amplitude, a  $1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$  angular frequency and a  $1 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  temperature gradient for a range of  $20 \text{ }^\circ\text{C} - 85 \text{ }^\circ\text{C}$ . Melting temperature  $T_m$  is determined as shown on Figure III-4. Thermal recovery experiments were conducted at constant shearing strain using a 0.5 % strain amplitude, a  $1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$  angular frequency applying five heating/cooling cycles. During each cycle, after a one-hour stabilization step at  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , the samples were heated up at  $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  to reach  $85 \text{ }^\circ\text{C}$ , followed by a 5-min stabilization time (in which no shear was applied). Then, samples were cooled down at  $5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  to reach  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . The storage ( $G'$ ) and loss ( $G''$ ) moduli reported were chosen at the end of each stabilization step.

### V.2.c Relaxometry

The  $^1\text{H}$  NMR relaxometry experiments were performed with a Stellar SMARtracer fast-field-cycling relaxometer (Stellar company) in a  $5 \text{ kHz} - 10 \text{ MHz}$  Larmor frequency range, at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  in 5-mm NMR tubes. For all R1 measurements, magnetization recovery curves were found to be monoexponential within the experimental errors. 32 different values of the static magnetic field were sampled, with a fixed acquisition field of  $7.2 \text{ MHz}$  ( $^1\text{H}$  Larmor frequency). Pre-polarized measurements were done between  $5 \text{ kHz}$  and  $4 \text{ MHz}$  with a polarization duration varying between  $0.7$  and  $1.5 \text{ s}$ , depending on the sample, and at a  $^1\text{H}$  frequency of  $8$

MHz, and non-polarized sequence was used between 4 MHz and 10 MHz. Field-switching time was 3 ms. For each  $B_0$  value,  $R_1$  were obtained from the magnetization monoexponential evolution as a function of the time, sampled with 16 values between 0.01 and 4 times the longitudinal relaxation time. 16 accumulations were used for all measurements and a recycle delay of 8 s was applied.

Experimental results were fitted by a combination of two Lorentzian functions  $L_1$  and  $L_2$  through the equation:  $R_1(\nu) = A_0 + \frac{A_1}{(1+\tau_c(1)\times\nu)^2} + \frac{A_2}{(1+\tau_c(2)\times\nu)^2}$ .  $A_1$  and  $A_2$  are the amplitudes and  $\tau_c(1)$  and  $\tau_c(2)$  are the correlation times, of the Lorentzian functions  $L_1$  and  $L_2$ , respectively.  $A_0$  is a constant.

#### **V.2.d Small-Angle X-ray scattering (SAXS)**

Small angle X-Ray scattering (SAXS) measurements were carried out on a SAXSpace instrument (Anton Paar), using line-collimation system at the SAXS facility in the "Institut Jean Barriol". This instrument is attached to a ID 3003 laboratory X-Ray generator (General Electric) equipped with a sealed X-Ray tube (PANalytical,  $\lambda$  Cu,  $K\alpha = 0.1542$  nm) operating at 40 kV and 50 mA. After the solubilization step, the samples were introduced in a "Special Glass" capillary, with a diameter equal to 2.0 mm and let to gel at 20 °C for 24 h before analysis. For the measurement, samples were placed at 25 °C, inside an evacuated sample chamber equipped with a temperature-controlled sample holder unit and exposed to X-Ray beam for about 50 min. Scattering of X-Ray beam was recorded by a 1D detector (Mythen 2 with strip of 50  $\mu$ m x 8 mm) placed at 250 mm distance from sample. Scattering intensities  $I(q)$  were provided as a function of the magnitude of the scattering vector  $q = (4\pi/\lambda)\cdot\sin(\theta)$ , where  $2\theta$  is the total scattering angle. Thanks to a translucent beamstop allowing the measurement of an attenuated primary beam at  $q = 0$ , all measured intensities can be calibrated by normalizing the attenuated primary intensity. The data were collected in a  $q$ -range from 0.03 to 7  $\text{nm}^{-1}$  and then corrected for the background scattering, from the empty capillary and the solvent (Tris.HCl 1 M), and for slit-smearing effects by a desmearing procedure, using Lake method. After correction, obtained intensities are scaled into absolute units using water as a reference material.

The SAXS data were analysed and fitted with the SasView 4.1 software, using the *CorrLength* model corresponding to the functional form  $I(q) = \frac{A}{q^n} + \frac{C}{1+(qL)^m} + B$ , in which  $I(q)$  is the

scattering intensity,  $q = (4\pi \cdot \sin(\theta/2))/\lambda$  (with  $\theta$  the scattering angle and  $\lambda$  the wavelength) is the scattering vector, A, B and C are constants, L is the correlation length, n and m are the scaling exponents at low and high q, respectively.<sup>516,585,586,608</sup>

### **V.2.e Transmission electron microscopy (TEM)**

Transmission Electron Microscopy (TEM) experiments were performed on a Philips CM200 electron microscope operating at 200 kV and fitted with CCD MSC 600 Gatan camera. Samples were prepared by placing a drop of each sample (1.5 mM in Tris.HCl (100 mM, pH 7.4)) on 200-mesh carbon-coated copper grids (CF-200-Cu-50) for 3 min. The excess fluid was subsequently removed and a drop of phosphotungstic contrasting agent (2% w/w in deionized water) was deposited for 1 min. The excess was subsequently removed, and the grid was air-dried for 5 min before analysis. Collected data were analysed using Gatan DigitalMicrograph and Fiji software.

### **V.2.f FTIR (IRTF)**

FT-IR (*IRTF*) measurements were carried out at room temperature on a Tensor27 spectrometer (Bruker) set to ATR mode, in a range of 4000 - 900  $\text{cm}^{-1}$  with a 2  $\text{cm}^{-1}$ -resolution. Infrared spectra represent an average of 256 scans recorded in a single-beam mode and corrected for the background. For the calculation of the arithmetic means, the FTIR signals of each peptide alone at 15 mM were added and divided by two.<sup>153,408</sup> Data were analysed, smoothed (Savitzky-Golay, 2<sup>nd</sup> order, 9 points), and treated using the OPUS software.

### **V.2.g Circular dichroism**

Circular dichroism spectra were recorded using a Chirascan Plus spectrophotometer (Applied Photophysics) at 20 °C. Hydrogels were prepared in an aqueous solution of NaF (667 mM in deionized water (18.2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ) adjusted to pH = 7.4 with NaOH) at a final concentration of peptide of 10 mM. The samples were deposited carefully inside a 0.1-mm-pathlength dismountable cuvette prior to be analysed. Their spectra were measured between 180 - 320 nm (step = 0.5 nm, response = 0.5 s, bandwidth = 1 nm) averaged on three repetitions. After background subtraction and smoothing (Savitzky-Golay, 2<sup>nd</sup> order, 9 points), all raw data ( $\theta$ , mdeg) were converted into mean residual ellipticity (MRE) according to the equation below:

$$MRE = \frac{\theta}{((n - 1) \times c \times d \times 10)}$$

Where MRE is in  $^{\circ}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ,  $d$  is the cuvette pathlength in cm, and  $c$  the molar concentration in  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . For the calculation of the arithmetic means, the MRE of each peptide alone at 10 mM were added and divided by two.<sup>153,391,409</sup>

#### **V.2.h Thioflavin T fluorescence**

Stock solutions of Thioflavin T (750  $\mu\text{M}$ ) were prepared in deionized water (18.2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ), and the actual concentration was determined through UV-vis spectral analysis at 412 nm with the molar extinction coefficient  $\epsilon(412\text{ nm}) = 36000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .<sup>525</sup> Samples were prepared mixing the ThT solution with peptide solutions (previously dissolved in Tris.HCl (1 M, pH 7.4)) to reach final concentrations  $[\text{ThT}] = 100\text{ }\mu\text{M}$  and concentration of each peptide = 2.5 mM (for PNA(C)-pep, PNA(G)-pep and Aeg-pep mixtures, b, Figure III-20, Partie III.12, Chapitre III) or 5 mM (for PNA(A)-pep, PNA(T)-pep and Aeg-pep mixtures, a, Figure III-20, Partie III.12, Chapitre III). Note: Two different sets of concentration were chosen to obtain exploitable signals in less than 15 hours. Samples were subsequently transferred into black 96-well microplates (150  $\mu\text{L}$  per well), protected with an optical adhesive film (to avoid evaporation) and the fluorescence was measured during 1000 min ( $\lambda_{\text{ex}} = 440\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 485\text{ nm}$ , response = 1 sec, excitation/emission bandwidth = 6 nm, sensitivity PMT = 800 V, temperature = 25  $^{\circ}\text{C}$ , 1 point each 5 minutes, orbital shaking (3 mm, 5 Hz)) with a Xenius SAFAS. Fluorescence emission at 485 nm was plotted as a function of time, and results are mean of three to four experiments. Data were fitted using a sigmoidal growth model,<sup>562</sup> and characteristic values were extracted from the graphs: the lag time  $t_{\text{lag}}$  and  $t_{50}$  corresponding to the time required to reach 5 % and 50 % of the maximum fluorescence intensity, respectively, and the apparent growth rate  $k_{\text{app}}$  calculated from the tangent at the inflexion point  $t_{50}$ .

#### **V.2.i Fluorescence**

Fluorescence spectra were recorded using a FP-8300 spectrofluorometer (JASCO Corp.) on 5 mM samples in Tris.HCl buffer (1 M, pH 7.4). For each experiment 700  $\mu\text{L}$  of the samples were transferred into quartz cuvettes (1 cm-pathlength). Fluorescence spectra were obtained at 20  $^{\circ}\text{C}$  with a 3D measurements mode (parameters: scanning speed = 200  $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$ , response time = 1 sec, emission bandwidth = 5 nm and excitation bandwidth = 1 nm). Excitation spectra were recorded from 290 to 420 nm (step = 1 nm) for an emission wavelength varying from 302 to 580 nm (step = 2 nm), and emission spectra were recorded from 300 nm to 600 nm (step = 1 nm) for an excitation wavelength varying from 290 to 420

nm (step = 2 nm). Data were processed and smoothed (Savitzky-Golay, 2<sup>nd</sup> order, 9 points) using OriginPro 8.5. For the determination of the REES phenomenon, the maximum of emission was spotted on each smoothed emission spectrum for all compounds as a function of the excitation wavelength. Subsequently, the graph  $\lambda_{em} = f(\lambda_{ex})$  was plotted and fitted by a linear regression on concerned points.

### **V.2.j NMR (RMN)**

Multicomponent samples {A+T} and {C+G} at  $C_T = 5$  mM were prepared by dissolving the mixed freeze-dried powders in a solution of deuterated Tris- $d_{11}$ .HCl (0.5 M, pH 7.4) and 5% D<sub>2</sub>O, shaken at 70 °C during 3 min. After one night, samples were homogenized again by heating at 70 °C and transferred into 5mm-NMR tubes. While {A+T} appeared to be a clear solution, {C+G} was forming a gel, making the measurement on this sample unsuccessful. {A+T} sample was analysed by NMR (<sup>1</sup>H) in a Bruker Advance III 400 MHz instrument.

## **V.3 Nouveaux systèmes supramoléculaires multi-composés à partir de nucléopeptides complémentaires**

Cette partie expérimentale concerne les synthèses et expériences du Chapitre IV, concernant les nouveaux systèmes multi-composés complémentaires.

### **V.3.a Peptide synthesis, purification, and chemical analyses of PNA(GTG)-pep and PNA(CAC)-pep**

Molecular structures of the nucleopeptides PNA(GTG)-pep and PNA(CAC)-pep are available on Figure IV-1, Partie IV.2.b, Chapitre IV and Section SI.IV.1, in annexes. These nucleopeptides were synthesized at a 100  $\mu$ mol-scale both manually and on an automated ResPep XL synthesizer (Intavis AG) using a Fmoc/*t*Bu strategy and double couplings for each amino acid. Preloaded Wang-resin (0.70 mmol·g<sup>-1</sup>, 200-400 mesh) was used. The standard experimental conditions for each coupling were: Fmoc-amino acid (6 eq.), 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium tetrafluoroborate (HBTU, 5 eq.), and 4-methylmorpholine (NMM, 10 eq.) in dimethylformamide (DMF) and *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP), coupling time = 45 min. Fmoc-PNA-G(Bhoc)-OH, PNA-A(Bhoc)-OH, Fmoc-PNA-C(Bhoc)-OH, Fmoc-PNA-T-OH were introduced manually (3.1 eq.) using PyBop (3.0 eq.), DIPEA (3.0 eq.), lutidine (4.5 eq.) in DMF and NMP (double coupling, 2.25 h, room temperature, 500 rpm), according to the sequence. Fmoc-deprotection steps were carried out using a 20 % (v/v) piperidine solution in DMF (3 × 15 min), and final cleavages were achieved using a trifluoroacetic



acid/triisopropylsilane/water (92,5/5/2,5) (v/v) mixture (2 h). The crude peptides were precipitated from cold diethyl ether (-20 °C), centrifuged (3 x 5000 rpm, 5 min) washed with cold diethyl ether and dried.

Then, nucleopeptides were dissolved in solvent A (see composition below) mixture, sonicated, and purified by semi-preparative HPLC (Waters) equipped with a Nucleosil (Macherey-Nagel) 100-5 C<sub>18</sub> 250 × 21 mm column using solvent A (95 % water, 5 % acetonitrile, 0.1 % trifluoroacetic acid) and solvent B (100 % acetonitrile, 0.1 % trifluoroacetic acid) with a 16-min linear gradient (0 % to 40 % solvent B), followed by a 10-min isocratic elution (40 % B) and a 9-min linear gradient (up to 100 % B) with a UV detection at 214 nm. The resulting solutions were evaporated under reduced-pressure and double-freeze drying.

The purity of each nucleopeptide was evaluated by analytical reversed-phase HPLC (Shimadzu LCMS-2020, monitored by a Diode Array Detector SPD-M20A and Mass Spectroscopy Detector (Shimadzu)) equipped with a Nucleosil (Macherey-Nagel) 100-5 C<sub>18</sub> 250×4.6 mm column using solvent A' (95 % water, 5 % acetonitrile, 0.1 % formic acid) and solvent B' (100 % acetonitrile, 0.1 % formic acid) with a 25-min linear gradient (0 % to 100 % solvent B') with a UV detection at 214 nm.

### **V.3.b Peptide synthesis, purification, and chemical analyses of Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub>, Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub>, Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> and Ac-FKFK-NH<sub>2</sub>**

Molecular structures of the nucleopeptides Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub> and Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub> are available on Figure IV-3, Partie IV.3.a, Chapitre IV and Section SI.IV.1, in annexes. Molecular structures of Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> and Ac-FKFK-NH<sub>2</sub> are available in annexes (Section SI.IV.1). Compounds were synthesized at a 100 μmol-scale both manually and on an automated ResPep XL synthesizer (Intavis AG) using a Fmoc/*t*Bu strategy and double couplings for each amino acid. Rink amide-resin (0.72 mmol·g<sup>-1</sup>, 200 - 400 mesh) was used. The standard experimental conditions for each coupling were: Fmoc-amino acid (6 eq.), 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium tetrafluoroborate (HBTU, 5 eq.), and 4-methylmorpholine (NMM, 10 eq.) in dimethylformamide (DMF) and *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP), coupling time = 45 min. Fmoc-PNA-G(Bhoc)-OH, PNA-A(Bhoc)-OH, Fmoc-PNA-C(Bhoc)-OH, Fmoc-PNA-T-OH were introduced manually (3.1 eq.) using HBTU (3.0 eq.), NMM (6.0 eq.) in DMF and NMP (double coupling, 2 h, room temperature, 500 rpm), according to the sequence. Fmoc-deprotection steps were carried out using a 20 % (v/v) piperidine solution in

DMF (3 × 15 min) and final acetylation were achieved using an acetic anhydride (5 % (v/v)) and lutidine (6 % (v/v)) mix, in DMF (2 × 10 min). Finally, cleavage was performed using a trifluoroacetic acid/triisopropylsilane/water (92,5/5/2,5) (v/v) mixture (2 h). The crude peptides were precipitated from cold diethyl ether (-20 °C), centrifuged (3 × 5000 rpm, 5 min) washed with cold diethyl ether and dried.

Then, compounds were dissolved in a H<sub>2</sub>O/acetonitrile (75/25) mixture, sonicated, and purified by semi-preparative HPLC (Waters) equipped with a Nucleosil (Macherey-Nagel) 100-5 C<sub>18</sub> 250 × 21 mm column using solvent A (95 % water, 5 % acetonitrile, 0.1 % trifluoroacetic acid) and solvent B (100 % acetonitrile, 0.1 % trifluoroacetic acid) with a 12-min linear gradient (0 % to 25 % solvent B), followed by a 10-min isocratic elution (25 % B) and a 8-min linear gradient (up to 100 % B) with a UV detection at 214 nm. The resulting solutions were evaporated under reduced-pressure and double-freeze-drying.

The purity of each peptide/nucleopeptide was evaluated by analytical reversed-phase HPLC (Shimadzu LCMS-2020, monitored by a Diode Array Detector SPD-M20A and Mass Spectroscopy Detector (Shimadzu)) equipped with a Nucleosil (Macherey-Nagel) 100-5 C<sub>18</sub> 250 × 4.6 mm column using solvent A' (95 % water, 5 % acetonitrile, 0.1 % formic acid) and solvent B' (100 % acetonitrile, 0.1 % formic acid). For Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub> and Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub>, applied gradients were a 25-min linear gradient (0 % to 60 % solvent B') followed by a faster 5-min linear gradient (60 % to 100 % solvent B'). For Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> and Ac-FKFK-NH<sub>2</sub>, applied gradients were a 15-min linear gradient (0 % to 60 % solvent B') followed by a faster 5-min linear gradient (60 % to 100 % solvent B'). UV-detection was set at 214 nm.

### **V.3.c Peptide synthesis, purification, and chemical analyses of PNA(A)-pep<sub>(+)</sub>, PNA(C)-pep<sub>(-)</sub>, PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> et PNA(T)-pep<sub>(-)</sub>**

Molecular structures of the nucleopeptides PNA(A)-pep<sub>(+)</sub>, PNA(C)-pep<sub>(-)</sub>, PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> et PNA(T)-pep<sub>(-)</sub> are available on Figure IV-6, Partie IV.4.a, Chapitre IV and Section SI.IV.1, in annexes. Nucleopeptides were synthesized at a 600 μmol-scale both manually and on an automated ResPep XL synthesizer (Intavis AG) using a Fmoc/*t*Bu strategy and double couplings for each amino acid. Rink amide-resin (0.65 mmol·g<sup>-1</sup>, 200 - 400 mesh) was used. The standard experimental conditions for each coupling were: Fmoc-amino acid (6 eq.), 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium tetrafluoroborate (HBTU, 5 eq.), and 4-methylmorpholine (NMM, 10 eq.) in dimethylformamide (DMF) and *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP), coupling

time = 45 minutes. Fmoc-PNA-G(Bhoc)-OH, PNA-A(Bhoc)-OH, Fmoc-PNA-C(Bhoc)-OH, Fmoc-PNA-T-OH were introduced manually (2.1 eq.) using PyBop (2.0 eq.), DIPEA (3.0 eq.) and lutidine (4.5 eq.), in DMF and NMP (double coupling, 1,5 h, room temperature, 500 rpm). Fmoc-deprotection steps were carried out using a 20 % (v/v) piperidine solution in DMF (3 × 15 min) and final acetylation were achieved using an acetic anhydride (5 % (v/v)) and lutidine (6 % (v/v)) mix, in DMF (2 x 10 min). Finally, cleavage was performed twice in order to get a better yield, using a trifluoroacetic acid/triisopropylsilane/water (92,5/5/2,5) (v/v) mixture (2 x 2 h). The crude peptides were precipitated from cold diethyl ether (-20 °C), centrifuged (3 x 5000 rpm, 5 min) washed with cold diethyl ether and dried.

Then, nucleopeptides were dissolved, sonicated and purified according to optimized conditions, adapted to each compound (Tableau V-1). Purification was performed by semi-preparative HPLC (Waters) equipped with a Nucleosil (Macherey-Nagel) 100-5 C<sub>18</sub> 250 × 21 mm column using solvent A (95 % water, 5 % acetonitrile, 0.1 % trifluoroacetic acid) and solvent B (100 % acetonitrile, 0.1 % trifluoroacetic acid). The resulting solutions were evaporated under reduced-pressure and double-freeze-drying.

Nucleopeptide	Dissolution conditions	Purification gradients
PNA(A)-pep(+)	Solvent A	- 10-min linear gradient (0 % to 30 % B)
PNA(G)-pep(+)		- 15-min linear gradient (30 % to 60 % B)
PNA(C)-pep(-)	H <sub>2</sub> O 100 % + NH <sub>3</sub> OH* 0.1 %	- 5-min linear gradient (60 % to 100 % B)
PNA(T)-pep(-)		

**Tableau V-1.** Conditions for the purification of the nucleopeptides studied in this paragraph. \*commercially available NH<sub>3</sub>OH (20 %) solution in water.

The purity of each nucleopeptide was evaluated by analytical reversed-phase HPLC (Shimadzu LCMS-2020, monitored by a Diode Array Detector SPD-M20A and Mass Spectroscopy Detector (Shimadzu)) equipped with a Nucleosil (Macherey-Nagel) 100-5 C<sub>18</sub> 250 × 4.6 mm column using solvent A' (95 % water, 5 % acetonitrile, 0.1 % formic acid) and solvent B' (100 % acetonitrile, 0.1 % formic acid) with a 15-min linear gradient (0 % to 60 % solvent B') followed by a faster 5-min linear gradient (60 % to 100 % solvent B') with a UV detection at 214 nm.

High resolution ESI-MS analyses were performed on a Bruker Daltonics MicrOTOFQ mass spectrometer.

#### **V.3.d Samples preparation**

Samples were prepared at the targeted concentration by weighting the powders and mixing them mechanically if relevant, before dissolution in Tris.HCl (1 M, pH 7.4). The buffers were prepared in deionized water (18.2 M $\Omega$ ·cm). Glass vials containing the solutions were sealed and subsequently heated (heatgun, 3 min, 70 °C), allowing a complete dissolution of the starting powder. Samples were observed at room temperature to assess their gelation properties or used directly for rheology.

#### **V.3.c Rheological characterizations**

Dynamic rheological measurements were performed on an AR2000 rheometer (TA Instruments) operating in oscillatory mode, equipped with a Peltier plate temperature control and a Couette geometry immersed inside the samples. Preliminary measurements were performed twice, giving first insights about the mechanical properties of the gels. Frequency sweep experiments on the nucleopeptide blends (PNA(A)-pep<sub>(+)</sub> + PNA(T)-pep<sub>(-)</sub> and PNA(C)-pep<sub>(-)</sub> + PNA(G)-pep<sub>(+)</sub>) were conducted 6 h after preparation of the hydrogels, at constant oscillatory stress (1 Pa) for a range of 0.1 - 100 rad·s<sup>-1</sup>, at 20 °C. Frequency sweep experiments on the peptide blend (Ac-FEFE-NH<sub>2</sub> + Ac-FKFK-NH<sub>2</sub>) were performed 24 h after preparation of the hydrogels, at constant shear strain (0.5 %) for a range of 0.1 - 100 rad·s<sup>-1</sup>, at 20 °C.

#### V.4 Essais préliminaires d'évaluation de la pertinence des composés PNA(X)-pep pour le développement de biomatériaux

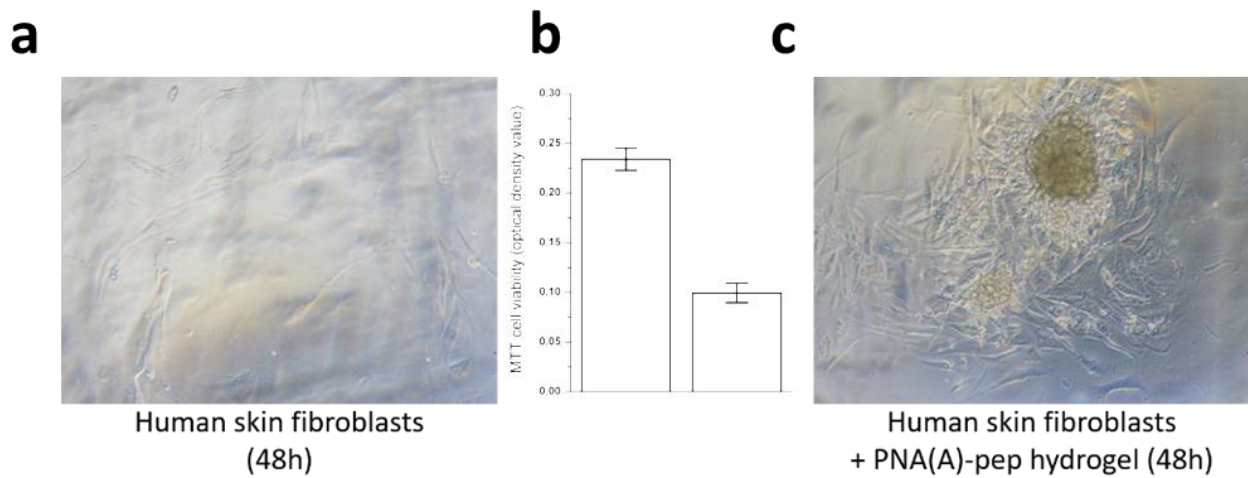
Comme présenté Partie I.1 du Chapitre I, les hydrogels peptidiques supramoléculaires sont fortement plébiscités pour des applications dans le domaine biomédical.<sup>21,85,86</sup> En effet, par leurs propriétés mécaniques et physico-chimiques proches des milieux biologiques, ainsi que par la biocompatibilité, la biodégradabilité et la faible immunogénicité de leurs constituants, ces gels forment un matériau de choix pour la culture cellulaire notamment.<sup>57,93–96</sup> Ainsi, l'applicabilité dans ce cadre de nombreux d'hydrogels peptidiques a été étudiée, par des tests *in vitro* de viabilité cellulaire<sup>190,194,196,212,232</sup> ou d'encapsulation de cellules,<sup>71,197–200,229</sup> voire des études *in vivo* concernant la non-immunogénicité et la dégradabilité de ces gels en milieux biologiques.<sup>208,235,236</sup>

Dans le cadre de cette thèse, des essais préliminaires ont été réalisés\* afin d'estimer le potentiel des nucléopeptides PNA(X)-pep dans le cadre de telles applications. Dans un premier temps, la capacité des composés PNA(A)-pep, PNA(C)-pep, PNA(G)-pep et PNA(C)-pep à gélifier des milieux de culture cellulaire complexes (DMEM,  $\alpha$ -MEM,  $\alpha$ -MEM + facteurs solubles) est évaluée. Ces nucléopeptides ont été formulés à une concentration de 15 mM dans ces milieux, à pH = 7.4, avec un protocole similaire à celui mis en place pour la formation d'hydrogels dans le tampon Tris.HCl 1 M (voir Partie V.1.b). De ces essais est ressorti que les nucléopeptides PNA(A)-pep et PNA(G)-pep étaient capables de gélifier ces milieux de culture sans se dégrader, même à 37 °C.

Pour la suite des essais, nous avons sélectionné PNA(A)-pep pour effectuer de premiers tests afin d'évaluer la pertinence des hydrogels nucléopeptidiques étudiés, en tant que supports de culture cellulaire. Ainsi, des gels de PNA(A)-pep en  $\alpha$ MEM enrichi par des facteurs solubles ont étéensemencés par des cellules fibroblastiques de peau humaine (a, Figure V-1).

Après 48h, l'observation par microscopie optique montre la présence de cellules saines sur le gel de PNA(A)-pep (c, Figure V-1), confirmée par les tests MTT (b, Figure V-1). La présence de l'hydrogel nucléopeptidique ne serait pas délétère pour la croissance des cellules, mais en comparant la viabilité cellulaire du gel et du témoin, celle-ci ne serait pas optimale. Les résultats présentés ici sont très préliminaires, incomplets, et n'ayant pas été répétés, ne sont pas entièrement représentatifs de la cytocompatibilité des hydrogels nucléopeptidiques.

Aussi, la légère opacité des gels peut biaiser le test MTT ce qui entraînerait une sous-estimation de la densité cellulaire des échantillons comportant le gel de PNA(A)-pep.



**Figure V-1.** Viabilité de cellules fibroblastiques de peau humaine sur un gel de PNA(A)-pep (c) formulé à 15 mM ( $\alpha$ MEM + facteurs solubles, pH = 7.4) comparé à un témoin sans hydrogel (a), observée par microscopie optique. Les résultats de viabilité cellulaire par le test MTT (b) soulignent la présence de cellules saines sur le gel de PNA(A)-pep, mais en nombre moindre comparé à l'expérience témoin.

Pour conclure, les tests de cytocompatibilité des gels nucléopeptidiques à partir des composés PNA(X)-pep nécessitent une optimisation des expériences et une étude plus approfondie afin de confirmer le potentiel de ces composés dans le cadre de la formulation d'hydrogels supports de culture cellulaire.

\*En collaboration avec le D<sup>r</sup> Emilie Velot (Université de Lorraine, IMoPa, UPR 7365).

## Références

- (1) Doi, M. in *Soft Matter Physics*; Oxford University Press, **2013**.
- (2) Hamley, I. W. in *Introduction to Soft Matter* ; John Wiley & Sons, Revised Edition, **2007**.
- (3) Dyre, J.; Hvidt, S.; Almdal, K.; Kramer, O. *Polym. Gels Netw.* **1993**, *1*, (1) 5–17.
- (4) Peters, G. M.; Davis, J. T. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (11), 3188–3206.
- (5) Terech, P.; Weiss, R. G. in *Molecular Gels* ; Springer, 1st ed., **2006**.
- (6) Flory, P. J. *Faraday Discuss.* **1974**, *57*, 7–18.
- (7) IUPAC in *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology: The Gold Book*, ed. McNaught, A., Wilkinson, A., International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC): Research Triangle Park, 4th ed., **2019**.
- (8) Vintiloiu, A.; Leroux, J.-C. *J. Control. Release* **2008**, *125* (3), 179–192.
- (9) Gronwald, O.; Shinkai, S. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7* (20), 4328–4334.
- (10) Terech, P.; Weiss, R. G. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (8), 3133–3160.
- (11) Anastas, P. T.; Zimmerman, J. B. *Green Chem.* **2019**, *21* (24), 6545–6566.
- (12) Apostolov, A. A.; Boneva, D.; Vassileva, E.; Mark, J. E.; Fakirov, S. *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *76* (14), 2041–2048.
- (13) Clark, A. H.; Ross-Murphy, S. B. *Adv. Polym. Sci.* **1987**, *83*, 136.
- (14) Kapoor, S.; Kundu, S. C. *Acta Biomater.* **2016**, *31*, 17–32.
- (15) Shchipunov, Y. A.; Shumilina, E. V.; Hoffmann, H. *Colloid Polym. Sci.* **1998**, *276* (4), 368–372.
- (16) Gallegos, C.; Franco, J. M. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, *4* (4), 288–293.
- (17) Zhang, K. *E3S Web Conf.* **2020**, *213*, 01015.
- (18) Schottner, G. *Chem. Mater.* **2001**, *13* (10), 3422–3435.
- (19) Ahmed, K.; Shiblee, M. N. I.; Khosla, A.; Nagahara, L.; Thundat, T.; Furukawa, H. *J. Electrochem. Soc.* **2020**, *167* (3), 037563.
- (20) Nguyen, Q. V.; Huynh, D. P.; Park, J. H.; Lee, D. S. *Eur. Polym. J.* **2015**, *72*, 602–619.
- (21) Doostmohammadi, M.; Ameri, A.; Mohammadinejad, R.; Dehghannoudeh, N.; Banat, I. M.; Ohadi, M.; Dehghannoudeh, G. *Drug Des. Devel. Ther.* **2019**, *13*, 3405–3418.
- (22) Drury, J. L.; Mooney, D. J. *Biomaterials* **2003**, *24* (24), 4337–4351.
- (23) Peppas, N. A.; Hilt, J. Z.; Khademhosseini, A.; Langer, R. *Adv. Mater.* **2006**, *18* (11), 1345–1360.
- (24) Fernández-Barbero, A.; Suárez, I. J.; Sierra-Martín, B.; Fernández-Nieves, A.; de las Nieves, F. J.; Marquez, M.; Rubio-Retama, J.; López-Cabarcos, E. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *147–148*, 88–108.
- (25) Zweep, N.; van Esch, J. H. in *Functional Molecular Gels*; ed. Escuder, B., Miravet, J. F., Royal Society of Chemistry, **2013**, chap. 1, pp 1–29.
- (26) Bhattacharya, S.; Maitra, U.; Mukhopadhyay, S.; Srivastava, A. in *Molecular Gels*; ed. Weiss, R. G., Terech, P., Springer, **2006**, chap. 17, pp 613–647.

- (27) Jong, J. M. J.; Feringa, B. L. in *Molecular Gels*; ed. Weiss, R. G., Terech, P., Springer, **2006**; chap. 26, pp 895–927.
- (28) Tsitsilianis, C. *Soft Matter* **2010**, *6* (11), 2372–2388.
- (29) Li, L.; Sun, R.; Zheng, R.; Huang, Y. *Mater. Des.* **2021**, *205*, 109759.
- (30) Okesola, B. O.; Smith, D. K. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (15), 4226–4251.
- (31) Zhang, L.; Wang, X.; Wang, T.; Liu, M. *Small* **2015**, *11* (9–10), 1025–1038.
- (32) Aida, T.; Meijer, E. W. *Isr. J. Chem.* **2020**, *60* (1–2), 33–47.
- (33) Fages, F. in *Low Molecular Mass Gelator*; Topics in Current Chemistry, Springer, **2005**, vol. 256.
- (34) Steed, J. W. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (5), 1379–1383.
- (35) Amabilino, D. B.; Smith, D. K.; Steed, J. W. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (9), 2404–2420.
- (36) Segarra-Maset, M. D.; Nebot, V. J.; Miravet, J. F.; Escuder, B. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (17), 7086–7098.
- (37) Muraoka, T.; Koh, C.-Y.; Cui, H.; Stupp, S. I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (32), 5946–5949.
- (38) Ikeda, M.; Tanida, T.; Yoshii, T.; Kurotani, K.; Onogi, S.; Urayama, K.; Hamachi, I. *Nat. Chem.* **2014**, *6* (6), 511–518.
- (39) Piepenbrock, M.-O. M.; Lloyd, G. O.; Clarke, N.; Steed, J. W. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (4), 1960–2004.
- (40) Escuder, B.; Rodríguez-Llansola, F.; Miravet, J. F. *New J. Chem.* **2010**, *34* (6), 1044–1054.
- (41) Mahmoud, Z. N.; Gunnoo, S. B.; Thomson, A. R.; Fletcher, J. M.; Woolfson, D. N. *Biomaterials* **2011**, *32* (15), 3712–3720.
- (42) Sun, H.-L.; Chuai, J.; Wei, H.; Zhang, X.; Yu, H. *J. Hazard. Mater.* **2019**, *366*, 46–53.
- (43) Yan, L.; Lv, M.; Su, C.; Zheng, L.; Li, J.; Ye, Z. *Soft Matter* **2017**, *13* (46), 8772–8780.
- (44) Webber, M. J.; Appel, E. A.; Meijer, E. W.; Langer, R. *Nat. Mater.* **2016**, *15* (1), 13–26.
- (45) Pan, P.; Chen, X.; Metavarayuth, K.; Su, J.; Wang, Q. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2018**, *35*, 104–111.
- (46) Iqbal, S.; Miravet, J. F.; Escuder, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *27*, 4580–4590.
- (47) van Esch, J. H.; Feringa, B. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39* (13), 2263–2266.
- (48) Skilling, K. J.; Ndungu, A.; Kellam, B.; Ashford, M.; Bradshaw, T. D.; Marlow, M. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2* (47), 8412–8417.
- (49) Estroff, L. A.; Hamilton, A. D. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (3), 1201–1218.
- (50) Graham, T. J. *Chem. Soc.* **1864**, *17*, 318–327.
- (51) Caló, E.; Khutoryanskiy, V. V. *Eur. Polym. J.* **2015**, *65*, 252–267.
- (52) Brown, T. E.; Anseth, K. S. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (21), 6532–6552.
- (53) Kopeček, J. *Biomaterials* **2007**, *28* (34), 5185–5192.
- (54) Ulijn, R. V. *Mater. Today* **2007**, *10* (4), 40–48.
- (55) Leijten, J.; Seo, J.; Yue, K.; Trujillo-de Santiago, G.; Tamayol, A.; Ruiz-Esparza, G. U.; Shin, S. R.; Sharifi, R.; Noshadi, I.; Álvarez, M. M.; Zhang, Y. S.; Khademhosseini, A. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2017**, *119*, 1–35.
- (56) Knipe, J. M.; Peppas, N. A. *Regen. Biomater.* **2014**, *1* (1), 57–65.



- (57) Collier, J. H.; Rudra, J. S.; Gasiorowski, J. Z.; Jung, J. P. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (9), 3413–3424.
- (58) Du, X.; Zhou, J.; Shi, J.; Xu, B. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (24), 13165–13307.
- (59) Lock, L. L.; Reyes, C. D.; Zhang, P.; Cui, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (10), 3533–3540.
- (60) Xu, T.; Liang, C.; Ji, S.; Ding, D.; Kong, D.; Wang, L.; Yang, Z. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (14), 7318–7323.
- (61) Zhang, S.; Ermann, J.; Succi, M. D.; Zhou, A. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2016**, *4*, *Conference Abstract: 10th World Biomaterials Congress*.
- (62) Norouzi, M.; Nazari, B.; Miller, D. W. *Drug Discov. Today* **2016**, *21* (11), 1835–1849.
- (63) Zhao, F.; Ma, M. L.; Xu, B. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (4), 883–891.
- (64) Lock, L. L.; Li, Y.; Mao, X.; Chen, H.; Staedtke, V.; Bai, R.; Ma, W.; Lin, R.; Li, Y.; Liu, G.; Cui, H. *ACS Nano* **2017**, *11* (1), 797–805.
- (65) Ren, C.; Wang, H.; Mao, D.; Zhang, X.; Fengzhao, Q.; Shi, Y.; Ding, D.; Kong, D.; Wang, L.; Yang, Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (16), 4823–4827.
- (66) Gao, Y.; Kuang, Y.; Guo, Z.-F.; Guo, Z.; Krauss, I. J.; Xu, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (38), 13576–13577.
- (67) Yang, Z.; Xu, K.; Wang, L.; Gu, H.; Wei, H.; Zhang, M.; Xu, B. *Chem. Commun.* **2005**, *35*, 4414–4416.
- (68) Wei, C.-W.; Gong, X.-Q.; Wang, X.-J.; Yang, X.-Z.; Gao, S.-Q.; Lin, Y.-W. *New J. Chem.* **2020**, *44* (18), 7265–7269.
- (69) Ng, V. W. L.; Chan, J. M. W.; Sardon, H.; Ono, R. J.; García, J. M.; Yang, Y. Y.; Hedrick, J. L. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *78*, 46–62.
- (70) Salick, D. A.; Pochan, D. J.; Schneider, J. P. *Adv. Mater.* **2009**, *21* (41), 4120–4123.
- (71) Beniash, E.; Hartgerink, J. D.; Storrer, H.; Stendahl, J. C.; Stupp, S. I. *Acta Biomater.* **2005**, *1* (4), 387–397.
- (72) Chassenieux, C.; Tsitsilianis, C. *Soft Matter* **2016**, *12* (5), 1344–1359.
- (73) Montheil, T.; Echaliier, C.; Martinez, J.; Subra, G.; Mehdi, A. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (21), 3434–3448.
- (74) Sanchez, C.; Soler-Illia, G. J. de A. A.; Ribot, F.; Lalot, T.; Mayer, C. R.; Cabuil, V. *Chem. Mater.* **2001**, *13* (10), 3061–3083.
- (75) Levin, A.; Hakala, T. A.; Schnaider, L.; Bernardes, G. J. L.; Gazit, E.; Knowles, T. P. J. *Nat. Rev. Chem.* **2020**, *4* (11), 615–634.
- (76) Valot, L.; Maumus, M.; Brunel, L.; Martinez, J.; Amblard, M.; Noël, D.; Mehdi, A.; Subra, G. *Gels* **2021**, *7* (2), 73.
- (77) Datta, S.; Bhattacharya, S. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (15), 5596–5637.
- (78) Zhang, X.; Liu, J.; Gao, Y.; Hao, J.; Hu, J.; Ju, Y. *Soft Matter* **2019**, *15* (23), 4662–4668.
- (79) Hu, Y.; Niemeyer, C. M. *Adv. Mater.* **2019**, *31* (26), 1806294.
- (80) Araki, K.; Yoshikawa, I. in *Low Molecular Mass Gelator*; Topics in Current Chemistry, Springer, **2005**, vol. 256., chap. 4, pp 133–165.
- (81) De Leon Rodriguez, L. M.; Hemar, Y.; Cornish, J.; Brimble, M. A. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (17), 4797–4824.

- (82) Mondal, S.; Das, S.; Nandi, A. K. *Soft Matter* **2020**, *16* (6), 1404–1454.
- (83) Dasgupta, A.; Mondal, J. H.; Das, D. *RSC Adv.* **2013**, *3* (24), 9117–9149.
- (84) Stephanopoulos, N.; Ortony, J. H.; Stupp, S. I. *Acta Mater.* **2013**, *61* (3), 912–930.
- (85) Sun, L.; Zheng, C.; Webster, T. *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *12*, 73–86.
- (86) Bowerman, C. J.; Nilsson, B. L. *Biopolymers* **2012**, *98* (3), 169–184.
- (87) Li, J.; Xing, R.; Bai, S.; Yan, X. *Soft Matter* **2019**, *15* (8), 1704–1715.
- (88) Hong, A.; Aguilar, M.-I.; Del Borgo, M. P.; Sobey, C. G.; Broughton, B. R. S.; Forsythe, J. *S. J. Mater. Chem. B* **2019**, *7* (25), 3927–3943.
- (89) Loo, Y.; Wong, Y.-C.; Cai, E. Z.; Ang, C.-H.; Raju, A.; Lakshmanan, A.; Koh, A. G.; Zhou, H. J.; Lim, T.-C.; Moochhala, S. M.; Hauser, C. A. E. *Biomaterials* **2014**, *35* (17), 4805–4814.
- (90) Chen, G.; Li, J.; Song, M.; Wu, Z.; Zhang, W.; Wang, Z.; Gao, J.; Yang, Z.; Ou, C. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27* (34), 1701798.
- (91) Cheng, T.-Y.; Chen, M.-H.; Chang, W.-H.; Huang, M.-Y.; Wang, T.-W. *Biomaterials* **2013**, *34* (8), 2005–2016.
- (92) Cigognini, D.; Satta, A.; Colleoni, B.; Silva, D.; Donega, M.; Gelain, F. *PLoS One* **2011**, *6* (5), e19782.
- (93) Jung, J. P.; Gasiorowski, J. Z.; Collier, J. H. *Biopolymers* **2010**, *94* (1), 49–59.
- (94) Jayawarna, V.; Ali, M.; Jowitt, T. A.; Miller, A. F.; Saiani, A.; Gough, J. E.; Ulijn, R. V. *Adv. Mater.* **2006**, *18* (5), 611–614.
- (95) Yang, Z.; Xu, H.; Zhao, X. *Adv. Sci.* **2020**, *7* (9), 1903718.
- (96) Hellmund, K. S.; Kokschi, B. *Front. Chem.* **2019**, *7*, 172.
- (97) Shah, A.; Malik, M. S.; Khan, G. S.; Nosheen, E.; Iftikhar, F. J.; Khan, F. A.; Shukla, S. S.; Akhter, M. S.; Kraatz, H.-B.; Aminabhavi, T. M. *Chem. Eng. J.* **2018**, *353*, 559–583.
- (98) Li, Y.; Wang, F.; Cui, H. *Bioeng. Transl. Med.* **2016**, *1* (3), 306–322.
- (99) Segers, V.; Lee, R. *Drug Discov. Today* **2007**, *12* (13–14), 561–568.
- (100) Liu, C.; Zhang, Q.; Zhu, S.; Liu, H.; Chen, J. *RSC Adv.* **2019**, *9* (48), 28299–28311.
- (101) Wang, H.; Feng, Z.; Xu, B. *Theranostics* **2019**, *9* (11), 3213–3222.
- (102) Shah, R. N.; Shah, N. A.; Del Rosario Lim, M. M.; Hsieh, C.; Nuber, G.; Stupp, S. I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107* (8), 3293–3298.
- (103) Kim, S.; Kim, J. H.; Lee, J. S.; Park, C. B. *Small* **2015**, *11* (30), 3623–3640.
- (104) Wei, G.; Su, Z.; Reynolds, N. P.; Arosio, P.; Hamley, I. W.; Gazit, E.; Mezzenga, R. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (15), 4661–4708.
- (105) Makam, P.; Gazit, E. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (10), 3406–3420.
- (106) Stefan, L. in *Amino Acid – New Insights and Roles in Plant and Animal*; ed. Asao, T., Asaduzzaman, M., InTech, **2017**, chap. 3, pp 31–73
- (107) Burgess, K. A.; Workman, V. L.; Elsayy, M. A.; Miller, A. F.; Oceandy, D.; Saiani, A. *PLoS One* **2018**, *13* (6), e0197517.
- (108) Tomasini, C.; Castellucci, N. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 156–172.
- (109) Rajbhandary, A.; Nilsson, B. L. *Pept. Sci.* **2017**, *108*, e22994.
- (110) Ibrahim, M. I. A.; Pickaert, G.; Stefan, L.; Jamart-Grégoire, B.; Bodiguel, J.; Averlant-Petit, M.-C. *RSC Adv.* **2020**, *10* (71), 43859–43869.

- (111) Milli, L.; Zanna, N.; Merlettini, A.; Di Giosia, M.; Calvaresi, M.; Focarete, M. L.; Tomasini, C. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22* (34), 12106–12112.
- (112) Zanna, N.; Focaroli, S.; Merlettini, A.; Gentilucci, L.; Teti, G.; Falconi, M.; Tomasini, C. *ACS Omega* **2017**, *2* (5), 2374–2381.
- (113) Nguyen, M. M.; Eckes, K. M.; Suggs, L. J. *Soft Matter* **2014**, *10* (15), 2693–2702.
- (114) Chronopoulou, L.; Sennato, S.; Bordi, F.; Giannella, D.; Di Nitto, A.; Barbetta, A.; Dentini, M.; Togna, A. R.; Togna, G. I.; Moschini, S.; Palocci, C. *Soft Matter* **2014**, *10* (12), 1944–1952.
- (115) Bowerman, C. J.; Liyanage, W.; Federation, A. J.; Nilsson, B. L. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (7), 2735–2745.
- (116) Aggeli, A.; Bell, M.; Boden, N.; Carrick, L. M.; Strong, A. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (45), 5603–5606.
- (117) Ryan, D. M.; Doran, T. M.; Nilsson, B. L. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 475–477.
- (118) Ryan, D. M.; Doran, T. M.; Nilsson, B. L. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 11145–11156.
- (119) Pizzi, A.; Pigliacelli, C.; Gori, A.; Ikkala, O.; Demitri, N.; Terraneo, G.; Castelletto, V.; Hamley, I. W.; Bombelli, F. B.; Metrangolo, P. *Nanoscale* **2017**, *9*, 9805–9810.
- (120) Fleming, S.; Debnath, S.; Frederix, P. W. J. M.; Hunt, N. T.; Ulijn, R. V. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (4), 1171–1184.
- (121) Adler-Abramovich, L.; Gazit, E. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (20), 6881–6893.
- (122) Smith, A. M.; Williams, R. J.; Tang, C.; Coppo, P.; Collins, R. F.; Turner, M. L.; Saiani, A.; Ulijn, R. V. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 37–41.
- (123) Orbach, R.; Mironi-Harpaz, I.; Adler-Abramovich, L.; Mossou, E.; Mitchell, E. P.; Forsyth, V. T.; Gazit, E.; Seliktar, D. *Langmuir* **2012**, *28* (4), 2015–2022.
- (124) Morris, K. L.; Chen, L.; Rodger, A.; Adams, D. J.; Serpell, L. C. *Soft Matter* **2015**, *11* (6), 1174–1181.
- (125) Zhao, X.; Pan, F.; Xu, H.; Yaseen, M.; Shan, H.; Hauser, C. A. E.; Zhang, S.; Lu, J. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (9), 3480–3498.
- (126) Dehsorkhi, A.; Castelletto, V.; Hamley, I. W. *J. Pept. Sci.* **2014**, *20* (7), 453–467.
- (127) Castelletto, V.; Hamley, I. W.; Whitehouse, C.; Matts, P. J.; Osborne, R.; Baker, E. S. *Langmuir* **2013**, *29*, 9149–9155.
- (128) Castelletto, V.; Hamley, I. W.; Perez, J.; Abezgauz, L.; Danino, D. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (48), 9185.
- (129) Dehsorkhi, A.; Castelletto, V.; Hamley, I. W.; Lindner, P. *Soft Matter* **2012**, *8* (33), 8608–8615.
- (130) Das, R.; Gayakvad, B.; Shinde, S. D.; Rani, J.; Jain, A.; Sahu, B. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3* (9), 5474–5499.
- (131) Li, X.; Kuang, Y.; Xu, B. *Soft Matter* **2012**, *8* (10), 2801–2806.
- (132) Li, X.; Du, X.; Li, J.; Gao, Y.; Pan, Y.; Shi, J.; Zhou, N.; Xu, B. *Langmuir* **2012**, *28* (37), 13512–13517.
- (133) DiMaio, J. T. M.; Doran, T. M.; Ryan, D. M.; Raymond, D. M.; Nilsson, B. L. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (11), 3591–3599.

- (134) Tsuzuki, T.; Kabumoto, M.; Arakawa, H.; Ikeda, M. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (21), 4595–4600.
- (135) Restuccia, A.; Seroski, D. T.; Kelley, K. L.; O'Bryan, C. S.; Kurian, J. J.; Knox, K. R.; Farhadi, S. A.; Angelini, T. E.; Hudalla, G. A. *Commun. Chem.* **2019**, *2*, 53.
- (136) Roviello, G. N.; Benedetti, E.; Pedone, C.; Bucci, E. M. *Amino Acids* **2010**, *39*, 45–57.
- (137) MacCulloch, T.; Buchberger, A.; Stephanopoulos, N. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (7), 1668–1682.
- (138) Scognamiglio, P. L.; Platella, C.; Napolitano, E.; Musumeci, D.; Roviello, G. N. *Molecules* **2021**, *26* (12), 3558.
- (139) Bandela, A. K.; Wagner, N.; Sadihov, H.; Morales-Reina, S.; Chotera-Ouda, A.; Basu, K.; Cohen-Luria, R.; de la Escosura, A.; Ashkenasy, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118* (9), e2015285118.
- (140) Noblett, A. D.; Baek, K.; Suggs, L. J. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, *7* (6), 2605–2614.
- (141) Mergny, J.-L.; Sen, D. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (10), 6290–6325.
- (142) Hu, Y.; Ceconello, A.; Idili, A.; Ricci, F.; Willner, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (48), 15210–15233.
- (143) Kaushik, M.; Kaushik, S.; Roy, K.; Singh, A.; Mahendru, S.; Kumar, M.; Chaudhary, S.; Ahmed, S.; Kukreti, S. *Biochem. Biophys. Rep.* **2016**, *5*, 388–395.
- (144) Sessler, J. L.; Lawrence, C. M.; Jayawickramarajah, J. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (2), 314–325.
- (145) Sessler, J. L.; Jayawickramarajah, J. *Chem. Commun.* **2005**, *15*, 1939–1949.
- (146) Sivakova, S.; Rowan, S. J. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 9–21.
- (147) Kogiso, M.; Hanada, T.; Yase, K.; Shimizu, T. *Chem. Commun.* **1998**, *17*, 1791–1792.
- (148) Giraud, T.; Bouguet-Bonnet, S.; Marchal, P.; Pickaert, G.; Averlant-Petit, M.-C.; Stefan, L. *Nanoscale* **2020**, *12* (38), 19905–19917.
- (149) Shundo, A.; Mizuguchi, K.; Miyamoto, M.; Goto, M.; Tanaka, K. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (31), 8844–8846.
- (150) Morris, A. M.; Watzky, M. A.; Finke, R. G. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **2009**, *1794* (3), 375–397.
- (151) Yuan, D.; Du, X.; Shi, J.; Zhou, N.; Baoum, A. A.; Xu, B. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2406–2413.
- (152) Stupp, S. I. *Adv. Mater.* **2020**, *32* (20), 1906741.
- (153) Das, A.; Molla, M. R.; Ghosh, S. *J. Chem. Sci.* **2011**, *123* (6), 963–973.
- (154) Elsayy, M. A.; Smith, A. M.; Hodson, N.; Squires, A.; Miller, A. F.; Saiani, A. *Langmuir* **2016**, *32* (19), 4917–4923.
- (155) Leon, E. J.; Verma, N.; Shuguang Zhang; Lauffenburger, D. A.; Kamm, R. D. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1998**, *9* (3), 297–312.
- (156) Buwalda, S. J.; Boere, K. W. M.; Dijkstra, P. J.; Feijen, J.; Vermonden, T.; Hennink, W. E. *J. Control. Release* **2014**, *190*, 254–273.
- (157) Yu, L.; Dean, K.; Li, L. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31* (6), 576–602.
- (158) Koning, C. *Prog. Polym. Sci.* **1998**, *23* (4), 707–757.

- (159) Sperling, L. H. in *Polymeric Multicomponent Materials : An Introduction*; John Wiley & Sons, **1997**.
- (160) Feng, L.; Wang, K.-Y.; Day, G. S.; Zhou, H.-C. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48* (18), 4823–4853.
- (161) Davies, R. P. W.; Aggeli, A.; Beevers, A. J.; Boden, N.; Carrick, L. M.; Fishwick, C. W. G.; Mcleish, T. C. B.; Nyrkova, I.; Semenov, A. N. *Supramol. Chem.* **2006**, *18* (5), 435–443.
- (162) Hirst, A. R.; Smith, D. K. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11* (19), 5496–5508.
- (163) Gasiorowski, J. Z.; Collier, J. H. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (10), 3549–3558.
- (164) Raymond, D. M.; Nilsson, B. L. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (10), 3659–3720.
- (165) Fan, K.; Kong, H.; Wang, X.; Yang, X.; Song, J. *RSC Adv.* **2016**, *6* (84), 80934–80938.
- (166) Gao, J.; Tang, C.; Elsayy, M. A.; Smith, A. M.; Miller, A. F.; Saiani, A. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (3), 826–834.
- (167) Amemiya, R.; Mizutani, M.; Yamaguchi, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (11), 1995–1999.
- (168) Buerkle, L. E.; Rowan, S. J. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (18), 6089–6102.
- (169) Li, D.; Shi, Y.; Wang, L. *Chin. J. Chem.* **2014**, *32* (2), 123–127.
- (170) Draper, E. R.; Dietrich, B.; Brasnett, C.; Sproules, S.; McDonald, T. O.; Seddon, A. M.; Adams, D. J. *Macromol. Rapid Commun.* **2018**, *39* (17), 1700746.
- (171) Giraud, T.; Bouguet-Bonnet, S.; Stébé, M.-J.; Richaudeau, L.; Pickaert, G.; Averlant-Petit, M.-C.; Stefan, L. *Nanoscale* **2021**, 19905–19917.
- (172) Ramachandran, S.; Taraban, M. B.; Trehwella, J.; Gryczynski, I.; Gryczynski, Z.; Yu, Y. B. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1502–1506.
- (173) Behanna, H. A.; Donners, J. J. J. M.; Gordon, A. C.; Stupp, S. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (4), 1193–1200.
- (174) Ramachandran, S.; Tseng, Y.; Yu, Y. B. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (3), 1316–1321.
- (175) King, P. J. S.; Lizio, M. G.; Booth, A.; Collins, R. F.; Gough, J. E.; Miller, A. F.; Webb, S. J. *Soft Matter* **2016**, *12*, 1915–1923.
- (176) Escuder, B.; Martí, S.; Miravet, J. F. *Langmuir* **2005**, *21*, 6776–6787.
- (177) Bischoff, R.; Schlüter, H. J. *Proteomics* **2012**, *75* (8), 2275–2296.
- (178) Lopez de la Paz, M.; Goldie, K.; Zurdo, J.; Lacroix, E.; Dobson, C. M.; Hoenger, A.; Serrano, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99* (25), 16052–16057.
- (179) Kasai, S.; Ohga, Y.; Mochizuki, M.; Nishi, N.; Kadoya, Y.; Nomizu, M. *Biopolymers* **2004**, *76*, 27–33.
- (180) Reches, M.; Gazit, E. *Isr. J. Chem.* **2005**, *45* (3), 363–371.
- (181) Woolfson, D.; Ryadnov, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10* (6), 559–567.
- (182) Woolfson, D. N. *Biopolymers* **2010**, *94* (1), 118–127.
- (183) Löwik, D. W. P. M.; Leunissen, E. H. P.; van den Heuvel, M.; Hansen, M. B.; van Hest, J. C. M. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (9), 3394–3412.
- (184) Yan, C.; Pochan, D. J. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (9), 3528–3540.
- (185) Rudra, J. S.; Tripathi, P. K.; Hildeman, D. A.; Jung, J. P.; Collier, J. H. *Biomaterials* **2010**, *31* (32), 8475–8483.

- (186) Ilawe, N. V.; Schweitzer-Stenner, R.; DiGiuseppi, D.; Wong, B. M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20* (27), 18158–18168.
- (187) Jarett, J.; Lansbury, P. *Cell* **1993**, *73*, 1055–1058.
- (188) Aggeli, A.; Bell, M.; Carrick, L. M.; Fishwick, C. W. G.; Harding, R.; Mawer, P. J.; Radford, S. E.; Strong, A. E.; Boden, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (32), 9619–9628.
- (189) Aggeli, A.; Nyrkova, I. A.; Bell, M.; Harding, R.; Carrick, L.; McLeish, T. C. B.; Semenov, A. N.; Boden, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98* (21), 11857–11862.
- (190) Kyle, S.; Aggeli, A.; Ingham, E.; McPherson, M. J. *Biomaterials* **2010**, *31* (36), 9395–9405.
- (191) Ceci, M.; Mirando, M. *Scanning* **2016**, *38* (344–351).
- (192) Schneider, J. P.; Pochan, D. J.; Ozbas, B.; Rajagopal, K.; Pakstis, L.; Kretsinger, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (50), 15030–15037.
- (193) Ozbas, B.; Kretsinger, J.; Rajagopal, K.; Schneider, J. P.; Pochan, D. J. *Macromolecules* **2004**, *37* (19), 7331–7337.
- (194) Kretsinger, J. K.; Haines, L. A.; Ozbas, B.; Pochan, D. J.; Schneider, J. P. *Biomaterials* **2005**, *26* (25), 5177–5186.
- (195) Worthington, P.; Langhans, S.; Pochan, D. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *110–111*, 127–136.
- (196) Salick, D. A.; Kretsinger, J. K.; Pochan, D. J.; Schneider, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (47), 14793–14799.
- (197) Haines-Butterick, L.; Rajagopal, K.; Branco, M.; Salick, D.; Rughani, R.; Pilarz, M.; Lamm, M. S.; Pochan, D. J.; Schneider, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104* (19), 7791–7796.
- (198) Altunbas, A.; Lee, S. J.; Rajasekaran, S. A.; Schneider, J. P.; Pochan, D. J. *Biomaterials* **2011**, *32* (25), 5906–5914.
- (199) Sun, J. E. P.; Stewart, B.; Litan, A.; Lee, S. J.; Schneider, J. P.; Langhans, S. A.; Pochan, D. J. *Biomater. Sci.* **2016**, *4* (5), 839–848.
- (200) Lindsey, S.; Piatt, J. H.; Worthington, P.; Sönmez, C.; Satheye, S.; Schneider, J. P.; Pochan, D. J.; Langhans, S. A. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (9), 2672–2683.
- (201) Chen, C.; Gu, Y.; Deng, L.; Han, S.; Sun, X.; Chen, Y.; Lu, J. R.; Xu, H. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (16), 14360–14368.
- (202) Zhang, S.; Lockshin, C.; Rich, A.; Holmes, T. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3334–3338.
- (203) Zhang, S.; Lockshin, C.; Cook, R.; Rich, A. *Biopolymers* **1994**, *34* (5), 663–672.
- (204) Zhang, S.; Holmes, T. C.; DiPersio, C. M.; Hynes, R. O.; Su, X.; Rich, A. *Biomaterials* **1995**, *16* (18), 1385–1393.
- (205) Davis, M. E.; Hsieh, P. C. H.; Takahashi, T.; Song, Q.; Zhang, S.; Kamm, R. D.; Grodzinsky, A. J.; Anversa, P.; Lee, R. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103* (21), 8155–8160.
- (206) Koutsopoulos, S.; Zhang, S. *J. Control Release* **2012**, *160* (3), 451–458.
- (207) Ellis-Behnke, R. G.; Liang, Y.-X.; You, S.-W.; Tay, D. K. C.; Zhang, S.; So, K.-F.; Schneider, G. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103* (13), 5054–5059.

- (208) Luo, Z.; Wang, S.; Zhang, S. *Biomaterials* **2011**, *32* (8), 2013–2020.
- (209) Narmoneva, D. A.; Oni, O.; Sieminski, A. L.; Zhang, S.; Gertler, J. P.; Kamm, R. D.; Lee, R. T. *Biomaterials* **2005**, *26* (23), 4837–4846.
- (210) Genové, E.; Shen, C.; Zhang, S.; Semino, C. E. *Biomaterials* **2005**, *26* (16), 3341–3351.
- (211) Gelain, F.; Bottai, D.; Vescovi, A.; Zhang, S. *PLoS One* **2006**, *1* (1), e119.
- (212) Holmes, T. C.; de Lacalle, S.; Su, X.; Liu, G.; Rich, A.; Zhang, S. *Med. Sci.* **2000**, *97* (12), 6728–6733.
- (213) Hynes, R. O.; Lander, A. D. *Cell* **1992**, *68* (2), 303–322.
- (214) Seow, W. Y.; Hauser, C. A. E. *Mater. Today* **2014**, *17* (8), 381–388.
- (215) Branco, M. C.; Nettesheim, F.; Pochan, D. J.; Schneider, J. P.; Wagner, N. J. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (6), 1374–1380.
- (216) Collier, J. H.; Hu, B.; Ruberti, J. W.; Zhang, J.; Shum, P.; Thompson, D. H.; Messersmith, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (38), 9463–9464.
- (217) Kisiday, J.; Jin, M.; Kurz, B.; Hung, H.; Semino, C.; Zhang, S.; Grodzinsky, A. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99* (15), 9996–10001.
- (218) Caplan, M. R.; Schwartzfarb, E. M.; Zhang, S.; Kamm, R. D.; Lauffenburger, D. A. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2002**, *13* (3), 225–236.
- (219) Kumada, Y.; Hammond, N. A.; Zhang, S. *Soft Matter* **2010**, *6* (20), 5073–5079.
- (220) Mohammed, A.; Miller, A. F.; Saiani, A. *Macromol. Symp.* **2007**, *251*, 88–95.
- (221) Wang, K.; Keasling, J. D.; Muller, S. J. *Int. J. Biol. Macromol.* **2005**, *36* (4), 232–240.
- (222) Caplan, M. R.; Schwartzfarb, E. M.; Zhang, S.; Kamm, R. D.; Lauffenburger, D. A. *Biomaterials* **2002**, *23*, 219–227.
- (223) Caplan, M. R.; Lauffenburger, D. A. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2002**, *41* (3), 403–412.
- (224) Marini, D. M.; Hwang, W.; Lauffenburger, D. A.; Zhang, S.; Kamm, R. D. *Nano Lett.* **2002**, *2* (4), 295–299.
- (225) Boothroyd, S.; Saiani, A.; Miller, A. F. *Macromol. Symp.* **2008**, *273*, 139–145.
- (226) Saiani, A.; Mohammed, A.; Frielinghaus, H.; Collins, R.; Hodson, N.; Kielty, C. M.; Sherratt, M. J.; Miller, A. F. *Soft Matter* **2009**, *5*, 193–202.
- (227) Boothroyd, S.; Miller, A. F.; Saiani, A. *Faraday Discuss.* **2013**, *166*, 195.
- (228) Tang, C.; Miller, A. F.; Saiani, A. *Int. J. Pharm.* **2014**, *465* (1–2), 427–435.
- (229) Mujeeb, A.; Miller, A. F.; Saiani, A.; Gough, J. E. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 4609–4617.
- (230) Wan, S.; Borland, S.; Richardson, S. M.; Merry, C. L. R.; Saiani, A.; Gough, J. E. *Acta Biomater.* **2016**, *46*, 29–40.
- (231) Li, L.; Li, J.; Guo, J.; Zhang, H.; Zhang, X.; Yin, C.; Wang, L.; Zhu, Y.; Yao, Q. *Adv. Funct. Mater.* **2019**, *29* (6), 1807356.
- (232) Castillo Diaz, L. A.; Saiani, A.; Gough, J. E.; Miller, A. F. *J. Tissue Eng.* **2014**, *5*, 1–12.
- (233) Szkolar, L.; Guilbaud, J.-B.; Miller, A. F.; Gough, J. E.; Saiani, A. *J. Pept. Sci.* **2014**, *20* (7), 578–584.
- (234) Castillo Diaz, L. A.; Elsayy, M.; Saiani, A.; Gough, J. E.; Miller, A. F. *J. Tissue Eng.* **2016**, *7*, 1–15.

- (235) Burgess, K. A.; Frati, C.; Meade, K.; Gao, J.; Castillo Diaz, L.; Madeddu, D.; Graiani, G.; Cavalli, S.; Miller, A. F.; Oceandy, D.; Quaini, F.; Saiani, A. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *119*, 111539.
- (236) Dubey, N.; Ferreira, J. A.; Malda, J.; Bhaduri, S. B.; Bottino, M. C. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12* (21), 23752–23763.
- (237) Martin, C.; Dumitrascuta, M.; Mannes, M.; Lantero, A.; Bucher, D.; Walker, K.; Van Wanseele, Y.; Oyen, E.; Hernot, S.; Van Eeckhaut, A.; Madder, A.; Hoogenboom, R.; Spetea, M.; Ballet, S. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (21), 9784–9789.
- (238) Du, X.; Zhou, J.; Guvench, O.; Sangiorgi, F. O.; Li, X.; Zhou, N.; Xu, B. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (6), 1031–1035.
- (239) Xu, B. *Langmuir* **2009**, *25* (15), 8375–8377.
- (240) Lawson, C. P.; Füchtbauer, A. F.; Wranne, M. S.; Giraud, T.; Floyd, T.; Dumat, B.; Andersen, N. K.; H. El-Sagheer, A.; Brown, T.; Gradén, H.; Wilhelmsson, L. M.; Grøtli, M. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13970.
- (241) Saito, Y.; Hudson, R. H. E. *J. Photochem. Photobiol. C* **2018**, *36*, 48–73.
- (242) Hocek, M.; Fojta, M. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5802–5814.
- (243) Collado, A.; Gómez-Gallego, M.; Sierra, M. A. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *2018* (14), 1617–1623.
- (244) Ivancová, I.; Leone, D.-L.; Hocek, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *52*, 136–144.
- (245) Bucci, R.; Bossi, A.; Erba, E.; Vaghi, F.; Saha, A.; Yuran, S.; Maggioni, D.; Gelmi, M. L.; Reches, M.; Pellegrino, S. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 19331.
- (246) Sharma, C.; Awasthi, S. K. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, *89*, 16–37.
- (247) Uhlmann, E.; Peyman, A.; Breipohl, G.; Will, D. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37* (20), 2796–2823.
- (248) Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S. M.; Driver, D. A.; Berg, R. H.; Kim, S. K.; Norden, B.; Nielsen, P. E. *Nature* **1993**, *365* (6446), 566–568.
- (249) Saabach, J.; Sabale, P. M.; Winssinger, N. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *52*, 112–124.
- (250) Quijano, E.; Bahal, R.; Ricciardi, A.; Saltzman, W. M.; Glazer, P. M. *Yale J. Biol. Med.* **2017**, *90*, 583–598.
- (251) Katritzky, A. R.; Narindoshvili, T. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (17), 3171–3176.
- (252) Calabretta, A.; Tedeschi, T.; Di Cola, G.; Corradini, R.; Sforza, S.; Marchelli, R. *Mol. Biosyst.* **2009**, *5* (11), 1323–1330.
- (253) Roviello, G. N.; Musumeci, D.; Moccia, M.; Castiglione, M.; Cesarani, A.; Bucci, E. M.; Saviano, M.; Pedone, C.; Benedetti, E. *J. Pept. Sci.* **2009**, *15* (3), 147–154.
- (254) Roviello, G. N.; Musumeci, D.; Bucci, E. M.; Pedone, C. *Amino Acids* **2012**, *43* (6), 2537–2543.
- (255) Dragulescu-Andrasi, A.; Rapireddy, S.; He, G.; Bhattacharya, B.; Hyldig-Nielsen, J. J.; Zon, G.; Ly, D. H. *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 16104–16112.
- (256) Sugiyama, T.; Kittaka, A. *Molecules* **2012**, *18*, 287–310.
- (257) Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E.; Berg, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (5), 1895–1897.



- (258) Shakeel, S.; Karim, S.; Ali, A. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, *81* (6), 892–899.
- (259) Demidov, V. V.; Potaman, V. N.; Frank-Kamenetskii, M. D.; Egholm, M.; Buchard, O.; Sönnichsen, S. H.; Nielsen, P. E. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48* (6), 1310–1313.
- (260) Hyrup, B.; Nielsen, P. E. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4* (1), 5–23.
- (261) Singh, K. R.; Sridevi, P.; Singh, R. P. *Eng. Rep.* **2020**, *2* (9), e12238.
- (262) Bonifazi, D.; Carloni, L.-E.; Corvaglia, V.; Delforge, A. *Artif. DNA PNA XNA* **2012**, *3* (3), 112–122.
- (263) Berger, O.; Adler-Abramovich, L.; Levy-Sakin, M.; Grunwald, A.; Liebes-Peer, Y.; Bachar, M.; Buzhansky, L.; Mossou, E.; Forsyth, V. T.; Schwartz, T.; Ebenstein, Y.; Frolow, F.; Shimon, L. J. W.; Patolsky, F.; Gazit, E. *Nat. Nanotechnol.* **2015**, *10* (4), 353–360.
- (264) Avitabile, C.; Diaferia, C.; Della Ventura, B.; Mercurio, F. A.; Leone, M.; Roviello, V.; Saviano, M.; Velotta, R.; Morelli, G.; Accardo, A.; Romanelli, A. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24* (18), 4729–4735.
- (265) Leontis, N. B. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (16), 3497–3531.
- (266) Saenger, W. in *Principles of Nucleic Acid Structure*; ed. Cantor, C. R., Springer, **1984**.
- (267) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, *171* (4356), 737–738.
- (268) Surin, M.; Ulrich, S. *ChemistryOpen* **2020**, *9* (4), 480–498.
- (269) Dash, J.; Saha, P. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (7), 2157–2163.
- (270) Zhang, D. Y.; Seelig, G. *Nat. Chem.* **2011**, *3* (2), 103–113.
- (271) Simmel, F. C.; Yurke, B.; Singh, H. R. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (10), 6326–6369.
- (272) Ong, L. L.; Hanikel, N.; Yaghi, O. K.; Grun, C.; Strauss, M. T.; Bron, P.; Lai-Kee-Him, J.; Schueder, F.; Wang, B.; Wang, P.; Kishi, J. Y.; Myhrvold, C.; Zhu, A.; Jungmann, R.; Bellot, G.; Ke, Y.; Yin, P. *Nature* **2017**, *552* (7683), 72–77.
- (273) Rothmund, P. W. K. *Nature* **2006**, *440* (7082), 297–302.
- (274) Seeman, N. C. *Mol. Biotechnol.* **2007**, *37* (3), 246–257.
- (275) Andersen, E. S.; Dong, M.; Nielsen, M. M.; Jahn, K.; Lind-Thomsen, A.; Mamdouh, W.; Gothelf, K. V.; Besenbacher, F.; Kjems, J. *ACS Nano* **2008**, *2* (6), 1213–1218.
- (276) Afonin, K. A. in *Nucleic Acid Architectures for Therapeutics, Diagnostics, Devices and Materials*; ed. Afonin, K. A., MDPI, **2019**.
- (277) Winfree, E.; Liu, F.; Wenzler, L. A.; Seeman, N. C. *Nature* **1998**, *394* (6693), 539–544.
- (278) Park, S. H.; Yan, H.; Reif, J. H.; LaBean, T. H.; Finkelstein, G. *Nanotechnology* **2004**, *15* (10), S525–S527.
- (279) Wei, B.; Dai, M.; Yin, P. *Nature* **2012**, *485* (7400), 623–626.
- (280) Gwak, S.-J.; Lee, J. S. *Nanomaterials* **2019**, *9* (4), 573.
- (281) Caffery, B.; Lee, J.; Alexander-Bryant, A. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 105.
- (282) Yousaf, S.; King, P. J. S.; Miller, A. F.; Saiani, A.; Clarke, D. J.; Trivoluzzi, L. T.; Aojula, H. S.; Bichenkova, E. V. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (15), 10016–10025.
- (283) Iwaura, R.; Yoshida, K.; Masuda, M.; Yase, K.; Shimizu, T. *Chem. Mater.* **2002**, *14* (7), 3047–3053.
- (284) Godeau, G.; Barthélémy, P. *Langmuir* **2009**, *25* (15), 8447–8450.
- (285) Sreenivasachary, N.; Lehn, J.-M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102* (17), 5938–5943.

- (286) Buchs (née Levrard), B.; Fieber, W.; Vigouroux-Elie, F.; Sreenivasachary, N.; Lehn, J.-M.; Herrmann, A. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (8), 2906–2919.
- (287) Angelierou, M. G. F.; Frederix, P. W. J. M.; Wallace, M.; Yang, B.; Rodger, A.; Adams, D. J.; Marlow, M.; Zelzer, M. *Langmuir* **2018**, *34* (23), 6912–6921.
- (288) Moreau, L.; Barthélémy, P.; El Maataoui, M.; Grinstaff, M. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (24), 7533–7539.
- (289) Buhler, E.; Sreenivasachary, N.; Candau, S.-J.; Lehn, J.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (33), 10058–10059.
- (290) Bhattacharyya, T.; Saha, P.; Dash, J. *ACS Omega* **2018**, *3* (2), 2230–2241.
- (291) Dash, J.; Patil, A. J.; Das, R. N.; Dowdall, F. L.; Mann, S. *Soft Matter* **2011**, *7* (18), 8120–8126.
- (292) Deshpande, S. R.; Hammink, R.; Das, R. K.; Nelissen, F. H. T.; Blank, K. G.; Rowan, A. E.; Heus, H. A. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26* (48), 9075–9082.
- (293) Deshpande, S. R.; Hammink, R.; Nelissen, F. H. T.; Rowan, A. E.; Heus, H. A. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (10), 3310–3317.
- (294) Xu, W.; Huang, Y.; Zhao, H.; Li, P.; Liu, G.; Li, J.; Zhu, C.; Tian, L. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (72), 18276–18281.
- (295) Dolman, N. P.; More, J. C. A.; Alt, A.; Knauss, J. L.; Troop, H. M.; Bleakman, D.; Collingridge, G. L.; Jane, D. E. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (8), 2579–2592.
- (296) Mik, V.; Mičková, Z.; Doležal, K.; Frébort, I.; Pospíšil, T. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80* (7), 2136–2140.
- (297) Roviello, G. N.; Musumeci, D.; Castiglione, M.; Bucci, E. M.; Pedone, C.; Benedetti, E. *J. Pept. Sci.* **2009**, *15* (3), 155–160.
- (298) Geotti-Bianchini, P.; Beyrath, J.; Chaloin, O.; Formaggio, F.; Bianco, A. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (20), 3661–3663.
- (299) Wu, Y.; Li, C.; Boldt, F.; Wang, Y.; Kuan, S. L.; Tran, T. T.; Mikhalevich, V.; Förtsch, C.; Barth, H.; Yang, Z.; Liu, D.; Weil, T. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (93), 14620–14622.
- (300) Stephanopoulos, N. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30* (7), 1915–1922.
- (301) Juodka, B. A. *Nucleosides Nucleotides* **1984**, *3* (5), 445–483.
- (302) Kuyl-Yeheskiely, E.; Dreef-Tromp, C. M.; Geluk, A. *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17* (8), 2897–2905.
- (303) Kuyl-Yeheskiely, E.; van der Klein, P. A. M.; Visser, G. M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1986**, *105* (2), 69–70.
- (304) Hotoda, H.; Ueno, Y.; Sekine, M. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *30* (16), 2117–2120.
- (305) Robles, J.; Pedroso, E.; Grandas, A. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (9), 2482–2486.
- (306) Robles, J.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32* (34), 4389–4392.
- (307) Ueno, Y.; Saito, R.; Hata, T. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21* (19), 4451–1157.
- (308) Dreef-Tromp, C. M.; van Dam; van den Elst, H.; van der Marel; van Boom, J. H. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18* (22), 6491–6495.
- (309) Dreef-Tromp, C. M.; van der Maarel; van den Elst, H.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20* (15), 4015–4020.

- (310) Dreef-Tromp, C. M.; van den Elst, H.; van den Boogaart, J. E.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20* (10), 2435–2439.
- (311) Serpell, C. J.; Barłóg, M.; Basu, K.; Fakhoury, J. F.; Bazzi, H. S.; Sleiman, H. F. *Mater Horizons* **2014**, *1* (3), 348–354.
- (312) Waldmann, H.; Gabold, S. *Chem. Commun.* **1997**, *19*, 1861–1862.
- (313) Du, X.; Zhou, J.; Li, X.; Xu, B. *Interface Focus* **2017**, *7* (6), 20160116.
- (314) Yao, Q.; Bao, Q.; Li, X.; Wang, H.; Yang, Z.; Shi, X.; Gao, Y.; Xu, B. *Nanoscale* **2018**, *10* (8), 3990–3996.
- (315) Roviello, G. N.; Gaetano, S. D.; Capasso, D.; Cesarani, A.; Bucci, E. M.; Pedone, C. *Amino Acids* **2010**, *38* (5), 1489–1496.
- (316) Du, X.; Li, J.; Gao, Y.; Kuang, Y.; Xu, B. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (15), 2098.
- (317) Wu, D.; Du, X.; Shi, J.; Zhou, J.; Zhou, N.; Xu, B. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *447*, 269–272.
- (318) Boback, K.; Bacchi, K.; O’Neill, S.; Brown, S.; Dorsainvil, J.; Smith-Carpenter, J. E. *Molecules* **2020**, *25*, 5493.
- (319) Wang, H.; Feng, Z.; Qin, Y.; Wang, J.; Xu, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (18), 4931–4935.
- (320) Yuan, D.; Du, X.; Shi, J.; Zhou, N.; Zhou, J.; Xu, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (19), 5705–5708.
- (321) Li, X.; Du, X.; Gao, Y.; Shi, J.; Kuang, Y.; Xu, B. *Soft Matter* **2012**, *8* (28), 7402.
- (322) Freeman, R.; Han, M.; Álvarez, Z.; Lewis, J. A.; Wester, J. R.; Stephanopoulos, N.; McClendon, M. T.; Lynsky, C.; Godbe, J. M.; Sangji, H.; Luijten, E.; Stupp, S. I. *Science* **2018**, *362* (6416), 808–813.
- (323) Datta, D.; Tiwari, O.; Ganesh, K. N. *Nanoscale* **2018**, *10* (7), 3212–3224.
- (324) Doel, M. T.; Jones, A. S.; Walker, R. T. *Tetrahedron* **1974**, *30* (16), 2755–2759.
- (325) Zhu, X.; Zou, R.; Sun, P.; Wang, Q.; Wu, J. *Polym. Chem.* **2018**, *9*, 69–76.
- (326) Doel, M. T.; Jones, A. S.; Taylor, N. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *27*, 2285–2288.
- (327) Shvachkin, Y. P.; Mishin, G. P.; Korshunova, G. A. *Russ. Chem. Rev.* **1982**, *51* (2), 178–188.
- (328) Draminski, M.; Pitha, J. *Makromol. Chem.* **1978**, *179* (9), 2195–2200.
- (329) Christensen, L.; Fitzpatrick, R.; Gildea, B.; Petersen, K. H.; Hansen, H. F.; Koch, T.; Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E.; Coull, J.; Berg, R. H. *J. Pept. Sci.* **1995**, *3*, 175–183.
- (330) Thomson, S. A.; Josey, J. A.; Cadilla, R.; Gaul, M. D.; Fred Hassman, C.; Luzzio, M. J.; Pipe, A. J.; Reed, K. L.; Ricca, D. J.; Wiethe, R. W.; Noble, S. A. *Tetrahedron* **1995**, *51* (22), 6179–6194.
- (331) Koch, T.; Naesby, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (38), 6933–6936.
- (332) Manicardi, A.; Guidi, L.; Ghidini, A.; Corradini, R. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1495–1503.

- (333) Basavalingappa, V.; Bera, S.; Xue, B.; Azuri, I.; Tang, Y.; Tao, K.; Shimon, L. J. W.; Sawaya, M. R.; Kolusheva, S.; Eisenberg, D. S.; Kronik, L.; Cao, Y.; Wei, G.; Gazit, E. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5256.
- (334) He, Y.; Zheng, K.; Wen, C.; Li, X.; Gong, J.; Hao, Y.; Zhao, Y.; Tan, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (26), 11394–11403.
- (335) Li, X.; Yi Kuang; Shi, J.; Gao, Y.; Lin, H.-C.; Xu, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (43), 17513–17518.
- (336) Tomassi, S.; Ieranò, C.; Mercurio, M. E.; Nigro, E.; Daniele, A.; Russo, R.; Chambery, A.; Baglivo, I.; Pedone, P. V.; Rea, G.; Napolitano, M.; Scala, S.; Cosconati, S.; Marinelli, L.; Novellino, E.; Messere, A.; Di Maro, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26* (9), 2539–2550.
- (337) Musumeci, D.; Roviello, V.; Roviello, G. N. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *13*, 2613–2629.
- (338) Daly, M. L.; Gao, Y.; Freeman, R. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30* (7), 1864–1869.
- (339) Buchberger, A.; Simmons, C. R.; Fahmi, N. E.; Freeman, R.; Stephanopoulos, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (3), 1406–1416.
- (340) Diaferia, C.; Avitabile, C.; Leone, M.; Gallo, E.; Saviano, M.; Accardo, A.; Romanelli, A. *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 14307–14316.
- (341) Gour, N.; Kedracki, D.; Safir, I.; Ngo, K. X.; Vebert-Nardin, C. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (44), 5440–5442.
- (342) Avitabile, C.; Diaferia, C.; Roviello, V.; Altamura, D.; Giannini, C.; Vitagliano, L.; Accardo, A.; Romanelli, A. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25* (65), 14850–14857.
- (343) Liu, P.; Ni, R.; Mehta, A. K.; Childers, W. S.; Lakdawala, A.; Pingali, S. V.; Thiyagarajan, P.; Lynn, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (50), 16867–16869.
- (344) Chotera, A.; Sadihov, H.; Cohen-Luria, R.; Monnard, P.-A.; Ashkenasy, G. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24* (40), 10128–10135.
- (345) Li, C.; Faulkner-Jones, A.; Dun, A. R.; Jin, J.; Chen, P.; Xing, Y.; Yang, Z.; Li, Z.; Shu, W.; Liu, D.; Duncan, R. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (13), 3957–3961.
- (346) Li, X.; Kuang, Y.; Lin, H.-C.; Gao, Y.; Shi, J.; Xu, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (40), 9365–9369.
- (347) Baek, K.; Noblett, A. D.; Ren, P.; Suggs, L. J. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2* (7), 2812–2821.
- (348) Guler, M. O.; Pokorski, J. K.; Appella, D. H.; Stupp, S. I. *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16* (3), 501–503.
- (349) Li, Y.; Huang, G.; Zhang, X.; Wang, L.; Du, Y.; Lu, T. J.; Xu, F. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32* (2), 347–365.
- (350) Baek, K.; Noblett, A. D.; Ren, P.; Suggs, L. J. *Biomater. Sci.* **2020**, *8* (11), 3130–3137.
- (351) Ralph, R. K.; Marshall, B.; Darkin, S. *Trends Biochem. Sci.* **1983**, *8* (6), 212–214.
- (352) West, H. T.; Csizmar, C. M.; Wagner, C. R. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (7), 2650–2656.
- (353) Woolfson, D. N.; Mahmoud, Z. N. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (9), 3464–3479.
- (354) Alakpa, E. V.; Jayawarna, V.; Lampel, A.; Burgess, K. V.; West, C. C.; Bakker, S. C. J.; Roy, S.; Javid, N.; Fleming, S.; Lamprou, D. A.; Yang, J.; Miller, A.; Urquhart, A. J.; Frederix, P. W. J. M.; Hunt, N. T.; Péault, B.; Ulijn, R. V.; Dalby, M. J. *Chem* **2016**, *1* (2), 298–319.

- (355) Rohner, S. S.; Ruiz-Olles, J.; Smith, D. K. *RSC Adv.* **2015**, *5* (34), 27190–27196.
- (356) Zhou, J.; Du, X.; Gao, Y.; Shi, J.; Xu, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (8), 2970–2973.
- (357) Li, L.; Sun, R. *Mater. Des.* **2021**, *197*, 109209.
- (358) Tanaka, W.; Shigemitsu, H.; Fujisaku, T.; Kubota, R.; Minami, S.; Urayama, K.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (12), 4997–5004.
- (359) Okesola, B. O.; Wu, Y.; Derkus, B.; Gani, S.; Wu, D.; Knani, D.; Smith, D. K.; Adams, D. J.; Mata, A. *Chem. Mater.* **2019**, *31* (19), 7883–7897.
- (360) Velázquez, D. G.; Luque, R. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17* (14), 3847–3849.
- (361) Castilla, A. M.; Draper, E. R.; Nolan, M. C.; Brasnett, C.; Seddon, A.; Mears, L. L. E.; Cowieson, N.; Adams, D. J. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8380.
- (362) Kölbl, M.; Menger, F. M. *Langmuir* **2001**, *17* (15), 4490–4492.
- (363) Thota, C. K.; Berger, A. A.; Elomaa, L.; Nie, C.; Böttcher, C.; Kokschi, B. *ACS Omega* **2020**, *5* (15), 8557–8563.
- (364) Xia, Q.; Mao, Y.; Wu, J.; Shu, T.; Yi, T. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2* (10), 1854–1861.
- (365) Okesola, B. O.; Redondo-Gomez, C.; Mata, A. in *Self-assembling Biomaterials*; ed. Azevedo, H. S., Woodhead Publishing, **2018**, chap. 18, pp 371–397.
- (366) Fuentes-Caparrós, A. M.; de Paula Gómez-Franco, F.; Dietrich, B.; Wilson, C.; Brasnett, C.; Seddon, A.; Adams, D. J. *Nanoscale* **2019**, *11* (7), 3275–3280.
- (367) Kanekiyo, Y.; Inoue, K.; Ono, Y.; Shinkai, S. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (42), 7721–7724.
- (368) Milani, A. H.; Fielding, L. A.; Greensmith, P.; Saunders, B. R.; Adlam, D. J.; Freemont, A. J.; Hoyland, J. A.; Hodson, N. W.; Elsayy, M. A.; Miller, A. F.; Ratcliffe, L. P. D.; Mykhaylyk, O. O.; Armes, S. P. *Chem. Mater.* **2017**, *29* (7), 3100–3110.
- (369) Tromp, R. H.; Edelman, M. W.; Van Der Linden, E. in *Gums and Stabilisers for the Food Industry*; ed. Phillips, G. O., Williams, P. A., Royal Society of Chemistry, **2009**, vol. 12, chap 22, pp 201–210.
- (370) Meunier, V.; Clark, A. H. in *Gums and Stabilisers for the Food Industry*; ed. Phillips, G. O., Williams, P. A., Royal Society of Chemistry, vol. 12, chap. 26, pp 244–251.
- (371) Li, R.; Boyd-Moss, M.; Long, B.; Martel, A.; Parnell, A.; Dennison, A. J. C.; Barrow, C. J.; Nisbet, D. R.; Williams, R. J. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4797.
- (372) Piras, C. C.; Slavik, P.; Smith, D. K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (2), 853–859.
- (373) Pugliese, R.; Gelain, F. *Mater. Des.* **2020**, *186*, 108370.
- (374) Cornwell, D. J.; Smith, D. K. *Mater. Horiz.* **2015**, *2* (3), 279–293.
- (375) Sun, W.; Xue, B.; Li, Y.; Qin, M.; Wu, J.; Lu, K.; Wu, J.; Cao, Y.; Jiang, Q.; Wang, W. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26* (48), 9044–9052.
- (376) Schnaider, L.; Brahmachari, S.; Schmidt, N. W.; Mensa, B.; Shaham-Niv, S.; Bychenko, D.; Adler-Abramovich, L.; Shimon, L. J. W.; Kolusheva, S.; DeGrado, W. F.; Gazit, E. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1365.
- (377) Radvar, E.; Azevedo, H. S. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5* (9), 4646–4656.
- (378) Gaharwar, A. K.; Peppas, N. A.; Khademhosseini, A. *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111* (3), 441–453.

- (379) Nanda, J.; Biswas, A.; Adhikari, B.; Banerjee, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (19), 5041–5045.
- (380) Roy, S.; Baral, A.; Banerjee, A. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19* (44), 14950–14957.
- (381) Molla, M. R.; Ghosh, S. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18* (32), 9860–9869.
- (382) Hu, Y.; Lin, R.; Zhang, P.; Fern, J.; Cheetham, A. G.; Patel, K.; Schulman, R.; Kan, C.; Cui, H. *ACS Nano* **2016**, *10*, 880–888.
- (383) Horgan, C. C.; Rodriguez, A. L.; Li, R.; Bruggeman, K. F.; Stupka, N.; Raynes, J. K.; Day, L.; White, J. W.; Williams, R. J.; Nisbet, D. R. *Acta Biomater.* **2016**, *38*, 11–22.
- (384) Kim, K. Y.; Ok, M.; Kim, J.; Jung, S. H.; Seo, M. L.; Jung, J. H. *Gels* **2020**, *6* (2), 16.
- (385) Aye, S.-S.; Li, R.; Boyd-Moss, M.; Long, B.; Pavuluri, S.; Bruggeman, K.; Wang, Y.; Barrow, C.; Nisbet, D.; Williams, R. *Polymers* **2018**, *10* (7), 690.
- (386) Hanabusa, K.; Miki, T.; Taguchi, Y.; Koyama, T.; Shirai, H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, *18*, 1382.
- (387) Cinar, G.; Ceylan, H.; Urel, M.; Erkal, T. S.; Deniz Tekin, E.; Tekinay, A. B.; Dâna, A.; Guler, M. O. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (10), 3377–3387.
- (388) Wang, Y.; He, X.; Bruggeman, K. F.; Gayen, B.; Tricoli, A.; Lee, W. M.; Williams, R. J.; Nisbet, D. R. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30* (9), 1900390.
- (389) Wong Po Foo, C. T. S.; Lee, J. S.; Mulyasasmita, W.; Parisi-Amon, A.; Heilshorn, S. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106* (52), 22067–22072.
- (390) Khalily, M. A.; Bakan, G.; Kucukoz, B.; Topal, A. E.; Karatay, A.; Yaglioglu, H. G.; Dana, A.; Guler, M. O. *ACS Nano* **2017**, *11* (7), 6881–6892.
- (391) Sugiyasu, K.; Kawano, S.; Fujita, N.; Shinkai, S. *Chem. Mater.* **2008**, *20* (9), 2863–2865.
- (392) Nandi, N.; Basak, S.; Kirkham, S.; Hamley, I. W.; Banerjee, A. *Langmuir* **2016**, *32* (49), 13226–13233.
- (393) Das, A.; Ghosh, S. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (31), 8922.
- (394) Ardoña, H. A. M.; Draper, E. R.; Citossi, F.; Wallace, M.; Serpell, L. C.; Adams, D. J.; Tovar, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (25), 8685–8692.
- (395) Ohseido, Y. *Polym. Adv. Technol.* **2016**, *27* (6), 704–711.
- (396) Kubota, R.; Liu, S.; Shigemitsu, H.; Nakamura, K.; Tanaka, W.; Ikeda, M.; Hamachi, I. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (6), 2058–2067.
- (397) Morris, K. L.; Chen, L.; Raeburn, J.; Sellick, O. R.; Cotanda, P.; Paul, A.; Griffiths, P. C.; King, S. M.; O'Reilly, R. K.; Serpell, L. C.; Adams, D. J. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1480.
- (398) Foster, J. A.; Edkins, R. M.; Cameron, G. J.; Colgin, N.; Fucke, K.; Ridgeway, S.; Crawford, A. G.; Marder, T. B.; Beeby, A.; Cobb, S. L.; Steed, J. W. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 279–291.
- (399) Draper, E. R.; Wallace, M.; Schweins, R.; Poole, R. J.; Adams, D. J. *Langmuir* **2017**, *33* (9), 2387–2395.
- (400) Safont-Sempere, M. M.; Fernández, G.; Würthner, F. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (9), 5784–5814.
- (401) Tanaka, F.; Ishida, M. *Macromolecules* **1999**, *32* (4), 1271–1283.
- (402) Wu, A.; Isaacs, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (16), 4831–4835.

- (403) Cicchi, S.; Pescitelli, G.; Lascialfari, L.; Ghini, G.; Bari, L. D.; Brandi, A.; Bussotti, L.; Atsbeha, T.; Marcelli, A.; Foggi, P.; Berti, D.; Mannini, M. *Chirality* **2011**, *23* (9), 833–840.
- (404) Smith, M. M.; Smith, D. K. *Soft Matter* **2011**, *7* (10), 4856–4860.
- (405) Moffat, J. R.; Coates, I. A.; Leng, F. J.; Smith, D. K. *Langmuir* **2009**, *25* (15), 8786–8793.
- (406) Medini, K.; West, B.; Williams, D. E.; Brimble, M. A.; Gerrard, J. A. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (10), 1715–1718.
- (407) Onogi, S.; Shigemitsu, H.; Yoshii, T.; Tanida, T.; Ikeda, M.; Kubota, R.; Hamachi, I. *Nat. Chem.* **2016**, *8* (8), 743–752.
- (408) Draper, E. R.; Adams, D. J. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (10), 3395–3405.
- (409) Colquhoun, C.; Draper, E. R.; Eden, E. G. B.; Cattoz, B. N.; Morris, K. L.; Chen, L.; McDonald, T. O.; Terry, A. E.; Griffiths, P. C.; Serpell, L. C.; Adams, D. J. *Nanoscale* **2014**, *6* (22), 13719–13725.
- (410) Yan, X.; Xu, D.; Chi, X.; Chen, J.; Dong, S.; Ding, X.; Yu, Y.; Huang, F. *Adv. Mater.* **2012**, *24* (3), 362–369.
- (411) Draper, E. R.; Eden, E. G. B.; McDonald, T. O.; Adams, D. J. *Nat. Chem.* **2015**, *7* (10), 848–852.
- (412) Cornwell, D. J.; Daubney, O. J.; Smith, D. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (49), 15486–15492.
- (413) Kar, H.; Ghosh, S. *Nat. Chem.* **2015**, *7* (10), 765–767.
- (414) Felip-León, C.; Díaz-Oltra, S.; Galindo, F.; Miravet, J. F. *Chem. Mater.* **2016**, *28* (21), 7964–7972.
- (415) Nuthanakanti, A.; Walunj, M. B.; Torris, A.; Badiger, M. V.; Srivatsan, S. G. *Nanoscale* **2019**, *11* (24), 11956–11966.
- (416) Xu, F.; Li, J.; Jain, V.; Tu, R. S.; Huang, Q.; Nanda, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 47–50.
- (417) Suzuki, M.; Saito, H.; Shirai, H.; Hanabusa, K. *New J. Chem.* **2007**, *31* (9), 1654–1660.
- (418) Nagarkar, R. P.; Hule, R. A.; Pochan, D. J.; Schneider, J. P. *Biopolymers* **2010**, *94* (1), 141–155.
- (419) Hu, T.; Zhang, Z.; Euston, S. R.; Geng, M.; Pan, S. *Biomacromolecules* **2020**, *21* (12), 5256–5268.
- (420) Kyle, S.; Felton, S. H.; McPherson, M. J.; Aggeli, A.; Ingham, E. *Adv. Healthc. Mater.* **2012**, *1* (5), 640–645.
- (421) Okesola, B. O.; Mata, A. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (10), 3721–3736.
- (422) Xing, P.; Chen, H.; Xiang, H.; Zhao, Y. *Adv. Mater.* **2018**, *30* (5), 1705633.
- (423) Smith, M. M.; Edwards, W.; Smith, D. K. *Chem Sci* **2013**, *4* (2), 671–676.
- (424) Langeveld-Voss, B. M. W.; Waterval, R. J. M.; Janssen, R. A. J.; Meijer, E. W. *Macromolecules* **1999**, *32*, 227–230.
- (425) Boothroyd, S.; Saiani, A.; Miller, A. F. *Biopolymers* **2014**, *101* (6), 669–680.
- (426) Behanna, H. A.; Rajangam, K.; Stupp, S. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (2), 321–327.
- (427) Wang, X.; Cui, W.; Li, B.; Zhang, X.; Zhang, Y.; Huang, Y. *Front. Chem. Sci. Eng.* **2020**, *14* (6), 1112–1121.

- (428) Du, E. Y.; Ziaee, F.; Wang, L.; Nordon, R. E.; Thordarson, P. *Polym. J.* **2020**, *52* (8), 947–957.
- (429) Liyanage, W.; Vats, K.; Rajbhandary, A.; Benoit, D. S. W.; Nilsson, B. L. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (56), 11260–11263.
- (430) Zhou, S.-L.; Matsumoto, S.; Tian, H.-D.; Yamane, H.; Ojida, A.; Kiyonaka, S.; Hamachi, I. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11* (4), 1130–1136.
- (431) Hirst, A. R.; Huang, B.; Castelletto, V.; Hamley, I. W.; Smith, D. K. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13* (8), 2180–2188.
- (432) Fleming, S.; Ulijn, R. V. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (23), 8150–8177.
- (433) Foster, J. A.; Piepenbrock, M.-O. M.; Lloyd, G. O.; Clarke, N.; Howard, J. A. K.; Steed, J. W. *Nat. Chem.* **2010**, *2* (12), 1037–1043.
- (434) Draper, E. R.; Mears, L. L. E.; Castilla, A. M.; King, S. M.; McDonald, T. O.; Akhtar, R.; Adams, D. J. *RSC Adv.* **2015**, *5* (115), 95369–95378.
- (435) Foster, J. S.; Prentice, A. W.; Forgan, R. S.; Paterson, M. J.; Lloyd, G. O. *ChemNanoMat* **2018**, *4* (8), 853–859.
- (436) Nowakowski, G. S.; Dooner, M. S.; Valinski, H. M.; Mihaliak, A. M.; Quesenberry, P. J.; Becker, P. S. *Stem Cells* **2004**, *22* (6), 1030–1038.
- (437) Taraballi, F.; Campione, M.; Sassella, A.; Vescovi, A.; Paleari, A.; Hwang, W.; Gelain, F. *Soft Matter* **2009**, *5* (3), 660–668.
- (438) Wang, X.; Horii, A.; Zhang, S. *Soft Matter* **2008**, *4* (12), 2388–2395.
- (439) Horii, A.; Wang, X.; Gelain, F.; Zhang, S. *PLoS One* **2007**, *2* (2), e190.
- (440) Li, X.-C.; Wu, Y.-H.; Bai, X.-D.; Ji, W.; Guo, Z.-M.; Wang, C.-F.; He, Q.; Ruan, D. *Tissue Eng. Part A* **2016**, *22* (19–20), 1218–1228.
- (441) Liu, X.; Wang, X.; Horii, A.; Wang, X.; Qiao, L.; Zhang, S.; Cui, F.-Z. *Nanoscale* **2012**, *4*, 2720–2727.
- (442) Wen, Y.; Kolonich, H. R.; Kruszewski, K. M.; Giannoukakis, N.; Gawalt, E. S.; Meng, W. S. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (3), 1035–1044.
- (443) Wen, Y.; Roudebush, S. L.; Buckholtz, G. A.; Goehring, T. R.; Giannoukakis, N.; Gawalt, E. S.; Meng, W. S. *Biomaterials* **2014**, *35* (19), 5196–5205.
- (444) Tajima, A.; Liu, W.; Pradhan, I.; Bertera, S.; Bagia, C.; Trucco, M.; Meng, W. S.; Fan, Y. *Clin. Immunol.* **2015**, *160*, 82–89.
- (445) Tajima, A.; Liu, W.; Pradhan, I.; Bertera, S.; Lakomy, R. A.; Rudert, W. A.; Trucco, M.; Meng, W. S.; Fan, Y. *J. Vis. Exp.* **2016**, *112*, 54062.
- (446) Scelsi, A.; Bochicchio, B.; Smith, A.; Workman, V. L.; Castillo Diaz, L. A.; Saiani, A.; Pepe, A. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2019**, *107* (3), 535–544.
- (447) Swanekamp, R. J.; DiMaio, J. T. M.; Bowerman, C. J.; Nilsson, B. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5556–5559.
- (448) Nagy, K. J.; Giano, M. C.; Jin, A.; Pochan, D. J.; Schneider, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (38), 14975–14977.
- (449) Tena-Solsona, M.; Alonso-de Castro, S.; Miravet, J. F.; Escuder, B. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2* (37), 6192–6197.



- (450) Tsutsumi, H.; Kawamura, M.; Mihara, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26* (12), 3126–3132.
- (451) Jung, J. P.; Moyano, J. V.; Collier, J. H. *Integr. Biol.* **2011**, *3* (3), 185–196.
- (452) Saunders, M. J.; Liu, W.; Szent-Gyorgyi, C.; Wen, Y.; Drennen, Z.; Waggoner, A. S.; Meng, W. S. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24* (5), 803–810.
- (453) Zhou, M.; Smith, A. M.; Das, A. K.; Hodson, N. W.; Collins, R. F.; Ulijn, R. V.; Gough, J. E. *Biomaterials* **2009**, *30* (13), 2523–2530.
- (454) Ghosh, M.; Halperin-Sternfeld, M.; Grigoriants, I.; Lee, J.; Nam, K. T.; Adler-Abramovich, L. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (11), 3541–3550.
- (455) Jayawarna, V.; Richardson, S. M.; Hirst, A. R.; Hodson, N. W.; Saiani, A.; Gough, J. E.; Ulijn, R. V. *Acta Biomater.* **2009**, *5* (3), 934–943.
- (456) Hsu, S.-M.; Wu, F.-Y.; Lai, T.-S.; Lin, Y.-C.; Lin, H.-C. *RSC Adv.* **2015**, *5* (29), 22943–22946.
- (457) Halperin-Sternfeld, M.; Ghosh, M.; Sevostianov, R.; Grigoriants, I.; Adler-Abramovich, L. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (69), 9586–9589.
- (458) Fichman, G.; Guterman, T.; Adler-Abramovich, L.; Gazit, E. *Cryst Eng Comm* **2015**, *17* (42), 8105–8112.
- (459) Panja, S.; Dietrich, B.; Shebanova, O.; Smith, A. J.; Adams, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 9973–9977.
- (460) Adhikari, B.; Nanda, J.; Banerjee, A. *Soft Matter* **2011**, *7* (19), 8913–8922.
- (461) Hirst, A. R.; Smith, D. K.; Feiters, M. C.; Geurts, H. P. M. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10* (23), 5901–5910.
- (462) Pauling, L.; Corey, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1953**, *39*, 253–256.
- (463) Weissbuch, I.; Illos, R. A.; Bolbach, G.; Lahav, M. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (8), 1128–1140.
- (464) Koga, T.; Matsuoka, M.; Higashi, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (50), 17596–17597.
- (465) Wadai, H.; Yamaguchi, K.; Takahashi, S.; Kanno, T.; Kawai, T.; Naiki, H.; Goto, Y. *Biochemistry* **2005**, *44*, 157–164.
- (466) Swanekamp, R. J.; Welch, J. J.; Nilsson, B. L. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (70), 10133–10136.
- (467) Sahoo, J. K.; VandenBerg, M. A.; Ruiz Bello, E. E.; Nazareth, C. D.; Webber, M. J. *Nanoscale* **2019**, *11* (35), 16534–16543.
- (468) Seroski, D. T.; Dong, X.; Wong, K. M.; Liu, R.; Shao, Q.; Paravastu, A. K.; Hall, C. K.; Hudalla, G. A. *Commun. Chem.* **2020**, *3*, 172.
- (469) Shao, Q.; Wong, K. M.; Seroski, D. T.; Wang, Y.; Liu, R.; Paravastu, A. K.; Hudalla, G. A.; Hall, C. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117* (9), 4710–4717.
- (470) Niece, K. L.; Hartgerink, J. D.; Donners, J. J. J. M.; Stupp, S. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (24), 7146–7147.
- (471) Hamley, I. W.; Dehsorkhi, A.; Castelletto, V. *Langmuir* **2013**, *29* (16), 5050–5059.
- (472) Snip, E.; Shinkai, S.; Reinhoudt, D. N. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (11), 2153–2156.
- (473) Skilling, K. J.; Kellam, B.; Ashford, M.; Bradshaw, T. D.; Marlow, M. *Soft Matter* **2016**, *12* (43), 8950–8957.
- (474) Park, S. M.; Kim, B. H. *Soft Matter* **2008**, *4* (10), 1995–1997.

- (475) Barthélemy, P. *C. R. Chim.* **2009**, *12*, 171–179.
- (476) Kaplan, J. A.; Barthélémy, P.; Grinstaff, M. W. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (34), 5860–5863.
- (477) Dueholm, K. L.; Egholm, M.; Behrens, C.; Christensen, L.; Hansen, H. F.; Vulpius, T.; Petersen, K. H.; Berg, R. H.; Nielsen, P. E.; Buchardt, O. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (19), 5767–5773.
- (478) Pattabiraman, V. R.; Bode, J. W. *Nature* **2011**, *480* (7378), 471–479.
- (479) Palomo, J. M. *RSC Adv* **2014**, *4* (62), 32658–32672.
- (480) Jaradat, D. M. M. *Amino Acids* **2018**, *50*, 39–68.
- (481) Bondalapati, S.; Jbara, M.; Brik, A. *Nat. Chem.* **2016**, *8* (5), 407–418.
- (482) Banwell, E. F.; Abelardo, E. S.; Adams, D. J.; Birchall, M. A.; Corrigan, A.; Donald, A. M.; Kirkland, M.; Serpell, L. C.; Butler, M. F.; Woolfson, D. N. *Nat. Mater.* **2009**, *8* (7), 596–600.
- (483) Braun, G. A.; Ary, B. E.; Dear, A. J.; Rohn, M. C. H.; Payson, A. M.; Lee, D. S. M.; Parry, R. C.; Friedman, C.; Knowles, T. P. J.; Linse, S.; Åkerfeldt, K. S. *Biomacromolecules* **2020**, *21* (12), 4781–4794.
- (484) Kamalov, M.; Kählig, H.; Rentenberger, C.; Müllner, A. R. M.; Peterlik, H.; Becker, C. F. *W. Sci. Rep.* **2019**, *9*, 2696.
- (485) El Hajj, S.; Sepulveda-Rincon, T.; Paris, C.; Giraud, T.; Csire, G.; Stefan, L.; Selmeczi, K.; Girardet, J.-M.; Desobry, S.; Bouhallab, S.; Muhr, L.; Gaucher, C.; Canabady-Rochelle, L. in *Biologically Active Peptides: From Basic Science to Applications for Human Health*; ed. Toldra, F., Wu, J., Elsevier, **A paraître**, chap. 19, pp 455–494.
- (486) Thakare, P.; Vasile, F.; Vallaro, M.; Visentin, S.; Caron, G.; Licandro, E.; Cauteruccio, S. *J. Pharm. Anal.* **2020**.
- (487) Shen, C.-L.; Murphy, R. M. *Biophys. J.* **1995**, *69*, 12.
- (488) Snyder, S. W.; Ladrör, U. S.; Wade, W. S.; Wang, G. T.; Barrett, L. W.; Matayoshi, E. D.; Huffaker, H. J.; Krafft, G. A.; Holzman, T. F. **1994**, *67*, 13.
- (489) Jeong, B.; Kim, S. W.; Bae, Y. H. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 154–162.
- (490) Zbacnik, T. J.; Holcomb, R. E.; Katayama, D. S.; Murphy, B. M.; Payne, R. W.; Coccaro, R. C.; Evans, G. J.; Matsuura, J. E.; Henry, C. S.; Manning, M. C. *J. Pharm. Sci.* **2017**, *106* (3), 713–733.
- (491) Akers, M. J. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91* (11), 2283–2300.
- (492) Good, N. E.; Izawa, S. in *Photosynthesis and Nitrogen Fixation Part B*; ed. San Pietro, A., Elsevier, **1972**; vol. 24, chap. 3, pp 53–68.
- (493) Rubio-Magnieto, J.; Tena-Solsona, M.; Escuder, B.; Surin, M. *RSC Adv.* **2017**, *7* (16), 9562–9566.
- (494) Lee, N. R.; Bowerman, C. J.; Nilsson, B. L. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (9), 3267–3277.
- (495) Kar, H.; Molla, M. R.; Ghosh, S. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (39), 4220–4222.
- (496) Mahler, A.; Rechtes, M.; Rechter, M.; Cohen, S.; Gazit, E. *Adv. Mater.* **2006**, *18* (11), 1365–1370.

- (497) Raeburn, J.; Mendoza-Cuenca, C.; Cattoz, B. N.; Little, M. *Soft Matter* **2015**, *11*, 927–935.
- (498) Diaferia, C.; Roviello, V.; Morelli, G.; Accardo, A. *ChemPhysChem* **2019**, *20* (21), 2774–2782.
- (499) Ding, B.; Li, Y.; Qin, M.; Ding, Y.; Cao, Y.; Wang, W. *Soft Matter* **2013**, *9* (18), 4672–4680.
- (500) Shen, C.-L.; Fitzgerald, M. C.; Murphy, R. M. *Biophys. J.* **1994**, *67*, 1238–1246.
- (501) Liu, X. Y.; Sawant, P. D. *Adv. Mater.* **2002**, *14* (6), 421–426.
- (502) Lescanne, M.; Colin, A.; Mondain-Monval, O.; Fages, F.; Pozzo, J.-L. *Langmuir* **2003**, *19* (6), 2013–2020.
- (503) Hiew, S. H.; Mohanram, H.; Ning, L.; Guo, J.; Sánchez-Ferrer, A.; Shi, X.; Pervushin, K.; Mu, Y.; Mezzenga, R.; Miserez, A. *Adv. Sci.* **2019**, *6* (21), 1901173.
- (504) Bertolani, A.; Pirrie, L.; Stefan, L.; Houbenov, N.; Haataja, J. S.; Catalano, L.; Terraneo, G.; Giancane, G.; Valli, L.; Milani, R.; Ikkala, O.; Resnati, G.; Metrangolo, P. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7574.
- (505) Cringoli, M. C.; Kralj, S.; Kurbasic, M.; Urban, M.; Marchesan, S. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2017**, *8*, 1553–1562.
- (506) Mezger, T. G. in *Applied Rheology : With Joe Flow on Rheology Road*; Anton Paar, **2015**.
- (507) Lakshmanan, A.; Cheong, D. W.; Accardo, A.; Di Fabrizio, E.; Riekkel, C.; Hauser, C. A. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110* (2), 519–524.
- (508) Loo, Y.; Lakshmanan, A.; Ni, M.; Toh, L. L.; Wang, S.; Hauser, C. A. E. *Nano Lett.* **2015**, *15* (10), 6919–6925.
- (509) Ajay Mallia, V.; Weiss, R. G. *Soft Matter* **2016**, *12* (16), 3665–3676.
- (510) Hauptstein, N.; Leon-Rodriguez, L. M. D.; Mitra, A. K.; Hemar, Y.; Kavianiinia, I.; Li, N.; Castelletto, V.; Hamley, I. W.; Brimble, M. A. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4*, 2733–2738.
- (511) Zhai, Z.; Xu, K.; Mei, L.; Wu, C.; Liu, J.; Liu, Z.; Wan, L.; Zhong, W. *Soft Matter* **2019**, *15* (42), 8603–8610.
- (512) Yan, C.; Altunbas, A.; Yucel, T.; Nagarkar, R. P.; Schneider, J. P.; Pochan, D. J. *Soft Matter* **2010**, *6* (20), 5143–5156.
- (513) Fumasi, F. M.; Stephanopoulos, N.; Holloway, J. L. *J. Appl. Polym. Sci.* **2020**, *137* (25), 49058.
- (514) Gao, Y.; Shi, J.; Yuan, D.; Xu, B. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1033.
- (515) Almeida, J. F.; Ferreira, P.; Alves, P.; Lopes, A.; Gil, M. H. *Int. J. Polym. Mater.* **2018**, *67* (13), 765–775.
- (516) Hule, R. A.; Nagarkar, R. P.; Altunbas, A.; Ramay, H. R.; Branco, M. C.; Schneider, J. P.; Pochan, D. J. *Faraday Discuss.* **2008**, *139*, 251–264.
- (517) Choi, B. G.; Park, M. H.; Cho, S.-H.; Joo, M. K.; Oh, H. J.; Kim, E. H.; Park, K.; Han, D. K.; Jeong, B. *Biomaterials* **2010**, *31* (35), 9266–9272.
- (518) Pham, L.; Dang, L. H.; Truong, M. D.; Nguyen, T. H.; Le, L.; Le, V. T.; Nam, N. D.; Bach, L. G.; Nguyen, V. T.; Tran, N. Q. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *117*, 109183.

- (519) Cole, M. A.; Voelcker, N. H.; Thissen, H.; Griesser, H. J. *Biomaterials* **2009**, *30* (9), 1827–1850.
- (520) Hatefi, A.; Amsden, B. J. *Control. Release* **2002**, *80*, 9–28.
- (521) Uto, K.; Tsui, J. H.; DeForest, C. A.; Kim, D.-H. *Prog. Polym. Sci.* **2017**, *65*, 53–82.
- (522) Naiki, H.; Higuchi, K.; Hosokawa, M.; Takeda, T. *Anal. Biochem.* **1989**, *177*, 244–249.
- (523) Levine III, H. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 404–410.
- (524) Eisele, Y. S.; Monteiro, C.; Fearn, C.; Encalada, S. E.; Wiseman, R. L.; Powers, E. T.; Kelly, J. W. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14* (11), 759–780.
- (525) Groenning, M.; Olsen, L.; van de Weert, M.; Flink, J. M.; Frokjaer, S.; Jørgensen, F. S. *J. Struct. Biol.* **2007**, *158* (3), 358–369.
- (526) Xue, C.; Lin, T. Y.; Chang, D.; Guo, Z. *R. Soc. Open Sci.* **2017**, *4*, 160696.
- (527) Castelletto, V.; Ryumin, P.; Cramer, R.; Hamley, I. W.; Taylor, M.; Allsop, D.; Reza, M.; Ruokolainen, J.; Arnold, T.; Hermida-Merino, D.; Garcia, C. I.; Leal, M. C.; Castaño, E. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 43637.
- (528) Chen, Y.; Hua, Y.; Zhang, W.; Tang, C.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Qiu, F. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *13*, 2477–2489.
- (529) Slynghorg, M.; Nielsen, D. A.; Fojan, P. *ChemBioChem* **2016**, *17* (21), 2083–2092.
- (530) Liu, Y.; Yang, Y.; Wang, C.; Zhao, X. *Nanoscale* **2013**, *5* (14), 6413.
- (531) Jackson, M.; Mantsch, H. H. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *30* (2), 95–120.
- (532) Kong, J.; Yu, S. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2007**, *39* (8), 549–559.
- (533) Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H.; Chapman, D. *Biochemistry* **1993**, *32* (2), 389–394.
- (534) Perczel, A.; Park, K.; Fasman, G. D. *Proteins* **1992**, *13*, 57–69.
- (535) Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **2005**, *1751* (2), 119–139.
- (536) Gottarelli, G.; Lena, S.; Masiero, S.; Pieraccini, S.; Spada, G. P. *Chirality* **2008**, *20*, 471–485.
- (537) Bulheller, B. M.; Rodger, A.; Hirst, J. D. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9* (17), 2020–2035.
- (538) Jackson, M.; Mantsch, H. H. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **1991**, *1078*, 231–235.
- (539) Gottarelli, G.; Spada, G. P.; Castiglioni, E. in *Molecular Gels*; ed. Weiss, R. G., Terech, P., Springer, **2006**, chap. 13, pp 431–446.
- (540) Manavalan, P.; Curtis. *Nature* **1983**, *305*, 831–832.
- (541) Bowerman, C. J.; Ryan, D. M.; Nissan, D. A.; Nilsson, B. L. *Mol. Biosyst.* **2009**, *5* (9), 1058.
- (542) Shlomo, Z.; Vinod, T. P.; Jelinek, R.; Rapaport, H. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (15), 3154–3157.
- (543) Bortolini, C.; Liu, L.; Hoffmann, S. V.; Jones, N. C.; Knowles, T. P. J.; Dong, M. *ChemistrySelect* **2017**, *2* (8), 2476–2479.
- (544) Guler, M. O.; Claussen, R. C.; Stupp, S. I. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15* (42), 4507–4512.
- (545) Iyer, A.; Roeters, S. J.; Kogan, V.; Woutersen, S.; Claessens, M. M. A. E.; Subramaniam, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (43), 15392–15400.

- (546) Lara, C.; Reynolds, N. P.; Berryman, J. T.; Xu, A.; Zhang, A.; Mezzenga, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (12), 4732–4739.
- (547) Juszczak, L. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (9), 7395–7404.
- (548) Kypr, J.; Kejnovska, I.; Renciuik, D.; Vorlickova, M. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37* (6), 1713–1725.
- (549) Kelly, S.; Price, N. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2000**, *1* (4), 349–384.
- (550) Usachev, K. S.; Filippov, A. V.; Antzutkin, O. N.; Klochkov, V. V. *Eur. Biophys. J.* **2013**, *42* (11–12), 803–810.
- (551) Brown, S. C.; Thomson, S. A.; Veal, J. M.; Davis, D. G. *Science* **1994**, *265*, 5.
- (552) He, W.; Hatcher, E.; Balaeff, A.; Beratan, D. N.; Gil, R. R.; Madrid, M.; Achim, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (40), 13264–13273.
- (553) He, W.; Crawford, M. J.; Rapireddy, S.; Madrid, M.; Gil, R. R.; Ly, D. H.; Achim, C. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6* (9), 1619.
- (554) Steinert, H. S.; Rinnenthal, J.; Schwalbe, H. *Biophys. J.* **2012**, *102* (11), 2564–2574.
- (555) Liu, Y.; Guo, P.; Lam, S. L. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121* (12), 2554–2560.
- (556) Mielke, S. P.; Krishnan, V. V. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2009**, *54* (3–4), 141–165.
- (557) Wishart, D. S.; Sykes, B. D. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4* (2), 171–180.
- (558) Hafsa, N. E.; Wishart, D. S. *J. Biomol. NMR* **2014**, *60* (2–3), 131–146.
- (559) Sponer, J.; Riley, K. E.; Hobza, P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 2595–2610.
- (560) Weinryb, I.; Steiner, R. F. in *Excited States of Proteins and Nucleic Acids*; ed. Steiner, R. F., Weinryb, I., Springer, **1971**, chap. 5, pp 277–318.
- (561) Eisinger, J.; Lamola, A. A. in *Excited States of Proteins and Nucleic Acids*; ed. Steiner, R. F., Weinryb, I., Springer, **1971**, chap. 3, pp 107–198.
- (562) Ziaunys, M.; Smirnovas, V. *PeerJ* **2019**, *7*, e6518.
- (563) Leroy, E.; Lami, H.; Laustriat, G. *Photochem. Photobiol.* **1971**, *13* (5), 411–421.
- (564) Demchenko, A. P. *Luminescence* **2002**, *17*, 19–42.
- (565) Haldar, S.; Chaudhuri, A.; Chattopadhyay, A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (19), 5693–5706.
- (566) Galley, W. C.; Purkey, R. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *67* (3), 1116–1121.
- (567) Chattopadhyay, A.; Haldar, S. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (1), 12–19.
- (568) Friedman, R. A.; Honig, B. *Biophys. J.* **1995**, *69* (4), 1528–1535.
- (569) Wang, Y. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112* (37), 14297–14305.
- (570) Brown, R. F.; Andrews, C. T.; Elcock, A. H. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11* (5), 2315–2328.
- (571) Chou, S.-H.; Chin, K.-H.; Wang, A. H.-J. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (10), 2461–2474.
- (572) Poater, J.; Swart, M.; Bickelhaupt, F. M.; Fonseca Guerra, C. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (26), 4691–4700.
- (573) Guler, M. O.; Hsu, L.; Soukasene, S.; Harrington, D. A.; Hulvat, J. F.; Stupp, S. I. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (6), 1855–1863.

- (574) Matsumoto, K.; Shundo, A.; Ohno, M.; Fujita, S.; Saruhashi, K.; Miyachi, N.; Miyaji, K.; Tanaka, K. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (3), 2192–2198.
- (575) Singh, N.; Zhang, K.; Angulo-Pachón, C. A.; Mendes, E.; van Esch, J. H.; Escuder, B. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (8), 5568–5572.
- (576) Ayabe, M.; Kishida, T.; Fujita, N.; Sada, K.; Shinkai, S. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (15), 2744–2747.
- (577) Shigemitsu, H.; Fujisaku, T.; Onogi, S.; Yoshii, T.; Ikeda, M.; Hamachi, I. *Nat. Protoc.* **2016**, *11* (9), 1744–1756.
- (578) Tena-Solsona, M.; Escuder, B.; Miravet, J. F.; Castelletto, V.; Hamley, I. W.; Dehsorkhi, A. *Chem. Mater.* **2015**, *27* (9), 3358–3365.
- (579) Yuan, D.; Du, X.; Shi, J.; Zhou, N.; Baoum, A. A.; Al Footy, K. O.; Badahdah, K. O.; Xu, B. *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 1352–1359.
- (580) Edwards, W.; Smith, D. *Gels* **2018**, *4* (2), 31.
- (581) Jiao, X.; Bryant, R. G. *Magn. Reson. Med.* **1996**, *35* (2), 159–161.
- (582) Korb, J.-P.; Bryant, R. G. *C. R. Phys.* **2004**, *5* (3), 349–357.
- (583) Ochbaum, G.; Davidovich-Pinhas, M.; Bitton, R. *Soft Matter* **2018**, *14* (21), 4364–4373.
- (584) Taraban, M. B.; Feng, Y.; Hammouda, B.; Hyland, L. L.; Yu, Y. B. *Chem. Mater.* **2012**, *24* (12), 2299–2310.
- (585) Hammouda, B.; Ho, D. L.; Kline, S. *Macromolecules* **2004**, *37* (18), 6932–6937.
- (586) Wei, Y.; Hore, M. J. A. *J. Appl. Phys.* **2021**, *129* (17), 171101.
- (587) Hule, R. A.; Nagarkar, R. P.; Hammouda, B.; Schneider, J. P.; Pochan, D. J. *Macromolecules* **2009**, *42*, 7137–7145.
- (588) Saffer, E. M.; Lackey, M. A.; Griffin, D. M.; Kishore, S.; Tew, G. N.; Bhatia, S. R. *Soft Matter* **2014**, *10* (12), 1905–1916.
- (589) da Silva, E. R.; Alves, W. A.; Castelletto, V.; Reza, M.; Ruokolainen, J.; Hussain, R.; Hamley, I. W. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (58), 11634–11637.
- (590) Guilbaud, J.-B.; Rochas, C.; Miller, A. F.; Saiani, A. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (5), 1403–1411.
- (591) Guilbaud, J.-B.; Saiani, A. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (3), 1200–1210.
- (592) Lushnikov, S. G.; Svanidze, A. V.; Gvasaliya, S. N.; Torok, G.; Rosta, L.; Sashin, I. L. *Phys. Rev. E* **2009**, *79* (3), 031913.
- (593) Suzuki, T.; Chiba, A.; Yarno, T. *Carbohydr. Polym.* **1997**, *34* (4), 357–363.
- (594) Beaucage, G. *J. Appl. Crystallogr.* **1996**, *29* (2), 134–146.
- (595) Ramachandran, S.; Trehwella, J.; Tseng, Y.; Yu, Y. B. *Chem. Mater.* **2006**, *18* (26), 6157–6162.
- (596) Teraoka, I. *Prog. Polym. Sci.* **1996**, *21*, 89–149.
- (597) Glossop, H. D.; De Zoysa, G. H.; Hemar, Y.; Cardoso, P.; Wang, K.; Lu, J.; Valéry, C.; Sarojini, V. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (7), 2515–2529.
- (598) Ochbaum, G.; Chetrit, E.; Berkovich, R.; Bitton, R. *Soft Matter* **2020**, *16* (26), 6155–6162.
- (599) Yang, Z.; Yang, H.; Yang, H. *Food Hydrocoll.* **2018**, *75*, 164–173.

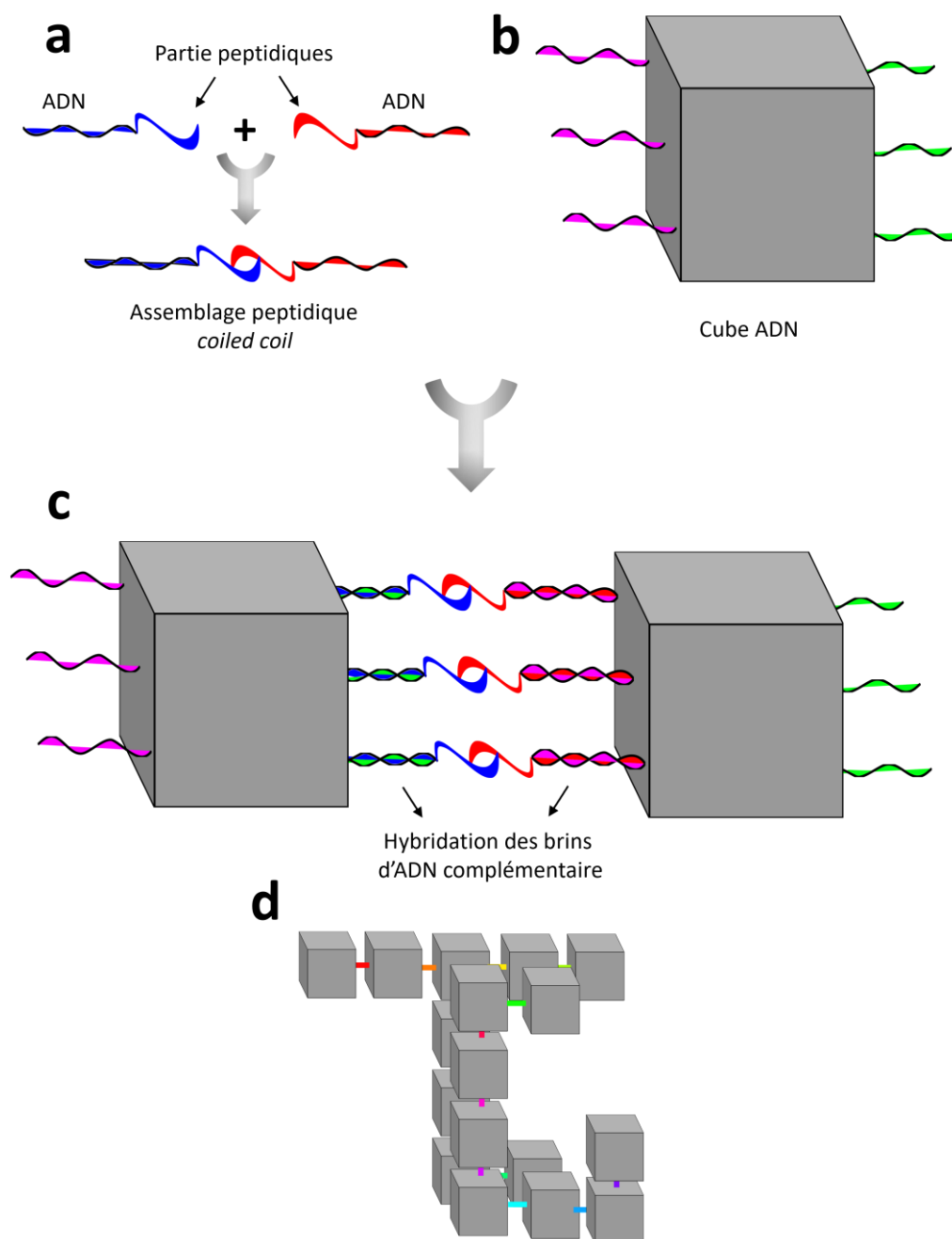
- (600) Tang, C.; Smith, A. M.; Collins, R. F.; Ulijn, R. V.; Saiani, A. *Langmuir* **2009**, *25* (16), 9447–9453.
- (601) Nikolova, V.; Cheshmedzhieva, D.; Ilieva, S.; Galabov, B. *Bulg. Chem. Commun.* **2017**, *49*, 8–18.
- (602) Wu, D.; Zhou, J.; Shi, J.; Du, X.; Xu, B. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (16), 1992–1994.
- (603) Lodish, H. ; Berk, A.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Scott, M. P., Bretscher, A.; Ploegh, H.; Matsudaira in *Molecular Cell Biology* ; ed. Lodish, H., Freeman, 6th ed., **2008**.
- (604) Xu, X.-D.; Chen, C.-S.; Lu, B.; Cheng, S.-X.; Zhang, X.-Z.; Zhuo, R.-X. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (7), 2365–2372.
- (605) Frisch, H.; Unsleber, J. P.; Lüdeker, D.; Peterlechner, M.; Brunklaus, G.; Waller, M.; Besenius, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (38), 10097–10101.
- (606) Hyland, L. L.; Taraban, M. B.; Feng, Y.; Hammouda, B.; Yu, Y. B. *Biopolymers* **2012**, *97* (3), 177–188.
- (607) Arosio, P.; Knowles, T. P. J.; Linse, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (12), 7606–7618.
- (608) Ryan, D. M.; Anderson, S. B.; Senguen, F. T.; Youngman, R. E.; Nilsson, B. L. *Soft Matter* **2010**, *6* (3), 475–479.







# ANNEXES

SI.1 SCHEMAS COMPLEMENTAIRES

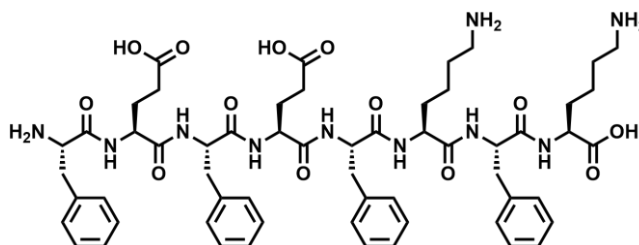
**Figure SI-1** – Représentation schématique de nucléopeptides capables de s'assembler en superhélice (« *coiled-coil* », bleu et rouge, (a)) et portant des brins d'ADN. Les séquences de ces brins sont complémentaires aux séquences portées par des nano-cubes d'ADN (b, rouge avec rose et bleu avec vert) ce qui permet l'assemblage de ces objets (c). La spécificité des interactions permet, en designant suffisamment de séquences ADN différentes, de former de manière entièrement maîtrisée des objets supra-moléculaires (d).<sup>339</sup>

## ANNEXES – CHAPITRE II

### SL.II.1 SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION CHIMIQUE

#### Octapeptide H<sub>2</sub>N-Phe-Glu-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Lys-OH (*F-pep*)

Composé H<sub>2</sub>N-Phe-Glu-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Lys-OH obtenu sous forme de solide blanc (176 mg, 203 μmol, 51 % de rendement).

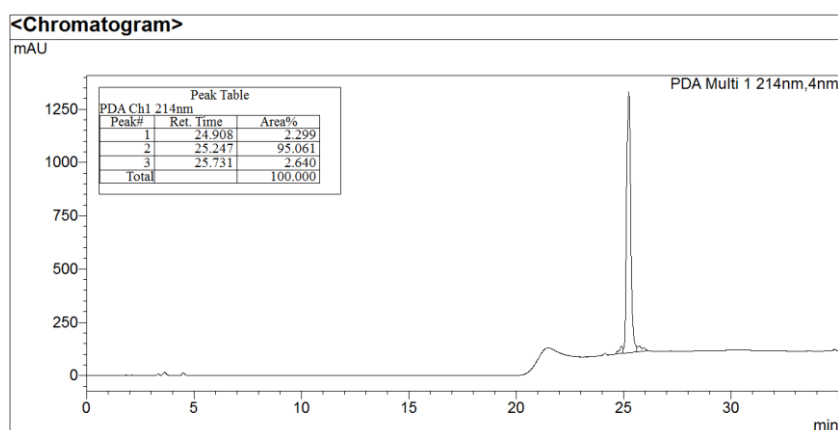


Attribution RMN:

<sup>1</sup> H	NH	α	β	γ	δ	ε	autres
<b>Phe<sub>1</sub></b>	-	3.87	2.97/2.77	-	-	-	a 7.18 b 7.21 c -
<b>Glu<sub>2</sub></b>	8.44	4.30	1.86/1.72	2.20	-	-	-
<b>Phe<sub>3</sub></b>	8.14	4.53	2.95/2.73	-	-	-	a 7.20 b 7.24 c -
<b>Glu<sub>4</sub></b>	8.18	4.25	1.84/1.70	2.19	-	-	-
<b>Phe<sub>5</sub></b>	7.94	4.51	2.87/2.70	-	-	-	a 7.15 b 7.20 c -
<b>Lys<sub>6</sub></b>	8.12	4.27	1.64/1.43	1.28	1.46	2.73	-
<b>Phe<sub>7</sub></b>	8.34	4.46	3.06/2.84	-	-	-	a 7.13 b 7.23 c -
<b>Lys<sub>8</sub></b>	7.77	3.96	1.68/1.57	1.32	1.56	2.77	-

<sup>13</sup> C	α	β	γ	δ	ε	autres
<b>Phe<sub>1</sub></b>	54.42	38.38	-	-	-	a 128.6 b 129.7 c -
<b>Glu<sub>2</sub></b>	52.13	28.52	30.46	-	-	-
<b>Phe<sub>3</sub></b>	54.23	37.70	-	-	-	a 128.7 b 129.6 c -
<b>Glu<sub>4</sub></b>	52.33	28.25	30.71	-	-	-
<b>Phe<sub>5</sub></b>	53.86	37.88	-	-	-	a 129.0 b 129.9 c -
<b>Lys<sub>6</sub></b>	52.94	32.56	22.85	27.53	39.01	-
<b>Phe<sub>7</sub></b>	54.84	37.88	-	-	-	a 128.4 b 129.6 c -
<b>Lys<sub>8</sub></b>	53.56	32.11	22.65	27.23	39.26	-

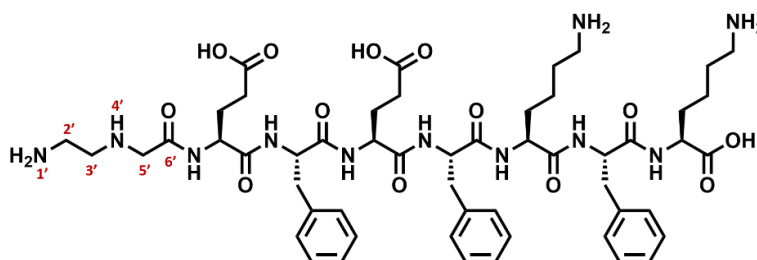
## Chromatogramme HPLC analytique en phase inverse:



**HRMS (ESI):**  $m/z$  calculé pour  $C_{58}H_{77}N_{10}O_{13}$   $[M+H]^+$  (100%), 1121.5666, trouvé 1121.5541.

### ***N*-(2-aminoethyl)glycine-Glu-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Lys-OH (Aeg-Pep)**

Composé *N*-(2-aminoethyl)glycine-Glu-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Lys-OH obtenu sous forme de solide blanc (334.2 mg, 235.9  $\mu$ mol, 59.0 % de rendement).



### Attribution RMN:

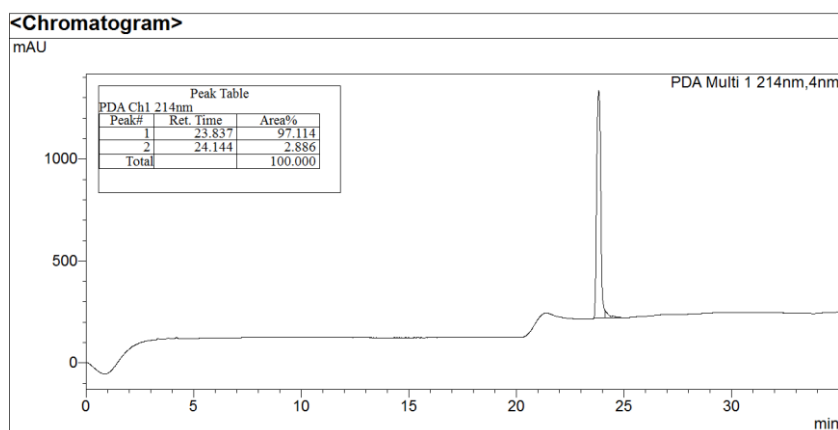
<sup>1</sup> H	NH1'	H2'	H3'	NH4'	H5'
Aeg	7.62	2.79	3.12	<i>n.d.</i>	3.17

<sup>1</sup> H	NH	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$	autres
<b>Glu<sub>2</sub></b>	8.43	4.16	1.86/1.72	2.10	-	-	-
<b>Phe<sub>3</sub></b>	8.04	4.46	2.99/2.76	-	-	-	a 7.17 b 7.21 c -
<b>Glu<sub>4</sub></b>	8.07	4.20	1.81/1.69	2.15	-	-	-
<b>Phe<sub>5</sub></b>	8.53	4.39	3.07/2.86	-	-	-	a 7.16 b 7.21 c 7.12
<b>Lys<sub>6</sub></b>	8.04	4.30	1.67	1.30	1.52/1.44	2.72	-
<b>Phe<sub>7</sub></b>	8.53	4.39	3.07/2.86	-	-	-	a 7.12 b 7.22 c -
<b>Lys<sub>8</sub></b>	7.50	3.87	1.66	1.30	1.55	2.76	-

<sup>13</sup> C	C2'	C3'	C5'
Aeg	42.31	42.19	49.84

<sup>13</sup> C	α	β	γ	δ	ε	autres
Glu <sub>2</sub>	53.04	27.84	32.09	-	-	-
Phe <sub>3</sub>	54.21	37.39	-	-	-	a 128.5 b 129.6 c -
Glu <sub>4</sub>	52.54	28.13	31.10	-	-	-
Phe <sub>5</sub>	54.02	37.75	-	-	-	a 128.4 b 129.7 c 126.6
Lys <sub>6</sub>	52.95	32.70	22.86	27.74	38.96	-
Phe <sub>7</sub>	55.30	37.82	-	-	-	a 128.5 b 129.4 c -
Lys <sub>8</sub>	54.11	32.53	22.53	27.33	39.34	-

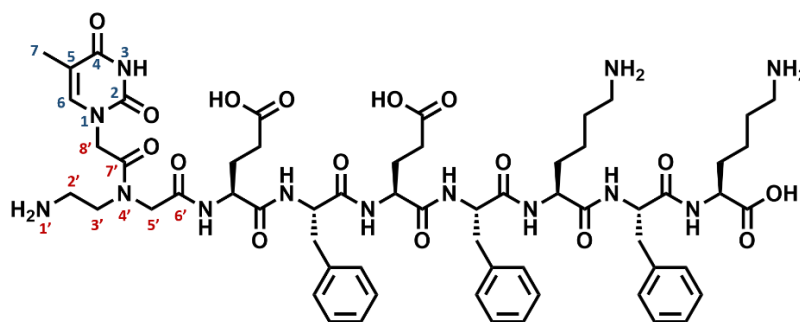
Chromatogramme HPLC analytique en phase inverse:



HRMS (ESI):  $m/z$  calculé pour C<sub>53</sub>H<sub>76</sub>N<sub>11</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup> (100%), 1074.5619, trouvé 1074.5606.

**PNA(Thymine)-Glu-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Lys-OH (PNA(T)-pep)**

Composé PNA(Thymine)-Glu-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Lys-OH obtenu sous forme de solide blanc (158.8 mg, 100.4 μmol, 50.2 % de rendement).



Attribution RMN:

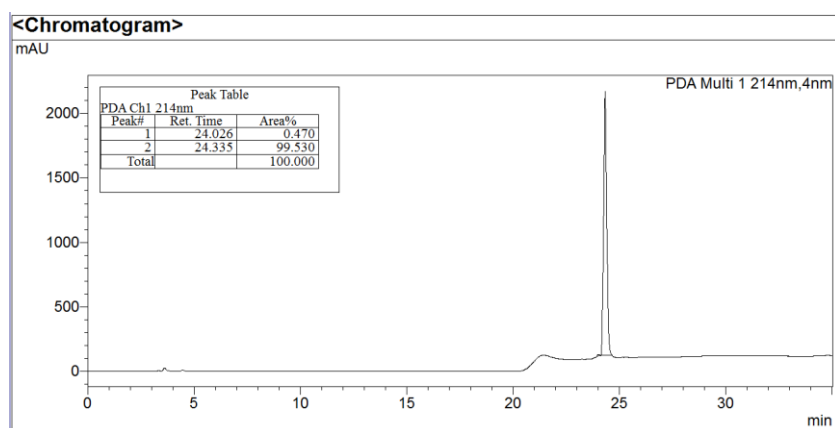
<sup>1</sup> H	NH1'	H2'	H3'	H5'	H8'	NH3	H7	H6
PNA(Thymine)	7.70	3.51/2.93	3.62/3.07	4.12	7.67/4.43	11.32	1.74	7.85

<sup>1</sup> H	NH	α	β	γ	δ	ε	autres
Glu <sub>2</sub>	8.50	4.24	1.83/1.68	2.17	-	-	-
	8.49	4.32	1.89/1.75	2.22			
Phe <sub>3</sub>	8.18	4.52	2.95/2.74	-	-	-	a 7.23 b 7.31 c -
	7.96	4.47	2.92/2.71				
Glu <sub>4</sub>	8.18	4.24	1.83/1.70	2.18	-	-	-
	8.12	4.24	1.83/1.70	2.19			
Phe <sub>5</sub>	7.95	4.51	2.90/2.71	-	-	-	a 7.16 b 7.22 c -
Lys <sub>6</sub>	8.12	4.27	1.63	1.27	1.47	2.73	-
Phe <sub>7</sub>	8.26	4.49	3.08/2.84	-	-	-	a 7.14 b 7.24 c -
Lys <sub>8</sub>	7.87	4.00	1.70	1.34	1.57	2.77	-

<sup>13</sup> C	C2'	C3'	C5'	C8'	C6	C7
PNA(Thymine)	37.38	46.07	50.15	48.27	<i>n.d.</i>	12.39

<sup>13</sup> C	α	β	γ	δ	ε	autres
Glu <sub>2</sub>	52.57	28.25	30.73	-	-	-
Phe <sub>3</sub>	53.95	37.42	-	-	-	<i>n.d.</i>
	54.22	37.76				
Glu <sub>4</sub>	52.38	28.23	30.69	-	-	-
Phe <sub>5</sub>	54.19	37.77	-	-	-	<i>n.d.</i>
Lys <sub>6</sub>	52.90	32.47	22.80	27.48	39.06	-
Phe <sub>7</sub>	54.51	37.89	-	-	-	<i>n.d.</i>
Lys <sub>8</sub>	53.53	31.91	22.71	27.24	39.25	-

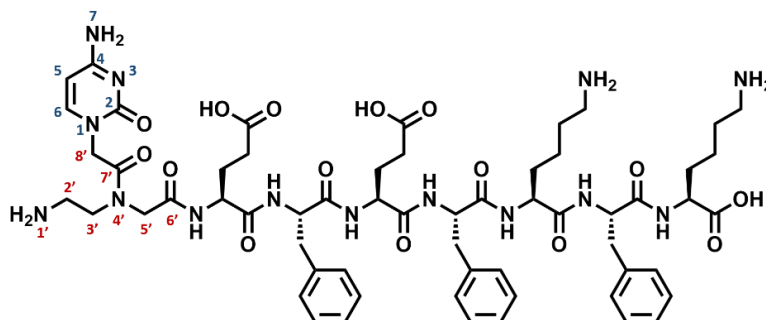
Chromatogramme HPLC analytique en phase inverse:



HRMS (ESI): *m/z* calculé pour C<sub>60</sub>H<sub>82</sub>N<sub>13</sub>O<sub>16</sub> [M+H]<sup>+</sup> (100%), 1240.5997, trouvé 1240.5958.

**PNA(Cytosine)-Glu-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Lys-OH (PNA(C)-pep)**

Composé PNA(Cytosine)-Glu-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Lys-OH obtenu sous forme de solide blanc (198.9 mg, 118.3  $\mu$ mol, 59.2 % de rendement).



Attribution RMN:

<sup>1</sup> H	NH1'	H2'	H3'	H5'	H8'	H5	H6	NH7
PNA(Cytosine)	7.71	3.51/2.94	3.66/3.10	4.17	4.65/4.43	5.76	7.28	7.59/7.52

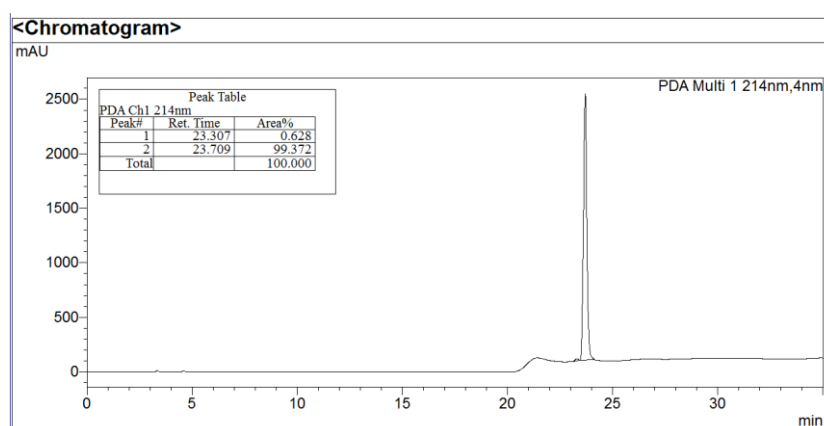
<sup>1</sup> H	NH	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$	autres
Glu <sub>2</sub>	8.41	4.31	1.89/1.74	2.22	-	-	-
	8.36	4.26	1.84/1.69	2.18			
Phe <sub>3</sub>	8.15	4.51	2.93/2.72	-	-	-	a 7.17
	8.00	4.47	2.92/2.71				b 7.22
Glu <sub>4</sub>	8.15	4.23	1.84/1.69	2.19	-	-	-
	8.10	4.237	1.84/1.69	2.20			
Phe <sub>5</sub>	7.94	4.54	2.97/2.75	-	-	-	a 7.21 b - c -
Lys <sub>6</sub>	8.15	4.21	1.58	1.24	1.46	2.73	-
Phe <sub>7</sub>	7.89	4.60	3.07/2.81	-	-	-	a 7.26
							b -
Lys <sub>8</sub>	8.32	4.16	1.74	1.36	1.57	2.78	-

<sup>13</sup> C	C2'	C3'	C5'	C8'	C5	C6
PNA(Cytosine)	45.59	46.07	50.28	49.47	120.34	93.82



<sup>13</sup> C	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$	autres
<b>Glu<sub>2</sub></b>	52.56	28.25	30.59	-	-	-
<b>Phe<sub>3</sub></b>	54.34	37.56	-	-	-	a 128.5 b 129.7 c -
	54.29					
<b>Glu<sub>4</sub></b>	52.30	28.14	30.48	-	-	-
<b>Phe<sub>5</sub></b>	53.95	37.79	-	-	-	a 128.5 b- c-
<b>Lys<sub>6</sub></b>	52.91	32.00	22.63	27.09	39.18	-
<b>Phe<sub>7</sub></b>	53.74	37.97	-	-	-	a 128.5 b- c-
<b>Lys<sub>8</sub></b>	52.32	30.93	22.86	27.09	39.11	-

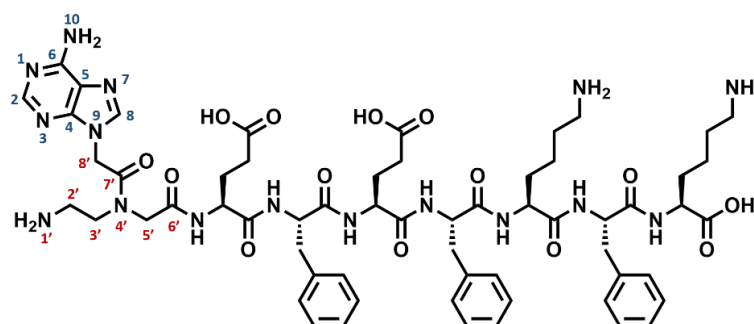
Chromatogramme HPLC analytique en phase inverse:



HRMS (ESI):  $m/z$  calculé pour C<sub>59</sub>H<sub>81</sub>N<sub>14</sub>O<sub>15</sub> [M+H]<sup>+</sup> (100%), 1225.6000, trouvé 1225.5967.

### **PNA(Adénine)-Glu-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Lys-OH (PNA(A)-pep)**

Composé PNA(Adénine)-Glu-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Lys-OH obtenu sous forme de solide blanc (212.2 mg, 124.4  $\mu$ mol, 62.2 % de rendement).



Attribution RMN:

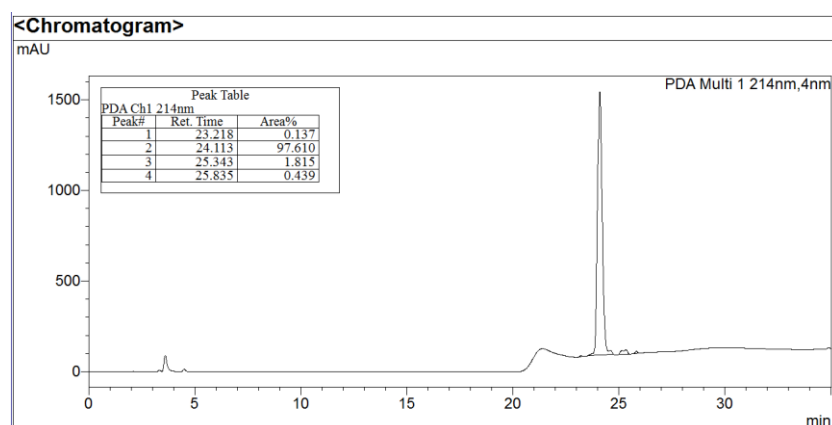
<sup>1</sup> H	NH1'	H2'	H3'	H5'	H8'	H2	H8	NH10
<b>PNA(Adénine)</b>	7.71	3.53/2.95	3.73/3.13	4.23	5.25/4.97	7.27	7.99	8.77

<sup>1</sup> H	NH	α	β	γ	δ	ε	autres
Glu <sub>2</sub>	8.46	4.38	4.93	4.78	-	-	-
	8.41	4.25	1.82/1.67	2.16			
Phe <sub>3</sub>	8.20	4.53	2.94/2.74	-	-	-	a 7.17 b 7.23 c 7.15
	7.96	4.45	2.87/2.62				
Glu <sub>4</sub>	8.07	4.25	1.84/1.69	2.19	-	-	-
	8.16	4.24	1.83/1.69	2.19			
Phe <sub>5</sub>	7.93	4.54	2.96/2.76	-	-	-	a 7.19 b 7.21 c -
Lys <sub>6</sub>	8.15	4.22	1.58	1.24	1.48	2.73	-
	8.11						
Phe <sub>7</sub>	7.91	4.59	3.07/2.81	-	-	-	a 7.24 b 7.26 c -
Lys <sub>8</sub>	8.29	4.15	1.74/1.61	1.36	1.55	2.77	-

<sup>13</sup> C	C2'	C3'	C5'	C8'	C2	C8
PNA(Adénine)	45.63	46.10	50.19	44.18	130.61	120.35

<sup>13</sup> C	α	β	γ	δ	ε	autres
Glu <sub>2</sub>	52.51	28.38	30.65	-	-	-
Phe <sub>3</sub>	54.20	37.45	-	-	-	a 128.4 b 129.7 c 126.7
	54.38					
Glu <sub>4</sub>	52.31	28.12	30.56	-	-	-
Phe <sub>5</sub>	53.91	37.83	-	-	-	a 128.5 b 129.7 c -
Lys <sub>6</sub>	52.89	32.06	22.66	27.12	39.16	-
Phe <sub>7</sub>	53.88	37.98	-	-	-	a 128.5 b 129.7 c -
Lys <sub>8</sub>	52.45	31.06	22.84	27.11	39.12	-

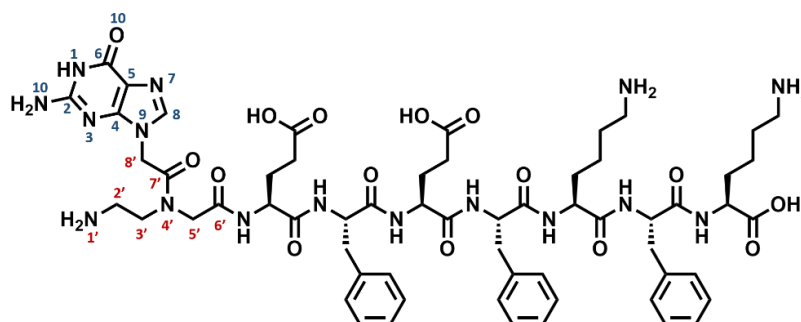
Chromatogramme HPLC analytique en phase inverse:



HRMS (ESI):  $m/z$  calculé pour C<sub>60</sub>H<sub>81</sub>N<sub>16</sub>O<sub>14</sub> [M+H]<sup>+</sup> (100%), 1249.6113, trouvé 1249.6067.

**PNA(Guanine)-Glu-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Lys-OH (PNA(G)-pep)**

Composé PNA(Guanine)-Glu-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Lys-OH obtenu sous forme de solide blanc (205.7 mg, 119.5  $\mu$ mol, 59.8 % de rendement).



Attribution RMN:

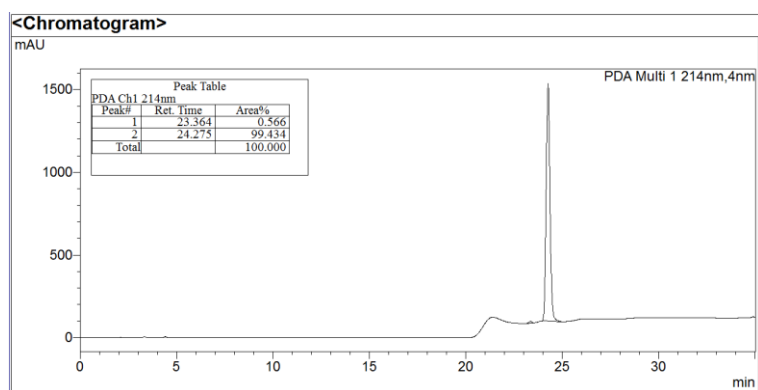
<sup>1</sup> H	NH1'	H2'	H3'	H5'	H8'	NH1	H8	NH10
PNA(Guanine)	7.49	3.49/2.94	3.68/3.12	4.19	5.01/4.76	10.62	7.53	7.76

<sup>1</sup> H	NH	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$	autres
Glu <sub>2</sub>	8.45	4.24	1.83/1.67	2.17	-	-	-
	8.48	4.33	1.91/1.75	2.23			
Phe <sub>3</sub>	7.94	4.52	2.93/2.73	-	-	-	a 7.15
	8.20	4.52	2.93/2.73				b 7.22
Glu <sub>4</sub>	8.19	4.24	1.83/1.69	2.18	-	-	-
	8.11	4.07	1.83/1.67	2.18			
Phe <sub>5</sub>	7.97	4.47	2.89/2.643	-	-	-	a 7.18
							b 7.16
							c -
Lys <sub>6</sub>	8.12	4.24	1.60	1.25	1.47	2.28	-
Phe <sub>7</sub>	8.08	4.53	3.07/2.82	-	-	-	a 7.24
							b 7.21
							c -
Lys <sub>8</sub>	8.08	4.07	1.71/1.60	1.343	1.55	2.77	-

<sup>13</sup> C	C2'	C3'	C5'	C8'	C8
PNA(Guanine)	45.58	46.08	50.22	44.08	<i>n.d.</i>

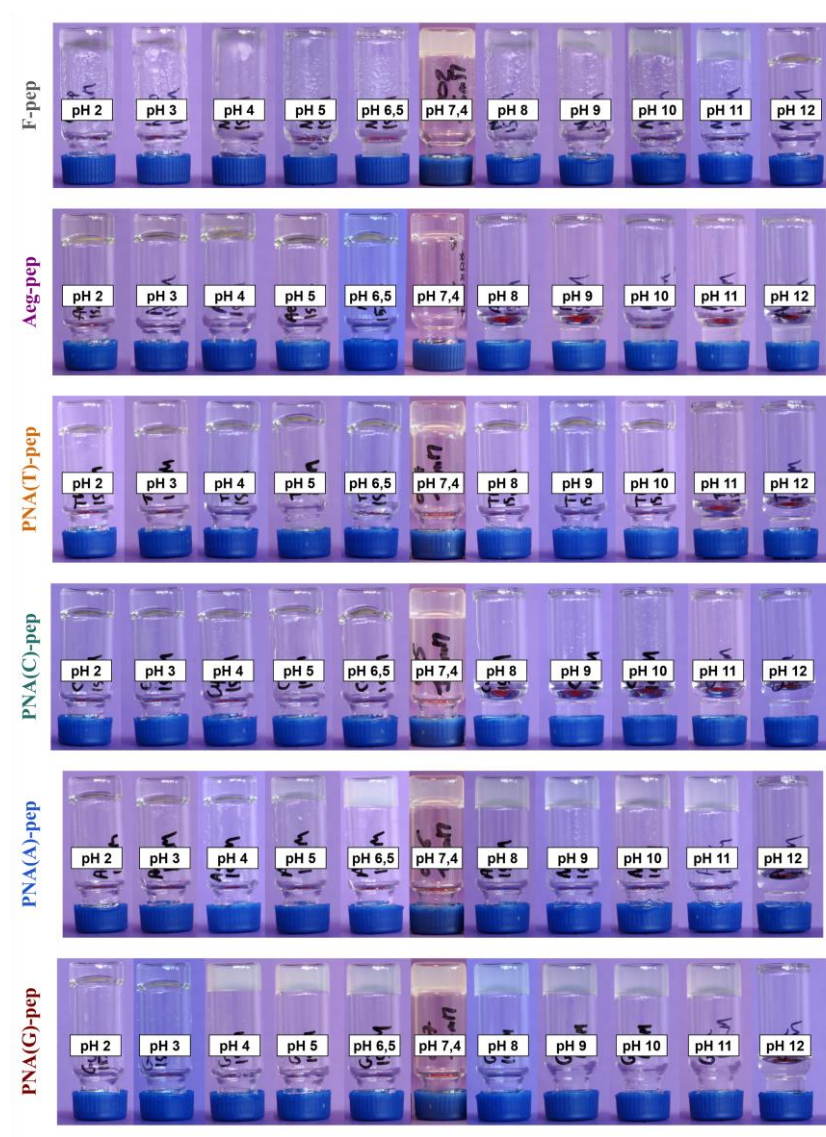
<sup>13</sup> C	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$	autres
Glu <sub>2</sub>	52.61	28.30	30.71	-	-	-
Phe <sub>3</sub>	53.99	37.77	-	-	-	a 128.4
						b 129.6
						c -
Glu <sub>4</sub>	52.39	28.19	30.62	-	-	-
Phe <sub>5</sub>	54.37	37.52	-	-	-	a 128.5
						b 129.6
						c -
Lys <sub>6</sub>	52.93	32.39	22.77	27.40	39.1	-
Phe <sub>7</sub>	54.26	37.88	-	-	-	a 128.6
						b 129.7
						c -
Lys <sub>8</sub>	53.27	31.83	22.71	27.20	39.23	-

## Chromatogramme HPLC analytique en phase inverse:



HRMS (ESI):  $m/z$  calculé pour  $C_{60}H_{81}N_{16}O_{15}$   $[M+H]^+$  (100%), 1265.6062, trouvé 1265.6011.

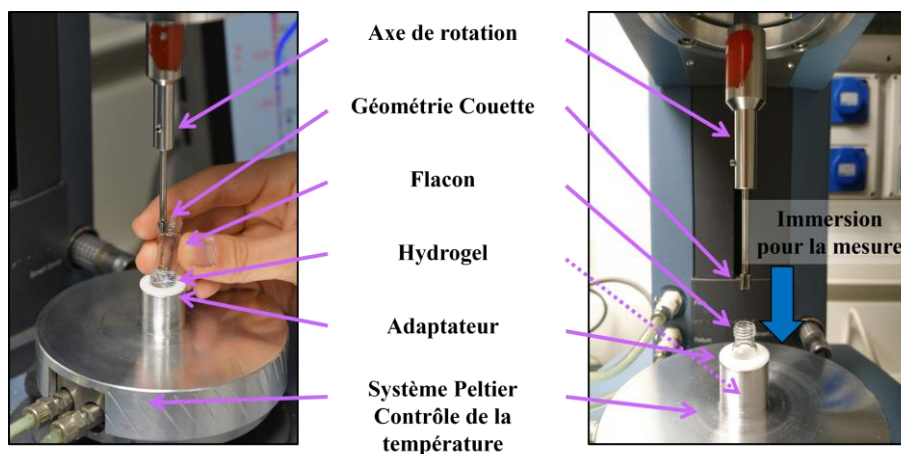
## SLII.2 FORMULATIONS ET CARACTERISATIONS RHEOLOGIQUES



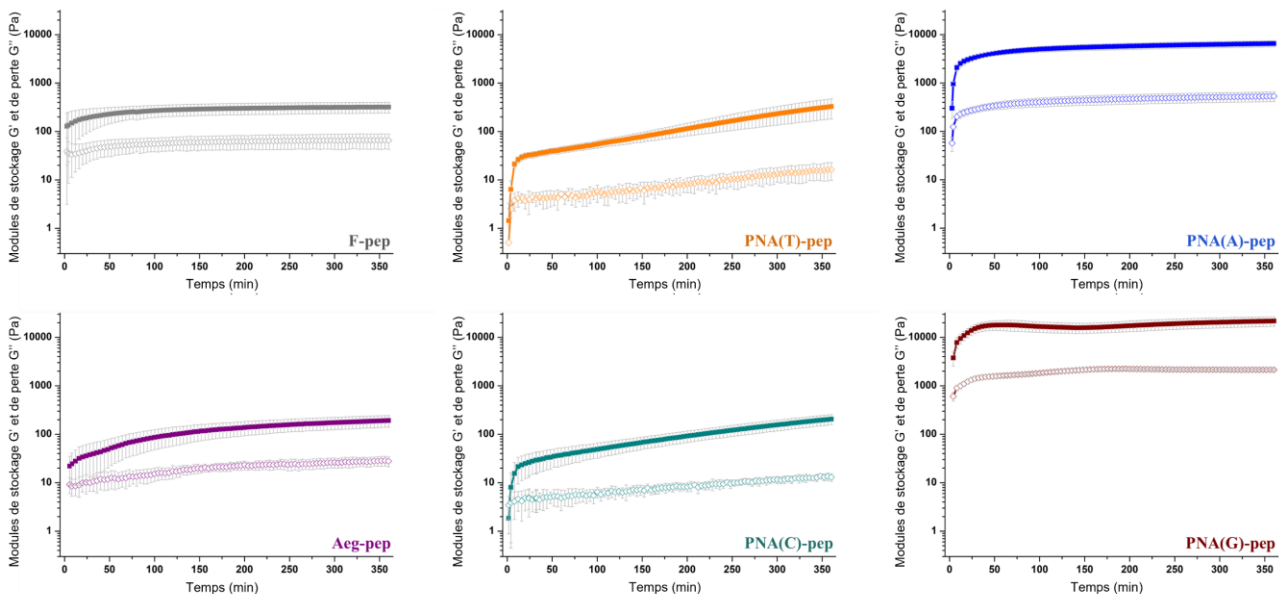
**Figure SII-1** Photos des hydrogels subissant le test d'inversion de tube à  $C = 15$  mM à différents pH (Tris.HCl 1 M).



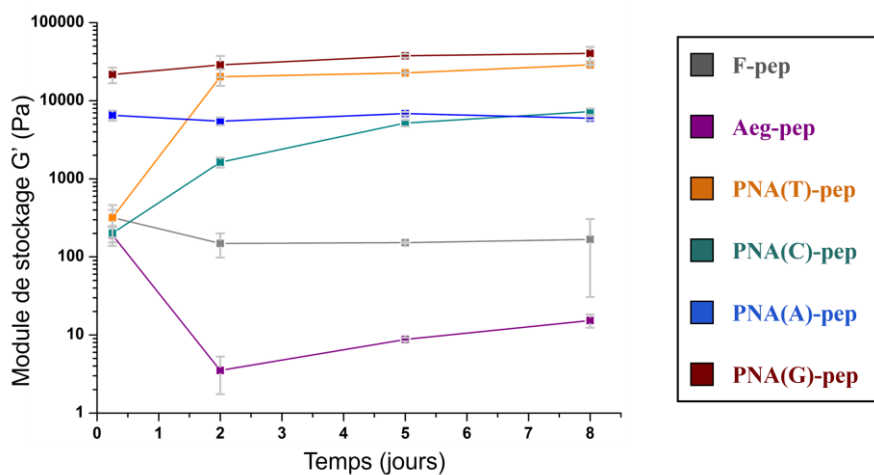
**Figure SII-2** Photos des hydrogels subissant le test d'inversion de tube (Tris.HCl (1 M, pH = 7.4)) à différentes concentrations (de 1 à 20 mM).



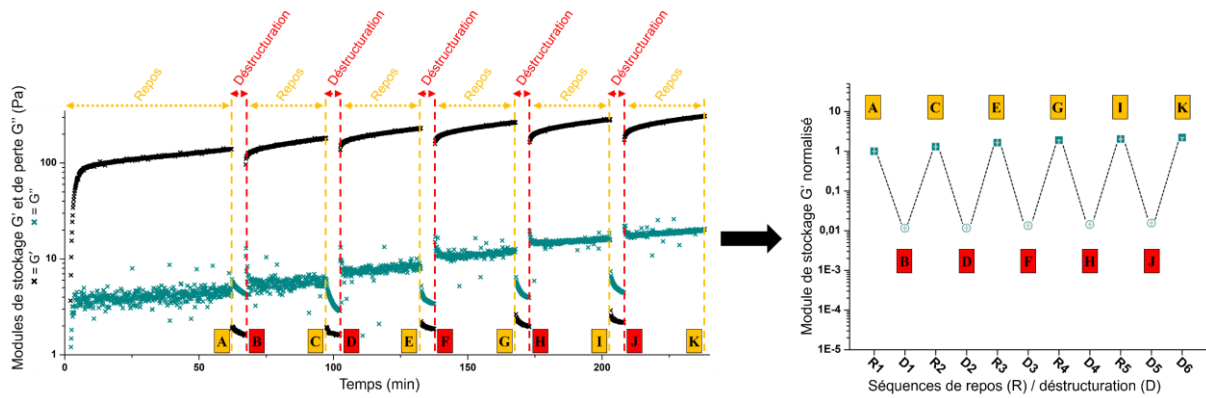
**Figure SII-3** Photos du rhéomètre et du système de mesure utilisés pour les expériences de rhéologie.



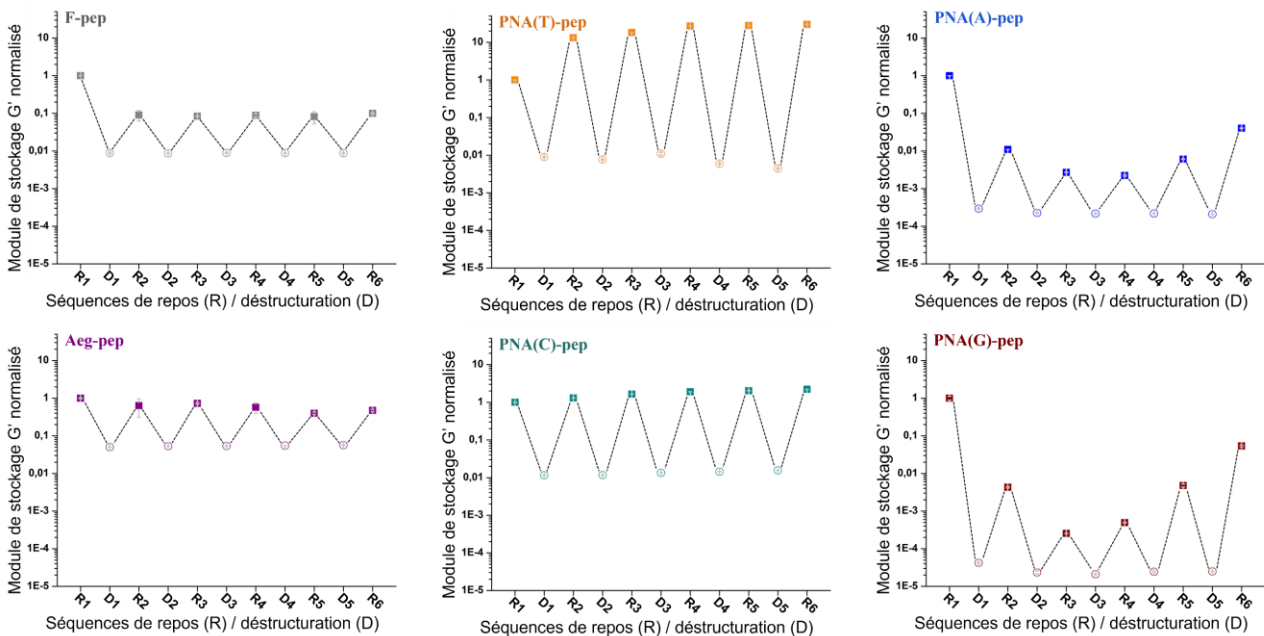
**Figure SII-4** Rhéogrammes des balayages en temps pour chacun des six peptides/nucléoptides étudiés (15 mM, Tris.HCl (1 M, pH 7.4)).



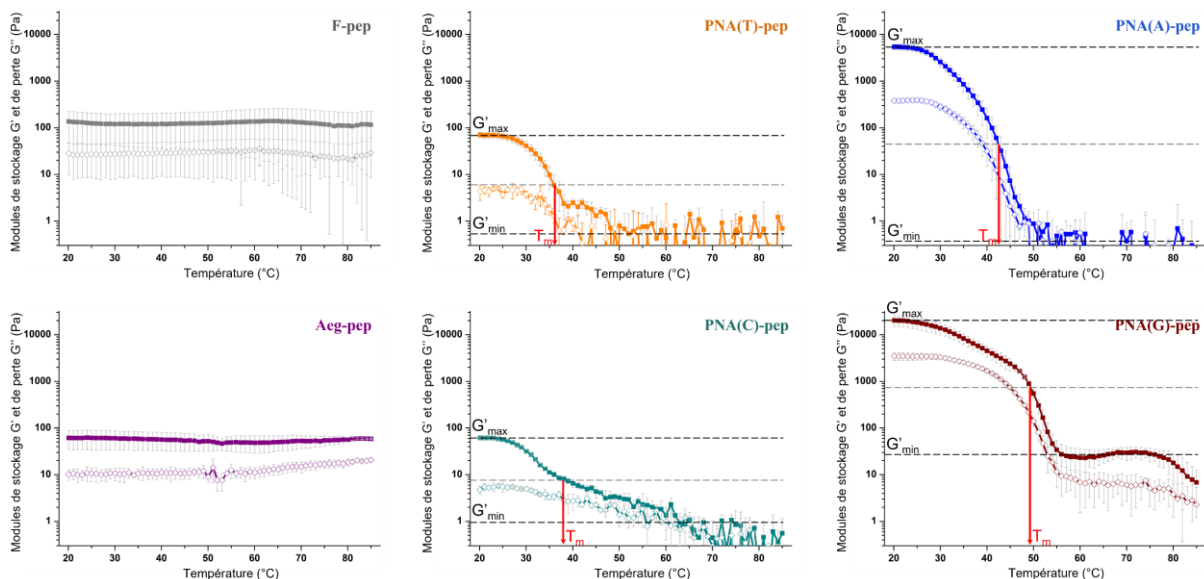
**Figure SII-5** Evolution du module de stockage  $G'$  des hydrogels sur plusieurs jours de vieillissement pour les six peptides/nucléoptides (15 mM, Tris.HCl (1 M, pH 7.4)).



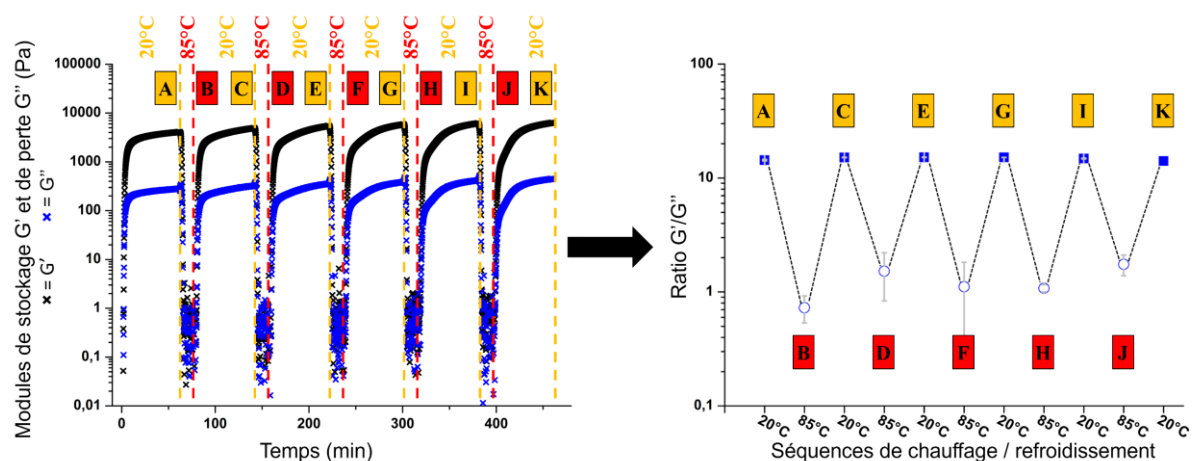
**Figure SII-6** Rhéogramme de l'expérience montrant le caractère thixotrope du gel de PNA(C)-pep (à gauche) et illustration de la méthodologie utilisée pour obtenir  $G'$  en fonction de séquences de repos/déstructuration (à droite). Pendant les étapes de repos et de déstructuration, les déformations imposées sont  $\gamma = 0.5 \%$  et  $\gamma = 200 \%$ , respectivement.



**Figure SII-7** Evaluation du caractère thixotrope des hydrogels pour chacun des six peptides/nucléopeptides étudiés (15 mM in Tris.HCl (1 M, pH 7.4)) selon des cycles alternants phases de destruction (D1 à D5) et de repos (R1 à R6).



**Figure SII-8** Rhéogrammes des balayages en température pour chacun des six peptides/nucléopeptides étudiés (15 mM, Tris.HCl (1 M, pH 7.4)) et détermination de la température de transition  $T_m$ .



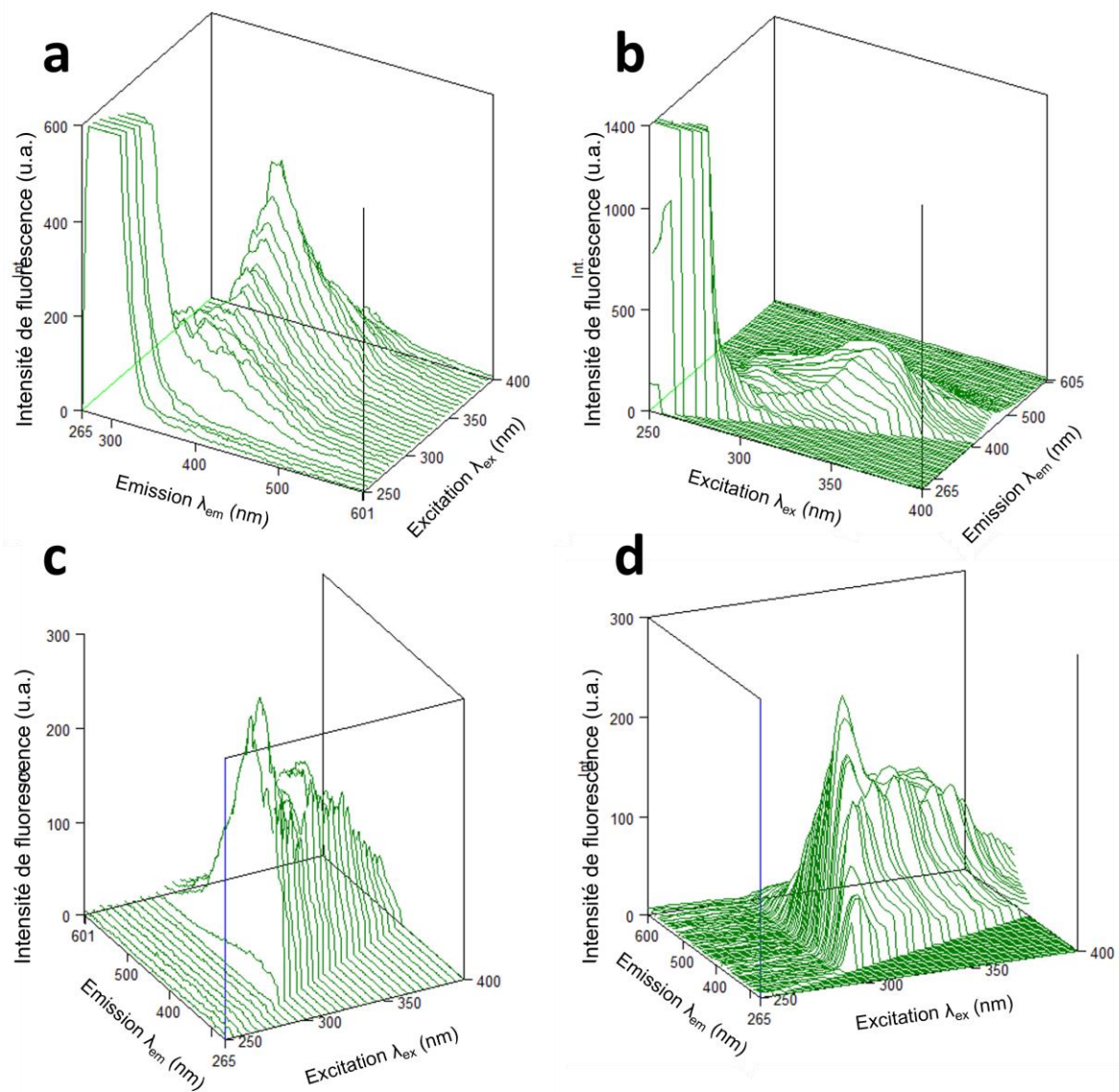
**Figure SII-9** Rhéogramme de l'expérience soulignant la capacité de régénération thermique du gel de PNA(A)-pep (à gauche) et illustration de la méthodologie utilisée pour obtenir  $G'/G''$  en fonction de séquences de chauffage/refroidissement (à droite).



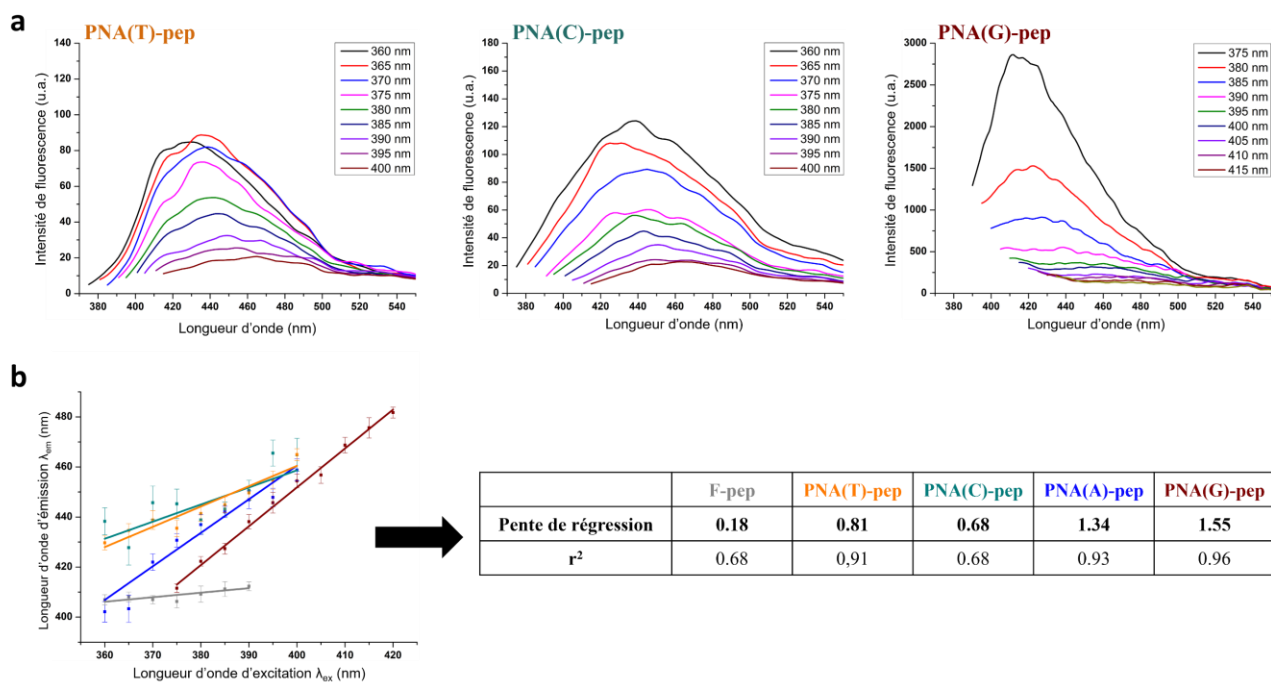
### SI-II.3 MICROSCOPIE TEM ET FLUORESCENCE



**Figure SII-10** Images supplémentaires de TEM (grandissement x11500, hormis (e) grandissement x20000), contrastées négativement à l'acide phosphotungstique.



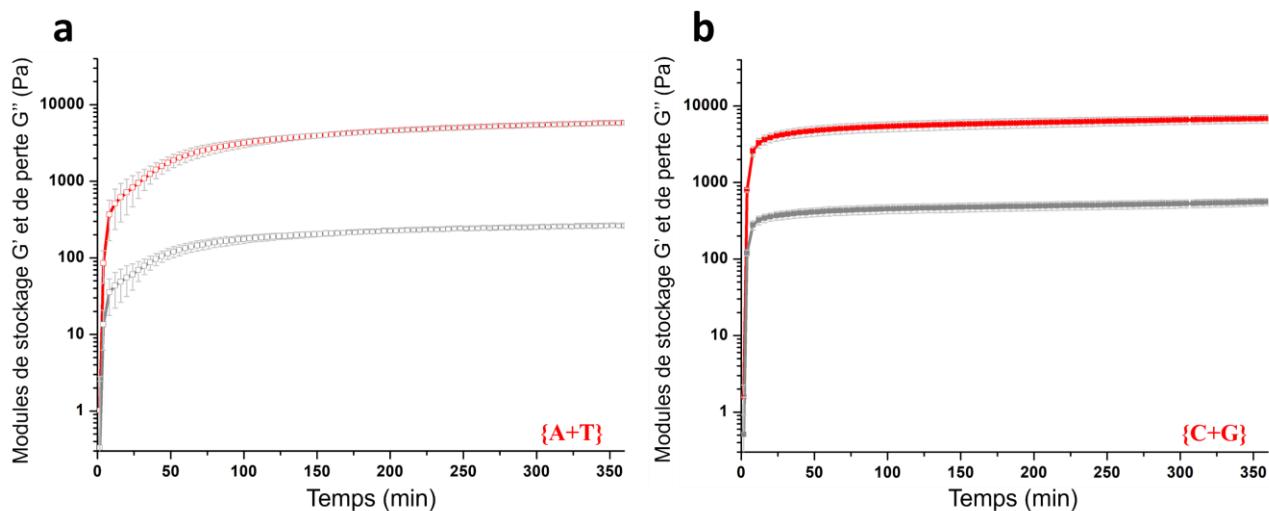
**Figure SII-11** Exemples de spectres de fluorescence 3D: (a) spectres d'émission et (b) spectres d'excitation pour un échantillon de Aeg-pep à 5 mM en Tris.HCl (1 M, pH = 7.4) et (c) spectres d'émission et (d) spectres d'excitation de PNA(C)-pep à 5 mM en Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).



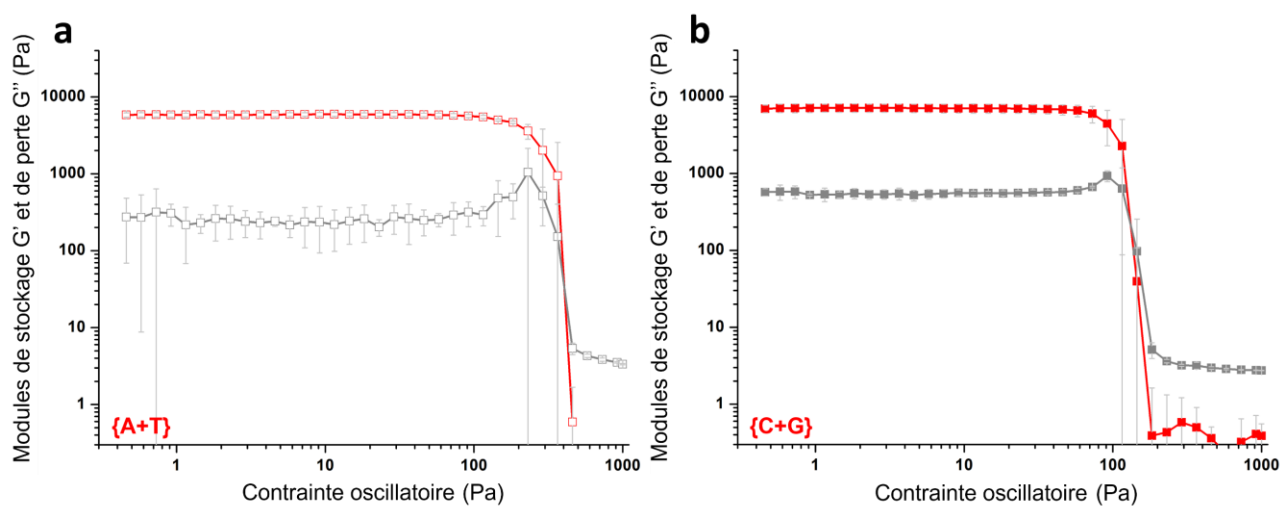
**Figure SII-12** (a) Spectres d'émission montrant l'évolution de la bande d'émission de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation pour les composés PNA(T)-pep, PNA(C)-pep et PNA(G)-pep; (b) Mise en évidence de la corrélation linéaire entre les longueurs d'onde d'émission et d'excitation indicative d'un effet de REES pour les quatre nucleopeptides PNA(X)-pep, et paramètres des régressions linéaires.

## ANNEXES – CHAPITRE III

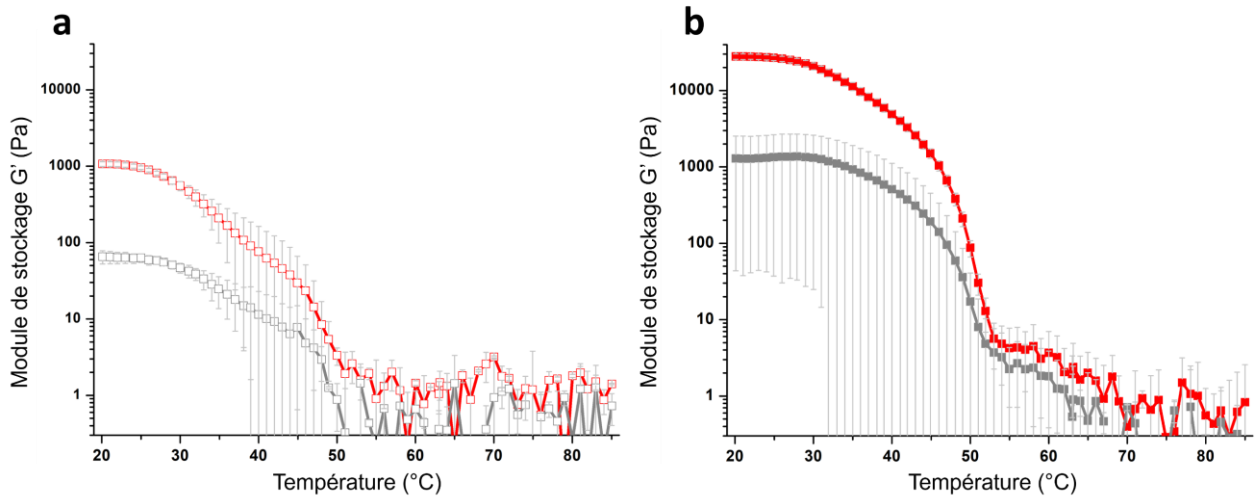
### SI.III.1 FORMULATIONS ET CARACTERISATIONS RHEOLOGIQUES



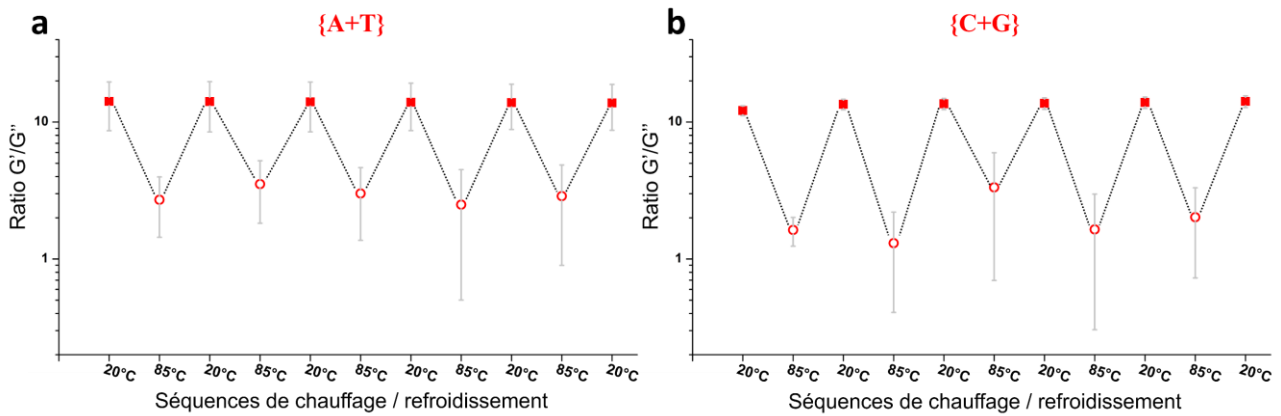
**Figure SIII-1** Rhéogrammes des balayages en temps pour les systèmes multi-composés {A+T} et {C+G} étudiés à  $C_T = 15$  mM (ratio 1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4).



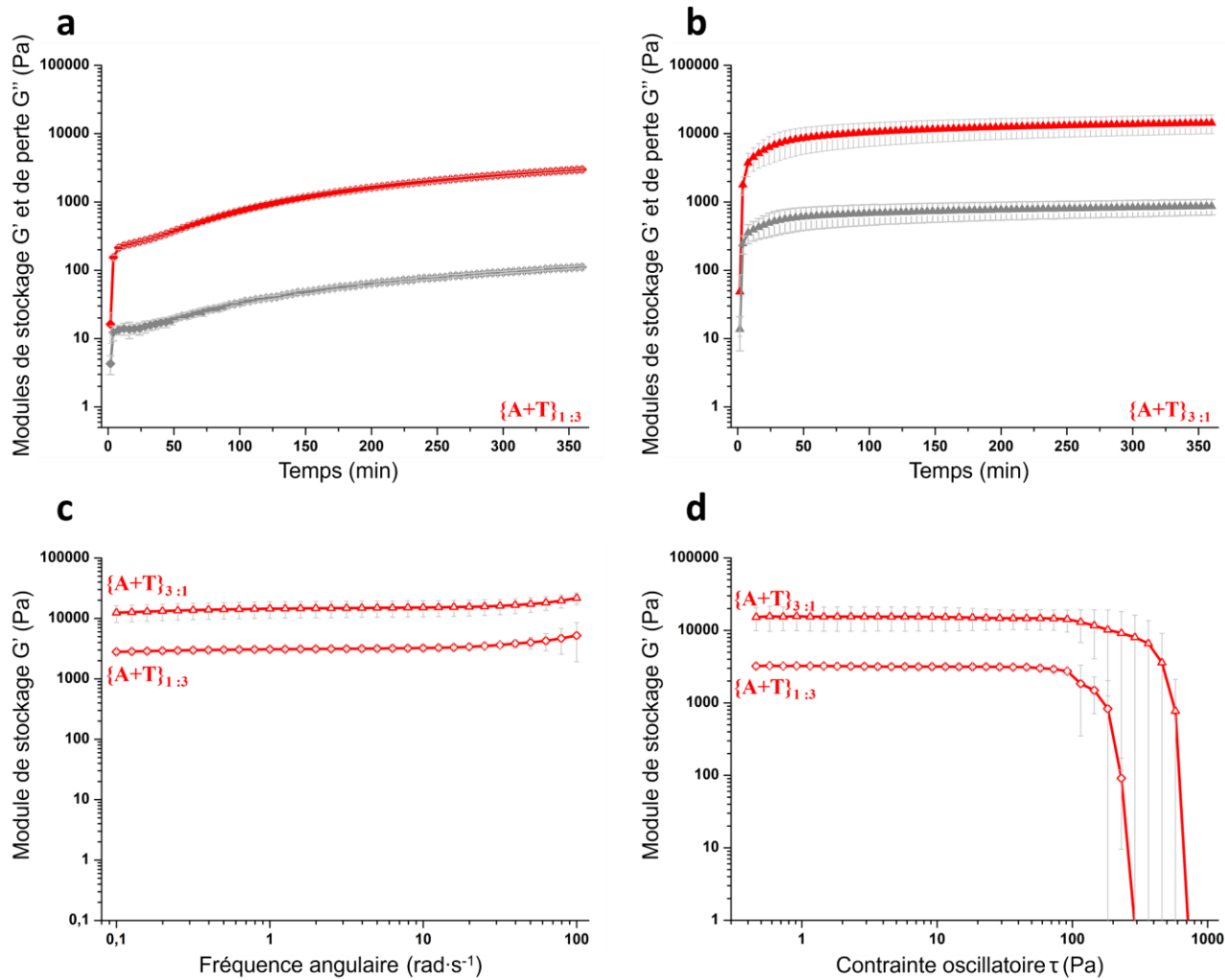
**Figure SIII-2** Rhéogrammes des balayages en temps pour les systèmes multi-composés {A+T} et {C+G} étudiés à  $C_T = 15$  mM (ratio 1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4).



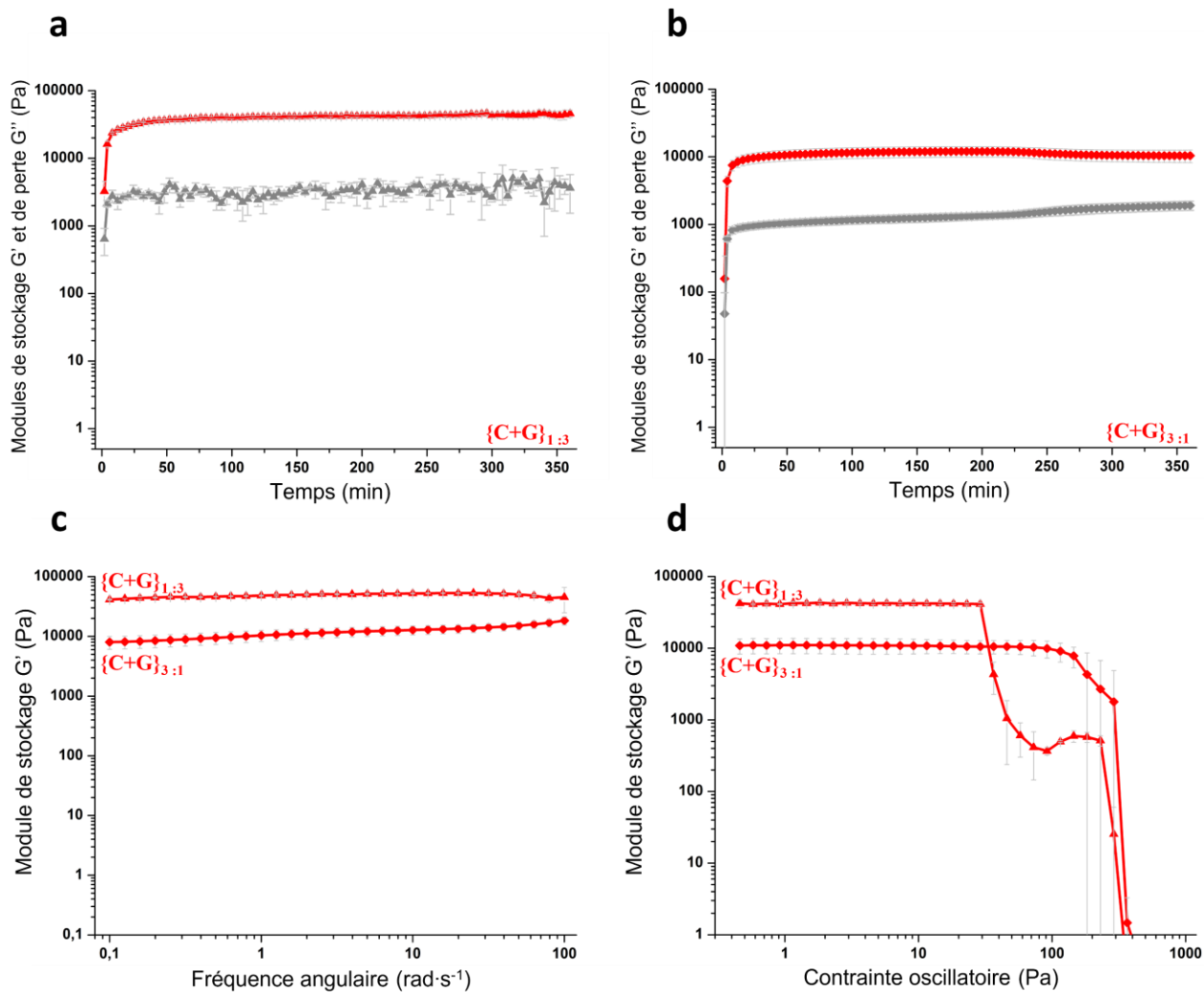
**Figure SIII-3** Rhéogrammes des balayages en température pour les systèmes multi-composés {A+T} (à gauche, a), et {C+G} (à droite, b), étudiés à  $C_T = 15$  mM (ratio 1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4).



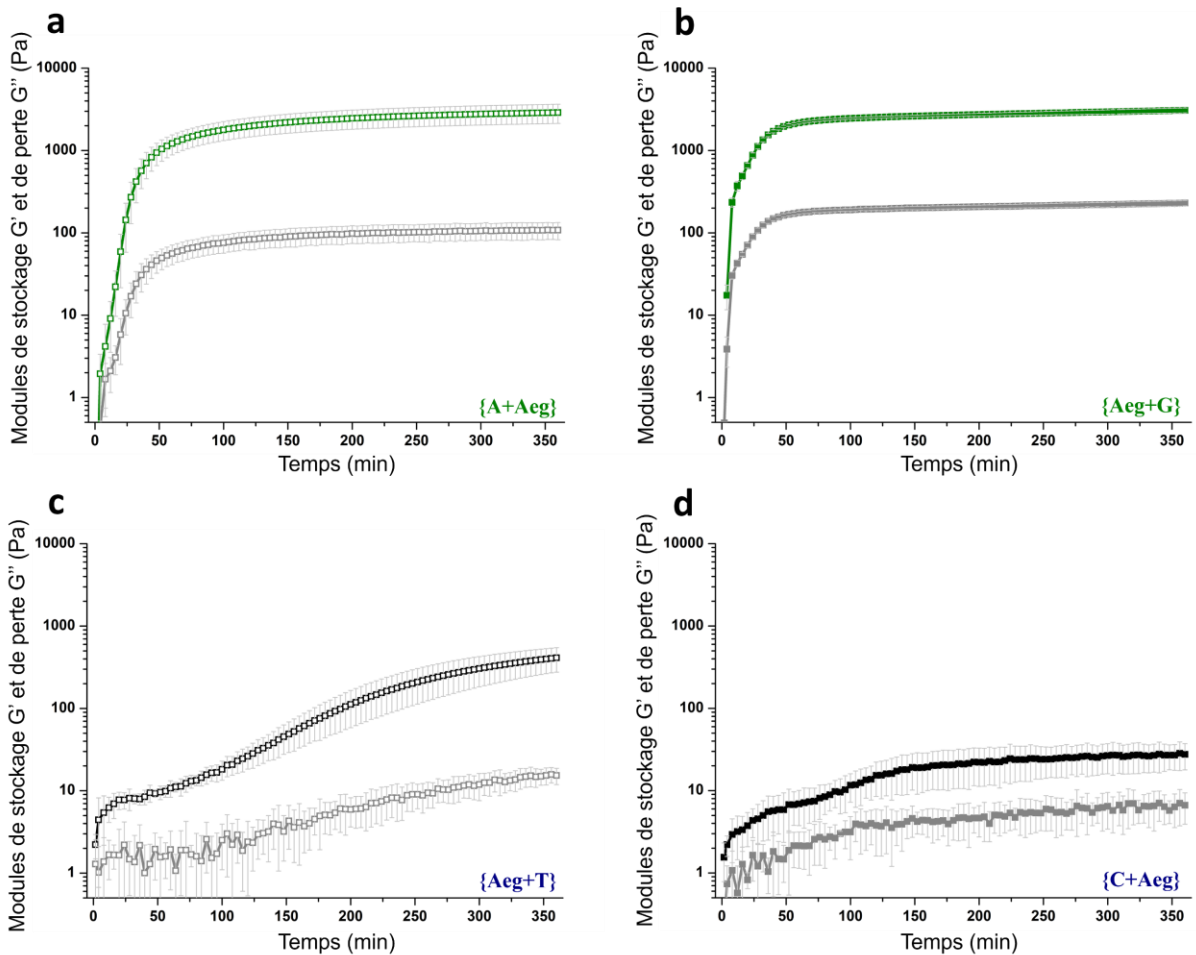
**Figure SIII-4** Rhéogramme de l'expérience soulignant la capacité de régénération thermique des hydrogels multi-composés {A+T} et {C+G} étudiés à  $C_T = 15$  mM en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4). La méthodologie utilisée est la même que celle employée pour les gels mono-composés, Figure SII-7.



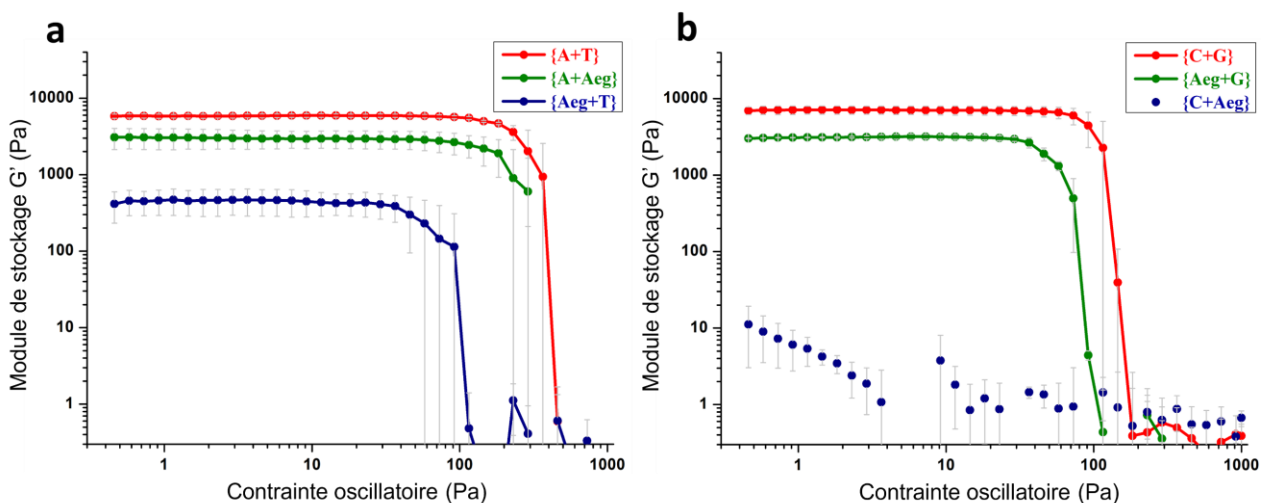
**Figure III-5** Rhéogrammes des balayages en temps pour les hydrogels multi-composés  $\{A+T\}_{1:3}$  (a) et  $\{A+T\}_{3:1}$  (b) ainsi que des balayages en fréquence (c) et des balayages en contrainte (d) effectués sur ces deux gels. Tous sont étudiés à  $C_T = 15$  mM, en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4).



**Figure SIII-6** Rhéogrammes des balayages en temps pour les hydrogels multi-composés  $\{C+G\}_{1:3}$  (a) et  $\{C+G\}_{3:1}$  (b) ainsi que des balayages en fréquence (c) et des balayages en contrainte (d) effectués sur ces deux gels. Tous sont étudiés à  $C_T = 15$  mM, en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4).



**Figure SIII-7** Rhéogrammes des balayages en temps pour les systèmes multi-composés témoins {A+Aeg} (a), {C+Aeg} (b), {Aeg+T} (c), et {Aeg+G} (d) étudiés à  $C_T = 15$  mM (ratio 1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4).



**Figure SIII-8** Rhéogrammes des balayages en contrainte pour les systèmes multi-composés {A+T}, {A+Aeg}, {Aeg+T} (a) et {C+G}, {C+Aeg} et {Aeg+G} (b) étudiés à  $C_T = 15$  mM (ratio 1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4).



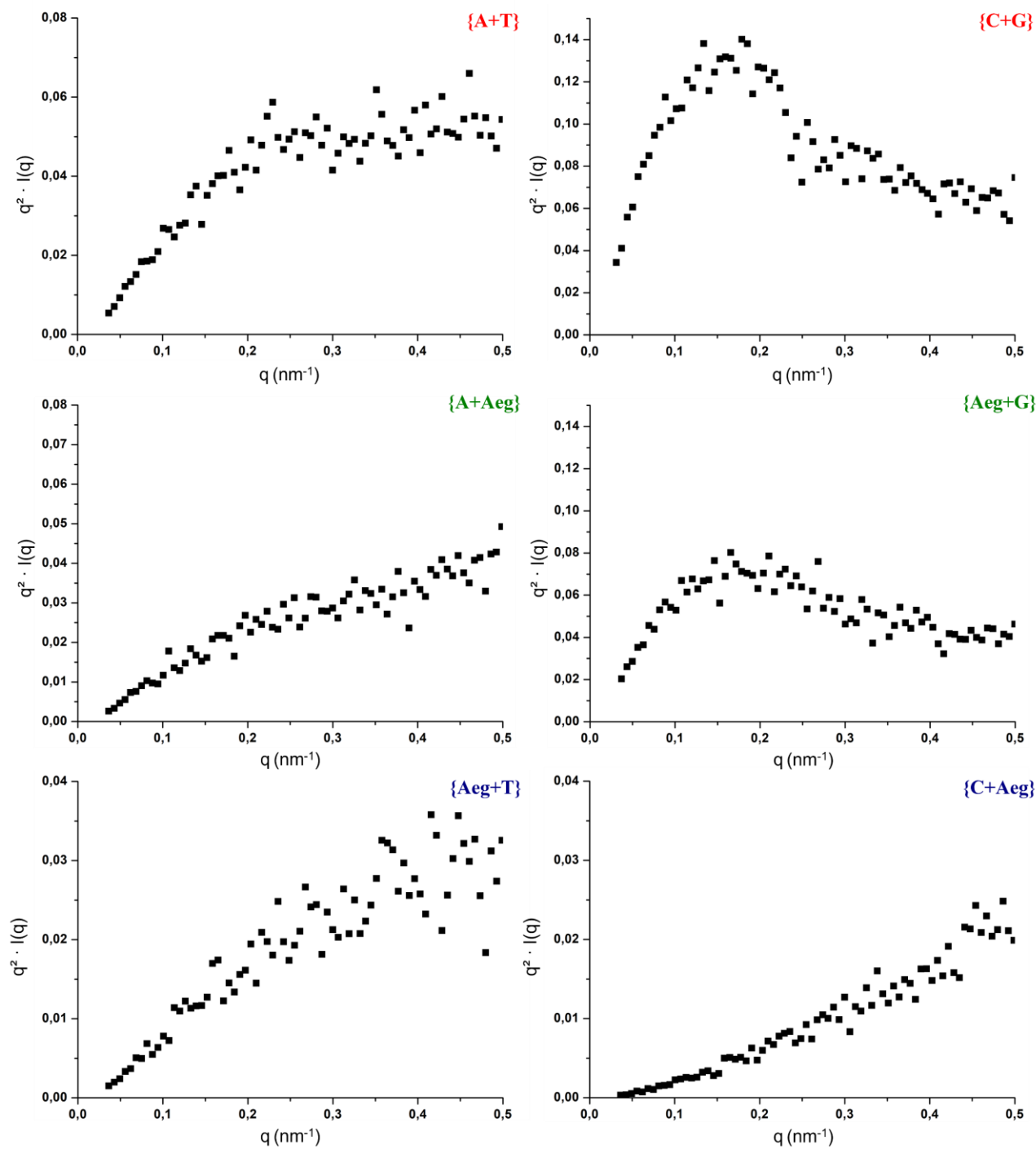
### SL.III.2 RELAXOMETRIE, SAXS, MICROSCOPIE TEM ET FLUORESCENCE

	$A_0 (s^{-1})$	$A_1 (s^{-1})$	$A_2 (s^{-1})$	$\tau_c(1)$ (s $\times 10^{-6}$ )	$\tau_c(2)$ (s $\times 10^{-8}$ )	$r_1 = \frac{A(1)}{\tau_c(1)}$ (s <sup>-2</sup> )	$r_2 = \frac{A(2)}{\tau_c(2)}$ (s <sup>-2</sup> )	<b>p</b>
{A+T}	0.54	6.55	0.51	6.48	7.07	$1.01 \times 10^6$	$7.21 \times 10^6$	12.3 %
{A+Aeg}	0.54	3.72	0.33	6.72	6.28	$0.554 \times 10^6$	$5.22 \times 10^6$	9.6 %
{Aeg+T}	0.54	3.01	0.28	6.54	6.25	$0.460 \times 10^6$	$4.54 \times 10^6$	9.2 %
{C+G}	0.54	9.06	0.65	7.34	7.79	$1.23 \times 10^6$	$8.35 \times 10^6$	12.8 %
{Aeg+G}	0.54	6.13	0.46	6.26	6.04	$0.979 \times 10^6$	$7.69 \times 10^6$	11.3 %
{C+Aeg}	0.54	1.78	0.19	6.70	4.95	$0.266 \times 10^6$	$3.87 \times 10^6$	6.4 %

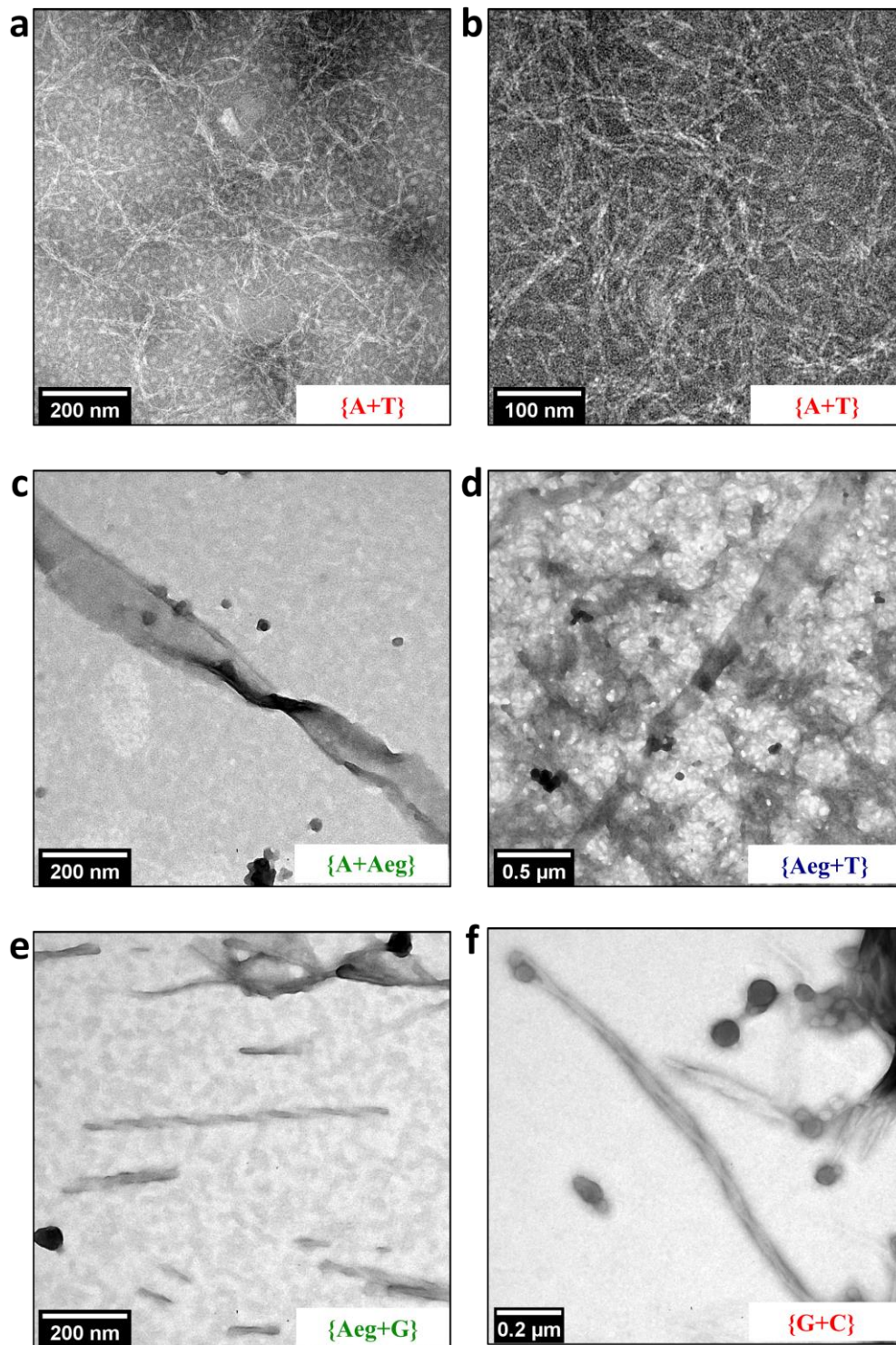
**Figure SIII-9** Tableau récapitulatif les grandeurs caractéristiques des Lorentziennes  $L_1$  et  $L_2$  permettant de modéliser les données expérimentales de relaxométrie RMN. L'équation du modèle est alors :  $R_1(\nu) = A_0 + \frac{A_1}{(1+\tau_c(1)\nu)^2} + \frac{A_2}{(1+\tau_c(2)\nu)^2}$ . Afin de faciliter la comparaison, sont calculés les rapports  $p = \frac{r(1)}{r(1)+r(2)}$  avec  $r(i) = \frac{A(i)}{\tau_c(i)}$ . Tous les gels multi-composés étudiés sont préparés à  $C_T = 15$  mM (ratio 1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4).

	Exposant $n$	Exposant $m$	Longueur de corrélation $L$ (nm)	A (a.u.)	C ( $10^{-3}$ a.u.)	B ( $10^{-3}$ a.u.)	$\chi^2$
{A+T}	1.71	1.89	9.32	4.55	18.06	1.00	0.0072
{A+Aeg}	1.05	1.75	10.2	2.33	2.07	30.83	0.0062
{Aeg+T}	1.02	1.51	9.02	1.40	0.97	0,0011	0.0057
{C+G}	1.95	2.99	9.91	19.9	10.38	0.028	0.0199
{Aeg+G}	1.95	2.93	8.82	8.81	0.01	19.99	0.0115
{C+Aeg}	0.99	0.71	15.0	0.43	0.05	0.0013	0.0029

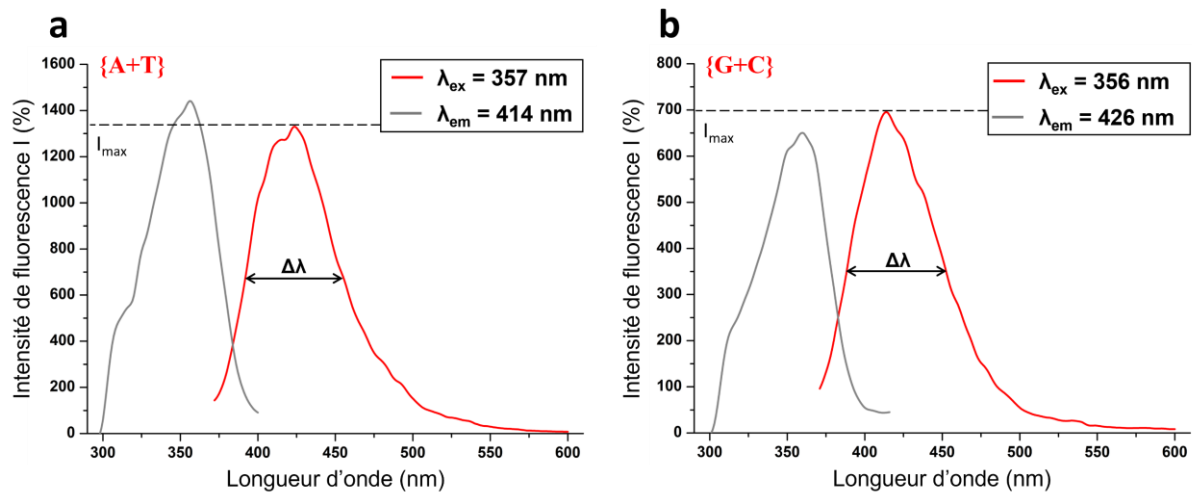
**Figure SIII-10** Paramètres du modèle « à deux longueurs de corrélation » (*CorrLength*) utilisés pour modéliser les données expérimentales de SAXS pour les systèmes multi-composés à  $C_T = 15$  mM (ratio 1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4).



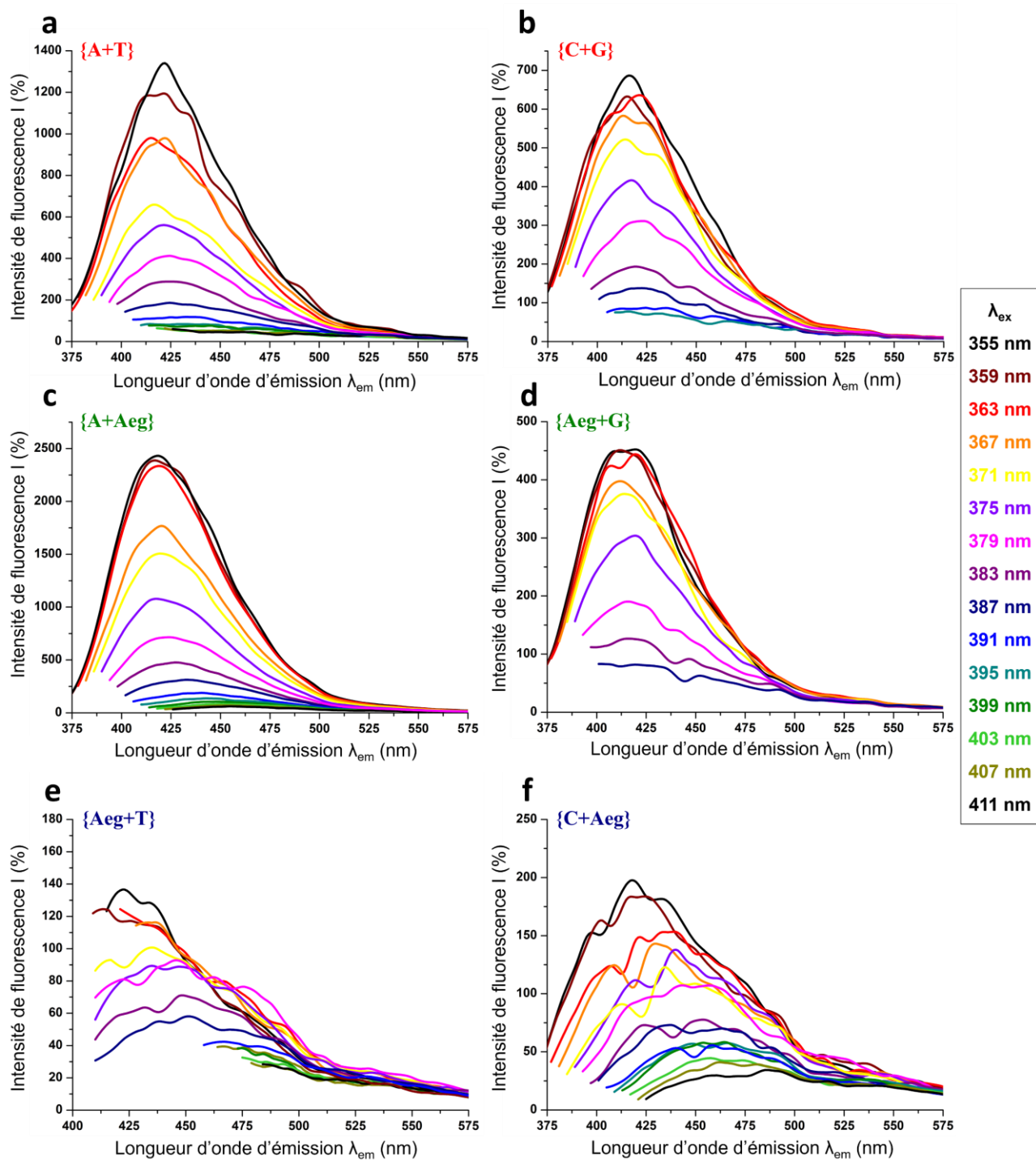
**Figure SIII-11** Représentations de Kratky ( $q^2 \times I(q) = f(q)$ ) des données expérimentales de SAXS pour les systèmes multi-composés à  $C_T = 15$  mM (ratio 1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4).



**Figure SIII-12** Images supplémentaires de TEM pour les systèmes multi-composés étudiés, contrastées négativement à l'acide phosphotungstique.



**Figure SIII-13** Spectres d'émission (en rouge) et d'excitation (en gris) de fluorescence pour systèmes multi-composés {A+T} et {C+G}, soulignant les transitions principales, et la largeur à mi-hauteur de la bande d'émission ( $\Delta\lambda$ ). Les échantillons sont étudiés à  $C_T = 5 \text{ mM}$  (ratio 1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4).



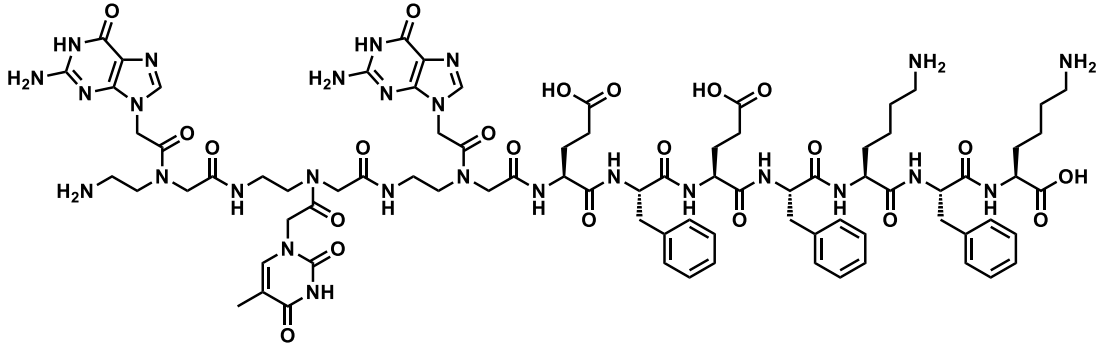
**Figure SIII-14** Spectres d'émission montrant l'évolution de la bande d'émission de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation pour les systèmes multi-composés à  $C_T = 5$  mM (ratio 1 :1) en tampon Tris.HCl (1 M, pH 7.4)).

## ANNEXES – CHAPITRE IV

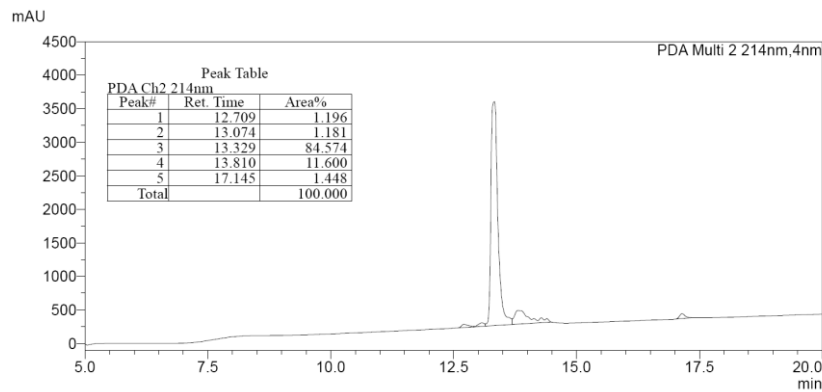
### SLIV.1 SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION CHIMIQUE

#### **H<sub>2</sub>N-PNA(GTG)-Glu-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Lys-OH (PNA(GTG)-pep)**

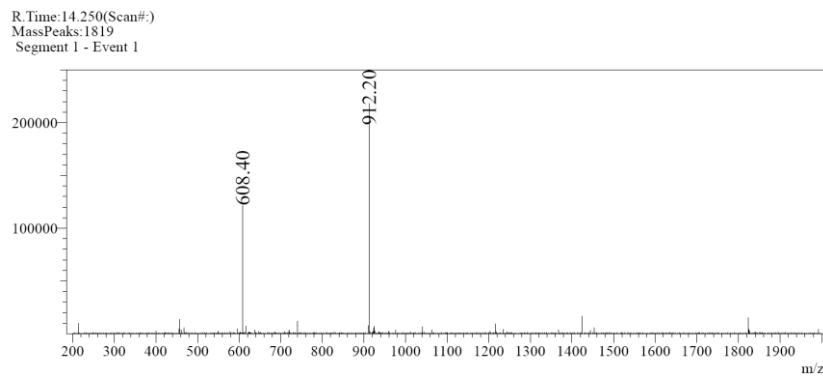
Composé H<sub>2</sub>N-PNA(GTG)-Glu-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Lys-OH obtenu sous forme de solide blanc (158.36 mg, 66.2 μmol, 66.2 % de rendement).



Chromatogramme HPLC analytique en phase inverse:

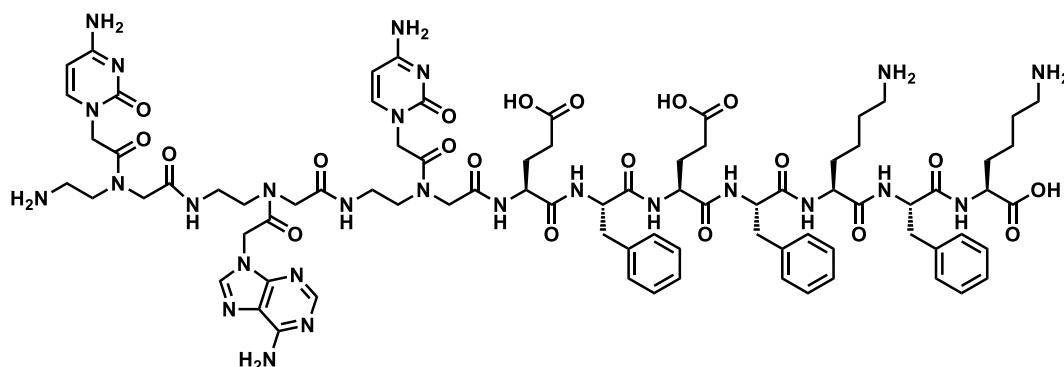


LCMS (ESD):  $m/z$  calculé pour C<sub>82</sub>H<sub>108</sub>N<sub>27</sub>O<sub>22</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 1822.82

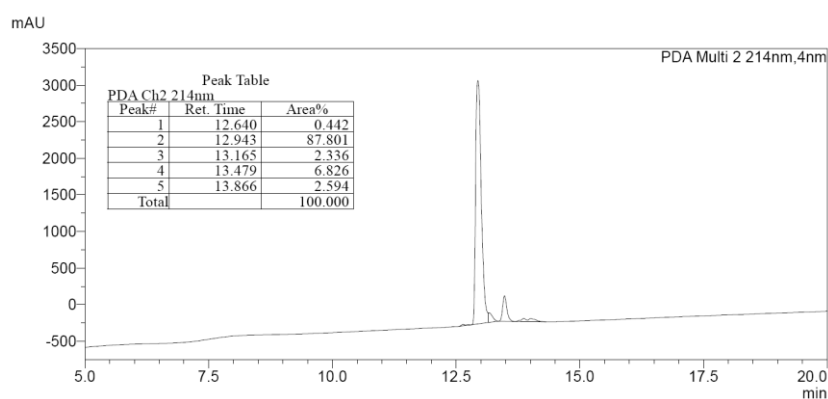


## H<sub>2</sub>N-PNA(CAC)-Glu-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Lys-OH (PNA(CAC)-pep)

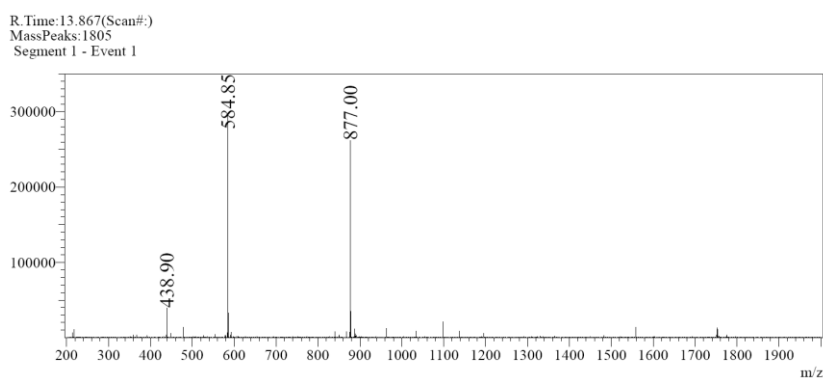
Composé H<sub>2</sub>N-PNA(CAC)-Glu-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Lys-OH obtenu sous forme de solide blanc (153.37 mg, 63.0 μmol, 63.0 % de rendement).



Chromatogramme HPLC analytique en phase inverse:

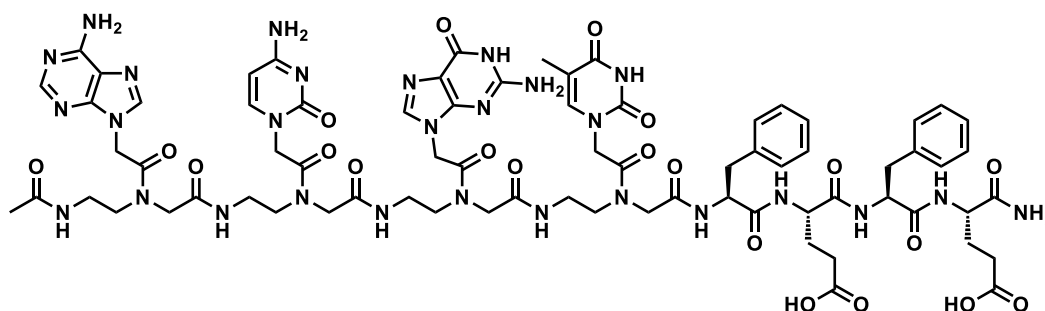


LCMS (ESI):  $m/z$  calculé pour C<sub>80</sub>H<sub>107</sub>N<sub>26</sub>O<sub>20</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 1751.82

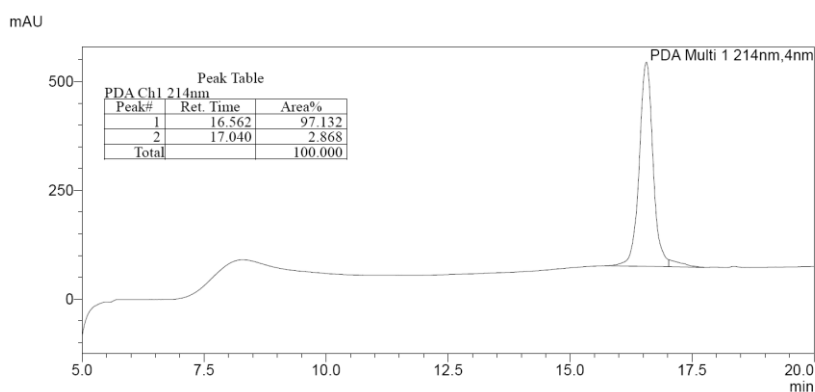


## Ac-PNA(ACGT)-Phe-Glu-Phe-Glu-NH<sub>2</sub> (Ac-PNA(ACGT)-FEFE-NH<sub>2</sub>)

Composé Ac-PNA(ACGT)-Phe-Glu-Phe-Glu-NH<sub>2</sub> obtenu sous forme de solide blanc (55.14 mg, 27.06 μmol, 27.1% de rendement).



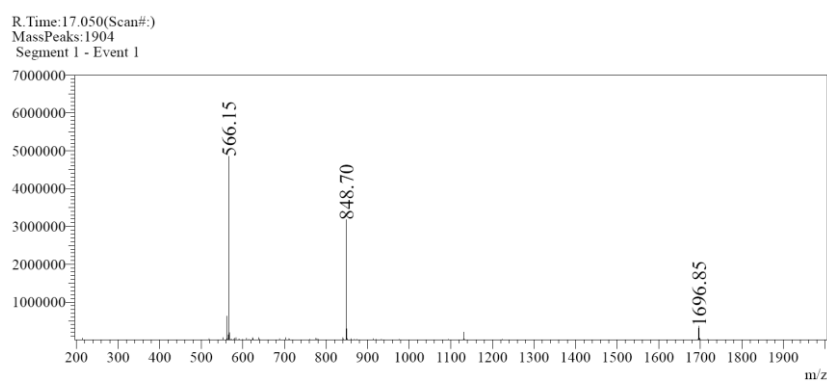
Chromatogramme HPLC analytique en phase inverse:



LCMS (ESI):  $m/z$  calculé pour C<sub>73</sub>H<sub>91</sub>N<sub>28</sub>O<sub>21</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 1696.69, trouvé 1696.85.

pour C<sub>73</sub>H<sub>92</sub>N<sub>28</sub>O<sub>21</sub> [M+2H]<sup>2+</sup>, 849.34, trouvé 848.70.

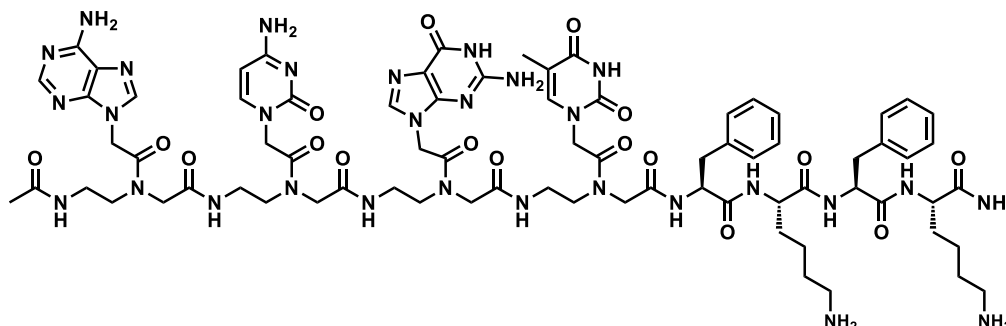
pour C<sub>73</sub>H<sub>93</sub>N<sub>30</sub>O<sub>17</sub> [M+3H]<sup>3+</sup>, 566.23, trouvé 566.15.



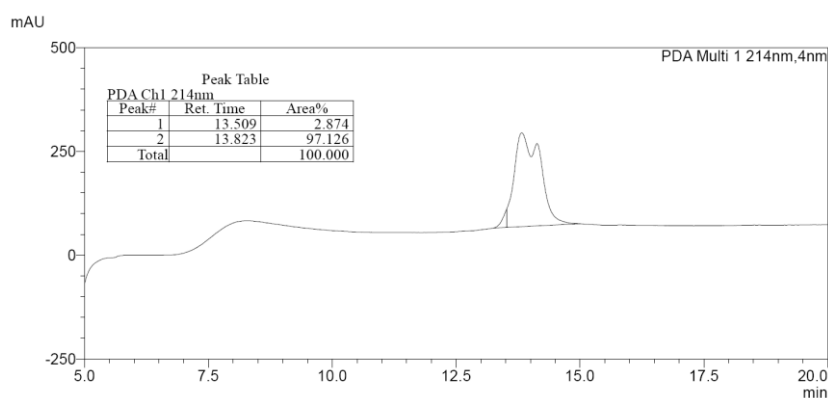


## Ac-PNA(ACGT)-Phe-Lys-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> (Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub>)

Composé Ac-PNA(ACGT)-Phe-Lys-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> obtenu sous forme de solide blanc (44.60 mg, 19.66  $\mu$ mol, 19.7 % de rendement).



### Chromatogramme HPLC analytique en phase inverse:

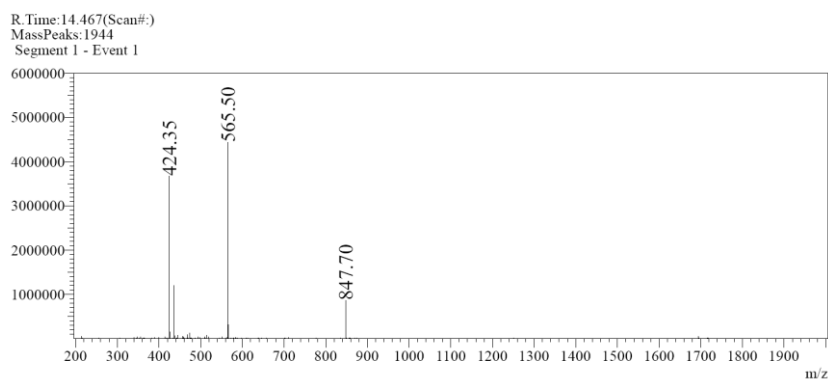


Remarque: L'apparent dédoublement du pic correspondant au produit Ac-PNA(ACGT)-FKFK-NH<sub>2</sub> est dû probablement à la présence de différentes conformations de ce composé.

LCMS (ESI):  $m/z$  calculé pour C<sub>75</sub>H<sub>102</sub>N<sub>30</sub>O<sub>17</sub> [M+2H]<sup>2+</sup>, 847.40, trouvé 847.70.

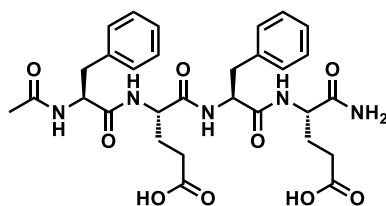
pour C<sub>75</sub>H<sub>103</sub>N<sub>30</sub>O<sub>17</sub> [M+3H]<sup>3+</sup>, 565.27, trouvé 565.50.

pour C<sub>75</sub>H<sub>104</sub>N<sub>30</sub>O<sub>17</sub> [M+4H]<sup>4+</sup>, 424.21, trouvé 424.35.

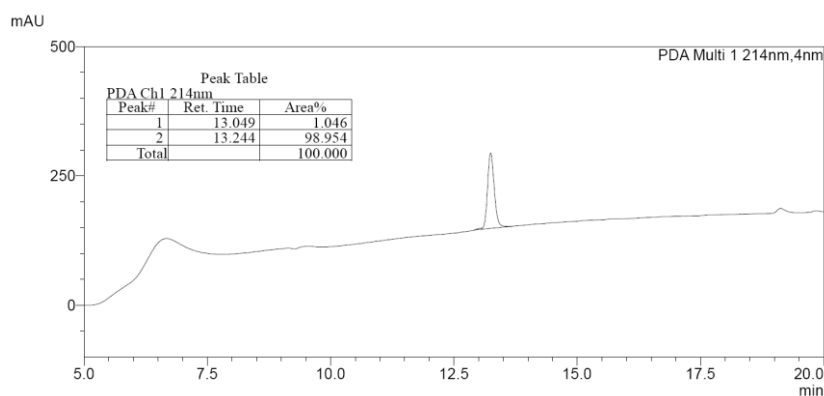


### Ac-Phe-Glu-Phe-Glu-NH<sub>2</sub> (Ac-FEFE-NH<sub>2</sub>)

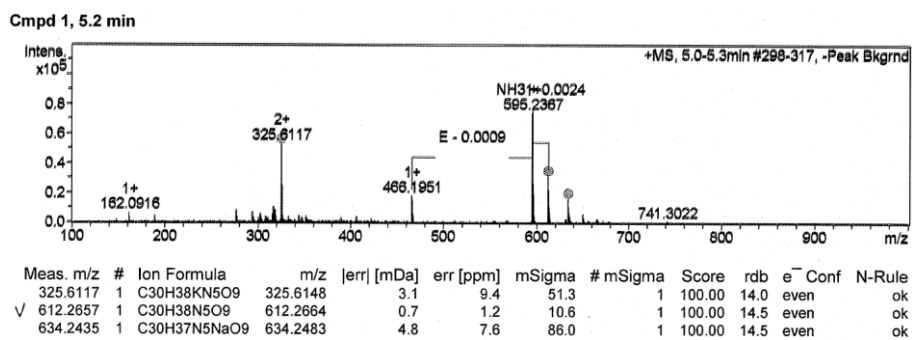
Composé Ac-Phe-Glu-Phe-Glu-NH<sub>2</sub> obtenu sous forme de solide blanc (38.66 mg, 63.21 μmol, 31.6% de rendement).



Chromatogramme HPLC analytique en phase inverse:

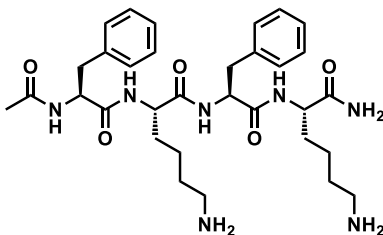


HRMS (ESI):  $m/z$  calculé pour C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> (100%), 612.2664, trouvé 612.2657.

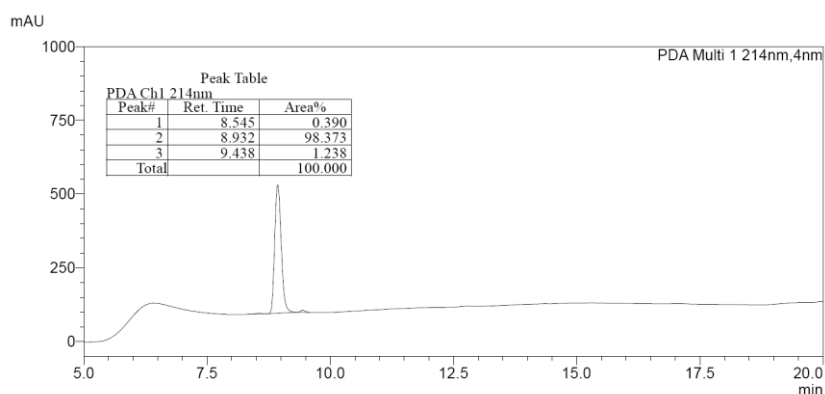


### Ac-Phe-Lys-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> (Ac-FKFK-NH<sub>2</sub>)

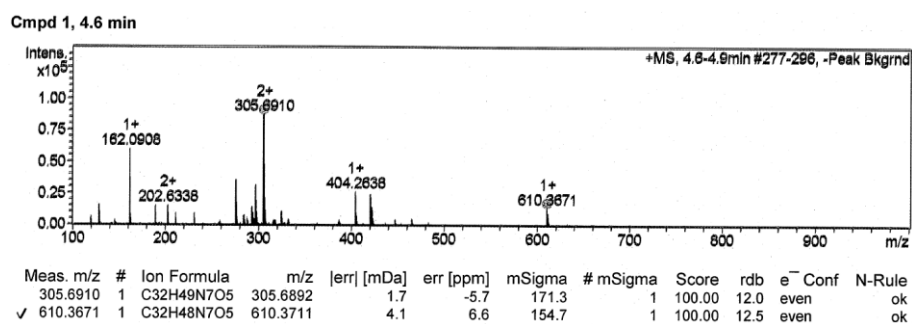
Composé Ac-Phe-Lys-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> obtenu sous forme de solide blanc (99.89 mg, 119.5 μmol, 29.9 % de rendement).



## Chromatogramme HPLC analytique en phase inverse:

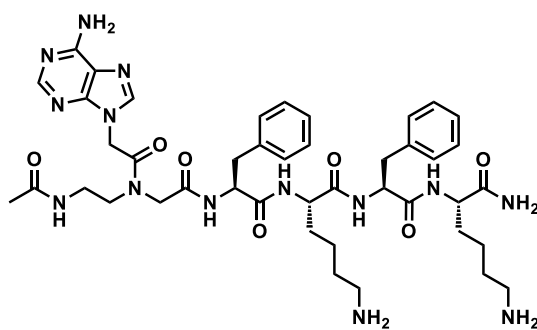


**HRMS (ESI):**  $m/z$  calculé pour  $C_{32}H_{48}N_7O_5$   $[M+H]^+$  (100%), 610.3711, trouvé 610.3671.

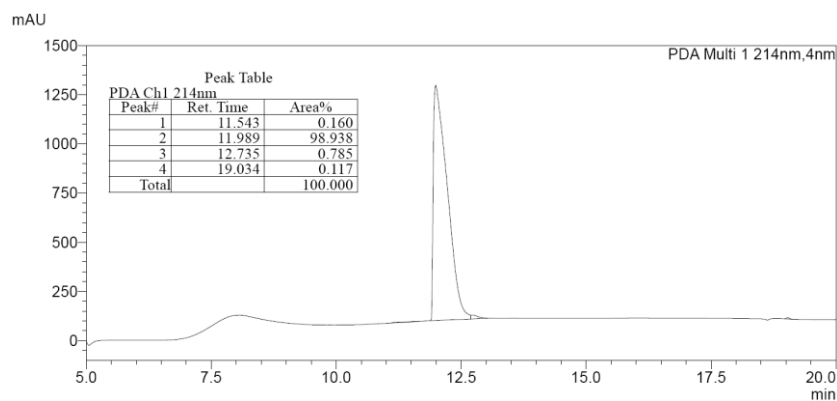


## Ac-PNA(A)-Phe-Lys-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> (Ac-PNA(A)-pep(+))

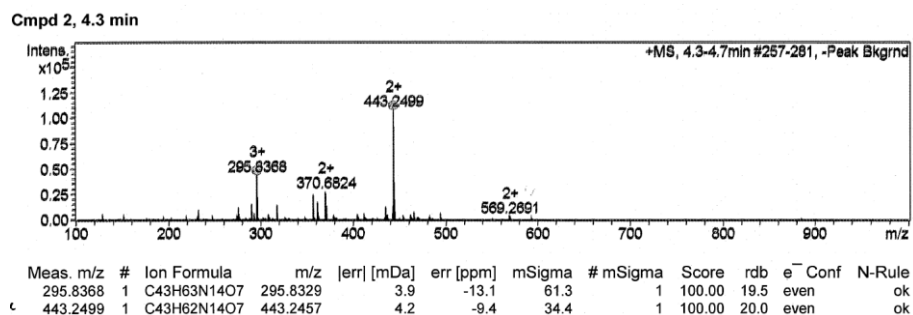
Composé Ac-PNA(A)-Phe-Lys-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> obtenu sous forme de solide blanc (348.71 mg, 284.2  $\mu$ mol, 47.5 % de rendement).



## Chromatogramme HPLC analytique en phase inverse:

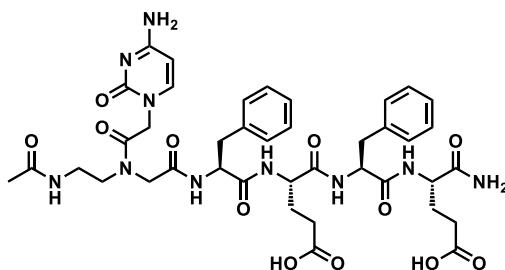


HRMS (ESI):  $m/z$  calculé pour  $C_{43}H_{62}N_{14}O_7$   $[M+2H]^{2+}$  (100%), 443.2457, trouvé 443.2499.

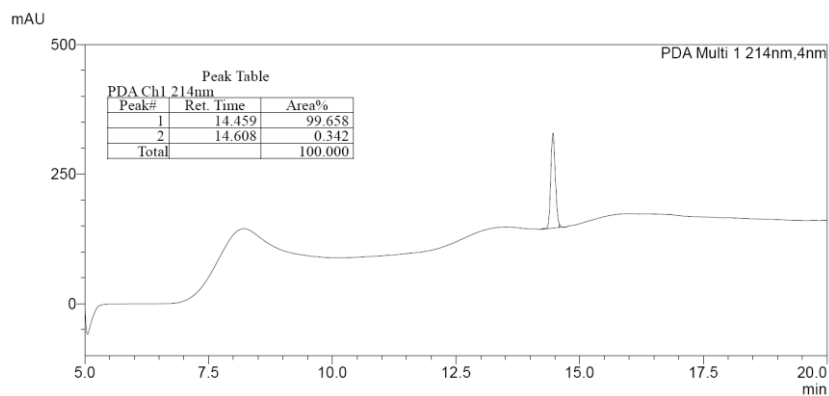


## Ac-PNA(C)-Phe-Glu-Phe-Glu-NH<sub>2</sub> (Ac-PNA(C)-pep(-))

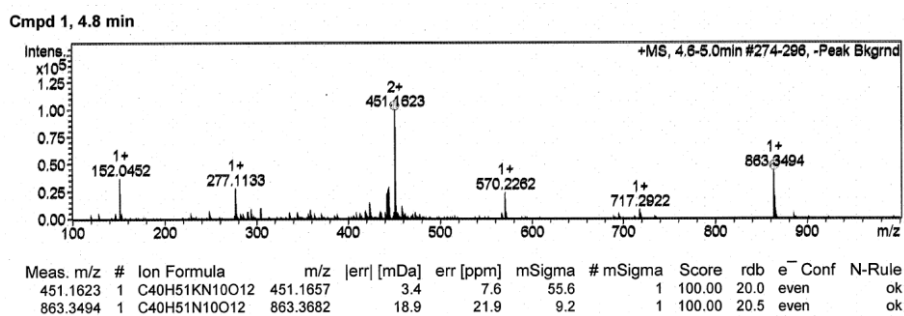
Composé Ac-PNA(C)-Phe-Glu-Phe-Glu-NH<sub>2</sub> obtenu sous forme de solide blanc (389.25 mg, 398.4  $\mu$ mol, 66.4% de rendement).



## Chromatogramme HPLC analytique en phase inverse:

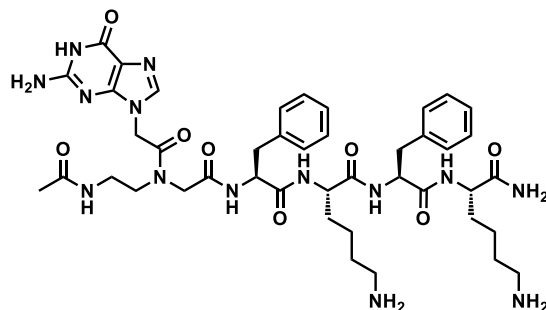


**HRMS (ESI):**  $m/z$  calculé pour  $C_{40}H_{51}N_{10}O_{12}$   $[M+H]^+$  (100%), 863.3682, trouvé 863.3494.

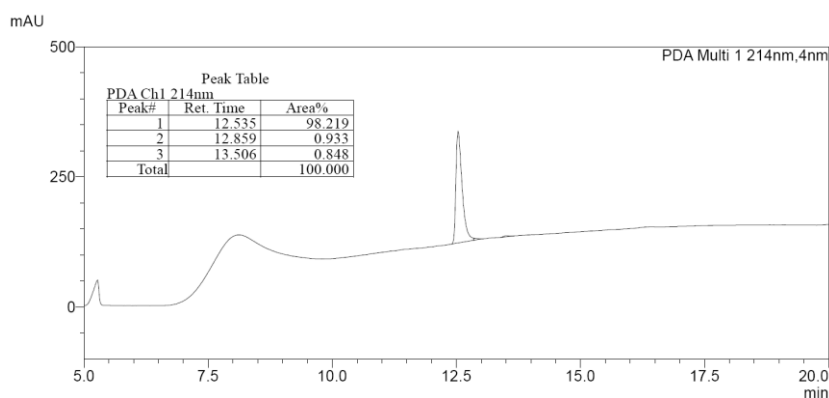


### Ac-PNA(G)-Phe-Lys-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> (Ac-PNA(G)-pep(+))

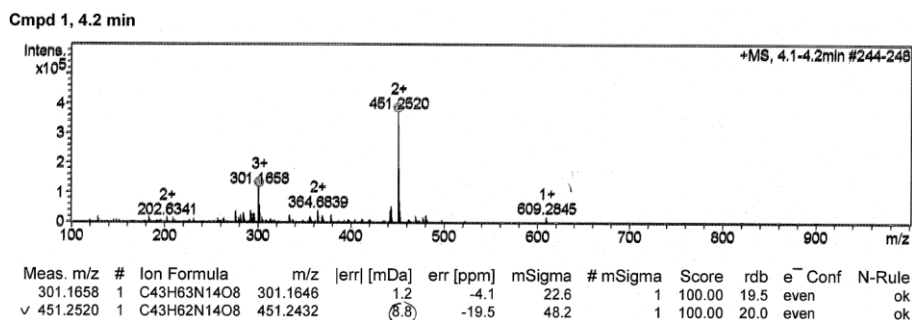
Composé Ac-PNA(G)-Phe-Lys-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> obtenu sous forme de solide blanc (321.26 mg, 258.4  $\mu$ mol, 43.1% de rendement).



### Chromatogramme HPLC analytique en phase inverse:

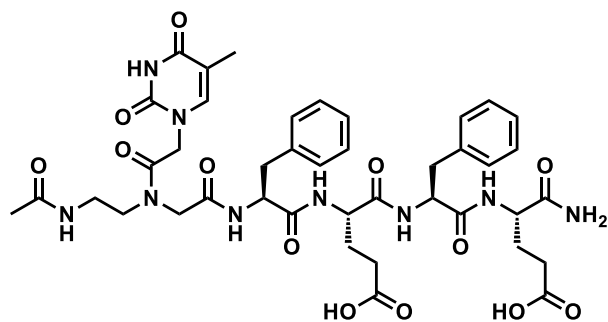


**HRMS (ESI):**  $m/z$  calculé pour  $C_{43}H_{62}N_{14}O_8$   $[M+2H]^{2+}$  (100%), 451.2432, trouvé 451.2520.

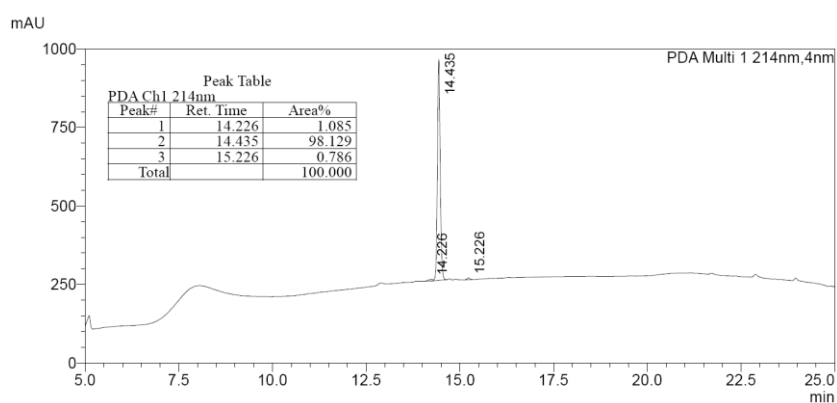


## Ac-PNA(T)- Phe-Glu-Phe-Glu-NH<sub>2</sub> (Ac-PNA(T)-*pep*(-))

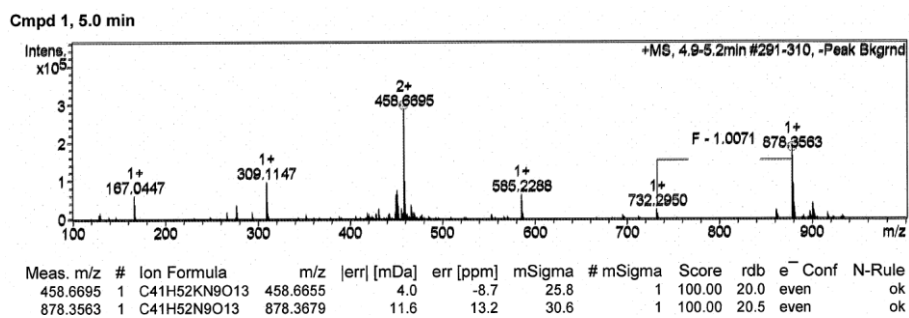
Composé Ac-PNA(T)- Phe-Glu-Phe-Glu-NH<sub>2</sub> obtenu sous forme de solide blanc (351.87 mg, 400,8 µmol, 66.8 % de rendement).



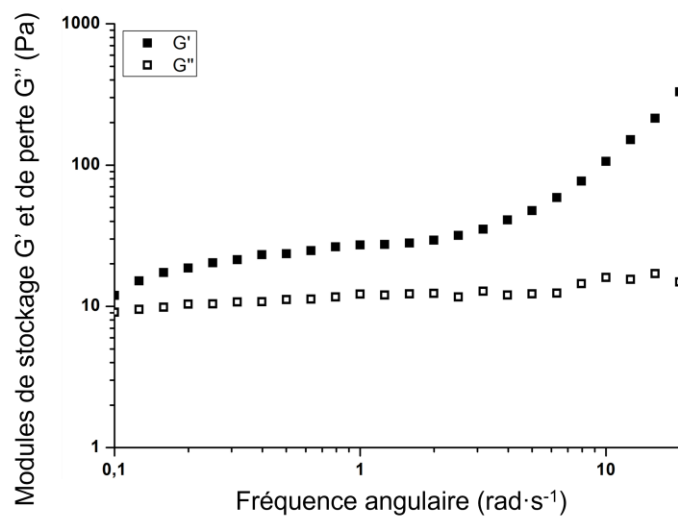
### Chromatogramme HPLC analytique en phase inverse:



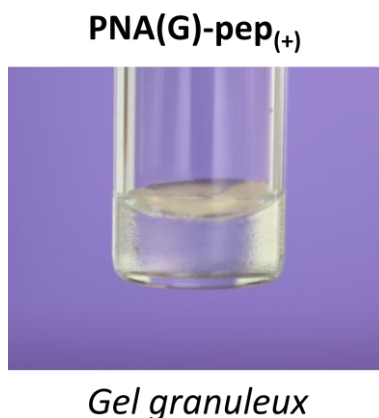
HRMS (ESI):  $m/z$  calculé pour C<sub>41</sub>H<sub>52</sub>N<sub>9</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup> (100%), 878.3679, trouvé 878.3563.



## SLIV.2 OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES COMPLEMENTAIRES



**Figure SIV-1** Rhéogramme du balayage en fréquence effectué sur un gel multi-composé Ac-FEFE- $\text{NH}_2$  + Ac-FKFK- $\text{NH}_2$ , préparé à un ratio de 1 : 1 et à concentration de  $C_T = 20$  mM en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4).



**Figure SIV-2** Photographie supplémentaire de l'hydrogel formé par PNA(G)-pep<sub>(+)</sub> à  $C = 20$  mM en tampon Tris.HCl (1 M, pH = 7.4), soulignant l'aspect granuleux de ce gel.







## Abstract

At the tenuous frontier between the solid and the liquid states, soft matter is focusing intense research interest. In particular, gels draw scientists' attention due to their ability to fix a large amount of solvent either organic (organogels) or aqueous (hydrogels). The latter are predominantly made of polymers and find dozens of applications from industry to daily life. However, over the last twenty years, a new kind of hydrogels has appeared: the peptide-based hydrogels. Indeed, depending on their amino acid sequences, peptides can self-assemble to form supramolecular assemblies which give rise to higher-level structures, namely fibrils, fibres and eventually complex tridimensional networks. Thanks to their inherent advantages in terms of biocompatibility and biodegradability, peptides are highly relevant to develop hydrogel materials for numerous applications, mainly in the biomedical domain. However, the rational design of such hydrogels remains difficult because of a lack of understanding of the relationships between the primary structure of peptides and the resulting properties. This limitation prevents researchers to develop new hydrogels with finely controlled physicochemical and mechanical properties.

In this context, we report herein on the development of new series of bio-inspired peptide-based structures forming hydrogels and their multiscale analyses from the supramolecular scale to the mechanical characterisations. Thus, we first discuss the rational design, synthesis and characterisation of hybrid DNA-nucleobase-incorporating peptide derivatives, also termed nucleopeptides, comprised of an heptapeptide functionalized with one of the four DNA nucleobases (*i.e.*, adenine, thymine, guanine or cytosine). Interestingly, the incorporation of a nucleobase induces significant modulations of their physical and structural gel properties, self-assembling kinetics and mechanical properties (*e.g.*, with drastic enhancements of the elastic moduli or resistances to stress, and remarkable thermal reversibilities), depending on the nature of the nucleobase. To further understand the origins of such differences, all the mono-component hydrogels have been subsequently studied at the mesoscopic and then at lower scales, highlighting the impact of nucleic acids on the supramolecular organization.

Then, to develop new hydrogel materials with more tuneable properties, we have focused our attention on the development of multicomponent nucleopeptide-based hydrogels. The multicomponent approach consists of the association of several constituents, which can interact in different ways, to obtain new hydrogels for which, in some instances, the resulting properties are greater than the sum of their parts. Thus, taking advantage of the presence of nucleobases and their inherent ability to self-assemble, we discuss the use of nucleopeptides to formulate multicomponent hydrogels and the impact of such mixtures on the structural, physicochemical and mechanical properties compared to the monocomponent approach. We show that mixing peptides and/or nucleopeptides bearing complementary nucleobases allows a control of the mechanical properties of the hydrogels. A multiscale analysis based on a large panel of techniques has provided new knowledge on the interaction behaviour of nucleopeptides and their subsequent consequences on the supramolecular assemblies, on the nanoobjects formed and on the physicochemical and mechanical properties of the resulting hydrogels.

Thus, through a multiscale analysis approach of original series of nucleopeptide-based hydrogels, this work provides a better understanding of the relationships between structures and properties, highlighting the high potential of nucleopeptides to develop mono or multicomponent supramolecular hydrogels with optimized and well-controlled properties, thanks to a rational design.

## Résumé

Connus pour leur capacité à retenir de grandes quantités de solvant, qu'il soit organique ou aqueux, les gels sont des matériaux mous présentant de nombreuses applications tant dans l'industrie que dans notre vie quotidienne. En particulier, les hydrogels sont largement utilisés dans les domaines de la santé, principalement formulés à partir de polymères. Toutefois, depuis une vingtaine d'années, nous observons l'émergence d'un nouveau type d'hydrogels conçus à partir de molécules bio-inspirées : les peptides. En effet, en fonction de leur séquence et de leur nature, les peptides sont capables de s'auto-organiser de manière hiérarchique pour former de premiers assemblages supramoléculaires qui évoluent en structures de plus grandes tailles, à savoir des fibrilles, des fibres, puis un réseau fibrillaire tridimensionnel complexe. Un des avantages de ces hydrogels réside dans la nature intrinsèque des peptides qui offrent d'indéniables atouts en termes de biocompatibilité et biodégradabilité. Ainsi, ces matériaux s'avèrent prometteurs dans le domaine biomédical avec de nombreuses applications déjà reportées, et l'arrivée de premiers composés commerciaux développés en tant que milieux de culture cellulaire. Toutefois, le développement raisonné de tels hydrogels se heurte à un manque de compréhension des liens entre structure primaire des peptides, auto-assemblage, objets supramoléculaires formés et propriétés mécaniques, c'est-à-dire la relation structure/propriétés, restreignant la mise au point de nouveaux hydrogels aux propriétés contrôlées. C'est dans ce contexte que notre travail se situe, par l'exploration de nouvelles structures bio-inspirées et par l'analyse multi-échelle des hydrogels formés, allant d'études aux échelles moléculaires et supramoléculaires jusqu'aux caractérisations physico-chimiques et mécaniques.

Nous avons ainsi développé, dans un premier temps, une série de nucléopeptides originaux, molécules hybrides peptides/acides nucléiques, constitués d'un heptapeptide fonctionnalisé par un dérivé de base nucléique. En fonction de la nature de cette dernière (à savoir : adénine, thymine, guanine ou cytosine), les hydrogels formés présentent de grandes disparités en termes de propriétés rhéologiques, avec notamment l'augmentation du module élastique et de la résistance à la contrainte, et l'émergence de propriétés de thermoréversibilité. Afin de comprendre l'origine de telles différences, des études à l'échelle mésoscopique, puis à plus petite échelle, ont été conduites, rendant compte des modulations structurales induites par la présence d'une base nucléique.

Dans un second temps, nous avons cherché à générer de nouveaux hydrogels aux propriétés nouvelles et contrôlables par une approche multi-composés. Cette stratégie, qui consiste en l'association de plusieurs composés dont chacun participe à la structure des gels, a déjà montré son intérêt dans le cadre de la formulation de matériaux et d'hydrogels supramoléculaires. Ainsi, nous avons mis en évidence que l'utilisation de mélanges de peptides et/ou de nucléopeptides permettait une modulation fine des propriétés physico-chimiques et mécaniques des hydrogels, notamment par le choix des constituants, leur ratio respectif, ou la présence de bases nucléiques complémentaires. Les études multi-échelles menées sur ces systèmes multi-composés ont permis de comprendre les modalités d'interaction des composés entre eux et leurs conséquences sur l'assemblage supramoléculaire ainsi que sur les propriétés des hydrogels obtenus.

Ainsi, par notre approche multi-échelle offrant une meilleure compréhension des liens entre modes d'assemblages supramoléculaires, structures et propriétés, ce travail de thèse montre l'intérêt de l'utilisation de composés nucléopeptidiques originaux, aux designs rationnels, pour la formulation d'hydrogels supramoléculaires, ouvrant ainsi une nouvelle voie vers la mise au point de matériaux mous aux propriétés optimisées et contrôlées.