



**HAL**  
open science

# Autoassemblage de peptides amphiphiles et de polymères pour l'élaboration de nouvelles membranes

Thomas Babut

► **To cite this version:**

Thomas Babut. Autoassemblage de peptides amphiphiles et de polymères pour l'élaboration de nouvelles membranes. Matériaux. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONT015 . tel-02296025

**HAL Id: tel-02296025**

**<https://theses.hal.science/tel-02296025>**

Submitted on 24 Sep 2019

**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.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Chimie

École doctorale Sciences Chimiques Balard - ED459

Unité de recherche Institut Européen des Membranes – UMR5635

## Autoassemblage de peptides amphiphiles et de polymères pour l'élaboration de nouvelles membranes

Présentée par Thomas BABUT

Le 21 janvier 2019

Sous la direction de Marc ROLLAND

Et Damien QUÉMENER

Devant le jury composé de

Christine GERARDIN, Professeur, Université de Lorraine

Olivier COLOMBANI, Maître de Conférence (HDR), Le Mans Université

Sophie MONGE-DARCOS, Professeur, Université de Montpellier

Marc ROLLAND, Maître de Conférence (HDR), Université de Montpellier

Damien QUÉMENER, Maître de Conférence (HDR), Université de Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice et

présidente du jury

Directeur de Thèse

Co-encadrant de Thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER







Remerciements

Je tiens d'abord à remercier le Professeur Philippe Miele pour m'avoir accordé une place dans son laboratoire durant ces trois années, pour la confiance qu'il m'a accordée et pour l'aide qu'il a pu m'apporter pendant cette période.

Je tiens particulièrement à remercier mes deux encadrants, Marc Rolland et Damien Quéméner, qui m'ont aiguillé, conseillé, soutenu, supporté pendant cette période de thèse durant laquelle j'ai connu des hauts et des bas. Je les remercie également pour le temps immesurable qu'ils m'ont accordé afin de me guider dans ces travaux de recherche.

Je remercie toute l'équipe « Matériaux Membranaires Avancés » : tous les membres permanents : Suming Li, Céline Pochat, André Deratani, Claire Antonelli et surtout Mona Semsarilar qui en plus de m'apporter son aide m'a aussi soutenu en tant qu'amie. Je remercie aussi les membres non permanents de l'équipe M2A pour les longues après-midis de discussion, de rigolade et d'AFM. Je remercie particulièrement Sabrina qui m'a d'ailleurs transmis toutes ses connaissances en tant que doctorante modèle. Je remercie Edgar, Laks, Aijing, Jie, Jieli, Jonathan, Ayben, Nono, Lucas, Adrien, Gregoire et j'en oublie probablement.

Je remercie également tous les membres permanents et non permanents de l'IEM qui m'ont accompagné, côtoyé, supporté pendant ces trois ans : Antoine, Marion, Abhijeet, Diane, David, Maxime, Joffrey, Dominique, Octavio, Carlos, Marlene, Ana, Mathieu, Marine, Marianne, Julien, Lucie et tous les autres.

Je voudrais adresser une mention spéciale à Habib, mon bras droit, mon mentor, mon partenaire, mon coéquipier, mon adversaire favori, mon VP, mon moteur, mon capitaine, mon matelot, mon professeur de foot, mon copilote, mon chauffeur, mon colocataire (still in progress). Il n'y a pas grand-chose à part ma copine qu'il n'a pas fait pour moi ... Merci de m'avoir soutenu et surtout supporté contre vents et marées durant ces trois années.

Une mention spéciale doit également être adressée à Antoine. Je ne vais pas refaire la liste car il a tout autant de casquettes. Il a surtout été mon voisin et mentor, grâce à lui je peux à présent aller à Geoffroy Guichard sans rougir car je connais pas mal de chant d'ultras.

Je remercie spécialement Camille pour cette grande amitié qui a été trop courte mais qui a permis de grandes réflexions personnelles et scientifiques.

Je souhaiterais remercier Christelle pour cette magnifique tradition qu'est le câlin de bonjour qui permet d'égayer la journée aussi noire soit elle mais aussi pour avoir été une deuxième Maman lors de ces trois ans.

Je remercie également Jérôme pour m'avoir permis de reprendre une de mes passions qu'est le rugby, d'avoir immortalisé mon anniversaire et pour tous les bons moments partagés en sa compagnie.

Je remercie Quiké et Sofia pour ces longues séances de jeux de société et de gâteaux délicieux, de soirées et autres.

Je souhaiterais adresser des remerciements particulièrement à Elsa pour nos discussions Rock'n Roll (vive Queens of the Stone Age) et sarcastiques mais toujours avec beaucoup d'affection.

J'aimerais remercier Dana, avec qui on a partagé et découvert beaucoup de choses durant ces trois années communes de thèse. Je lui dois mon niveau d'espagnol qui est passé de 0 à « sais dire trois mots et comprends les mots transparents ». Je lui dois beaucoup d'autres choses ...

Je souhaiterais remercier Cyril. On ne dirait pas comme ça mais le peu de temps que nous avons passé ensemble a permis d'établir une amitié extraordinaire et (je l'espère) durable. Même s'il parle beaucoup de son école, il écoute et agit pour ses proches et ça m'a beaucoup aidé.

Je remercie particulièrement Yves Marie Legrand pour m'avoir guidé et aidé pour les analyses de dichroïsme circulaire, Eddy Petit pour les analyses en RMN, IR et LC-MS et tous ses conseils, Didier Cot pour m'avoir accompagné pour les analyses en MEB et enfin Valérie Bonniol pour m'avoir formé et aidé pour tout ce qui est en rapport avec la chromatographie.

Je souhaiterais également remercier les membres de la médiation scientifique à l'université de Montpellier : Thiery, Anaïs, Jonathan, Franziska, Meera, Yves, Quentin et Chahine pour m'avoir fait découvrir une nouvelle facette de la science et m'avoir appris beaucoup de choses.

Je voudrais aussi remercier les membres du club des jeunes Languedoc Roussillon de la Société Chimique de France : Simon, (de nouveau) Habib, Audrey, Mathieu, Aude, Kim,



Rayane, Mathilde, Jimmy, Youn pour l'expérience extraordinaire que nous avons partagée en organisant cet évènement (parce que c'est notre congrès !).

Je remercie toute ma famille qui m'a toujours soutenu pendant cette dure période qu'est la thèse.

Afin de terminer en beauté, je souhaiterais remercier ma muse, à savoir Myriam, avec qui j'ai tout partagé que ce soit dans les bons jours comme dans les moins bons et je vous prie de croire que ça n'a pas dû être facile tous les jours pour elle aussi.



# Table des matières

Remerciements.....	5
Introduction Générale .....	13
Partie Bibliographie .....	17
I - Les molécules et peptides amphiphiles .....	19
I-1 Quelques généralités sur les molécules amphiphiles .....	19
I-2 Modifications de la formule du peptide .....	25
I-3 Facteurs externes .....	35
II-Association de peptides amphiphiles avec différentes molécules .....	42
II-1 Interactions avec de petites molécules.....	42
II-2 Interactions avec des polymères.....	44
III-Etude de matériaux membranaires nanostructurés .....	51
Synthèse et autoassemblages de peptides amphiphiles .....	57
I-Synthèse et caractérisations chimiques.....	59
I-1 Choix de la séquence peptidique .....	59
I-2 Choix de la voie de synthèse .....	60
II-Caractérisations de l'autoassemblage .....	68
II-1 Modification post-synthèse.....	68
II-2 Etude en solution .....	69
II-3 Etude à l'état solide.....	75
Conclusion .....	83
Association Peptides Polymères.....	85
I-Choix du polymère .....	87
I-1 Rappel sur l'association peptide polymère.....	87
I-2 Polystyrène sulfonate de sodium .....	88
II-Observations à l'état solide.....	90

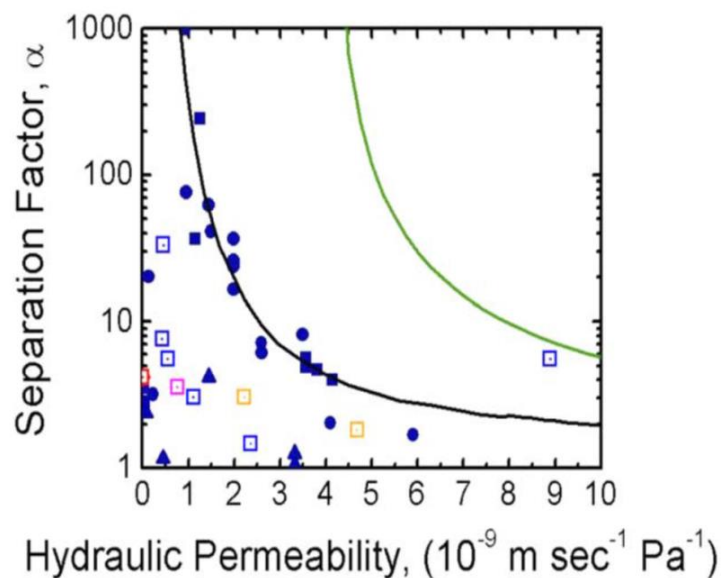
II-1 Etude de l'équivalence .....	90
II-2 Avant l'équivalence .....	94
II-3 Après l'équivalence .....	95
III-Propriétés mécaniques .....	98
Conclusion .....	104
Matériau Membranaire.....	105
I-Mise en forme du matériau .....	107
I-1 Membranes autosupportées.....	107
I-2 Support de membrane .....	114
II-Etude du matériau membranaire.....	118
II-1 Calcul de flux et résistance à la pression.....	118
II-2 Seuil de coupure.....	121
Partie expérimentale .....	127
I-Synthèse .....	129
I-1 Synthèse $C_{16}-V_3A_3K_3-NH_2$ .....	129
I-2 Synthèse $C_{16}-V_3A_3K_3G-NH_2$ .....	130
I-3 Synthèse $C_2V_3A_3K_3G-NH_2$ .....	131
I-4 Synthèse $C_{16}V_3A_4K_3G-NH_2$ .....	131
I-5 Produits chimiques.....	132
II-Echange d'ions .....	133
II-1 Echange d'ions avec l'acétate .....	133
II-2 Echange d'ion $Cl^-$ .....	134
II-3 Echange sur résine négative.....	134
III-Analyses .....	134
III-1 Dichroïsme circulaire.....	134
III-2 Infrarouge à transformé de Fourier.....	134

III-3 RMN.....	135
III-4 LC-MS .....	135
III-5 Chromatographie .....	136
IV-Observation à l'état solide .....	136
IV-1 Dépôt.....	136
IV-2 Microscopie.....	137
IV-3 Mélange .....	137
IV-4 Propriétés mécaniques .....	137
V-Filtration.....	138
Conclusion Générale et perspectives .....	139
Références bibliographiques .....	139

Introduction

Générale

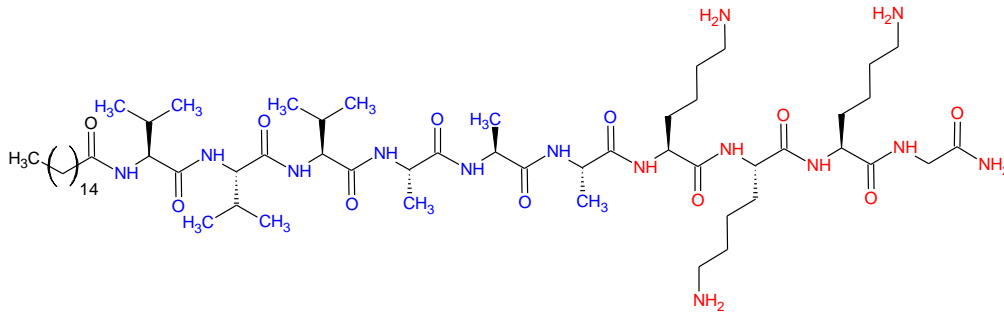
Les membranes de filtration sont des matériaux permettant de séparer de milieux distincts. Cette interface va permettre de laisser passer des éléments plus petits et laisser passer des éléments plus volumineux. La capacité à retenir des éléments plus ou moins gros est appelée sélectivité de la membrane. Un autre paramètre caractéristique de la membrane est sa perméabilité traduisant de la quantité de ces éléments pouvant passer pendant une certaine période de temps. Les membranes commerciales présentent un fonctionnement théorique optimal représenté par la courbe noire sur la Figure 1.



*Figure 1 : Graphiques des fonctionnement optimaux théoriques des membranes d'ultrafiltration avec et sans structuration du matériau<sup>2</sup>*

Pour des perméabilités élevées, il est normal de trouver des sélectivités faibles et inversement. Afin de repousser cette limite théorique, il est possible d'apporter de la structuration au matériau grâce à l'utilisation de briques élémentaires. Dans le cas présenté ci-dessus cette structuration est apportée par des copolymères à blocs.

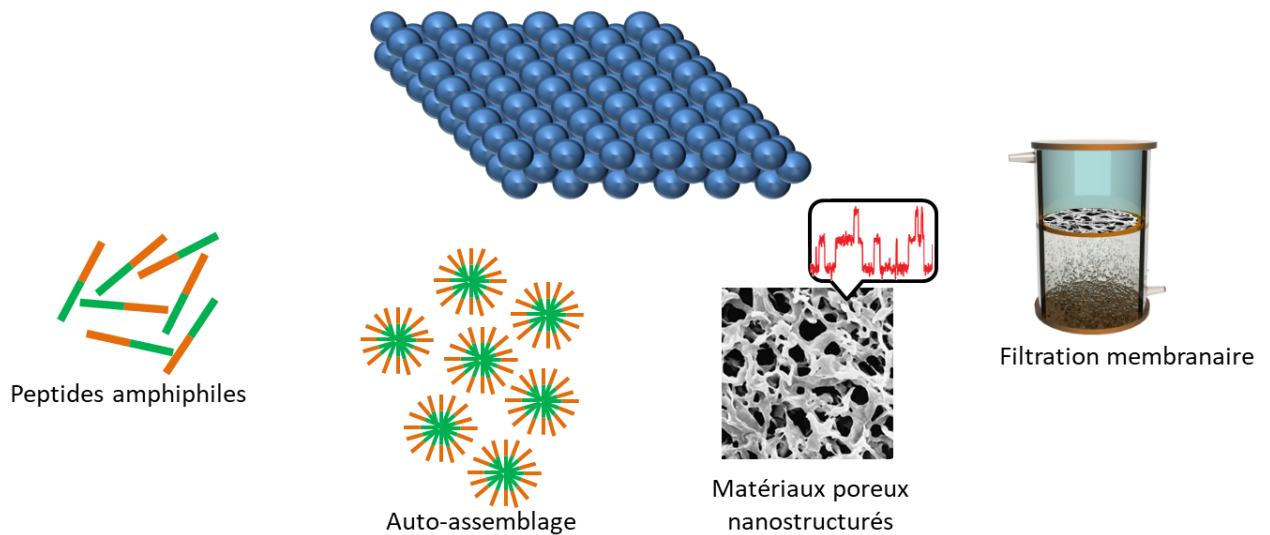
Les molécules amphiphiles permettent grâce à leurs propriétés d'autoassemblage de créer de larges objets acquérant de ce fait de nouvelles propriétés. Les peptides amphiphiles ne dérogent pas à la règle. Il est possible de donner différentes formes d'assemblages en fonction de la formule chimique de ces derniers.



*Schéma 1 schéma d'un peptide amphiphile avec les parties essentielles colorisées*

Le peptide amphiphile présenté sur la Schéma 1 possède trois parties distinctes grâce auxquelles il est possible de créer des micelles cylindriques. Les extrémités en rouge et en noir rendent le peptide amphiphile et la partie symbolisée en bleu va grâce aux liaisons hydrogènes stabiliser l'assemblage. Dans les membranes créées à partir de copolymères amphiphiles, la porosité est apportée par l'espace entre chaque sphère mais dans un système, notre système (cylindrique), il est possible d'obtenir des zones avec des porosités différentes selon l'empilement des fibres. De plus, le peptide amphiphile présenté ci-dessus est très soluble dans l'eau ce qui en fait un candidat peu viable pour une application de filtration membranaire. Le peptide amphiphile ne peut être utilisé seul comme un matériau membranaire autosupporté. Il est donc nécessaire de lui apporter un support permettant de figer la structure, de lier les micelles entre elles sans pour autant changer la structure. Les meilleurs candidats pour cela sont les polymères car ils présentent une structure sous forme de longues chaînes qui permettent de répondre à ce besoin. La brique élémentaire choisie pour former la membrane est donc la micelle cylindrique de peptides amphiphiles comme présenté sur Figure 2. Afin de former un matériau nanostructuré, le peptide amphiphile forme des micelles cylindriques en milieu aqueux et est mis en présence de polymère afin d'obtenir un matériau solide et poreux.





*Figure 2 : Schéma du projet : de la molécule élémentaire à la formation de matériaux nanostructurés*

C'est donc en solution que sont associés les peptides amphiphiles et les polymères afin d'obtenir une structure déjà préformée du peptide qui s'associe sous cette forme avec le polymère qui va la figer et la consolider. Il est possible d'imaginer une étape où le peptide est prélevé par la suite pour former les pores de la membrane. Les peptides semblent donc être les candidats idéaux pour établir cette association pour former des membranes. Pour répondre à ces questionnements, une première partie traite l'état de l'art des peptides amphiphiles et leur association avec diverses molécules. Une seconde partie traite des peptides amphiphiles et de leur synthèse. Ces derniers sont caractérisés à l'état solide afin d'observer ces micelles cylindriques. La troisième partie traite de l'association entre le peptide amphiphile et le polymère et la dernière partie traite des tests de filtration membranaire réalisés sur le matériau obtenu de l'association peptide amphiphile-polymère.

Partie  
Bibliographie

Remerciements.....	5
Introduction Générale .....	13
Partie Bibliographie .....	17
I - Les molécules et peptides amphiphiles .....	19
I-1 Quelques généralités sur les molécules amphiphiles .....	19
I-2 Modifications de la formule du peptide .....	25
I-2.1 Modification du type d'assemblages .....	25
I-2.1.a Modification de la séquence peptidique .....	25
I-2.1.b Modification de la partie hydrophobe.....	30
I-2.2 Relation entre la structure du peptide et son assemblage.....	31
I-2.2.a Modification de la séquence peptidique .....	31
I-2.2.b Modification de la chaîne alkyle .....	33
I-3 Facteurs externes .....	35
I-3.1 Influence du solvant.....	35
I-3.2 Influence du pH.....	36
I-3.3 Influence d'additifs .....	38
II-Association de peptides amphiphiles avec différentes molécules .....	42
II-1 Interactions avec de petites molécules.....	42
II-2 Interactions avec des polymères.....	44
II-2.1 Interactions par $\pi$ -stacking .....	44
II-2.2 Interactions par liaisons covalentes.....	45
II-2.3 Interactions par liaisons ioniques .....	45
III-Etude de matériaux membranaires nanostructurés .....	51

## I- Les molécules et peptides amphiphiles

### I-1 Quelques généralités sur les molécules amphiphiles

Les molécules amphiphiles existent à l'état naturel sous différentes formes. Le principe en est simple, une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Avec cette coexistence de deux parties distinctes, les molécules s'assemblent selon différentes formes en fonction de l'environnement ou de la composition de ces molécules. Les tensioactifs, par exemple, sont une classe de molécules amphiphiles. Ils permettent de réduire la tension de surface entre deux milieux non miscibles (Figure 3). L'application la plus rencontrée est la détergence.

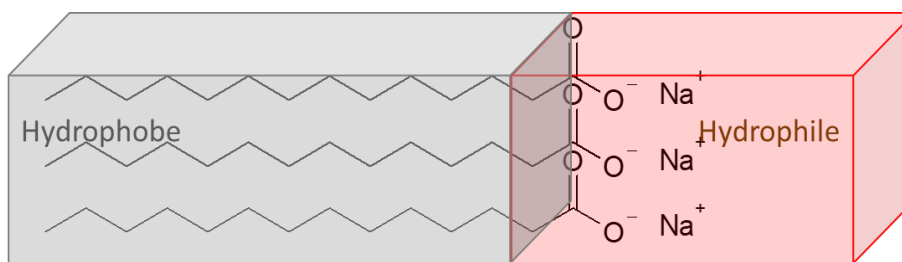


Figure 3 : schéma d'arrangement de molécules de tensioactifs

Composé d'une longue chaîne carbonée et d'une tête polaire (carboxylate), un tensioactif améliore considérablement la stabilité d'une interface entre une phase aqueuse et une phase organique, toutes deux étant non miscibles. Alors que la partie hydrophobe interagit avec les salissures généralement hydrophobes, la partie hydrophile maintient l'ensemble en suspension dans l'eau. Plus généralement, les tensioactifs, grâce à leur caractère amphiphile, vont stabiliser des systèmes dispersés comme par exemple des émulsions. Il existe une multitude de tensioactifs différents et ils ont tous un rôle particulier : détergent, solubilisation, effet moussant, dispersant, mouillant etc. Comme autre exemple de tensioactif, le triton X (Figure 4) peut être cité comme molécule amphiphile neutre.

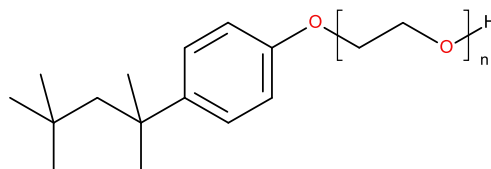
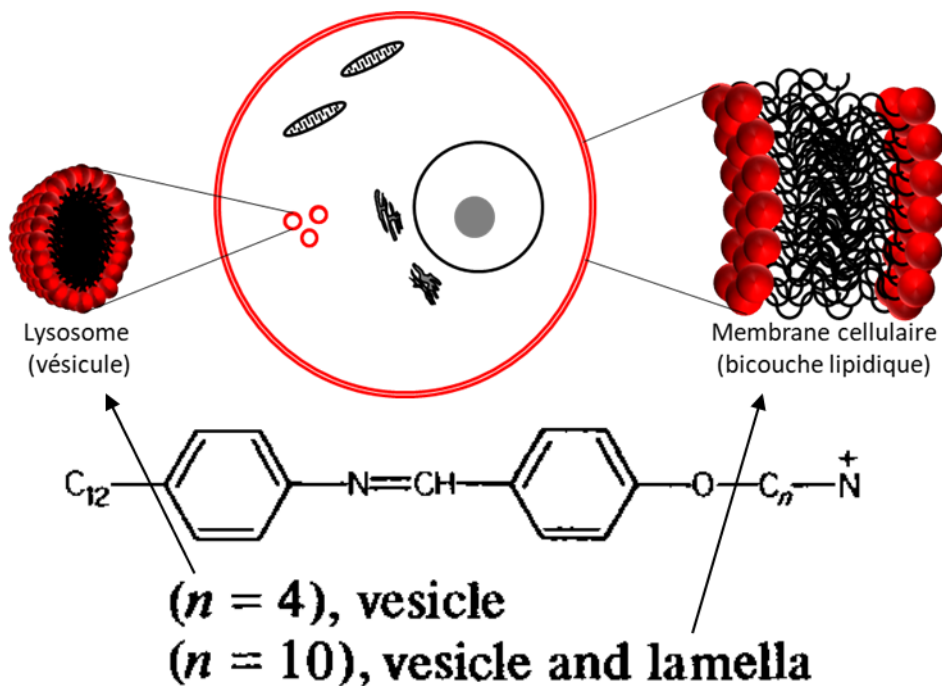


Figure 4 : structure du triton X

Il est utilisé comme détergent mais peut également servir au passage des anticorps au travers d'une membrane cellulaire.

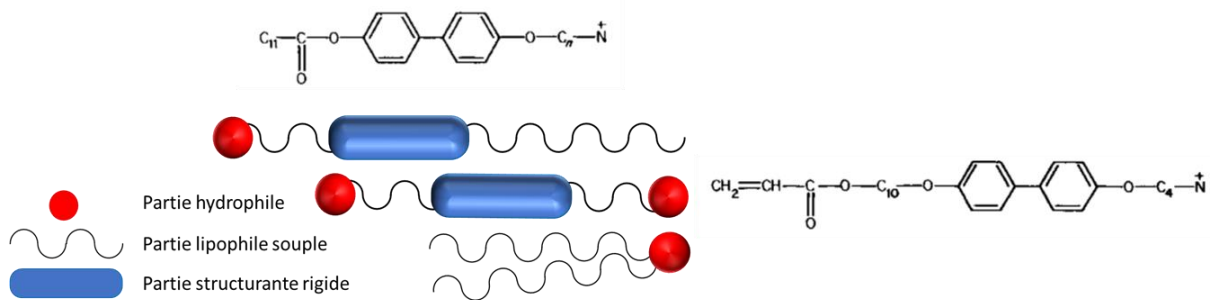
Les phospholipides sont une autre classe de molécules amphiphiles. Elles constituent la bicouche lipidique des membranes cellulaires. Leur caractère amphiphile permet, comme pour les tensioactifs, de réduire la tension de surface entre deux milieux non miscibles mais également de produire des assemblages disposant d'une stabilité mécanique suffisante pour former la membrane cellulaire. Deux couches superposées s'organisent de la manière suivante : les parties hydrophiles s'assemblent des deux côtés formant deux parois à l'intérieur et à l'extérieur de la membrane cf. Figure 5 ci-dessous.



*Figure 5 : rôle des phospholipides dans la formation des cellules et exemples de molécules amphiphiles synthétisées par Kunitake et al<sup>3</sup>*

A l'intérieur de la cellule, il existe des organites constitués de phospholipides. Ces derniers forment des micelles et vésicules renfermant un milieu hydrophobe à l'intérieur de la cellule. Ces organites sont les lysosomes.

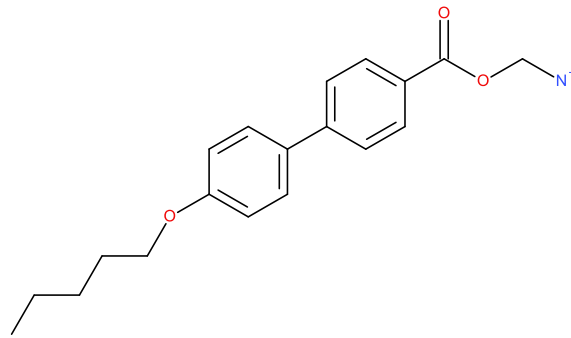
En se basant sur ce type de molécules, les recherches se sont portées sur l'élaboration de composés mimant les propriétés d'assemblage des molécules amphiphiles naturelles. Ces travaux de recherche se sont portés sur la forme et les propriétés que peuvent avoir ces assemblages. Les travaux de Kunitake et al. présentent ces molécules composées de trois différentes parties essentielles. Le caractère amphiphile de ces molécules permet d'obtenir des assemblages de formes très diverses.



*Figure 6 Structure globale de quelques molécules amphiphiles inspirée des travaux de Kunitake et al.<sup>3</sup>*

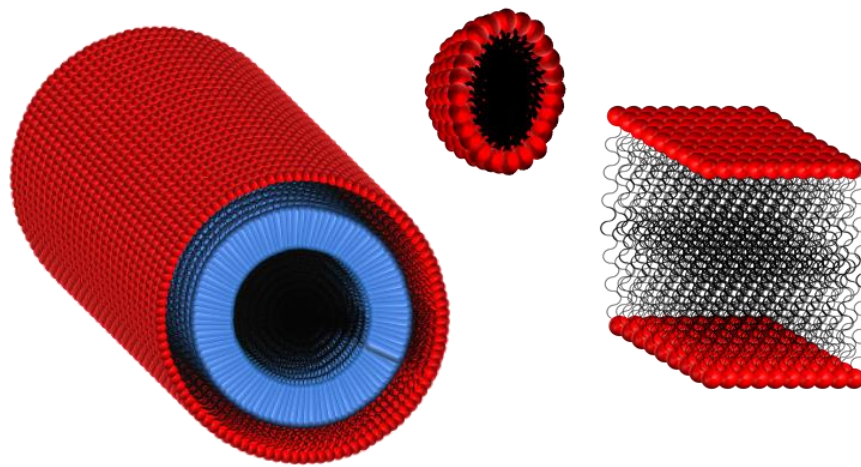
Selon l'architecture de la molécule cf. Figure 6 ci-dessus, les assemblages prendront une forme globale très spécifique. Les recherches montrent alors que trois parties essentielles se détachent. Les deux extrémités permettent de dicter l'orientation des liaisons intermoléculaires. Le milieu dans lequel se trouvent les molécules va aussi influencer la forme des assemblages. La partie lipophile, constituée de chaînes aliphatiques, se trouve au cœur de la micelle alors que la partie hydrophile, chargée ou non, se situe à l'extérieur de la micelle et constitue la partie superficielle. Entre ces deux parties, se situe la partie structurante. Cette partie est essentielle à la stabilisation de l'assemblage. Elle permet des interactions fortes entre les molécules. Elle permet également d'obtenir de nouvelles formes d'assemblage. Les molécules amphiphiles naturelles ont une structure simple comme celle présentée plus haut. Cette forme est caractéristique des phosphatidylcholines, élément constitutif de la bicouche lipidique cf. Figure 5. Les travaux de Kunitake et al. ont eu pour but de synthétiser des molécules similaires à ces molécules amphiphiles naturelles en ajoutant cette partie structurante afin d'obtenir des assemblages différents. Cette partie structurante est le

véritable « squelette » des assemblages et est modifiée pour permettre l'obtention de différentes formes.



*Figure 7 : formule d'une molécule synthétisée par Kunitake et al.<sup>3</sup>*

Dans ces premières molécules, la partie structurante est constituée de cycles aromatiques. Cette structure va interagir par  $\pi$ -stacking. Les formes des assemblages obtenues présentent trois morphologies principales cf. Figure 8 ci-dessous.

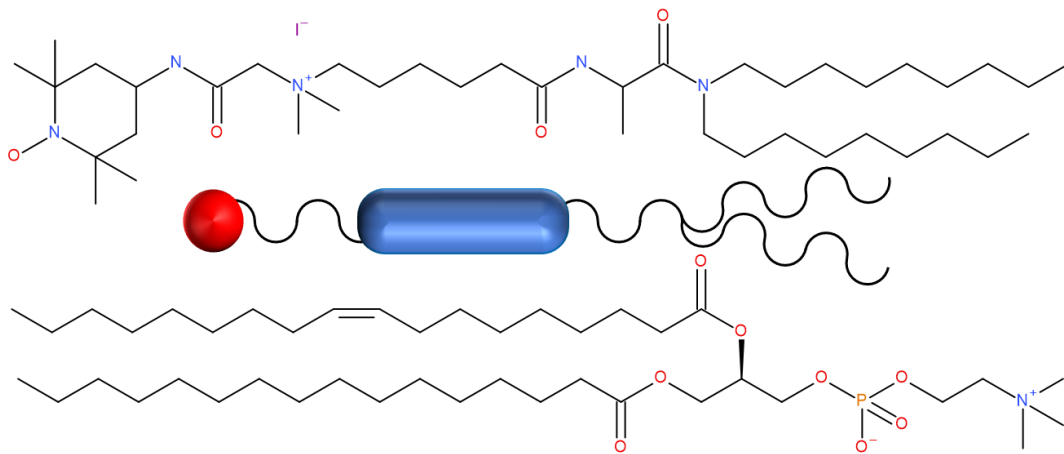


*Figure 8 Différentes formes d'autoassemblages : cylindrique, sphérique et lamellaire<sup>3</sup>*

Les travaux de Kunitake et al. démontrent que la structure de la partie rigide de la molécule amphiphile va permettre d'avoir une morphologie lamellaire comme représenté sur le schéma de droite de la Figure 8 mais aussi des morphologies sphériques et tubulaires. Les cycles aromatiques (cf. Figure 7) sont reliés dans cette étude par différentes liaisons et cette partie va prendre différentes conformations. Une forme droite et rigide va induire une formation

globulaire alors qu'introduire des angles dans la molécule va induire des formes plus longues comme des tubes ou des disques. C'est la forme conique de la molécule qui permet cette forme de micelle.

La présence d'acides aminés dans des molécules amphiphiles comme partie structurante est présentée dans les travaux de Murakami et al. en 1984<sup>4</sup>. La molécule synthétisée ici (Figure 5) présente toutes les caractéristiques des molécules précédemment présentées, à savoir la partie hydrophile, la partie structurante et la partie hydrophobe constituée de deux chaînes carbonées à l'image de la phosphatidylcholine cf. Figure 9, molécule constitutrice de la bicouche lipidique cf. Figure 5.



*Figure 9 : Formule du peptide amphiphile et de la phosphatidylcholine et forme globale des molécules synthétisées dans les travaux de Murakami et al.<sup>4</sup>*

Dans ces molécules, les interactions hydrogènes entre les parties structurantes des peptides amphiphiles influencent la structure de l'assemblage. Le cœur structurant de la molécule est constitué de d'une alanine, acide aminé avec une grande propension à établir des liaisons hydrogènes intermoléculaires. Ces travaux portent sur la disponibilité de ces liaisons hydrogènes mais aussi la proportion des différentes parties les unes par rapport aux autres. En allongeant la chaîne lipidique, la partie hydrophobe augmentant, la forme des assemblages va passer d'une structure rigide et résistante comme celle des micelles cylindriques ou des vésicules à des structures beaucoup plus flexibles comme des lamelles qui se fractionnent en particules après agitation poussée. L'origine de cette résistance est expliquée par des interactions intermoléculaires fortes et un rapprochement des sites de liaisons hydrogènes



grâce à une diminution de la taille des chaînes lipidiques. L'augmentation de la longueur de ces chaînes va éloigner les parties structurantes, diminuer par conséquent la force des interactions intermoléculaires et rendre les assemblages plus fragiles.

Ce type d'interactions entre les acides aminés dans les peptides amphiphiles ont d'abord été découvertes dans les protéines et chaque acide aminé favorise une structure secondaire. En effet chaque acide aminé a tendance à favoriser un type de liaisons, empêcher un second type d'interactions et ne pas interférer pour le troisième type. Les travaux de Levitt et al.<sup>1</sup> ont pour but de répertorier après avoir étudié les interactions de chaque acide aminé dans un très grand nombre de protéines globulaires. Ces travaux peuvent être résumés dans un Tableau 1 ci-dessous.

*Tableau 1 : Différents acides aminés décrits dans les travaux de Levitt et al.<sup>1</sup>*

Type de structure secondaire	favorise	n'interagit pas	empêche
hélice- $\alpha$	Ala, Leu, Met, Val, Ile, Phe, Tyr, Thr, Gly, His, Glu, Gln, Trp, Asp, Asn, Ser, Pro, Lys, (Cys)	Arg	
feuillet- $\beta$	Val, Ile, Phe, Ala, Leu, Met, Glu, Gln, Lys, (Trp), Tyr, His, Gly, Ser, Asp, Asn, Pro, Thr, Arg		Cys
repliement interne	Gly, Ser, Asp, Asn, Pro	Glu, Gln, Lys, Tyr, (Arg)	Ala, Leu, Met, His, Val, Ile, Phe, (Trp), (Cys), (Arg)

Ces interactions entre acides aminés diffèrent dans les peptides amphiphiles. Du fait de leur petite taille, les peptides ne vont pas présenter de repliements internes. A la place, il s'agit plus d'arrangements aléatoires observables par dichroïsme circulaire par exemple. La liaison peptidique est une liaison amide. Cette liaison présente deux plans constitutifs, l'un formé par la liaison C=O et l'autre formé par le ou les atomes d'hydrogène et l'atome d'azote. Ces deux plans forment un angle appelé angle dièdre. Le dichroïsme circulaire permet de caractériser

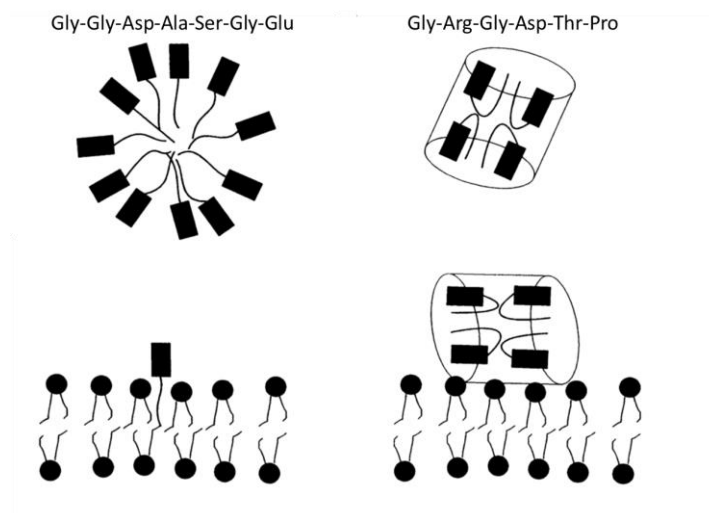
cet angle grâce à un signal UV-visible. Selon la structure secondaire du peptide ou de la protéine, cet angle est modifié. Le signal enregistré en dichroïsme circulaire est alors spécifique de la structure secondaire. Toutefois, ce tableau donne une idée générale sur l'assemblage des peptides, quel acide aminé choisir et dans quel cas selon le type d'interactions souhaitées. Les travaux de Murakami et al.<sup>4</sup> décrivent une molécule dans laquelle sont incorporées deux alanines pour la partie structurante. Cela démontre la différence entre le comportement des protéines et celui des peptides. Alors que l'alanine est décrite comme favorisant des assemblages en hélice- $\alpha$ , aucune formation de ce type n'est observée avec les peptides synthétisés contenant cet acide aminé.

## I-2 Modifications de la formule du peptide

### I-2.1 Modification du type d'assemblages

#### I-2.1.a Modification de la séquence peptidique

C'est plus tard que la formulation des peptides amphiphiles a changé pour une séquence peptidique plus longue permettant d'incorporer des séquences terminales de protéines virales par exemple<sup>5</sup>. Le terme lipide-peptide est employé pour caractériser le peptide amphiphile correspondant à un court peptide de quelques acides aminés sur lequel deux chaînes de myristoyle ( $C_{14}$ ) ont été ajoutées. La forme de l'assemblage n'est pas la partie la plus étudiée. Ce qui est étudié ici est l'interaction avec une bicouche lipidique.



*Figure 10 : Schéma d'association des peptides entre eux et avec la bicouche lipidique décrit dans les travaux de Sankaram et al.*

Trois parties distinctes sont retrouvées ici : la queue hydrophobe constituée des deux chaînes lipidiques, la partie structurante constituée d'acides aminés élaborant des liaisons hydrogènes et enfin une partie hydrophile ionique ou ionisable. Les deux peptides synthétisés ont deux formules différentes en acides aminés. Différentes interactions entre parties sont observées et de cela résultent des assemblages de formes diverses qui vont interagir différemment avec la bicouche lipidique. La présence de charges le long de la chaîne peptidique ou encore la présence de chaînes latérales va entraîner une répulsion plus ou moins importante entre la partie hydrophobe et la partie hydrophile. Le peptide qui présente la structure suivante : moins de chaînes latérales, charges localisées va présenter une forme de micelle sphérique cf. Figure 10 ci-dessus. Le second peptide présente une séquence d'acides aminés complètement différente et des acides aminés chargés distribués le long de la chaîne peptidique. Ceci est confirmé par l'interaction avec la bicouche lipidique : le premier a un comportement très similaire à cette bicouche alors que le second va former ses propres assemblages et ce sont seulement ces assemblages qui interagissent avec la membrane.

D'autres travaux comme ceux de Moyer et al.<sup>6</sup> ont eu pour but de démontrer que la partie structurante était obligatoire pour l'obtention d'assemblages de forme cylindrique cf. Figure 11 ci-dessous.

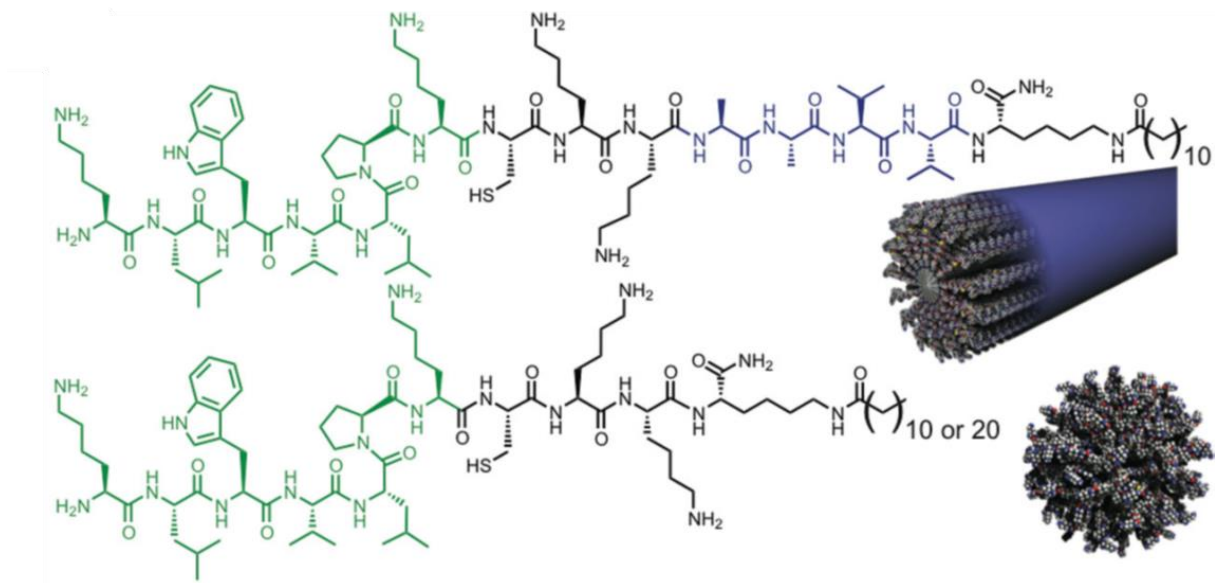
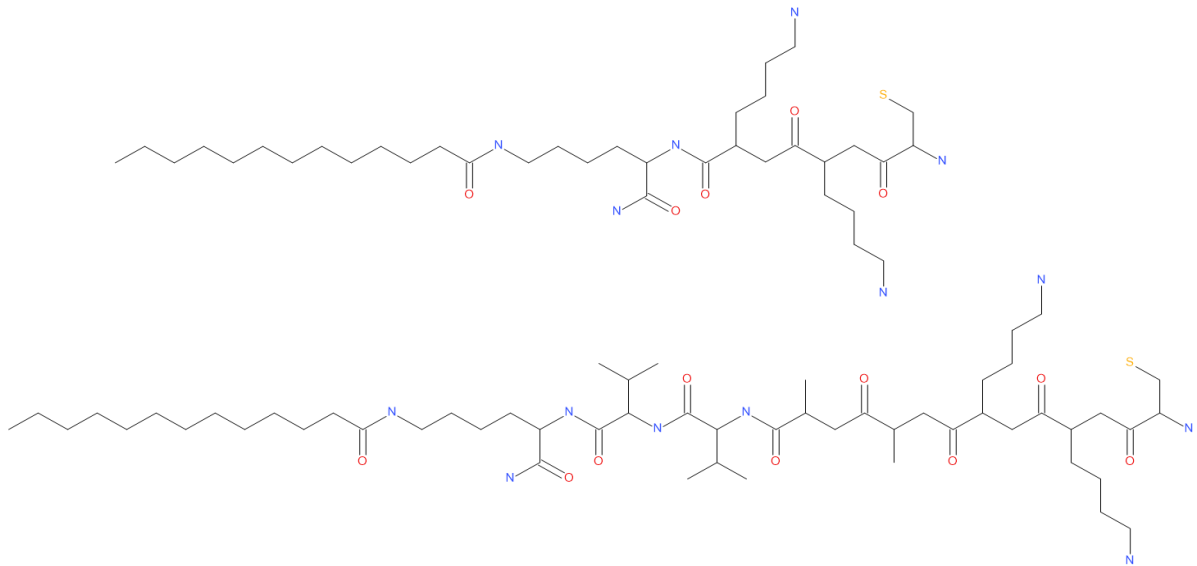


Figure 11 : Schéma d'autoassemblage de peptide avec et sans partie structurante issus des travaux de Moyer et al.<sup>6</sup>

La partie structurante est une des parties essentielles du peptide amphiphile. Si celle-ci n'est pas présente, les interactions intermoléculaires sont absentes et la molécule ne s'associe que grâce à son caractère amphiphile. Dans ces travaux, deux types de peptides sont synthétisés.



*Figure 12 : formule des deux peptides synthétisés dans les travaux de Moyer et al.<sup>6</sup>*

Un peptide présentant une partie structurante importante avec des valines et alanines et un autre peptide ou cette partie est complètement supprimée cf. Figure 12. Dans le premier cas, la structure des assemblages est bien celle de micelles cylindriques. Dans le second cas, la seule structure observée est une micelle sphérique. Ces résultats concordent avec le dichroïsme circulaire qui indique que pour des micelles cylindriques, la présence de liaisons hydrogène permet l'organisation en feuillet- $\beta$ . Lorsque la partie structurante est absente, les arrangements observés sont aléatoires. L'organisation est maintenue par la seule présence des deux parties hydrophiles et hydrophobes mais comme précisé plus haut, la partie « interaction » n'est plus présente.

Une autre étude portant sur la séquence peptidique et sur la forme des assemblages que prendraient ces peptides en solution a été réalisée par Cui et al.<sup>7</sup>. Dans cette étude, le peptide synthétisé présente trois parties distinctes pour permettre la formation d'assemblages robustes. Une partie hydrophobe constituée d'une seule chaîne carbonée, une

partie hydrophile constituée de deux acides glutamiques, et une partie structurante constituée de deux valines cf. Figure 13 ci-dessous.

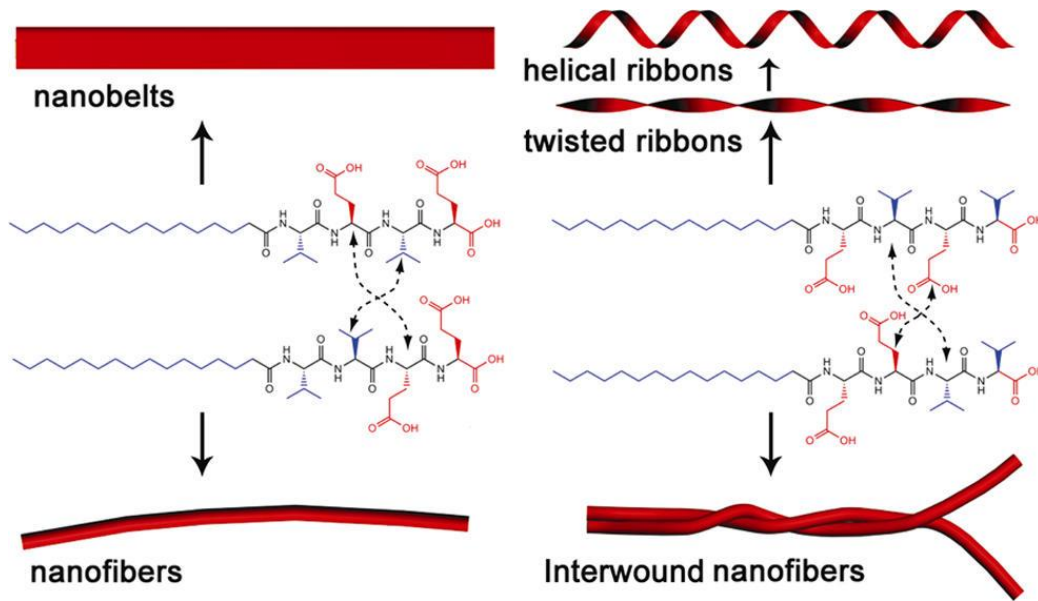


Figure 13 Schéma des quatre systèmes observés dans les travaux de Cui et al.

Ces molécules amphiphiles remplissent les conditions décrites dans les travaux d'Israelachvili<sup>8</sup> pour former des assemblages allongés tels qu'observés sur la Figure 13. La séquence peptidique est choisie dans cette optique. Deux facteurs sont mis en évidence dans ces travaux. L'alternance d'acides aminés chargés va entraîner un aplatissement de la structure tridimensionnelle de l'assemblage pour donner des rubans. Un rassemblement des acides aminés chargés et structurants va induire la formation de structures cylindriques. L'acide aminé qui fait la liaison dans le cas présent peut être soit hydrophile soit structurant. Dans le premier cas, il rendra la structure flexible permettant des torsions et des enroulements formant donc des rubans torsadés ou des fibres qui s'associent par paire en s'enroulant. Dans le second cas, le peptide est alors rigide et la structure prendra une forme droite. Il est également possible d'effectuer un mélange de peptides différents pour renforcer les interactions intermoléculaires. Dans cette étude, il est démontré que lorsqu'un acide aminé hydrophile s'aligne avec un acide aminé structurant, la liaison hydrogène qui se forme entre les deux peptides sera plus forte. De ce fait, en mélangeant deux peptides qui ont une formule différente mais qui permettent cet alignement, l'interaction entre deux peptides sera plus forte et les fibres ou rubans plus stables.

Ces travaux peuvent être mis en relation avec les travaux de Pashuck et al.<sup>9</sup>. La force d'interaction entre différents peptides a été étudiée en fonction de leur formule. Dans ces travaux, comme il a été montré plus haut que la partie structurante jouait un rôle primordial dans la formation d'assemblages, l'attention s'est portée sur la longueur (en termes de nombre d'acides aminés) de la partie structurante. Ces travaux s'appuient également sur les travaux de Levitt et al.<sup>1</sup>. La partie structurante étudiée ici est constituée de valine, acide aminé favorisant l'interaction en feuillet- $\beta$ , et d'alanine qui favorise plus les interactions en hélice- $\alpha$ . Le but est donc d'allonger plus ou moins la partie structurante mais aussi de modifier le ratio entre valine et alanine afin d'observer la force d'interaction inter peptide. Cette force d'interaction est mesurée par rhéologie et présentée sur la Figure 14 ci-dessous.

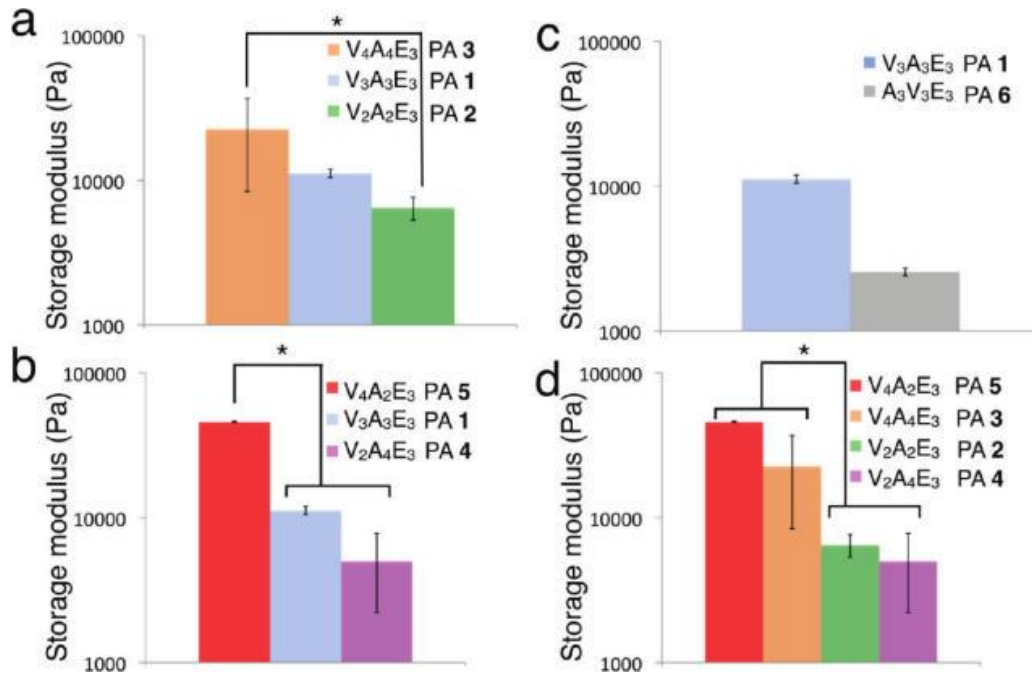


Figure 14 : Modules de conservation des différents peptides synthétisés dans les travaux de Pashuck et al.<sup>9</sup>

Les données présentées ici sont les modules de conservation qui traduisent du caractère élastique du matériau. Plus ces modules sont élevés et plus le matériau est solide. Premièrement, l'étude sur la taille démontre que plus la partie structurante est longue, plus les interactions intermoléculaires sont fortes. Une étude similaire aux travaux de Cui et al.<sup>7</sup> démontre que selon l'acide aminé positionné au niveau de la queue hydrophobe, la rigidité ou la force d'interaction sera plus ou moins forte. C'est avec un acide aminé formant plus de

feuillet- $\beta$  (valine) que l'interaction sera la plus forte. Enfin, pour une taille identique, l'interaction est plus forte pour un peptide présentant plus de valines que d'alanines.

### I-2.1.b Modification de la partie hydrophobe

Il est également possible d'effectuer des modifications au niveau de la chaîne alkyle. Ceci a été réalisé par Dasgupta<sup>10</sup>. Dans ces travaux, la chaîne alkyle a soit été remplacée par un système aromatique (pyrène ou fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)) qui permet l'association de la partie hydrophobe par  $\pi$ -stacking, soit doublée (deux chaînes hydrophobes parallèles) cf. Figure 15 ci-dessous.

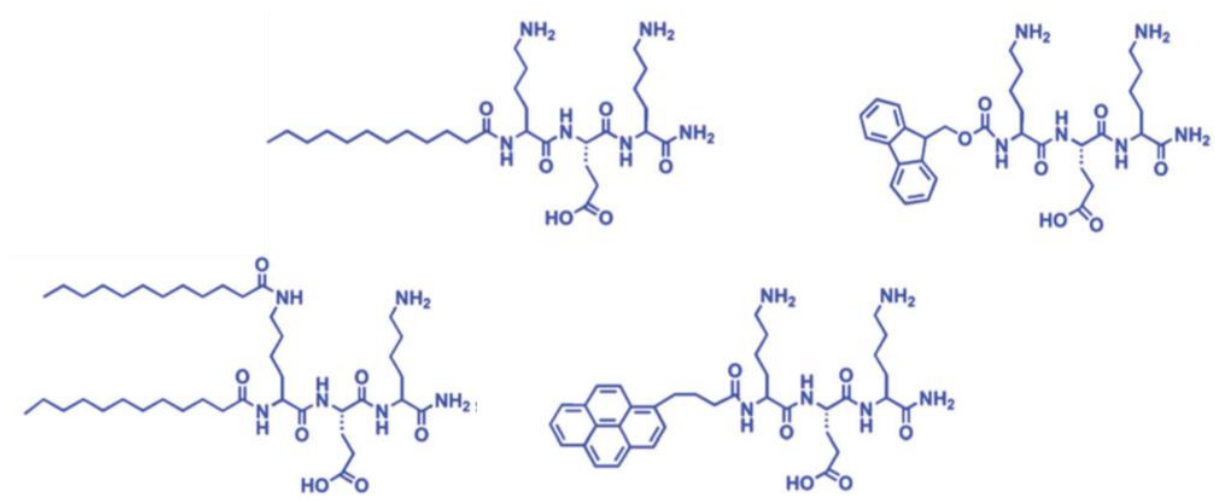


Figure 15 : Schéma des peptides synthétisés par Dasgupta

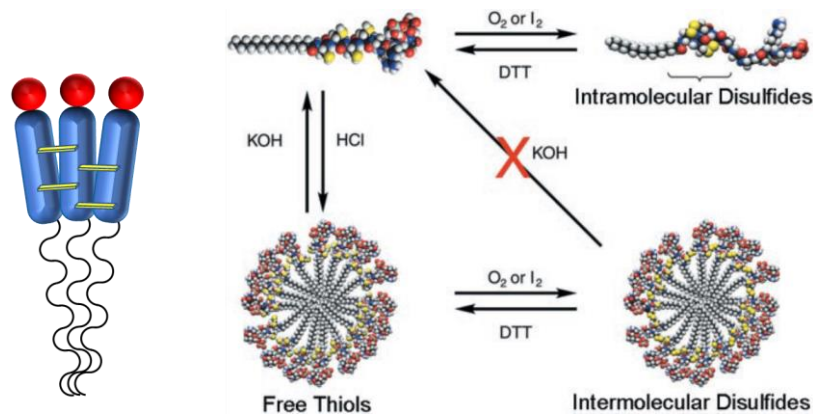
Les peptides présentant des parties aromatiques n'ont pas permis l'observation d'agrégats, fibres, sphères, ou autres. En dichroïsme circulaire, seul un signal correspondant à un arrangement aléatoire a été observé. La deuxième chaîne hydrophobe ajoutée sur le troisième peptide représenté à droite de la Figure 15 a été ajoutée sur l'amine primaire d'une chaîne latérale de lysine. Ce second type de peptides possédant deux chaînes hydrophobes présente une structure en forme de fibres qui s'arrange en ruban torsadé. Cela s'explique par l'arrangement antiparallèle des peptides opposés provoqué par la présence de l'asymétrie des deux chaînes aliphatiques. La partie structurante n'est pas vraiment présente ici. Il s'agit des liaisons amides qui vont tout de même permettre de former des liaisons hydrogènes

intermoléculaires. Ceci est observé en dichroïsme circulaire où un signal en feuillet- $\beta$  est très marqué.

### *1-2.2 Relation entre la structure du peptide et son assemblage*

#### *1-2.2.a Modification de la séquence peptidique*

La modification de la séquence peptidique peut être amenée à changer mais pour des propriétés autres que la forme de l'assemblage formé par le peptide amphiphile. Il est possible d'ajouter des propriétés de reconnaissance cellulaire ou figer une structure. Dans les travaux de d'Hartgerink et al.<sup>11</sup>, le peptide amphiphile possède toujours la même structure générale mais des cystéines ont été ajoutées à la séquence peptidique cf. Figure 16 ci-dessous.



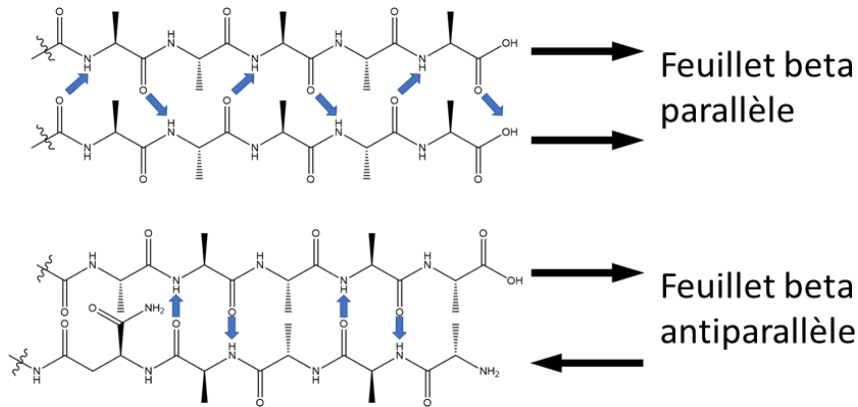
*Figure 16 : Schéma d'assemblage des peptides synthétisés par Hartgerink et al.<sup>11</sup>*

Les cystéines n'influent pas sur la morphologie de l'assemblage mais peuvent permettre de créer des liaisons inter et intramoléculaires solides. Le peptide seul forme donc des micelles cylindriques mais en milieu oxydant, les thioles libres forment des ponts disulfures soit à l'intérieur de la molécule s'il n'y a pas eu d'assemblage au préalable soit inter chaînes. Cela va avoir pour conséquence de stabiliser la micelle ou déformer quelque peu la molécule s'il s'agit de liaisons intra chaînes Mais quel que soit l'état d'oxydation des thioles, la micelle ne change pas de forme.

Une modification observée précédemment est l'alignement des acides aminés entre eux. Lorsque deux peptides identiques interagissent, les liaisons hydrogènes qui se créent entre deux peptides ne sont pas dans un état idéal. Les sites de liaisons hydrogènes sont éloignés et l'interaction en est réduite. Une solution pour cela comme vu précédemment est d'alterner acides aminés hydrophiles et structurants. Il est également possible d'imaginer une



synthèse dans le sens inverse. Jusqu'ici, les peptides présentés possédaient une extrémité C-terminale libre et la liaison à la chaîne aliphatique se faisait par une liaison amide à l'extrémité N-terminale. Dans les travaux de Behanna et al.<sup>12</sup>, des peptides présentant des structures inversées sont assemblés et étudiés. Lorsque ces peptides sont mis en présence de leur homologue synthétisé dans le sens « conventionnel », les sites de liaisons hydrogènes s'alignent parfaitement comme présenté sur la Figure 17 ci-dessous.

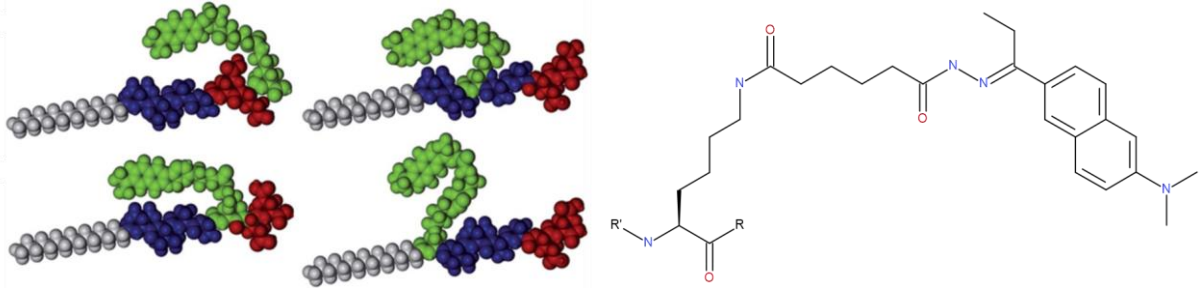


*Figure 17 : Alignement des liaisons hydrogène avec deux peptides synthétisés dans deux sens différents*

Grâce à ce rapprochement des peptides entre eux, l'interaction intermoléculaire se voit augmenter comme dans le cas des alternances d'acides aminés présentées par Cui et al.

Les peptides ne sont pas uniquement choisis pour leurs propriétés d'assemblages mais parce qu'ils peuvent présenter des propriétés additionnelles comme la reconnaissance cellulaire. Par exemple, une séquence de trois acides aminés constituée d'arginine, de glycine et d'acide aspartique (RGD) va permettre à l'intégrine, une protéine transmembranaire, de reconnaître et de se lier aux composés présentant cette séquence. La principale application explorée pour les peptides est thérapeutique. Le peptide est un vecteur par son caractère amphiphile. Il peut transporter des molécules organiques à travers le corps humain et se désassocier dans certaines conditions pour libérer ce principe actif. Un moyen de le faire passer dans les cellules est l'incorporation de cette séquence (RGD). Cet ajout peut être observé dans les travaux d'Hartgerink<sup>11</sup> cité plus en avant. Il se situe généralement à l'extrémité C-terminale, à l'opposé de la chaîne lipidique afin d'être présenté sur le pourtour de la micelle, quel que soit sa forme. Il est également possible d'ajouter d'autres séquences à

intérêt thérapeutique. Les travaux de Matson et al.<sup>13</sup> décrivent l'ajout d'une séquence différente pour la reconnaissance cellulaire. Elle se situe sur l'amine primaire d'une lysine.

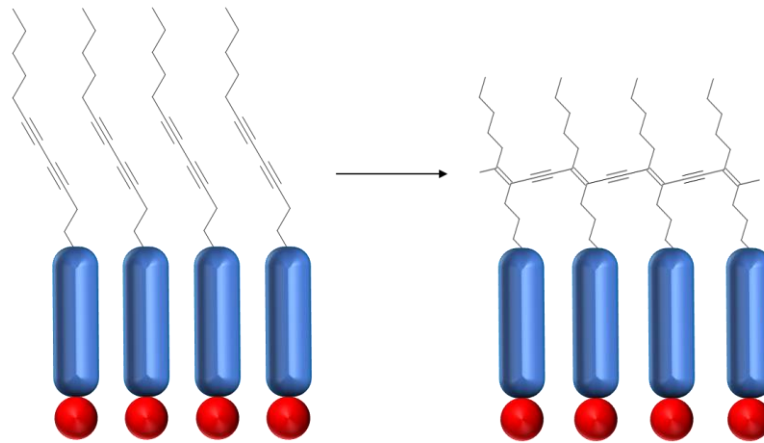


*Figure 18 : Positionnement et formule de la lysine présentant la séquence de reconnaissance Matson et al.<sup>13</sup>*

Cette lysine fonctionnalisée, symbolisée en vert sur la Figure 18 ci-dessus, a été synthétisée et positionnée à différentes positions du peptide amphiphile. L'assemblage créé, quel que soit la position de la lysine a toujours une forme cylindrique due à sa séquence peptidique. La position des lysines va uniquement influencer sur le relargage de principes actifs.

#### I-2.2.b Modification de la chaîne alkyle

Une modification de la chaîne lipidique peut, dans une certaine mesure, ne pas changer la morphologie. Ce type de travaux a d'abord été réalisé par Biesalski et al.<sup>14</sup>. Un dialcine est positionné au milieu de la chaîne alkyle. Cette fonction est un support de polymérisation. Dans le but de stabiliser une membrane constituée de peptides, cette fonction est polymérisée sous irradiation ultraviolette. Une surface rigide est alors créée avec uniquement des parties polaires de peptides positionnées sur le dessus.



*Figure 19 : Schéma de surface de peptides polymérisés, inspiré des travaux de Biesalski et al.<sup>14</sup>*

Ces travaux ont rendu possibles d'autres recherches afin de polymériser des peptides amphiphiles sous différentes formes. Hsu et al.<sup>15</sup> ont réussi à polymériser des peptides amphiphiles sous forme de micelle cylindrique stable. Le principe est le même et est permis par la forte interaction feuillet- $\beta$  faite par les peptides. Le rapprochement des peptides entre eux rend les sites de polymérisation plus proches, et la polymérisation peut alors se produire sous irradiation UV. Il s'agit de la même fonction responsable de la polymérisation, une fonction diacétylène, judicieusement placée au milieu de la chaîne aliphatique. Contrairement à l'étude de Biesalski où des repliements de la chaîne peuvent s'opérer et des liaisons entre deux blocs de peptide peuvent se faire, l'encapsulation de la fonction diacétylène empêche deux fibres de se lier par polymérisation. Les fibres sont donc très solides, mais les fibres ne sont pas liées entre elles de sorte que la cohésion globale repose principalement sur la rigidité de chaque fibre.

Il a été observé dans cette première présentation des peptides amphiphiles que ces derniers, au même titre que certaines molécules amphiphiles présentées au début de la partie bibliographique, peuvent s'associer sous forme de micelle cylindrique. Mais les peptides présentent des propriétés supplémentaires comme de l'adhésion possible avec des cellules ou encore des propriétés anti bactériologiques. Il est donc possible d'utiliser les peptides amphiphiles comme brique élémentaire afin de former notre membrane nanostructurée. Toutefois le peptide seul ne permet pas de former un matériau solide. Il est donc nécessaire de lui apporter un élément extérieur.

### I-3 Facteurs externes

#### I-3.1 Influence du solvant

Les peptides amphiphiles sont solubles dans beaucoup de solvants mais certains de ces solvants ont un rôle destructurant sur leur autoassemblage. L'hexafluoroisopropanol (HFIP) en est un exemple parfait. Il solubilise parfaitement les peptides amphiphiles classiquement retrouvés dans la littérature. Ce solvant a pour effet de réduire la propension des peptides amphiphiles à établir des interactions en feuillet- $\beta$ . Au-delà d'une certaine quantité de ce solvant, l'assemblage est complètement dénaturé. Les travaux de Korevaar et al.<sup>16</sup> se sont portés sur le comportement de peptides amphiphiles lorsqu'un mélange aqueux de peptide amphiphile est mis en présence de HFIP.

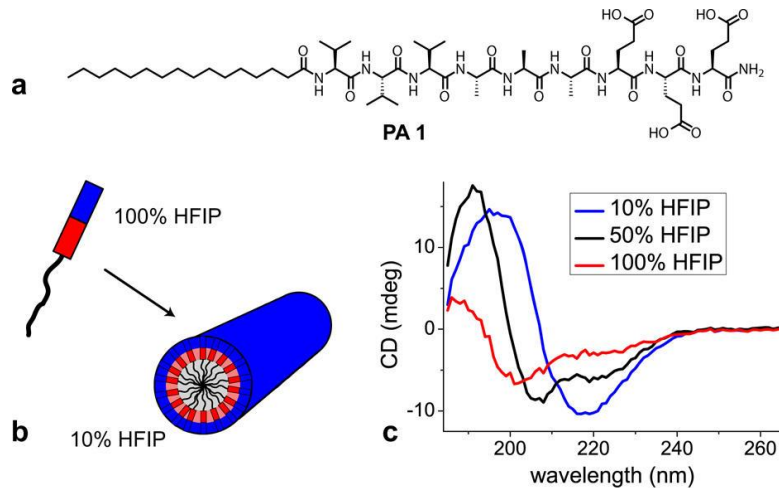


Figure 20 schéma du peptide synthétisé dans les travaux de Korevaar et al.<sup>16</sup> et effet de HFIP sur l'assemblage

Un suivi en dichroïsme circulaire permet de quantifier la perte d'interactions en feuillet- $\beta$ . Afin de pousser l'étude vers une approche cinétique, Korevaar et al. ont étudié l'importance le moment d'ajout du HFIP. Cette étude a permis de déterminer qu'à partir d'une concentration en HFIP supérieure à 20%, aucun assemblage n'est possible.

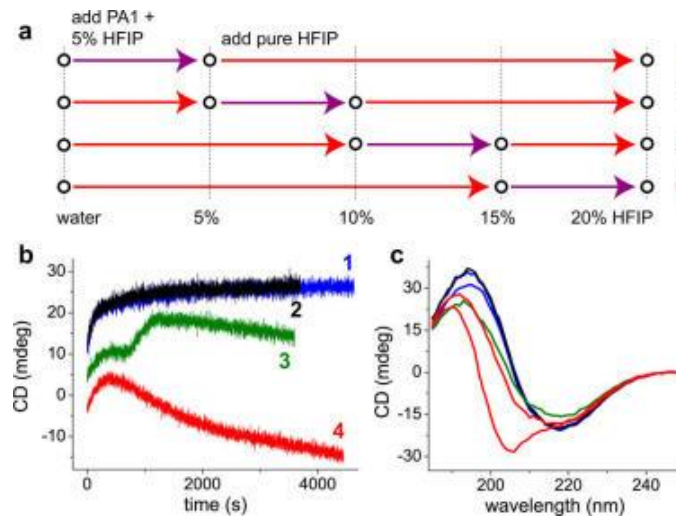


Figure 21 Schéma des différents moments d'ajout du peptide dans le HFIP suivi dans les travaux de Korevaar et al.<sup>16</sup>

Il apparait donc que plus le peptide est ajouté tardivement, plus les difficultés pour s'assembler sont présentes jusqu'à un point où il n'y a plus de formation d'assemblages. Le solvant a donc un effet très important dans la formation des autoassemblages et la perte d'interaction en feuillet- $\beta$  se traduit par un changement complet de morphologie.

### *1-3.2 Influence du pH*

Le pH est un facteur qui influe beaucoup sur les peptides amphiphiles contenant des acides aminés à chaîne latérale ionisable. Selon le pKa de la chaîne latérale de ces acides aminés et selon la séquence peptidique, il est possible d'obtenir différentes formes d'assemblage en fonction du pH. Les travaux de Chen et al.<sup>17</sup> portent sur différents peptides avec une structure, comme vu précédemment, faite des trois parties constitutives des peptides amphiphiles. A ce peptide a été ajoutée une partie constituée d'arginine et d'acide aspartique. Cette partie possède plusieurs modèles de répétition pour répartir différemment les charges le long du peptide. Lorsque le pH de la solution se situe au-delà du pKa de l'arginine (12,1) seul l'acide aspartique est sous forme chargée. Ces acides aminés étant situés à l'extrémité hydrophile du peptide, ils s'organisent alors au pourtour de la micelle cylindrique. Plusieurs cas présentés sur la Figure 22 ci-dessous sont observés.

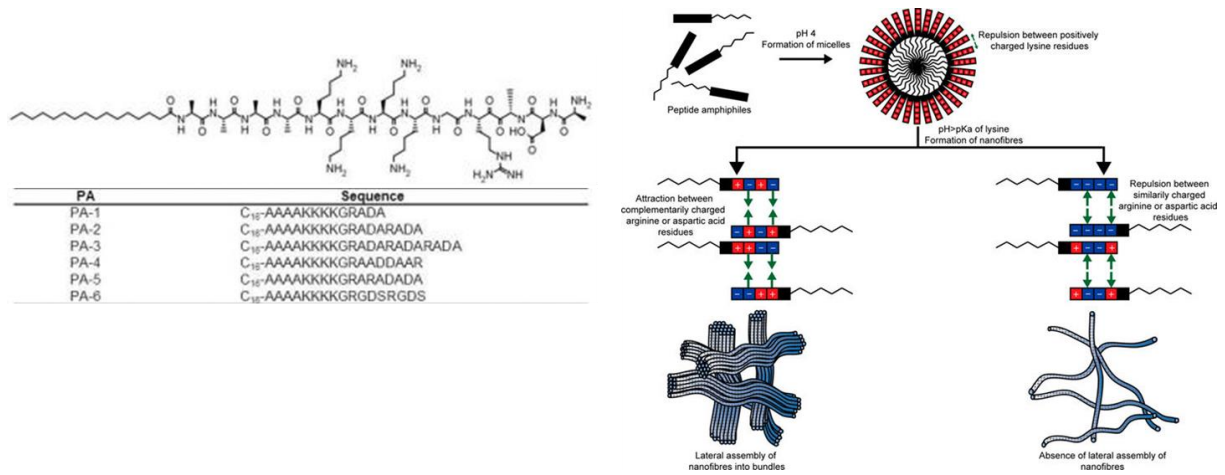
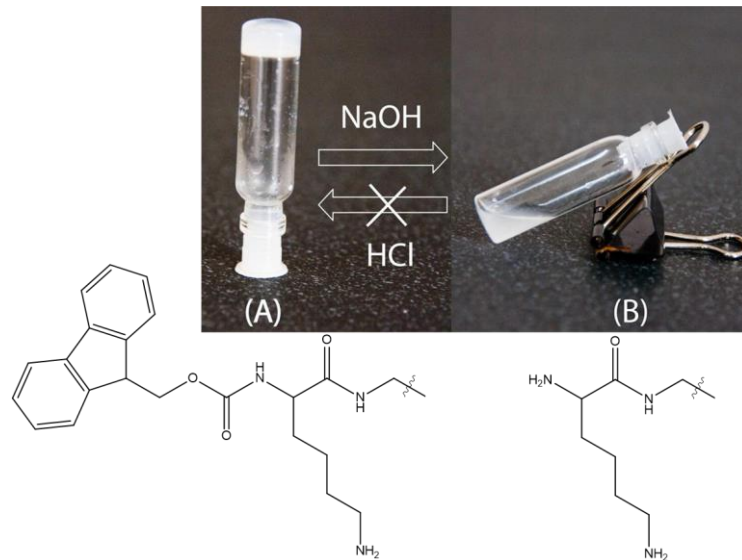


Figure 22 Schéma d'association des fibres selon l'arrangement des charges sur le peptide (Chen et al.<sup>17</sup>)

Quel que soit l'arrangement des charges, le peptide va former une micelle cylindrique. Lorsque les charges s'alignent permettant une interaction « tête-tête » des peptides, les fibres de peptides s'associent entre elles pour former des faisceaux de fibres d'un diamètre beaucoup plus important que si elles étaient isolées. Le pH a dans ce cas un effet sur la propension du peptide à former des assemblages plus grands.

Le pH peut également avoir une influence sur l'intégrité même du peptide. Les travaux de recherche d'Ahmed et al.<sup>18</sup> ont pour but de synthétiser des peptides très courts constitués d'une chaîne lipidique, d'un acide aminé (lysine) protégé à son extrémité N-terminale par un groupement Fmoc. Ces peptides sont étudiés ensuite pour leurs propriétés d'autoassemblage. Le groupement Fmoc est une extension de la séquence peptidique très courte. Il va également stabiliser l'assemblage grâce au  $\pi$ -stacking. En condition acide ou neutre, le peptide se comporte de manière habituelle en formant de longues fibres torsadées. Lorsque le peptide est placé en milieu basique, ses propriétés d'autoassemblage disparaissent et cette perte est définitive. Le groupement protecteur Fmoc est un groupement basolabile cf. Figure 23 ci-dessous.

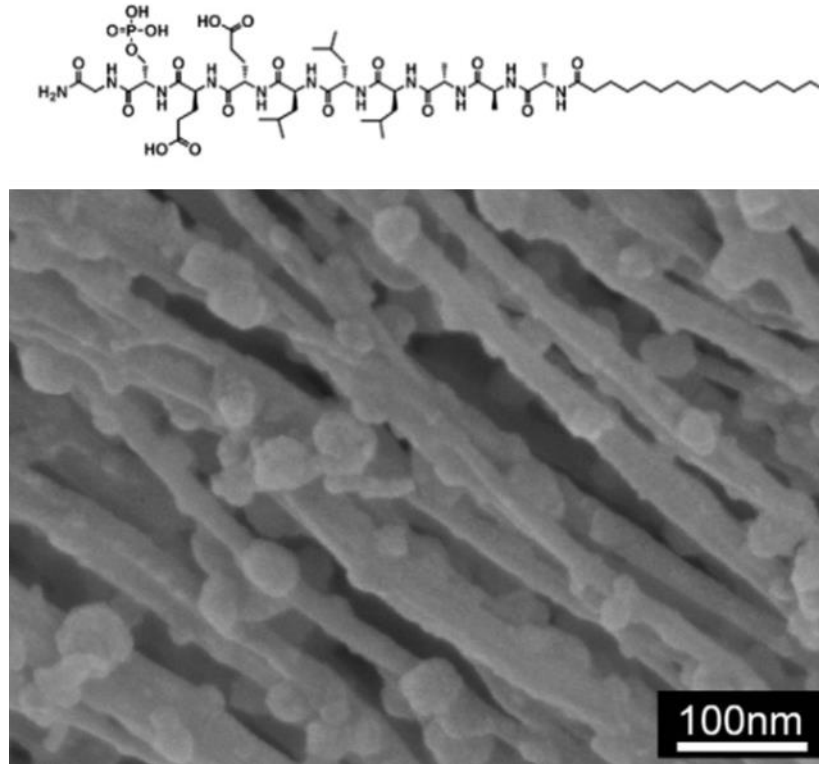


Lorsque le groupement Fmoc est retiré, le  $\pi$ -stacking qu'il permettait et qui stabilisait l'assemblage disparaît.

### 1-3.3 Influence d'additifs

Ces travaux peuvent également être mis en avant également pour leur étude sur la formation d'éléments extérieurs aux peptides autour des fibres formées. Des nanoparticules de silices sont déposés autour de ces fibres dans le but de créer des nanofibres creuses.

Des travaux similaires se sont portés sur la minéralisation de peptides amphiphiles. Afin de créer ces même fibres creuses hydrides, Sargeant et al.<sup>19</sup> ont synthétisé un peptide amphiphile avec une phosphoserine. La phosphoserine est un acide aminé porteur d'un groupement phosphoryle qui permet la nucléation d'hydroxyapatite. Ces cristaux vont ensuite se propager et entourer les fibres de peptides cf. Figure 24 ci-dessous.



*Figure 24 Image MEB de fibres de peptides amphiphiles après nucléation d'hydroxyapatite (Sargeant et al.<sup>19</sup>)*

L'élément extérieur se comporte de la même manière que les nanoparticules de silices observées précédemment dans les travaux de Ahmed et al. Il peut être observé que dans ces deux cas, l'ajout d'éléments extérieurs n'influe en aucun cas sur la morphologie des assemblages.

Un élément extérieur qui peut être utilisé ou modifié est le contre ion. Sur beaucoup de peptides amphiphiles synthétisés, lorsque le peptide sort de synthèse même après purification, si un seul acide aminé est porteur de charge, l'acide aminé possède un contre ion souvent issu de la synthèse. Cela peut très bien être du trifluoroacétate résultant de la clivage des groupement tertbutoxycarbone (Boc) ou encore d'autres ions. Les travaux de Greenfield et al.<sup>20</sup> ont pour but de décrire différents contre ions possibles pour un peptide anionique et les effets qu'ils engendrent. Les contre ions présentés dans ces travaux sont H<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup>. H<sup>+</sup> va permettre de protoner le peptide alors que Ca<sup>2+</sup> a lui un rôle de lien entre les micelles cf. Figure 25 ci-dessous.



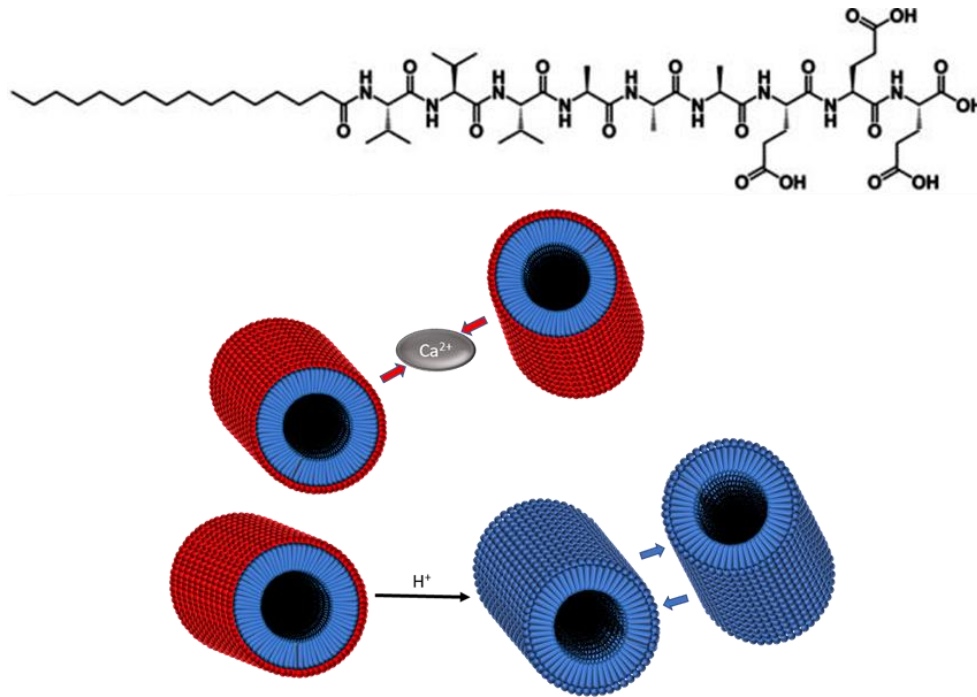
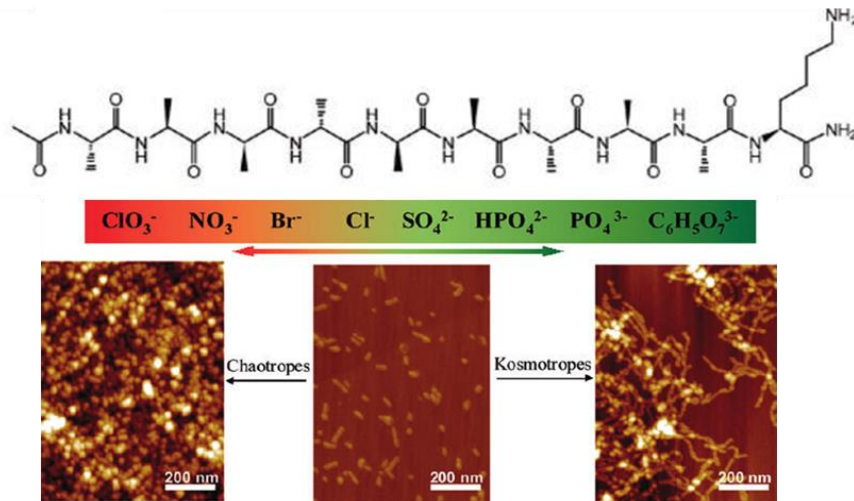


Figure 25 Schéma d'interaction d'H<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup> sur les micelles cylindriques de peptide

Tout d'abord Ca<sup>2+</sup>, du fait de sa bivalence, va permettre de créer un pont entre les fibres de peptides. La partie ionique du peptide est constituée d'acides glutamiques, chargés négativement. Ces acides aminés se situent au pourtour de la micelle cylindrique. La micelle cylindrique possède donc une surface chargée négativement. Ca<sup>2+</sup> va permettre d'attirer ces micelles entre elles et les stabiliser afin de former un gel résistant. Ce système n'est pas réversible. Si le gel est trop déformé, l'interaction avec Ca<sup>2+</sup> est perdue et revient difficilement à son état d'origine. Dans le cas d'H<sup>+</sup>, son rôle est de protoner les acides glutamiques présents. Le peptide n'est alors plus chargé et par conséquent la surface de la micelle non plus. Mais la surface de la micelle va pouvoir interagir avec les autres micelles par liaisons hydrogènes. Cette liaison va aussi stabiliser le réseau de fibres créant un gel moins robuste que le précédent. Cette interaction bien que plus faible est beaucoup plus aisée à reformer une fois détruite car tous les éléments sont toujours présents quel que soit la conformation du peptide. Ce système forme donc un gel très réversible. Dans les deux cas encore une fois la forme de l'assemblage n'est pas en jeu, il s'agit uniquement des interactions inter fibres qui sont modifiées avec l'ajout d'éléments extérieurs.

Les travaux de Cao et al.<sup>21</sup> se sont portés plus en détail sur les contre ions possibles pour un peptide cationique. Le peptide amphiphile synthétisé est quelque peu exotique comparé aux autres peptides qui sont décrits dans la littérature. Il est composé de neuf alanines formant à la fois le cœur hydrophobe grâce aux groupements méthyle le long de la chaîne peptidique et aussi la partie structurante à l'aide de liaisons hydrogènes. La partie hydrophile est constituée d'une lysine.



*Figure 26 images AFM décrivant les formes des assemblages de peptide selon la nature des contre anions Cao et al.<sup>21</sup>*

Dans cette étude, la nature des ions importe beaucoup car c'est la forme des assemblages qui est modifiée selon la nature des contre ions cf. Figure 26 ci-dessus. Plus l'anion utilisé possède une valence élevée, plus il va permettre la formation de longues structures. Ces ions vont donc favoriser l'agrégation des molécules. Les anions monovalents inhibent cette agrégation et entraîne la formation d'assemblages plus petits telles que des sphères.

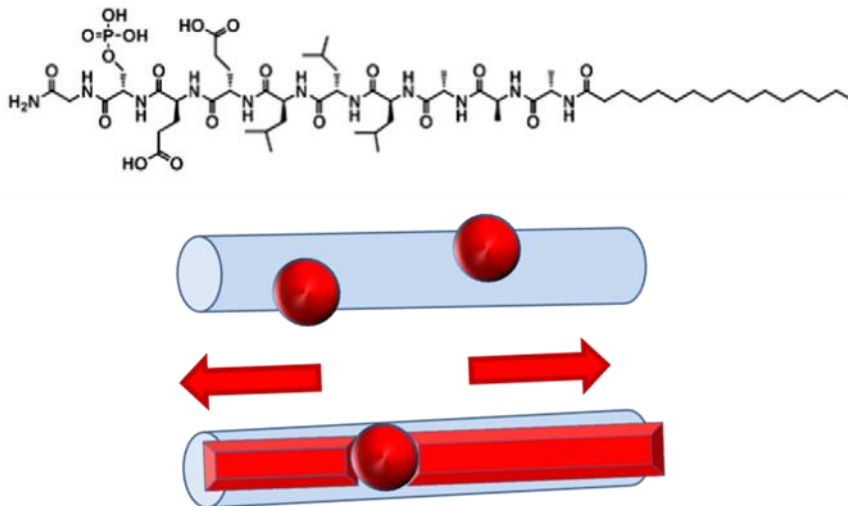
Il a été démontré ici comment la structure des peptides amphiphiles ainsi que le milieu dans lequel ils s'associent permet d'avoir une grande variabilité d'autoassemblages. Beaucoup de facteurs influent sur le type d'assemblage observé pour les peptides amphiphiles. Ils ne diffèrent pas des molécules amphiphiles naturelles. La formule du peptide est le premier facteur influant sur son type d'assemblage. Trois parties sont le plus souvent retrouvées. Ces parties sont indispensables pour l'obtention de micelles cylindriques. La partie hydrophobe constitue le cœur de la micelle, la partie hydrophile constitue la couche externe de la micelle.

La troisième partie, la partie structurante permet d'établir des liaisons entre peptides. Cette partie détermine le type de structure secondaire et par conséquent la forme des assemblages. Le milieu influe également sur l'autoassemblage. Le pH, le solvant et d'autres composés vont permettre de dénaturer, modifier ou améliorer les assemblages. Ils ont soit une action favorisante pour la formation d'autoassemblages soit une action destructurante.

## II-Association de peptides amphiphiles avec différentes molécules

### II-1 Interactions avec de petites molécules

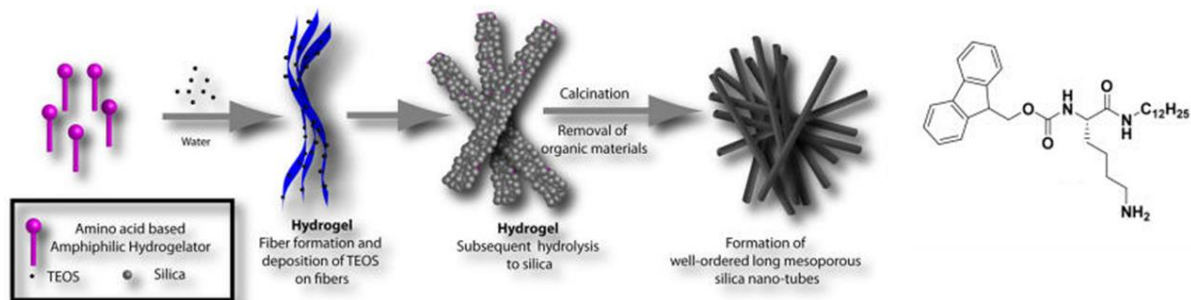
Nous avons vu précédemment la possibilité d'observer des associations entre des molécules organiques et des molécules inorganiques. Des éléments extérieurs qui n'interviennent pas dans la formation des micelles cylindriques sont ajoutés à ces derniers afin de créer un nouveau matériau. Le but est de donner aux éléments ajoutés la forme caractéristique des micelles formées par les peptides amphiphiles. Les peptides amphiphiles ont par exemple été mis en présence de calcium dans le but de développer de l'hydroxyapatite le long de ces fibres. Sargeant et al.<sup>19</sup> ont démontré que le long de fibres de peptides, si ces derniers possèdent un groupement phosphorylé, l'hydroxyapatite se forme en noyaux sphériques lorsque dans le milieu est ajouté du calcium et des cellules souches mésenchymateuses humaines de type ostéoblastes cf. Figure 27 ci-après



*Figure 27 : organisation de l'hydroxyapatite sur les fibres de peptides amphiphiles*

Des travaux similaires ont été réalisés par Hartgerink et al.<sup>22</sup>. Lors de ces recherches, l'hydroxyapatite ne s'est pas contentée de s'associer aux peptides amphiphiles. Comme les peptides amphiphiles synthétisés sont très robustes grâce à leurs ponts disulfures intermoléculaires présentés dans les travaux de Hartgerink et al.<sup>22</sup> dans la partie précédente, l'hydroxyapatite possède un support très solide permettant la croissance des cristaux d'hydroxyapatite le long des fibres cf. Figure 27 ci-dessus. Le système recouvre alors toute la fibre pour lui-même former une fibre inorganique creuse encapsulant la micelle cylindrique.

Ce système d'association et de formation d'un solide inorganique autour de fibres de peptides a également été étudié par Ahmed et al.<sup>18</sup>. Dans ces travaux, brièvement présentés dans la partie précédente, le composé ajouté au peptide amphiphile est de l'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS). Il s'associe directement aux micelles pour former des fibres décorées de sphères cf. Figure 28 ci-après. Une étape d'hydrolyse va ensuite permettre de former une couche homogène de silice autour de la fibre.



*Figure 28 Schéma de formation des fibres de silice à partir de peptides amphiphiles (Ahmed et al.<sup>18</sup>)*

La fibre inorganique créée n'épouse pas uniquement la forme de la micelle située à l'intérieur. Lors de la calcination, le matériau va se contracter et former une fibre de section circulaire. Il s'agit ici du même principe que dans l'étude précédente où une petite molécule sert de point de départ à la formation d'un matériau plus répandu sur la structure du peptide amphiphile. Ce système est permis uniquement par la capacité des peptides amphiphiles, en solution ou à l'état solide de s'associer avec différents composés. Au-delà des associations décrites avec les composés inorganiques, d'autres interactions ont été étudiées.

## II-2 Interactions avec des polymères

### II-2.1 Interactions par $\pi$ -stacking

Certains peptides amphiphiles possèdent une partie aromatique au niveau de la partie hydrophobe comme les travaux de Dasgupta<sup>10</sup>. Dans ce cas, le système aromatique ne joue que le rôle de partie hydrophobe changeant les interactions lipophiles par du  $\pi$ -stacking. Il est également possible d'observer des peptides avec des systèmes aromatiques à l'opposé de la chaîne peptidique, au niveau de la tête polaire. C'est le cas dans les travaux d'Ahmed et al.<sup>18</sup> où l'utilité de ce système aromatique est de permettre l'alignement des peptides grâce au  $\pi$ -stacking. Cette interaction peut également être utilisée pour l'association avec d'autres molécules afin de former des assemblages de tailles ou formes plus complexes. Loh et al.<sup>23</sup> ont démontré que sur un peptide décoré d'un système aromatique tel qu'un pyrène lié à un imidazolium, il est possible d'associer un polymère qui possède une fonction viologène cf. Figure 29 ci-après.

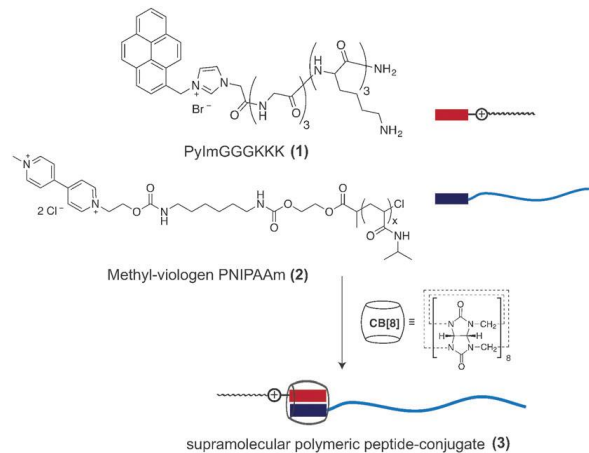


Figure 29 Association de peptide et de poly *N*-Isopropylacrylamide (PNIPAAm) par  $\pi$ -stacking (Loh et al.<sup>23</sup>)

Cette association permet de créer une longue chaîne se comportant exactement comme une molécule amphiphile. La partie peptide étant la partie hydrophile et la partie polymère formant la partie hydrophobe. Cette association permet de former des vésicules avec à l'intérieur comme à l'extérieur, une paroi faite de peptides.

### II-2.2 Interactions par liaisons covalentes

Selon les travaux d'Elder et al.<sup>24</sup>, il est également possible de lier un peptide directement à une chaîne polymère. Le polymère utilisé ici est un acide hyaluronique. L'ajout du peptide sur le polymère permet une forme de réticulation réversible cf. Figure 30 ci-après.

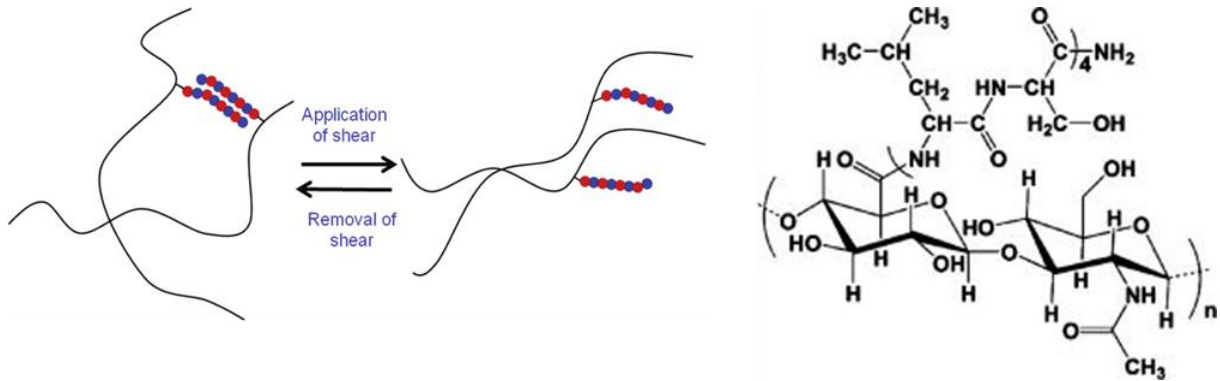
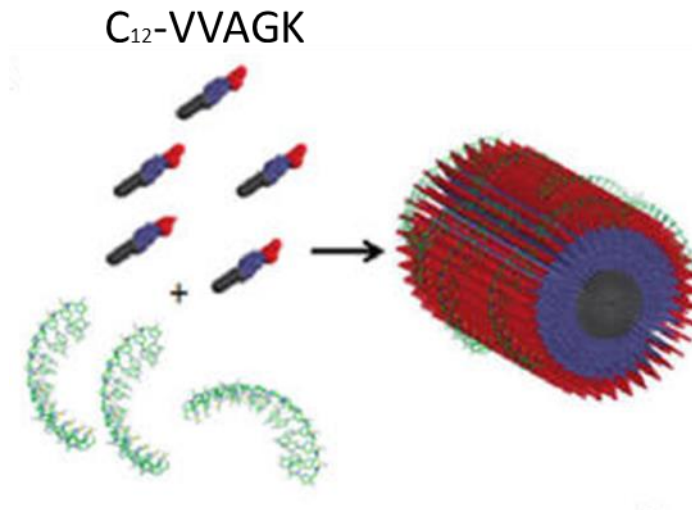


Figure 30 Schéma d'association des chaînes de polymère par l'intermédiaire des peptides (Elder et al.<sup>24</sup>)

Les peptides sont sous formes de chaînes latérales sur le polymère et leurs associations vont aider à solidifier le système polymère. Cette étude est suivie en rhéologie afin d'étudier la résistance du matériau avec et sans peptide. Le peptide permet uniquement pour des déformations faibles une meilleure résistance. Un taux de cisaillement trop élevé entraîne la même réponse que le polymère, qu'il soit décoré ou non de peptides. Un gel est formé lorsque des faibles concentrations de ce mélange sont observées.

### II-2.3 Interactions par liaisons ioniques

Les travaux de recherche de Bulut et al.<sup>25</sup> démontrent qu'il est possible d'associer les peptides amphiphiles avec des oligonucléotides. Une chaîne de 18 nucléotides est attachée au peptide sur le pourtour de la micelle cylindrique cf. Figure 31 ci-après.

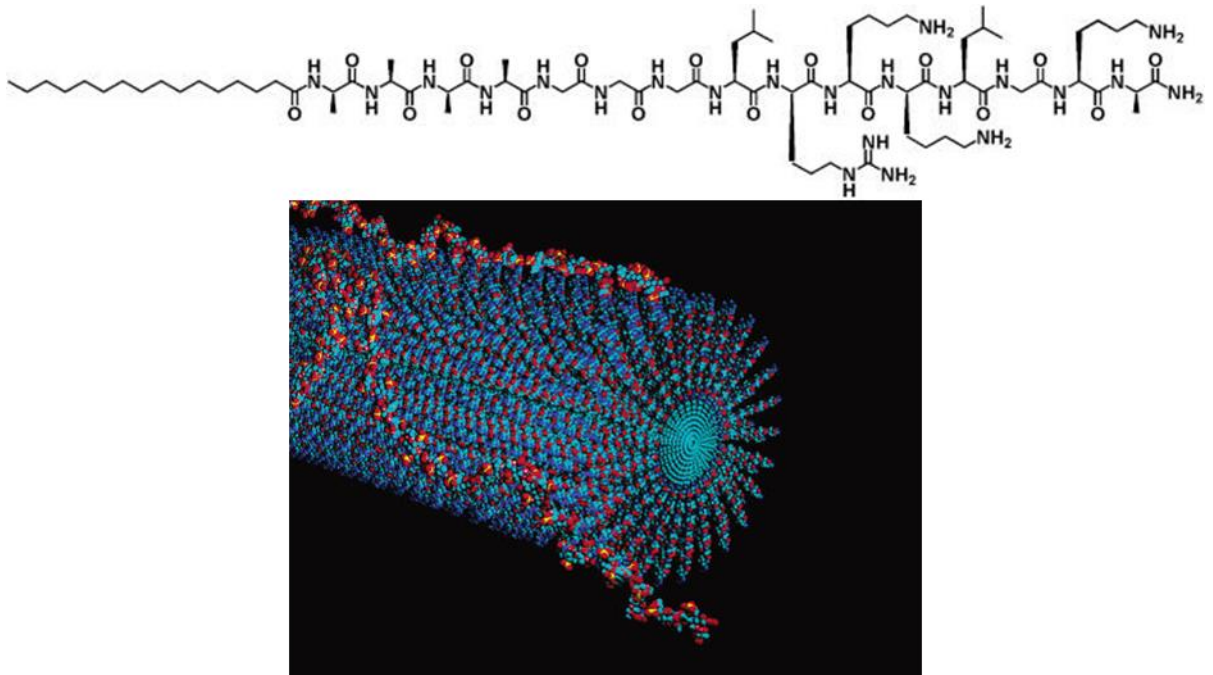


*Figure 31 Schéma d'association du peptide amphiphile et d'oligonucléotides (Bulut et al.<sup>25</sup>)*

L'association de ces deux molécules permet l'obtention d'un gel encapsulant de l'eau. Cette association est permise par la formation d'interactions ioniques entre le peptide (lysine) et les nucléotides chargés négativement. Les effets supplémentaires de cette interaction sont l'augmentation de la force du signal feuillet- $\beta$  observé en dichroïsme circulaire mais également la formation de ce gel qui possède un comportement élastique solide.

Un autre polymère utilisé pour l'association avec des peptides amphiphiles est l'héparine. Rajangam et al.<sup>26</sup> ont étudié cette association. L'héparine est une longue chaîne d'unités disaccharidiques trisulfatées. Ce site sulfaté est un très bon candidat pour l'association avec la partie cationique du peptide. De cette manière, l'héparine peut s'enrouler autour de la micelle cylindrique cf. Figure 32 ci-après.





*Figure 32 Schéma de modélisation de l'association de l'héparine avec les peptides amphiphiles (Rajangam et al.<sup>26</sup>)*

La présence de cette chaîne le long et autour des micelles cylindriques va entraîner leur stabilisation. Cette observation est faite, comme pour l'association avec les nucléotides, avec le dichroïsme circulaire. Le signal feuillet- $\beta$  devient même majoritaire lors de l'ajout du polymère. Avant cela, le signal est plus caractéristique d'hélice- $\alpha$ . Il s'opère donc un changement de conformation. C'est grâce à cette association que peut se former la micelle cylindrique, forme d'assemblage spécifique pour une interaction forte en feuillet- $\beta$ .

Un autre polymère choisi pour l'association avec des peptides amphiphiles est le polyéthylène glycol réticulé grâce à la présence de groupements méthacrylate en bout de chaîne. Afin de permettre cette réticulation, elle a été réalisée par Goktas et al.<sup>27</sup> en présence de peptides amphiphiles cationiques et anioniques afin de créer un réseau de fibres réticulé par la présence du polymère cf. Figure 33 ci-après.



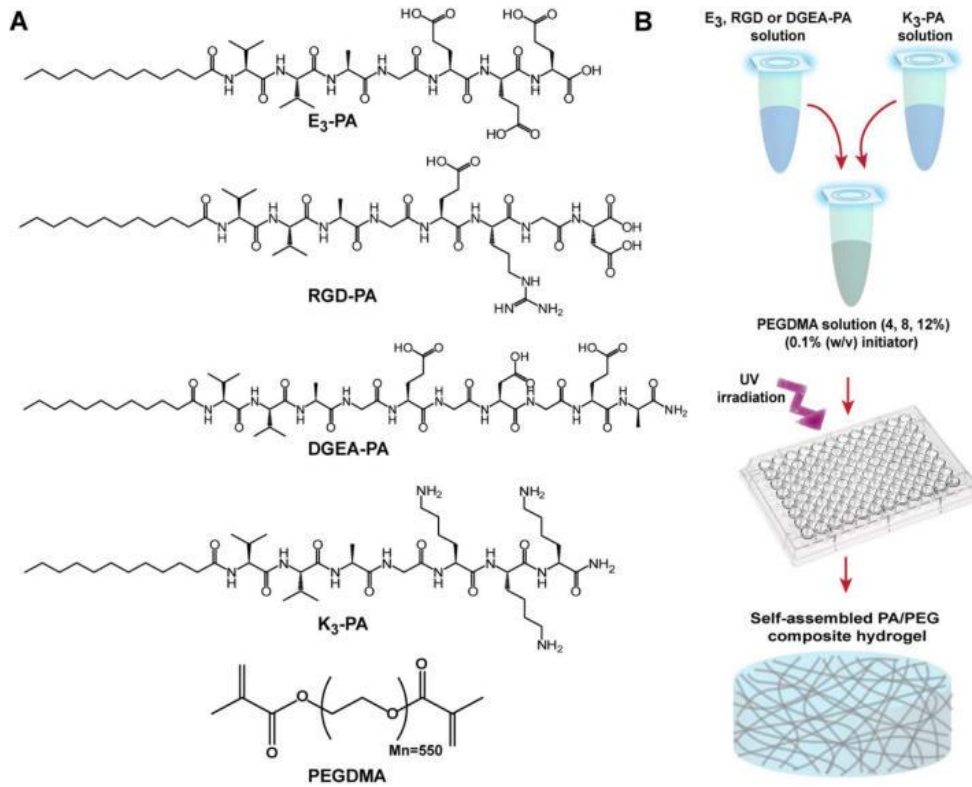
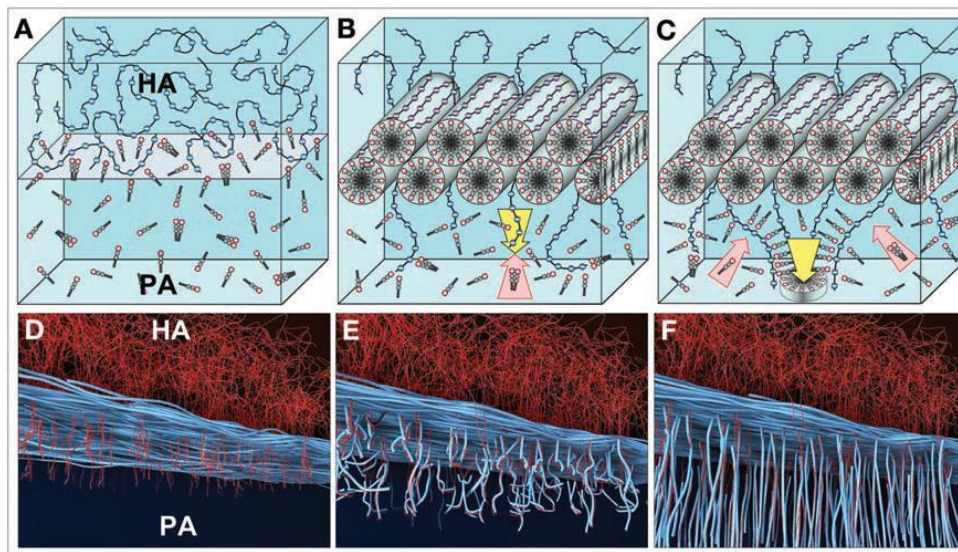


Figure 33 Schéma de formation du matériau peptide-PEG (Goktas et al.<sup>27</sup>)

Les peptides étudiés lorsqu'ils sont seuls ne forment qu'un gel peu résistant. Le peptide, une fois mélangé au réseau réticulé de PEG, forme un solide très robuste. Comme les peptides ont des structures similaires, il est possible d'ajouter toutes sortes d'épitopes comme par exemple une séquence de reconnaissance cellulaire (RGD).

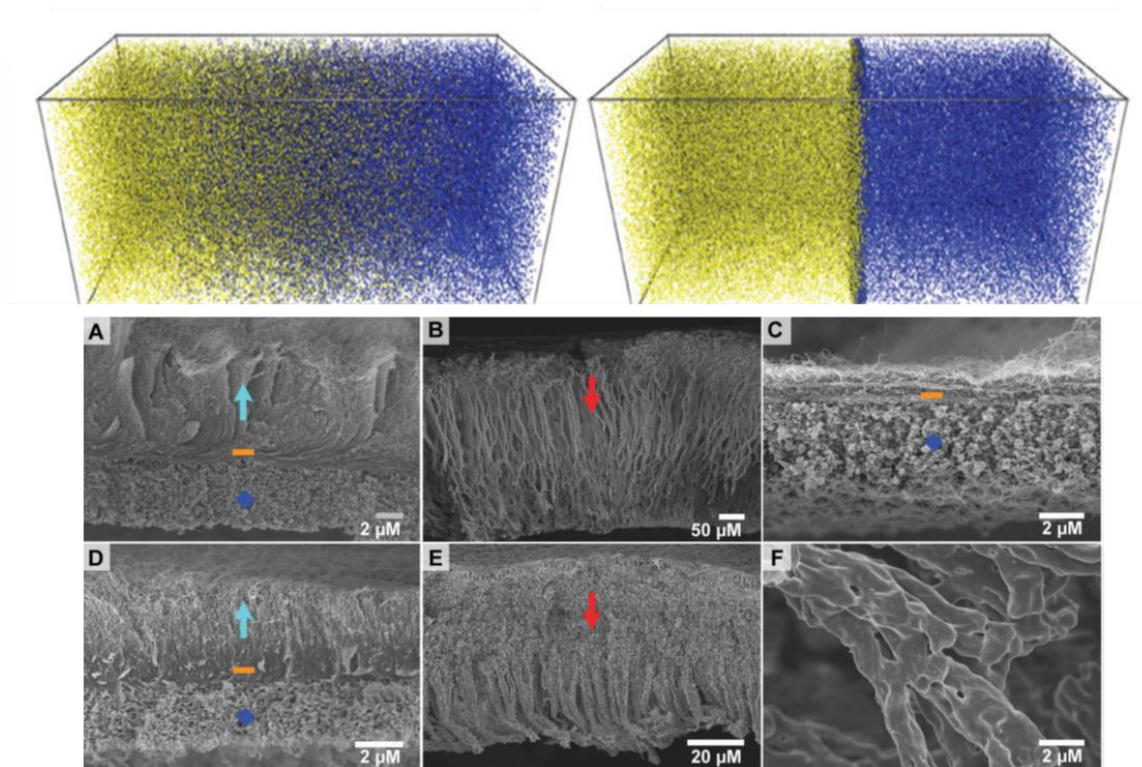
Un dernier polymère qui a déjà été utilisé dans des travaux présentés précédemment est l'acide hyaluronique. L'acide hyaluronique avait été utilisé pour son site acide carboxylique, fonction servant de liaison avec le peptide pour former des peptides en chaînes latérales. L'acide carboxylique peut facilement être déprotoné pour donner un site anionique, candidat à l'association avec des têtes polaires cationiques de peptides. Capito et al.<sup>28</sup> ont utilisé cette association entre l'acide hyaluronique et un peptide amphiphile afin de créer un matériau basé sur le même principe que l'association avec l'héparine. Le peptide utilisé est directement capable d'établir des micelles cylindriques sans l'aide du polymère. Le polymère ne stabilise pas la micelle mais utilise la micelle comme squelette pour s'organiser autour. La particularité de l'acide hyaluronique lorsqu'il est associé à des peptides est de former très

rapidement un solide. Deux milieux aqueux d'acide hyaluronique et de peptides amphiphiles vont rapidement s'organiser pour former une interface solide cf. Figure 34 ci-après.



*Figure 34 schéma d'association d'acide hyaluronique et de peptides amphiphiles entre deux milieux aqueux (Capito et al.)*

Cette interface solide peut être isolée et a fait l'objet de recherches plus poussées dans les travaux de Zha et al.<sup>29</sup> cf. Figure 35. Dans cette seconde étude, différents peptides amphiphiles sont comparés pour leur habilité à former cette interface. Plus la force de l'interaction est grande, plus l'interface formée sera dense ce qui limitera voire empêchera l'inter-diffusion des deux phases aqueuses. Au contraire, plus l'interaction entre les deux composants des différentes phases est faible, plus l'interface créée sera large, laissant alors librement diffuser les constituants dans un sens ou dans l'autre. Il est tout de même important de noter que dans les deux cas, après la formation de l'interface, se forment des fibres de manière orthogonale vis-à-vis de l'interface.



*Figure 35 : Interface créée par la mise en contact d'une solution aqueuse de peptide amphiphile et un solution aqueuse d'acide hyaluronique et présentation des différentes forces d'interaction dans les travaux de Zha et al.<sup>29</sup>*

Dans le cas présenté à gauche correspondant aux images MEB A et D, la force d'interaction entre le polymère et le peptide amphiphile n'est pas assez forte pour établir des liaisons solides et chaque solution va s'interpénétrer avec l'autre formant une interface très épaisse. Sur les images MEB A et D, trois systèmes distincts sont observables : une interface représentée par la ligne orange. Au-dessus s'organisent les micelles cylindriques de peptides amphiphiles avec autour l'acide hyaluronique représentées par la flèche bleue. Le milieu en dessous représenté par le disque bleu est constitué d'arrangements aléatoires d'acide hyaluronique. A l'inverse lorsque la force d'interactions est trop forte l'interface est trop solide et aucune interpénétration n'est possible comme sur la simulation réalisée sur l'image de droite. La formation de la séparation est trop rapide et sur les images MEB les phénomènes représentés par la ligne orange et le point bleu sont les deux seuls observables. Afin de moduler ces forces d'interaction, la séquence peptidique est quelque peu modifiée : ajout ou suppression de lysines. La taille du polymère est également modifiée afin d'agir sur la force

d'interaction. De plus on remarque la présence de plusieurs types d'interactions. Les interactions électrostatiques sont les plus présentées mais il existe aussi des liaisons chimiques comme avec dans les travaux d'Elder et al.<sup>24</sup> ou encore des interaction mécaniques avec l'encapsulation de peptide amphiphiles comme dans les travaux de Goktas et al.<sup>27</sup>.

L'étude de l'équipe de Samuel Stupp a mis en avant une séquence peptidique très utilisée pour former des micelles cylindriques. Ce peptide de formule  $C_{16}-V_3A_3K_3-NH_2$  est d'abord étudié seul et présente une forme de micelle cylindrique robuste. Mais même avec cette forme d'autoassemblage, le peptide seul ne gélifie pas en solution aqueuse. La partie structurante du peptide est d'abord constituée de trois valines puis de trois alanines. Le peptide présente donc un gradient de polarité entre la partie hydrophobe et la partie hydrophile. Ce gradient permet d'aider l'alignement des peptides entre eux pour stabiliser la micelle cylindrique. Ce peptide est également étudié en présence de polymères. Le peptide amphiphile s'assemble également en présence de polymères et la forme des assemblages est conservée malgré la présence de polyélectrolytes. Le polymère choisi par le groupe de Samuel Stupp est l'acide hyaluronique, un polymère biodégradable et dont la tenue mécanique est faible. Il est donc nécessaire afin de former notre matériau membranaire de choisir un autre polyélectrolyte car l'acide hyaluronique ne conviendrait pas à des applications de filtration membranaire.

### III-Etude de matériaux membranaires nanostructurés

Lorsque les membranes d'ultrafiltration sont étudiées, plusieurs paramètres doivent pris en compte : la perméabilité et la sélectivité comme présentées sur la

Figure 36 ci-dessous. La courbe de noire de ce graphique des travaux de Zhang et al.<sup>2</sup> représente le fonctionnement optimal théorique des membrane d'ultrafiltration. Comme stipulé précédemment, il est nécessaire pour repousser cette limite de fonctionnement d'apporter de la nano structuration au matériau.

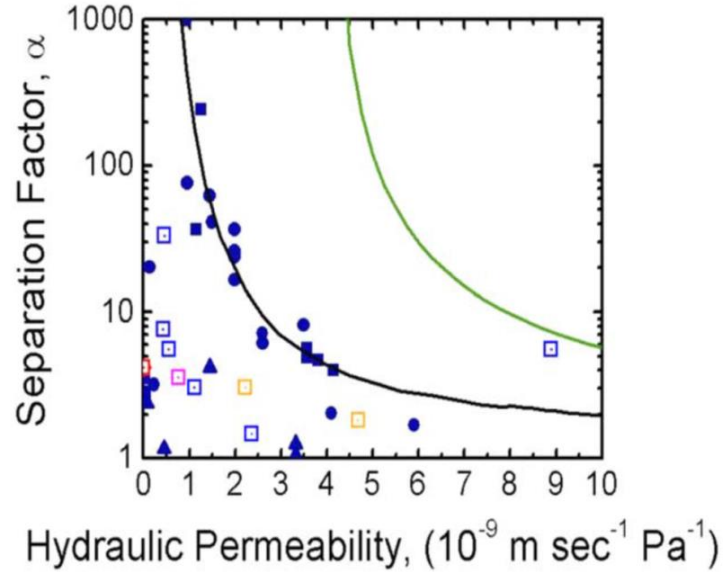


Figure 36 : Fonctionnement théorique des membranes d'ultrafiltration<sup>2</sup>

Il est important de noter que l'utilisation des copolymères à blocs comme présenté dans la Figure 36 dans la formation de membrane devient de plus en plus répandue car ils permettent de fabriquer une brique élémentaire de petite taille formant un matériau poreux. La porosité est alors créée par le volume libre entre chaque objet nanométrique. Les peptides amphiphiles se différencient donc des copolymères à blocs par leurs différentes propriétés présentées dans cette partie à savoir la possibilité de modifier les propriétés avec uniquement la modification d'une fonction chimique ou d'un acide aminé comme par exemple avec le folate lié à une lysine dans les travaux de Matson et al.<sup>13</sup>. Il est également possible de les rendre biocompatibles grâce à l'ajout de lysine par exemple et enfin d'effectuer de la culture cellulaire.

La structuration permet de repousser la limite théoriquement jusqu'à la courbe verte. Comme il a été décrit dans cette étude bibliographique, les peptides amphiphiles et plus particulièrement le peptide présentant la séquence suivante :  $C_{16}-V_3A_3K_3-NH_2$  permet la formation d'un objet nanométrique : une micelle cylindrique très stable. Cet objet élémentaire a même été associé à un polymère pour former un matériau dans les travaux de Zha et al.<sup>29</sup> mais le polymère choisi dans notre étude doit apporter des propriétés mécaniques différentes pour des applications de filtration. Afin de mettre en forme le matériau membranaire, la force d'interaction entre le polymère et le peptide amphiphile doit être modulée pour ajuster résistance mécanique et vitesse de formation.



- (1) Levitt, M. Conformational Preferences of Amino Acids in Globular Proteins. *Biochemistry* **1978**, *17* (20), 4277–4285. <https://doi.org/10.1021/bi00613a026>.
- (2) Zhang, Y.; Sargent, J. L.; Boudouris, B. W.; Phillip, W. A. Nanoporous Membranes Generated from Self-Assembled Block Polymer Precursors: *Quo Vadis?* *Journal of Applied Polymer Science* **2015**, *132* (21), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/app.41683>.
- (3) Kunitake, T.; Okahata, Y.; Shimomura, M.; Yasunami, S.; Takarabe, K. Formation of Stable Bilayer Assemblies in Water from Single-Chain Amphiphiles. Relationship between the Amphiphile Structure and the Aggregate Morphology. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103* (18), 5401–5413. <https://doi.org/10.1021/ja00408a021>.
- (4) Murakami, Y.; Nakano, A.; Yoshimatsu, A.; Uchitomi, K.; Matsuda, Y. Characterization of Molecular Aggregates of Peptide Amphiphiles and Kinetics of Dynamic Processes Performed by Single-Walled Vesicles. *Journal of the American Chemical Society* **1984**, *106* (12), 3613–3623. <https://doi.org/10.1021/ja00324a034>.
- (5) Sankaram, M. B. Membrane Interaction of Small N-Myristoylated Peptides: Implications for Membrane Anchoring and Protein-Protein Association. *Biophys J* **1994**, *67* (1), 105–112.
- (6) Moyer, T. J.; Kassam, H. A.; Bahnson, E. S. M.; Morgan, C. E.; Tantakitti, F.; Chew, T. L.; Kibbe, M. R.; Stupp, S. I. Shape-Dependent Targeting of Injured Blood Vessels by Peptide Amphiphile Supramolecular Nanostructures. *Small* **2015**, *11* (23), 2750–2755. <https://doi.org/10.1002/smll.201403429>.
- (7) Cui, H.; Cheetham, A. G.; Pashuck, E. T.; Stupp, S. I. Amino Acid Sequence in Constitutionally Isomeric Tetrapeptide Amphiphiles Dictates Architecture of One-Dimensional Nanostructures. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (35), 12461–12468. <https://doi.org/10.1021/ja507051w>.
- (8) Israelachvili, J. N. Intermolecular and Surface Forces. 706.
- (9) Pashuck, E. T.; Cui, H.; Stupp, S. I. Tuning Supramolecular Rigidity of Peptide Fibers through Molecular Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (17), 6041–6046. <https://doi.org/10.1021/ja908560n>.
- (10) Dasgupta, A. Exploring Architectures at the Nanoscale: The Interplay between Hydrophobic Twin Lipid Chains and Head Groups of Designer Peptide Amphiphiles in the Self-Assembly Process and Application. *Soft Matter* **2016**, *12* (19), 4352–4360. <https://doi.org/10.1039/C6SM00147E>.
- (11) Hartgerink, J. D.; Beniash, E.; Stupp, S. I. Peptide-Amphiphile Nanofibers: A Versatile Scaffold for the Preparation of Self-Assembling Materials. *PNAS* **2002**, *99* (8), 5133–5138. <https://doi.org/10.1073/pnas.0726999999>.
- (12) Behanna, H. A.; Donners, J. J. J. M.; Gordon, A. C.; Stupp, S. I. Coassembly of Amphiphiles with Opposite Peptide Polarities into Nanofibers. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (4), 1193–1200. <https://doi.org/10.1021/ja044863u>.
- (13) Matson, J. B.; Newcomb, C. J.; Bitton, R.; Stupp, S. I. Nanostructure-Templated Control of Drug Release from Peptide Amphiphile Nanofiber Gels. *Soft Matter* **2012**, *8* (13), 3586–3595. <https://doi.org/10.1039/C2SM07420F>.
- (14) Biesalski, M. A.; Knaebel, A.; Tu, R.; Tirrell, M. Cell Adhesion on a Polymerized Peptide-Amphiphile Monolayer. *Biomaterials* **2006**, *27* (8), 1259–1269. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.08.002>.
- (15) Hsu, L.; Cvetanovich, G. L.; Stupp, S. I. Peptide Amphiphile Nanofibers with Conjugated Polydiacetylene Backbones in Their Core. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (12), 3892–3899. <https://doi.org/10.1021/ja076553s>.

- (16) Korevaar, P. A.; Newcomb, C. J.; Meijer, E. W.; Stupp, S. I. Pathway Selection in Peptide Amphiphile Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (24), 8540–8543. <https://doi.org/10.1021/ja503882s>.
- (17) Chen, Y.; Gan, H. X.; Tong, Y. W. PH-Controlled Hierarchical Self-Assembly of Peptide Amphiphile. *Macromolecules* **2015**, *48* (8), 2647–2653. <https://doi.org/10.1021/ma502572w>.
- (18) Ahmed, S.; Mondal, J. H.; Behera, N.; Das, D. Self-Assembly of Peptide-Amphiphile Forming Helical Nanofibers and in Situ Template Synthesis of Uniform Mesoporous Single Wall Silica Nanotubes. *Langmuir* **2013**, *29* (46), 14274–14283. <https://doi.org/10.1021/la4024986>.
- (19) Sargeant, T. D.; Aparicio, C.; Goldberger, J. E.; Cui, H.; Stupp, S. I. Mineralization of Peptide Amphiphile Nanofibers and Its Effect on the Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Acta Biomaterialia* **2012**, *8* (7), 2456–2465. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.03.026>.
- (20) Greenfield, M. A.; Hoffman, J. R.; Olvera de la Cruz, M.; Stupp, S. I. Tunable Mechanics of Peptide Nanofiber Gels. *Langmuir* **2010**, *26* (5), 3641–3647. <https://doi.org/10.1021/la9030969>.
- (21) Cao, M.; Wang, Y.; Ge, X.; Cao, C.; Wang, J.; Xu, H.; Xia, D.; Zhao, X.; Lu, J. R. Effects of Anions on Nanostructuring of Cationic Amphiphilic Peptides. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (41), 11862–11871. <https://doi.org/10.1021/jp205987w>.
- (22) Hartgerink, J. D.; Beniash, E.; Stupp, S. I. Self-Assembly and Mineralization of Peptide-Amphiphile Nanofibers. *Science* **2001**, *294* (5547), 1684–1688. <https://doi.org/10.1126/science.1063187>.
- (23) Loh, X. J.; Barrio, J. del; Lee, T.-C.; Scherman, O. A. Supramolecular Polymeric Peptide Amphiphile Vesicles for the Encapsulation of Basic Fibroblast Growth Factor. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (23), 3033–3035. <https://doi.org/10.1039/C3CC49074B>.
- (24) Elder, A. N.; Dangelo, N. M.; Kim, S. C.; Washburn, N. R. Conjugation of  $\beta$ -Sheet Peptides to Modify the Rheological Properties of Hyaluronic Acid. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (7), 2610–2616. <https://doi.org/10.1021/bm200393k>.
- (25) Bulut, S.; Erkal, T. S.; Toksoz, S.; Tekinay, A. B.; Tekinay, T.; Guler, M. O. Slow Release and Delivery of Antisense Oligonucleotide Drug by Self-Assembled Peptide Amphiphile Nanofibers. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (8), 3007–3014. <https://doi.org/10.1021/bm200641e>.
- (26) Rajangam, K.; Behanna, H. A.; Hui, M. J.; Han, X.; Hulvat, J. F.; Lomasney, J. W.; Stupp, S. I. Heparin Binding Nanostructures to Promote Growth of Blood Vessels. *Nano Lett.* **2006**, *6* (9), 2086–2090. <https://doi.org/10.1021/nl0613555>.
- (27) Goktas, M.; Cinar, G.; Orujalipoor, I.; Ide, S.; Tekinay, A. B.; Guler, M. O. Self-Assembled Peptide Amphiphile Nanofibers and PEG Composite Hydrogels as Tunable ECM Mimetic Microenvironment. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (4), 1247–1258. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00041>.
- (28) Capito, R. M.; Azevedo, H. S.; Velichko, Y. S.; Mata, A.; Stupp, S. I. Self-Assembly of Large and Small Molecules into Hierarchically Ordered Sacs and Membranes. *Science* **2008**, *319* (5871), 1812–1816. <https://doi.org/10.1126/science.1154586>.
- (29) Zha, R. H.; Velichko, Y. S.; Bitton, R.; Stupp, S. I. Molecular Design for Growth of Supramolecular Membranes with Hierarchical Structure. *Soft Matter* **2016**, *12* (5), 1401–1410. <https://doi.org/10.1039/C5SM02381E>.
- (30) Berndt, P.; Fields, G. B.; Tirrell, M. Synthetic Lipidation of Peptides and Amino Acids: Monolayer Structure and Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (37), 9515–9522. <https://doi.org/10.1021/ja00142a019>.

- (31) El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (11), 6557–6602. <https://doi.org/10.1021/cr100048w>.
- (32) Rouse, C. K.; Martin, A. D.; Easton, C. J.; Thordarson, P. A Peptide Amphiphile Organogelator of Polar Organic Solvents. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1). <https://doi.org/10.1038/srep43668>.





Synthèse et autoassemblages  
de peptides amphiphiles

I-Synthèse et caractérisations chimiques.....	59
I-1 Choix de la séquence peptidique .....	59
I-2 Choix de la voie de synthèse .....	60
II-Caractérisations de l'autoassemblage .....	68
II-1 Modification post-synthèse.....	68
II-2 Etude en solution .....	69
II-3 Etude à l'état solide.....	75
II-3.a Méthode de dépôt .....	75
II-3.b Effet de la concentration .....	79
II-3.c Changement de contre-ion .....	81
Conclusion .....	83
Association Peptides Polymères.....	85

## I-Synthèse et caractérisations chimiques

### I-1 Choix de la séquence peptidique

Le choix de la séquence peptidique a tout d'abord été réalisé afin d'obtenir une micelle cylindrique, brique élémentaire de la membrane créé en fin de projet. Pour que cette molécule s'organise en micelle cylindrique comme cela a été présenté dans la partie bibliographique, il est nécessaire pour le peptide de présenter les trois parties constitutives des peptides amphiphiles à savoir la partie structurante, et autour la partie hydrophobe et la partie hydrophile. La partie hydrophobe du peptide est constituée d'une chaîne de 16 carbones. La partie hydrophile est constituée de trois lysines. Cet acide aminé a été préféré à l'acide aspartique tout d'abord afin d'obtenir une micelle globalement chargée positivement. De plus les peptides amphiphiles possédant des acides aspartiques gélifient spontanément en milieu aqueux. Cette gélification est un problème pour la mise en forme du futur matériau. Si le peptide amphiphile gélifie seul, il est très compliqué de l'associer à des polyélectrolytes qui eux sont à l'état liquide en solution. Pour finir sur la séquence peptidique, la partie structurante est constituée de trois valines reliées à la partie hydrophobe et trois alanines liées à la partie hydrophile cf. Schéma 2. On retrouve dans ce peptide un gradient de polarité favorisé par la partie structurante constituée d'acides aminés plus ou moins hydrophobe selon la liaison qu'ils effectuent : valine liée à la partie hydrophobe et Alanine liée à la partie hydrophile.

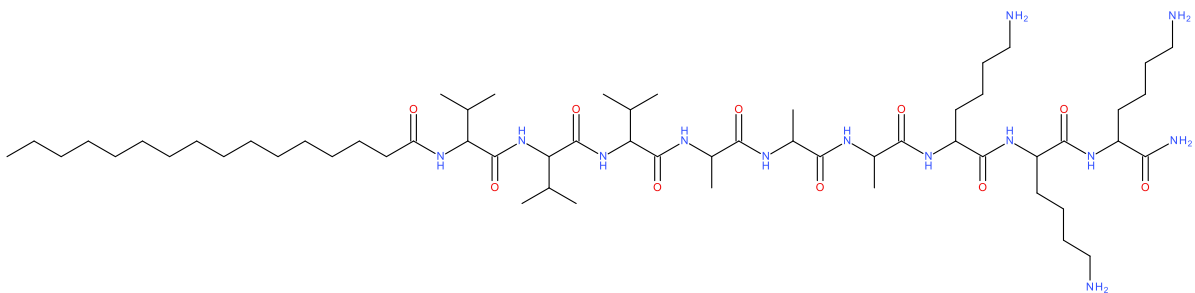
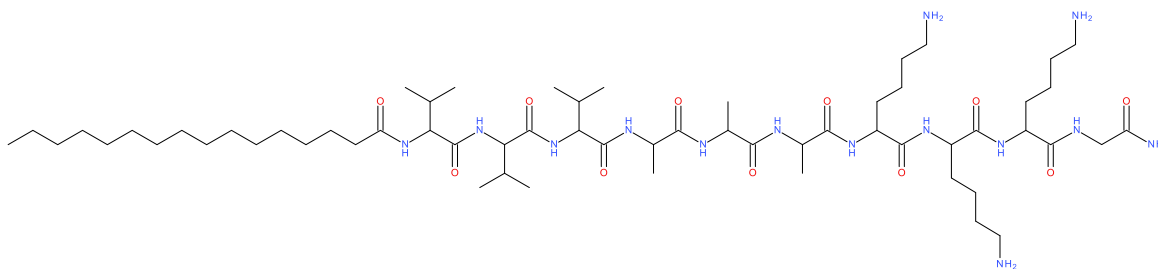


Schéma 2 : Structure du peptide  $C_{16}-V_3A_3K_3-NH_2$

Ce peptide a été étudié notamment par l'équipe de Samuel Stupp. Dans ces deux articles, il est choisi pour son association de type feuillet- $\beta$ , ses lysines permettant soit des sites de liaisons (exemple de la liaison avec un folate dans les travaux de Matson<sup>13</sup>) soit des

sites ioniques. En solution aqueuse, ce peptide se présente sous la forme de micelles cylindriques du fait de la répartition de ses acides aminés.



*Schéma 3 : Autre exemple de peptide amphiphile utilisé C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub>*

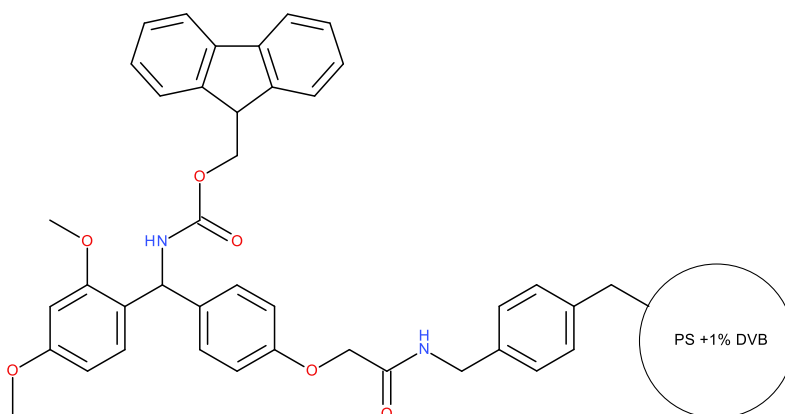
Afin de remédier à un problème de réactivité lors du premier couplage (voir partie I-2), un acide aminé plus petit, la glycine, a été introduit comme espaceur (Schéma 3). Etant le plus petit des acides aminés, il est aisément insérable sur la résine. Par ailleurs, on peut noter une seconde variation dans les travaux de Matson avec une lysine porteuse d'un groupement folate, ajoutée en tout début de synthèse du peptide C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub>. Lorsque les deux peptides sont comparés, les spectres de dichroïsme circulaire sont identiques, confirmant la possibilité d'ajout d'acides aminés fonctionnels sans aucune perturbation des propriétés d'autoassemblage.

## I-2 Choix de la voie de synthèse

La synthèse de molécules amphiphiles se fait plus aisément en phase solide. La synthèse en phase solide est un procédé qui permet de garder le composé sous forme solide quel que soit le solvant comme précisé dans les travaux de Berndt et al.<sup>30</sup> En effet le problème de la synthèse en solution est l'autoassemblage du produit. Si celui-ci reste sur le support voir, il ne risque pas de s'autoassembler en micelles et donc de bloquer l'ajout d'acides aminés supplémentaires. De plus cette synthèse permet des rendements élevés de par son fonctionnement. La synthèse en phase solide permet le contrôle de chaque étape de synthèse. Si celle-ci n'est pas complète, le couplage d'acides aminés peut être répété.

Le support solide est une résine en polystyrène réticulée avec du divinylbenzène. Cette résine est fonctionnalisée avec afin de présenter une fonction amine primaire sur laquelle le

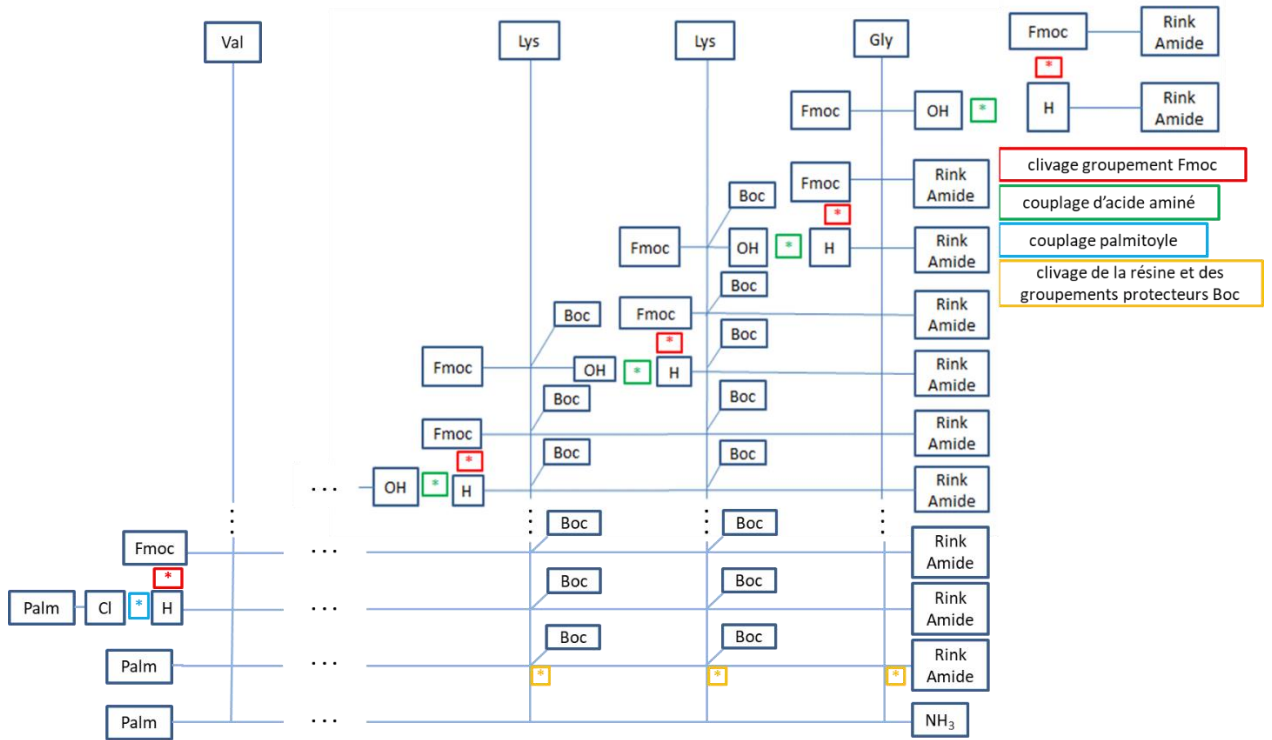
premier acide aminé peut être accroché après clivage du groupement protecteur Fmoc (Schéma 3).



*Schéma 4 : résine Aminométhyl AM, support de la synthèse peptidique*

Une fois le premier acide aminé fixé, la synthèse consiste en un enchaînement de clivages et de couplages de chaque acide aminé souhaité.

Le suivi de cette synthèse est réalisé grâce au test de Kaiser<sup>31</sup>. Il est constitué de trois solutions, une solution de phénol à 80% dans l'éthanol, une solution de cyanure de potassium dans l'eau et enfin une solution de pyridine et ninhydrine dans l'éthanol à 3%. Ce test consiste en un prélèvement d'une infime partie de la résine afin de vérifier s'il reste ou non des fonctions amines primaires présentes dans le milieu. Les amines primaires vont réagir avec la ninhydrine présente dans le kit du test afin de former un composé bleu. Le test est négatif si le mélange reste à sa couleur d'origine, le jaune. Le couplage peut être réalisé de nouveau jusqu'à ce que le test soit négatif et que tout l'acide aminé ait réagi avec la résine ou l'acide aminé précédent. Dans le cas où un couplage complet ne peut être réalisé, les amines primaires restantes sont couplées avec un groupe acétyle. Les peptides acétylés seront ensuite éliminés lors de l'étape finale. Chaque couplage s'effectue donc sur le dernier acide aminé couplé qui a au préalable été clivé des groupements protecteurs Fmoc. L'étape de clivage des groupements Fmoc se fait avec une solution de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène (DBU) et pipéridine dans le diméthylformamide (DMF) dans les proportions molaires suivantes : 2/2/96.

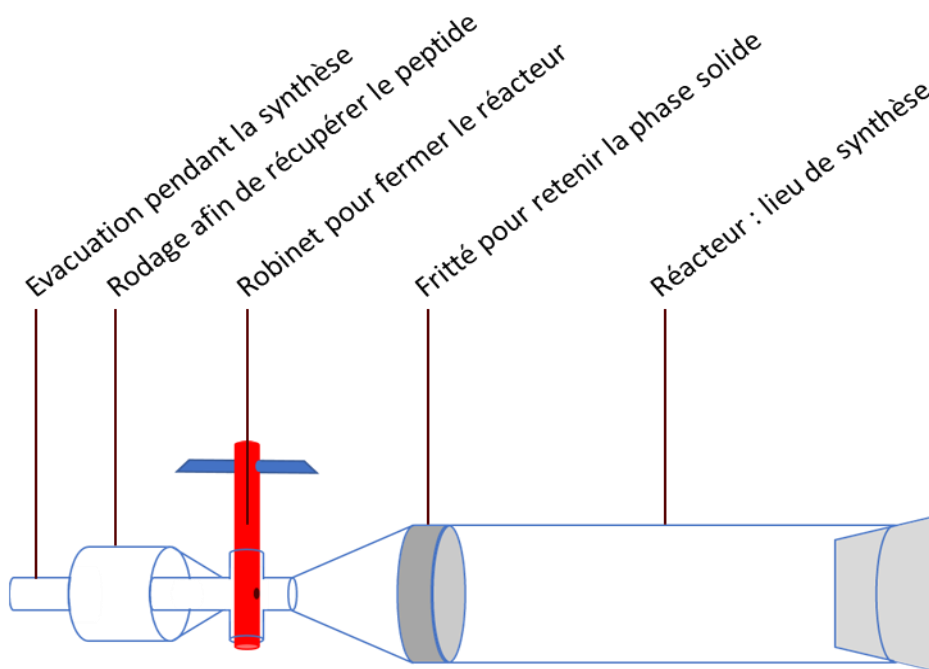


*Schéma 5 Résumé de la synthèse peptidique en phase solide*

La séquence est ainsi réalisée avec pour chaque étape de couplage un rendement élevé voir schéma de synthèse suivant Schéma 5. Le couplage d'un acide aminé se fait dans le DMF avec comme agent de couplage le benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP). Cet agent de couplage est utilisé pour la synthèse peptidique mais a entraîné une répétition trop importante de chaque couplage entraînant une diminution du rendement et de la pureté du produit final. Il a été remplacé par des carbodiimides. Cette famille d'agents de couplage entraîne la formation d'un produit secondaire de la famille des urées. Le premier agent de couplage utilisé est la dicyclohexylcarbodiimide. Toutefois le produit secondaire créé est la dicyclohexylurée es test très difficile à éliminer car elle est insoluble dans beaucoup de solvants. Elle a donc été remplacée par la diisopropylcarbodiimide qui entraîne cette fois la formation de diisopropylurée qui est soluble dans le dichlorométhane. C'est l'agent de couplage choisi pour le reste de la synthèse. A cet agent de couplage est ajouté un additif. L'additif entraîne une étape supplémentaire dans l'activation des acides carboxyliques et permet une synthèse plus aisée. L'effet des additifs diffèrent selon l'acide aminé couplé. Deux additifs ont été choisis. L'Hydroxybenzotriazole (HOBt) favorise le

couplage des alanines mais présente des difficultés lors du couplage des lysines. A l'inverse le K-Oxyma favorise le couplage des lysines.

Le dernier couplage s'effectue avec le chlorure de palmitoyle dans un mélange de dichlorométhane et de DMF afin de connecter au peptide une partie hydrophobe. Cette étape se déroule dans un milieu basique organique à l'aide de la N-méthylmorpholine (NMM). Une fois cette étape réalisée, le peptide est décroché de la résine et les amines primaires des chaînes secondaires des lysines sont clivées de façon concomitante. Cette étape de clivage se déroule dans un milieu acide : Acide trifluoroacétique (TFA), eau et triisopropylsilane (TIPS) dans les proportions 90/5/5% volumiques. Le peptide est alors précipité dans l'éther diéthylique, filtré pour ensuite être lyophilisé. Toute la réaction se produit dans un réacteur créé pour la synthèse en phase solide. :

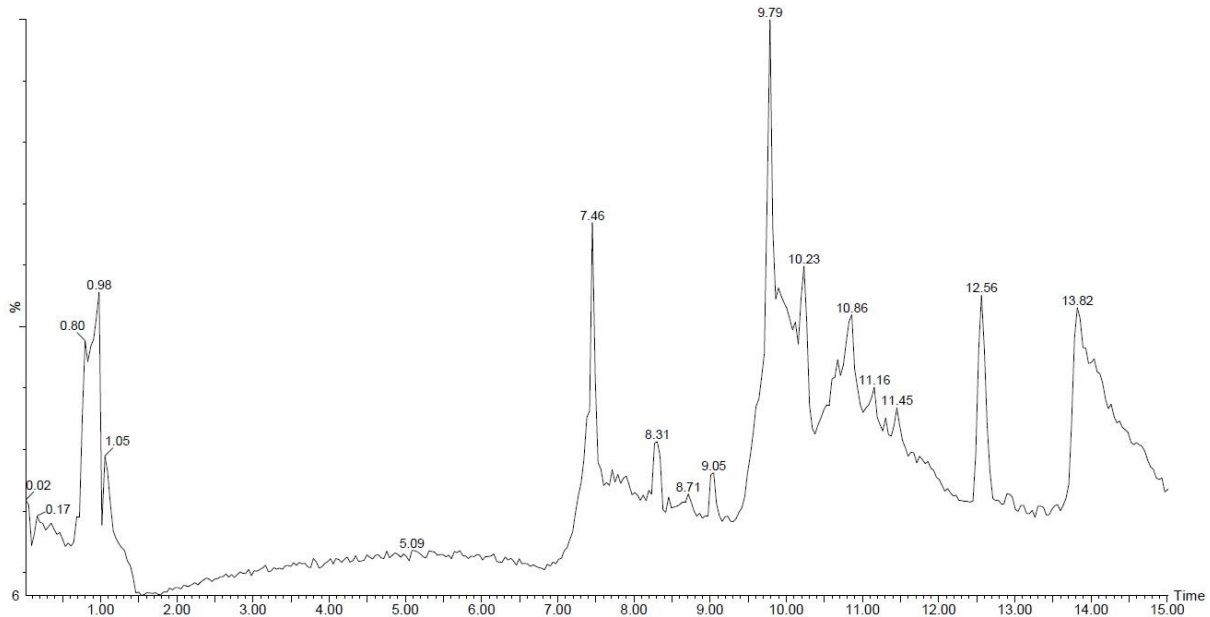


*Figure 37 : Réacteur de synthèse*

Une première synthèse a été réalisée avec les conditions suivantes : Séquence peptidique :  $C_{16}-V_3A_3K_3-NH_2$ , agent de couplage BOP et conditions de clivage TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS. Ce premier essai a mené à la formation d'un produit très difficile à purifier et analyser. Le produit obtenu était insoluble après synthèse et l'analyse choisie pour le contrôle en fin de



réaction (LC-MS) a montré un produit impur dont les différents fragments ne correspondent pas à un peptide complètement synthétisé cf. Figure 38.

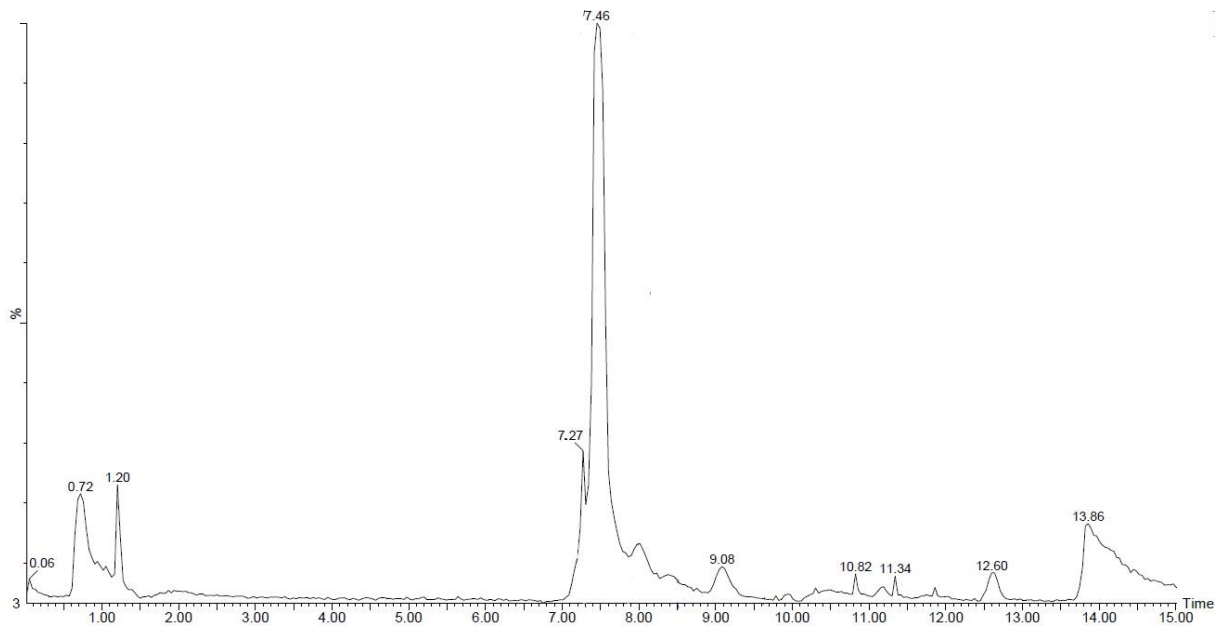


*Figure 38 : Chromatogramme des différents fragments de peptides dans le surnageant centrifugé démontrant que la pureté du peptide est très basse*

Le problème a pu venir de différents facteurs : l'agent de couplage qui a entraîné la multiplication des étapes de synthèse et de ce fait le rendement et la pureté du produit final. Il est également possible que le TIPS ne convienne pas dans l'étape de clivage et entraîne la formation d'un produit insoluble. Enfin la dernière hypothèse proposée est que l'acide aminé couplé en premier, la lysine, est trop volumineux pour être directement couplé à la résine. Il est donc nécessaire d'ajouter un espaceur, un acide aminé plus petit en début de synthèse. Cet acide aminé doit toutefois être globalement hydrophile pour ne pas altérer le caractère amphiphile de notre molécule et son orientation dans la micelle cylindrique. Différents fragments peuvent toutefois être observés sur ce chromatogramme. Ces fragments sont des peptides plus courts qui ont été acétylés lors d'étapes répétées qui n'ont pas abouti.

La synthèse a donc été modifiée pour les conditions suivantes : séquence peptidique C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub>, agent de couplage DCC, additif HOBT, conditions de clivage TFA/H<sub>2</sub>O (90/10). Dans ces conditions, la glycine fait office d'espaceur. Il s'agit de l'acide aminé le plus simple et donc le plus petit. Il peut être inséré aisément à la résine lors d'un premier couplage. Le

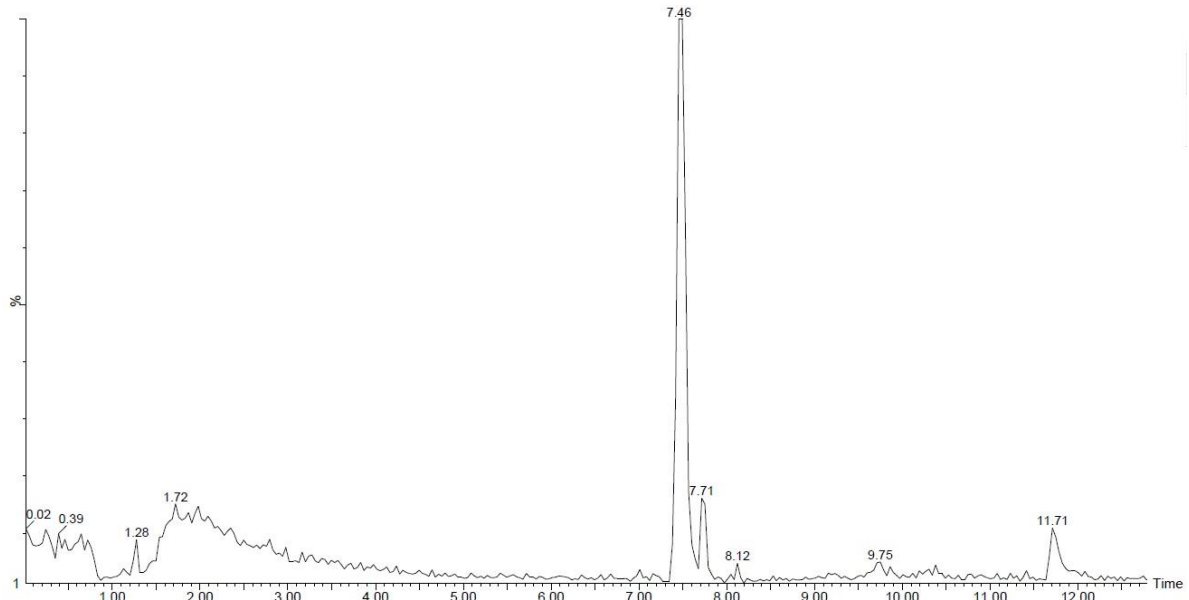
système de couplage est complètement revu et ces conditions permettent lors de la synthèse des étapes moins répétées et donc un rendement plus élevé ainsi qu'une pureté accrue. L'analyse de fin de synthèse en LC-MS cf. Figure 39 ci-dessous permet de calculer une pureté de 80% en surface d'aire. La difficulté de coupler les trois lysines est toutefois notée avec l'additif HOBt. La présence d'une poudre blanche identifier comme la dicyclohexylurée a engendré pendant la synthèse d'un changement d'agent de couplage. La DIC est donc préféré à la DCC pour le reste de la synthèse.



*Figure 39 : Chromatogramme du peptide C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> synthétisé avec le système HOBt/DCC*

Le peptide synthétisé possède une masse de 1207 g/mol (partie expérimentale synthèse C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub>). Le pic majoritaire correspond à cette masse. Le pic à 9.08 minutes est analysé en spectrométrie de masse et correspond à un composé de masse m/z : 723 g/mol. Cette masse correspond à un peptide recombiné également avec les acides aminés présents dans le milieu. Cette voie de synthèse permet donc la synthèse complète du peptide. Afin de supprimer les problèmes de synthèse dues aux couplages des lysine avec l'additif HOBt. Outre l'expérience, la preuve de ces difficultés de couplages est observée grâce aux différents fragments retrouvés sur le chromatogramme présenté Figure 39.: Chromatogramme du peptide C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> synthétisé avec le système HOBt/DCC Ces problèmes ont orienté l'utilisation d'un autre additif. Les conditions de synthèse sont donc les suivantes : Séquence

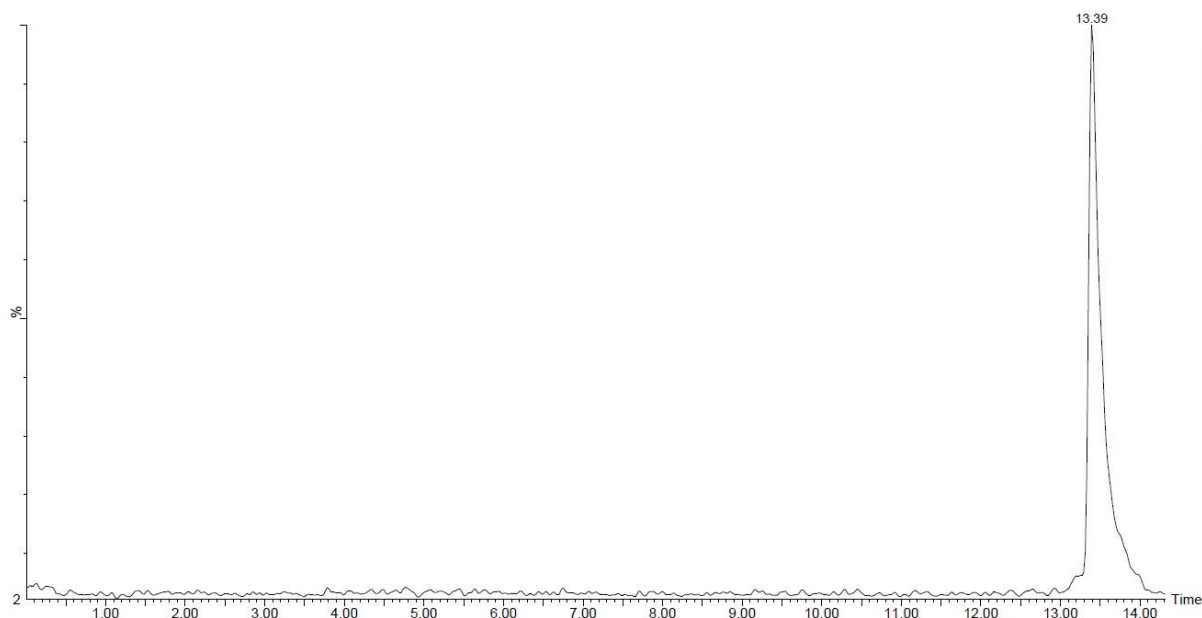
peptidique : C<sub>2</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub>, agent de couplage DIC, additif K-Oxyma, conditions de clivage TFA/H<sub>2</sub>O (90/10). Ce changement a permis d'améliorer le couplage de la lysine cf. Figure 40 ci-après.



*Figure 40 : Chromatogramme du peptide C<sub>2</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> synthétisé avec le système K-Oxyma/DIC*

Ce peptide plus court qui ne présente pas de chaîne hydrophobe a été synthétisé dans deux optiques : analyser les modifications apportées aux propriétés d'autoassemblage en supprimant une partie du peptide amphiphile et tester de nouvelles conditions de synthèse. Le peptide synthétisé ( $m/z = 1011$  g/mol) a le même temps de rétention : 7,46 minutes. Deux composés dont les masses correspondent à des peptides plus courts sont observés. Deux peptides de masses différentes sont observés sur ce chromatogramme : un peptide de masse 1104 g/mol et un de masse 790 g/mol. Ce système d'agents de couplage permet également la synthèse complète du peptide, le couplage de la lysine (voir partie expérimentale synthèse C<sub>2</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub>) est plus aisé mais les couplages des autres acides aminés peuvent présenter des difficultés de synthèse. Au même titre que la lysine avec le système DIC, HOBT, le couplage de la valine et de l'alanine avec le système DIC, K-Oxyma doit être réalisé à plusieurs reprises. La pureté du peptide est cependant améliorée : 88% contre 80% dans la première synthèse réussie.

Un dernier peptide a été synthétisé afin d'optimiser les conditions de couplage pour chaque étape de synthèse. La séquence peptidique est la suivante C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>4</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub>. L'agent de couplage choisi pour toute cette synthèse est la DIC. Pour le couplage de la glycine, des valines et des alanines, l'additif utilisé est le HOBt. Pour le couplage des lysines, l'additif utilisé est le K-Oxyma.



*Figure 41 : Chromatogramme du peptide C16-V3A4K3G-NH2 avec optimisation de chaque étape de couplage*

Ce peptide plus long cette fois a été synthétisé dans le but d'optimiser la synthèse et tester les propriétés d'autoassemblage lorsque la partie structurante du peptide amphiphile est plus longue. La masse molaire du peptide synthétisé est de 1278 g/mol. Lorsque ce peptide a été analysé par LC-MS, le chromatogramme a montré un produit très pur avec l'absence de fragments plus courts cf. Figure 41 ci-dessus. La méthode de synthèse permet l'obtention du peptide sans difficulté quel que soit l'acide aminé choisi. La pureté obtenue pour cette méthode de synthèse est la plus élevée enregistrée (98%) (voir partie expérimentale synthèse C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>4</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub>).

Un tableau (Tableau 2) permet de résumer les résultats de synthèse. On observe une augmentation significative du rendement et surtout de la pureté du peptide en sortie de synthèse.

*Tableau 2 Résumé des conditions de synthèse des peptides amphiphiles étudiés*

Peptide	Agent de couplage	Additif	Conditions de clivage	Pureté (%aire)	Rendement (%)
C <sub>16</sub> -V <sub>3</sub> A <sub>3</sub> K <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>	BOP	/	TFA/H <sub>2</sub> O/TIPS	< 5	19
C <sub>16</sub> -V <sub>3</sub> A <sub>3</sub> K <sub>3</sub> G-NH <sub>2</sub>	DIC	HOBt	TFA/H <sub>2</sub> O	80	83
C <sub>2</sub> -V <sub>3</sub> A <sub>3</sub> K <sub>3</sub> G-NH <sub>2</sub>	DIC	K-Oxyma	TFA/H <sub>2</sub> O	88	93
C <sub>16</sub> -V <sub>3</sub> A <sub>4</sub> K <sub>3</sub> G-NH <sub>2</sub>	DIC	HOBt/K-Oxyma	TFA/H <sub>2</sub> O	98	86

Le compromis choisi est l'association du HOBt et du K-Oxyma afin d'obtenir la pureté la plus élevée possible. Une fois cette synthèse mise en évidence elle a ensuite été utilisée pour la synthèse du peptide choisi pour l'étude à savoir : C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> afin d'augmenter la quantité du produit qui nous intéresse pour l'association. Le but final est d'utiliser le peptide en sortie de synthèse sans étape de purification nécessaire à l'utilisation pour l'association ou autre.

## II-Caractérisations de l'autoassemblage

### II-1 Modification post-synthèse

Lors de l'étude du peptide et particulièrement l'étude des propriétés d'autoassemblage, la dernière étape de clivage s'est révélée très importante. Lors de cette étape, le TFA est utilisé pour détacher le peptide de la résine. Ces conditions acides sont également idéales pour enlever les groupements protecteurs Boc des amines des chaînes secondaires des lysines. Une fois ces groupements enlevés, les amines sont protonées (pKa = 10,67). Ces sites protonés forment la partie hydrophile du peptide. Il est donc nécessaire de les conserver sous cet état. Le contre-ion de ces sites cationiques est le trifluoroacétate. Le trifluoroacétate peut interférer avec les propriétés d'assemblage du peptide amphiphile et il peut être nécessaire de l'enlever. Pour les analyses en dichroïsme circulaire, ce même contre-ion peut aussi modifier le signal dans le domaine spectral étudié. Les spectres infrarouges présentés sur la Figure 42 ci-après démontrent la présence du TFA dans le peptide juste après la synthèse.

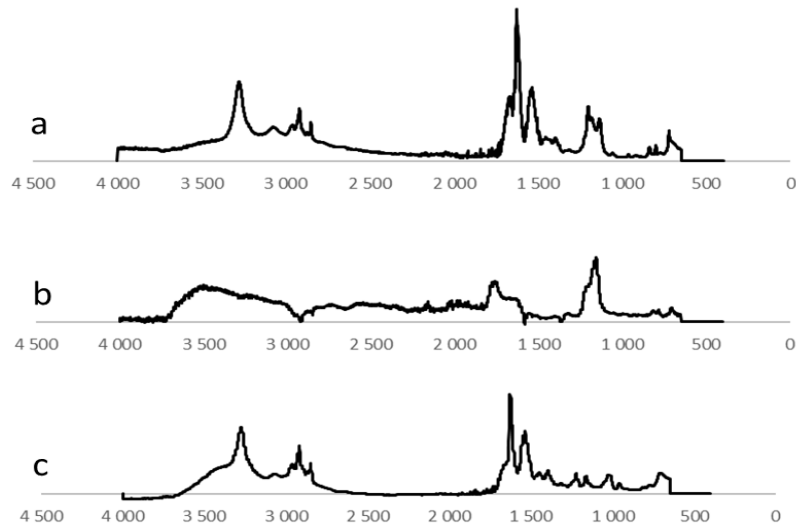


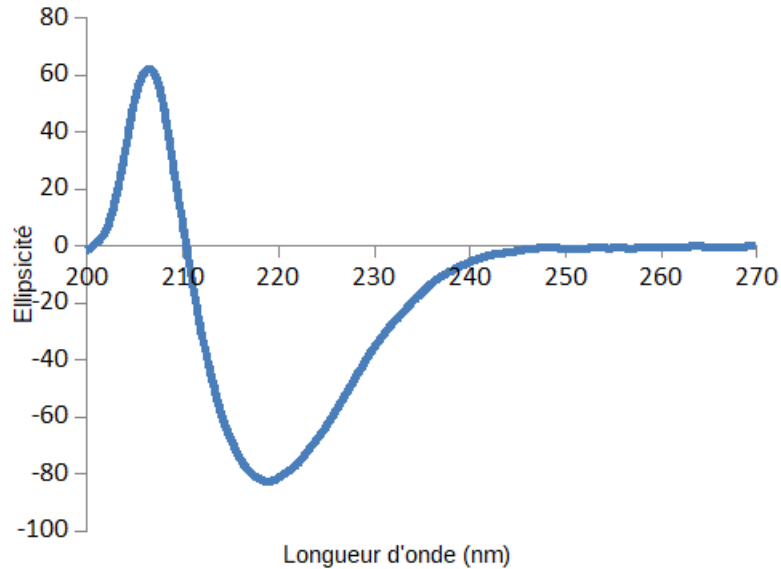
Figure 42 : Spectre IR du peptide  $C_{16}\text{-V}_3\text{A}_3\text{K}_3\text{G-NH}_2$  (a), du TFA (b) et du peptide après échange d'ions avec  $\text{Cl}^-$  (c)

Les bandes à  $1700$  et  $1200\text{ cm}^{-1}$  spécifiques de l'acide trifluoroacétique, à en voir sur le spectre du TFA pur, sont présentes uniquement sur le spectre réalisé après la synthèse. Le peptide est mis en présence de résine échangeuse d'ions Dowex® 1X8 qui présente des ions  $\text{Cl}^-$ . Cette résine peut être chargée avec un autre anion pour choisir le contre-ion du peptide. L'acétate est également un candidat pour l'échange d'ions. Le contre-ion TFAcétate de  $C_{16}\text{-V}_3\text{A}_3\text{K}_3\text{G-NH}_2$  a ainsi été échangé par un acétate ainsi qu'un chlorure de sorte à déterminer ultérieurement son impact sur la structuration des assemblages. Cet échange est confirmé par le spectre infrarouge, les bandes à  $1700$ ,  $1200$  et  $1150\text{ cm}^{-1}$  tendent à disparaître après l'échange d'ions. Ces bandes sont spécifiques aux liaisons :  $\text{C=O}$  ;  $\text{C-O}$  et  $\text{C-F}$  du TFA. Une étude sur l'effet du caractère en feuillet- $\beta$  a été réalisée par Rouse et al.<sup>32</sup> Cette étude démontre qu'un déplacement de la bande  $\text{C=O}$  vers des nombres d'ondes plus faible est un signe d'une augmentation du caractère en feuillet- $\beta$ .

## II-2 Etude en solution

La méthode la plus utilisée pour caractériser les peptides et les protéines en solution est le dichroïsme circulaire. Cette technique permet d'identifier la nature de leur structure secondaire adoptée selon qu'ils soient des arrangements aléatoires, des hélices- $\alpha$  ou des feuillets- $\beta$ . Ces trois structures ont un signal distinct et très spécifique en dichroïsme circulaire.

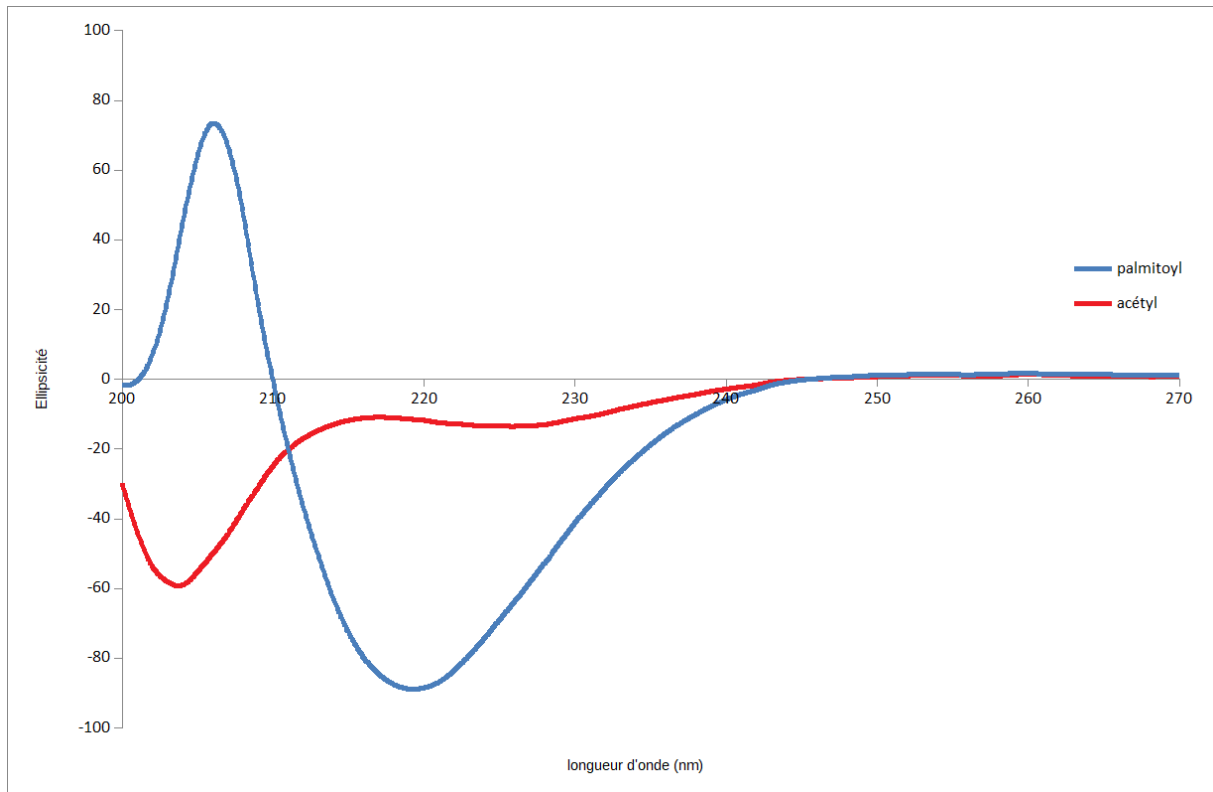
Cette méthode permet donc de déterminer la force motrice prédominante lors de la formation des assemblages. Dans les travaux de Levitt et al.<sup>1</sup>, les acides aminés sont classés grâce à des études de dichroïsme circulaire selon la propension à établir différentes structures secondaires au sein d'une protéine ou d'un polypeptide. Les acides aminés choisis pour C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> étant la glycine, la lysine, l'alanine et la valine, l'association de ces acides aminés conduirait globalement, selon Levitt et al., une structure en hélice- $\alpha$ .



*Figure 43 : spectre de dichroïsme circulaire du peptide C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> spécifique d'association en feuillet- $\beta$*

Toutefois cette étude ne prend pas en compte l'alignement imposé par la structure de la molécule. La présence de la chaîne alkyle hydrophobe et des trois lysines à l'opposé va en effet entraîner l'orientation des peptides dans une certaine direction. Il y a un alignement créé du fait de ces deux extrémités. C'est uniquement ensuite que la structure secondaire entre en jeu. Pour cette raison, la structure secondaire du peptide 2 est uniquement du feuillet- $\beta$  cf. Figure 43 ci-dessus.

Pour confirmer cette observation, un peptide dont la chaîne hydrophobe de 16 carbones a été remplacée par un groupement acétyle a été synthétisé. Ce dernier a été comparé au peptide C<sub>2</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> cf. Figure 44 ci-après.



*Figure 44 : spectre de dichroïsme circulaire du peptide  $C_{16}-V_3A_3K_3G-NH_2$  et du peptide  $C_2-V_3A_3K_3G-NH_2$  Mise en évidence de la perte d'alignement*

Dans ce cas il y a une perte complète de l'alignement en raison de l'absence de la partie hydrophobe. Le peptide n'étant plus forcé de s'aligner, les différentes contributions des acides aminés pour la structure secondaire entraîne un mélange de feuillet- $\beta$  et d'hélice- $\alpha$ . De ce mélange résulte un arrangement complètement aléatoire que le spectre sur la Figure 44 confirme. Les travaux de Moyer et al. ont montré que la structure des autoassemblages est directement liée à la structure secondaire d'un peptide amphiphile. Pour des structures présentant un caractère en feuillet- $\beta$  fort, il est usuel d'observer des structures cylindriques. L'apparition d'arrangements aléatoires va donc tendre à faire disparaître cette structure cylindrique, soulignant ainsi l'importance de la présence de la chaîne aliphatique dans ce travail.

Le peptide ( $C_{16}-V_3A_4K_3G-NH_2$ ) présentant une partie structurante plus longue a été comparé au peptide 2 ( $C_{16}-V_3A_3K_3G-NH_2$ ). Malgré la propension de l'alanine à induire une structure en hélice- $\alpha$ , l'alignement de la chaîne carbonée dans le cas présent va à nouveau orienter les interactions intermoléculaires et favoriser les feuillets- $\beta$  cf. Figure 45 ci-dessous.



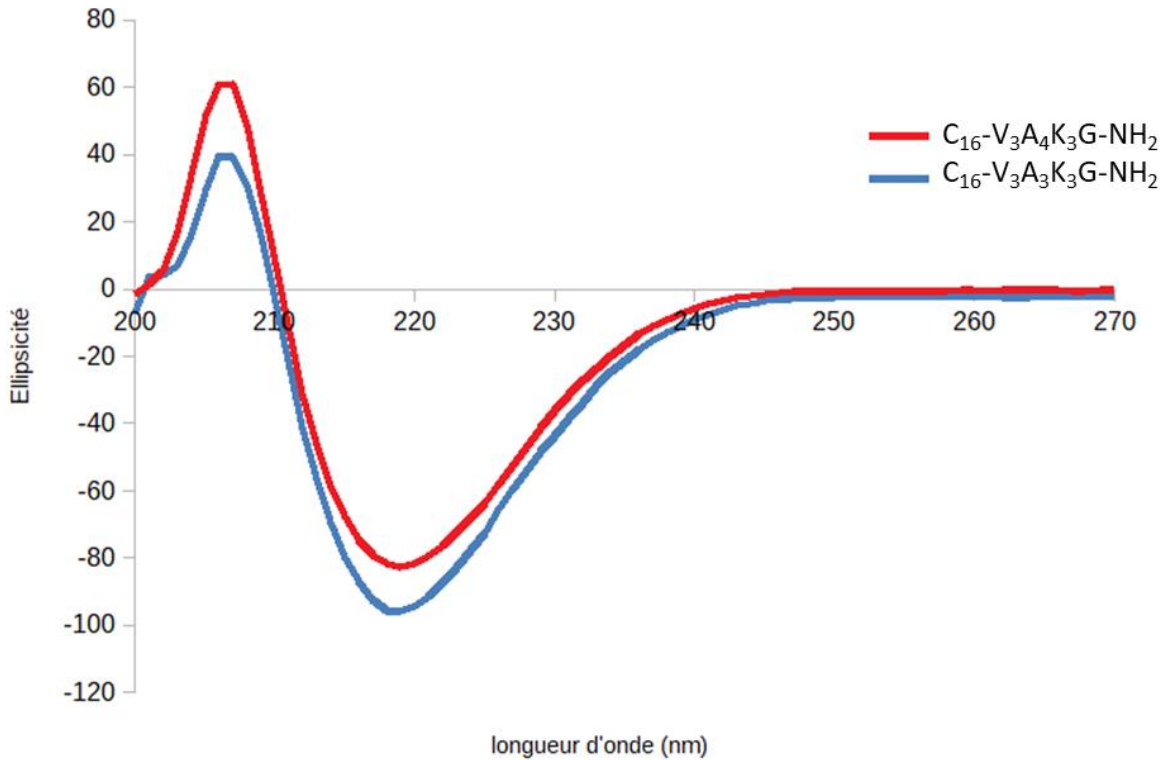
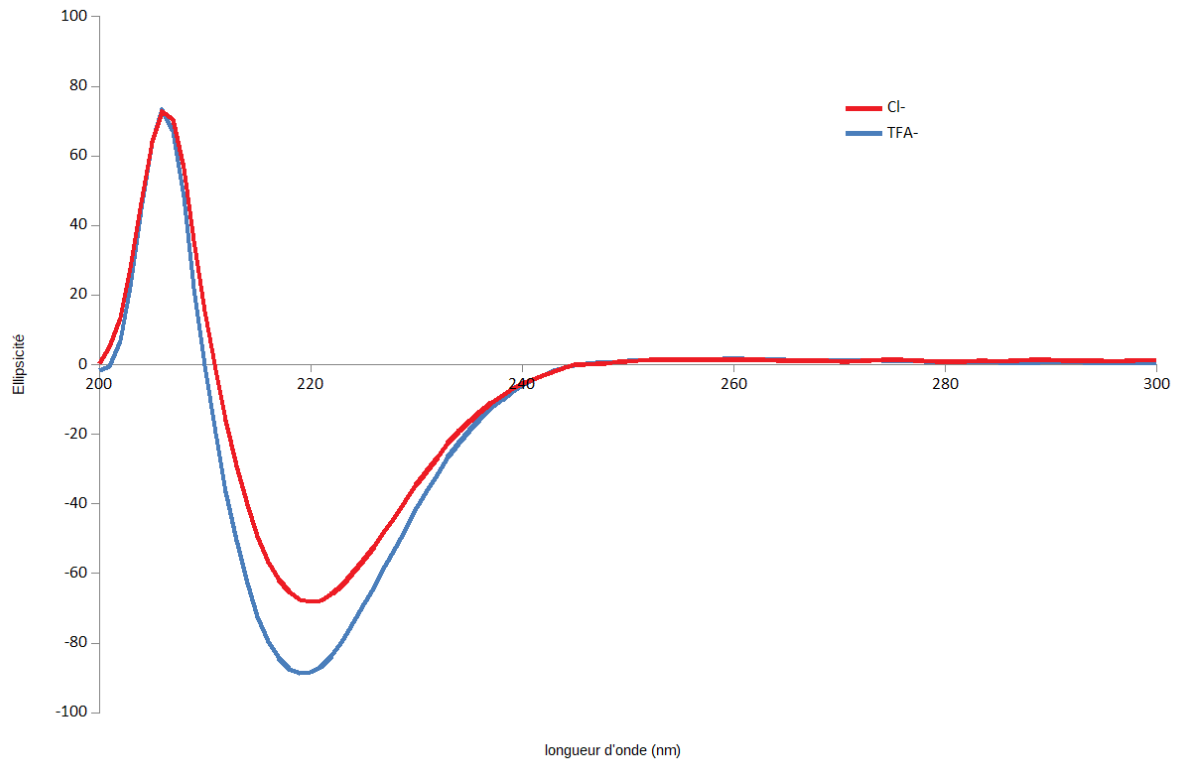


Figure 45 : spectre de dichroïsme circulaire des peptide  $C_{16}$ -V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> et  $C_{16}$ -V<sub>3</sub>A<sub>4</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> afin d'étudier l'effet de la partie structurante sur le caractère feuillet- $\beta$

L'ajout d'un acide aminé à la partie structurante du peptide, s'il n'est pas substitué d'un groupement trop volumineux, va donc entraîner uniquement l'élongation du peptide. Comme observé sur le spectre ci-dessus le caractère feuillet- $\beta$  est inchangé. Pour déterminer la proportion en feuillet- $\beta$ , il est nécessaire d'observer à quelle longueur d'onde le signal croise la ligne de base aux alentours des 210 nm. Moins la longueur d'onde à laquelle le signal croise la ligne de base est élevée, plus la proportion en feuillet- $\beta$  est faible. Cette observation a été mise en évidence par Korevaar et al.<sup>16</sup>. Ces travaux ont montré qu'en ajoutant un solvant déstructurant comme l'hexafluoroisopropan-2-ol (HFIP), la structure secondaire transite d'un système en feuillet- $\beta$  vers un système aléatoire. Dans le cas présent, l'ajout d'un acide aminé au niveau de la partie structurante ne modifie en rien cette longueur d'onde donc le caractère feuillet- $\beta$  reste inchangé.

Les effets de l'échange d'ions ont pu être observés dans un premier temps grâce au dichroïsme circulaire cf. Figure 46 ci-dessous.



*Figure 46 : Spectre de dichroïsme circulaire du peptide après échange d'ion avec Cl<sup>-</sup>*

Selon la même règle qu'énoncée précédemment, l'intersection entre le signal et l'ordonnée à l'origine démontrent qu'un caractère feuillet- $\beta$  est très légèrement plus marqué pour le peptide ayant pour contre-ion Cl<sup>-</sup>. Ce caractère très faiblement supérieur peut être expliqué par l'encombrement du groupement trifluoroacétate. Dans le cas de l'ion chlorure l'espace entre chaque peptide est plus restreint. Le rapprochement des peptides favorise les liaisons hydrogène à l'origine des interactions en feuillet- $\beta$ . Toutefois cette amélioration est très faible.

L'effet inverse peut également être observé. La diminution du caractère feuillet- $\beta$  induite par l'éloignement des peptides est observable lorsqu'un tensioactif est ajouté dans le milieu. Deux tensioactifs ont été testés pour cette expérience. Le premier tensioactif utilisé est un tensioactif ionique, le dodécylsulfate de sodium (SDS) présenté sur la figure 14 ci-après. Ce tensioactif ionique opère une interaction électrostatique forte avec le peptide amphiphile et la compensation de charge entraîne une précipitation dans le milieu. Il est donc impossible

d'observer cette interaction en dichroïsme circulaire. Le second tensioactif expérimenté est le TritonX cf. Schéma 6 ci-après.

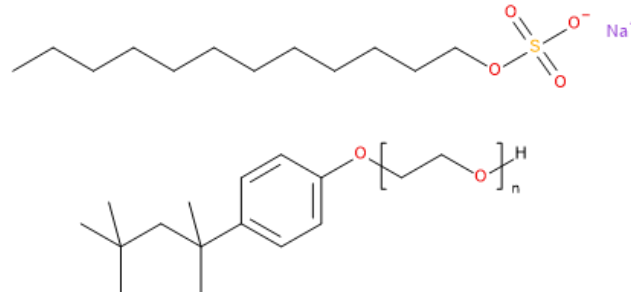


Schéma 6 : Schéma du SDS et du TritonX

Le triton X a été ajouté à hauteur de 5% volumique. Ce mélange a été observé en dichroïsme circulaire cf. Figure 47 ci-dessous. L'éloignement opéré par l'ajout de tensioactif induit une diminution significative du caractère feuillet- $\beta$ .

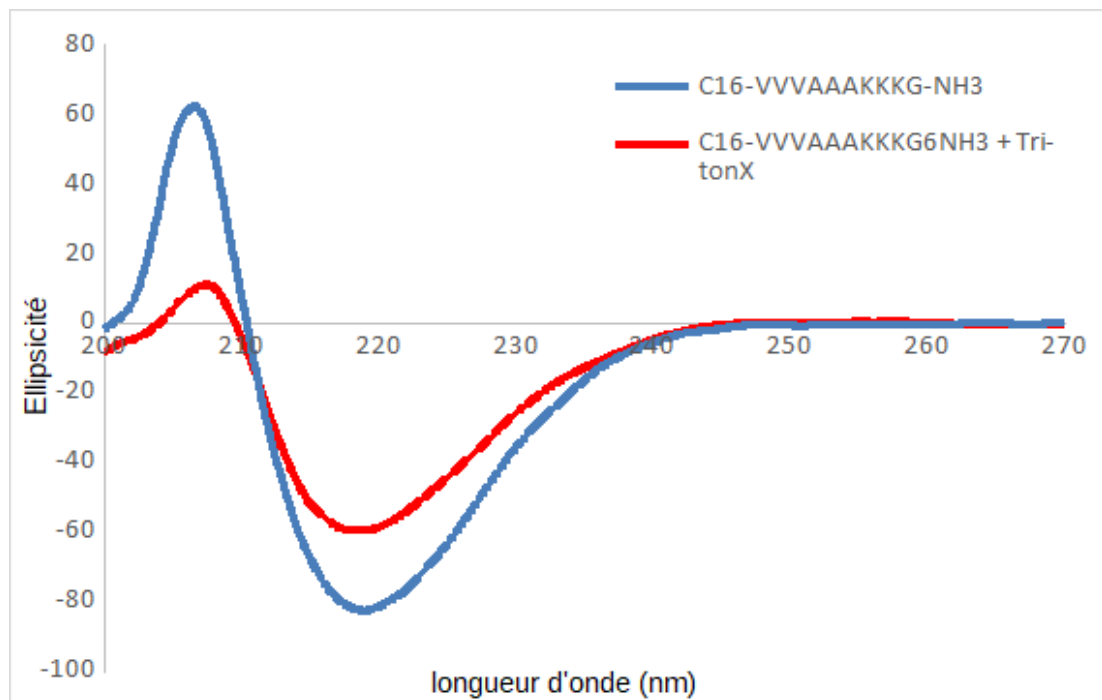


Figure 47 : spectre de dichroïsme circulaire avec ajout de tensioactif

En plus de pouvoir espacer les peptides, le triton X peut établir des liaisons hydrogènes. Au même titre que le HFIP dans les travaux de Korevaar et al.<sup>16</sup>, le triton X peut interagir via des liaisons hydrogène avec le peptide amphiphile, réduisant de fait encore plus le caractère feuillet- $\beta$  de l'assemblage. II-2 Etude à l'état solide

### II-3 Etude à l'état solide

La méthode utilisée pour observer à l'état solide l'autoassemblage réalisé par le peptide est la microscopie à force atomique (AFM). Cette méthode permet d'obtenir une image en relief du peptide et de déterminer la morphologie de surface. L'inconvénient de cette méthode est que le matériau doit être très plan, sec, propre et solide car cette méthode entraîne une interaction directe avec l'échantillon. Le diamètre des différents objets observés est mesuré grâce à l'outil de profil du logiciel de traitement d'image. La méthode d'AFM a surtout été choisie car elle convient à l'étude du peptide seul, du peptide lorsqu'il est associé à des polymères ou encore lorsque la membrane a été réalisée avant et après filtration. De plus, il n'est pas nécessaire pour observer ces phénomènes d'apporter une modification au système. Il est toutefois important pour de noter que pour que l'échantillon puisse être observé en AFM celui-ci doit être très plat, propre et sec. Comme notre échantillon risque de présenter une rugosité élevée, pour toutes les images AFM réalisées, le mode contact intermittent a été choisi et il s'est avéré que des pointes à constante de dureté élevée sont obligatoire pour l'obtention d'images du peptide  $C_{16}\text{-V}_3\text{A}_3\text{K}_3\text{G-NH}_2$ . Ces mesures ne sont toutefois pas aisées et l'humidité ambiante ou d'autres facteurs extérieurs peuvent interférer avec la mesure. L'objectif premier reste de pouvoir mesurer les diamètres des micelles cylindriques quel que soit l'état d'association.

#### *II-3.a Méthode de dépôt*

La première méthode de dépôt utilisée a été le drop-casting. Quelques gouttes d'une solution à 20g/L de  $C_{16}\text{-V}_3\text{A}_3\text{K}_3\text{G-NH}_2$  sont déposées sur un support. Les différents supports utilisés et suffisamment plans pour une utilisation en AFM sont les wafers de silicium, les lames ou lamelles de verre et enfin les feuillets de mica.

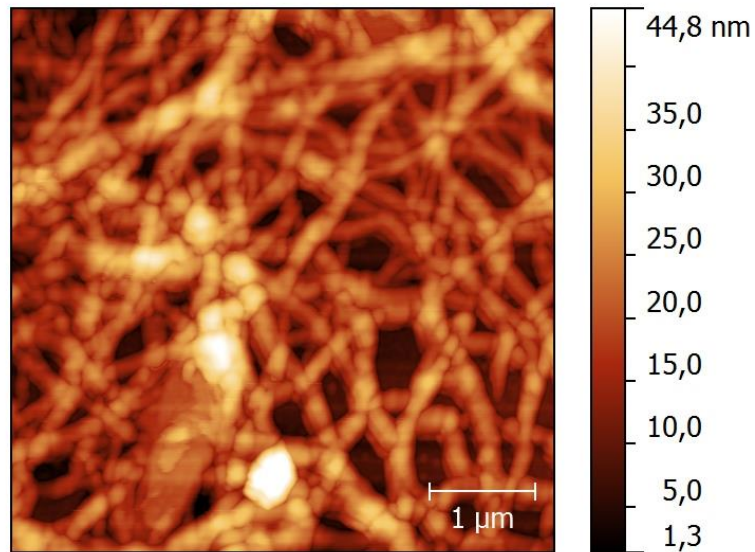


Figure 48 : Image AFM en topographie du peptide  $C_{16}\text{-V}_3\text{A}_3\text{K}_3\text{G-NH}_2$  déposé sur wafer de silicium par drop-casting obtenue en mode contact intermittent

Le premier dépôt a été réalisé sur un wafer de silicium cf. Figure 48 ci-dessus. Avec cette méthode de dépôt, des micelles cylindriques sont observées. L'échantillon semble avoir été détérioré par un élément extérieur. Les fibres observées ont un diamètre beaucoup plus gros qu'attendu (80 nm). Si cette même méthode de dépôt est utilisée sur une lamelle de verre la structure suivante a été observé cf. Figure 49 ci-dessous.

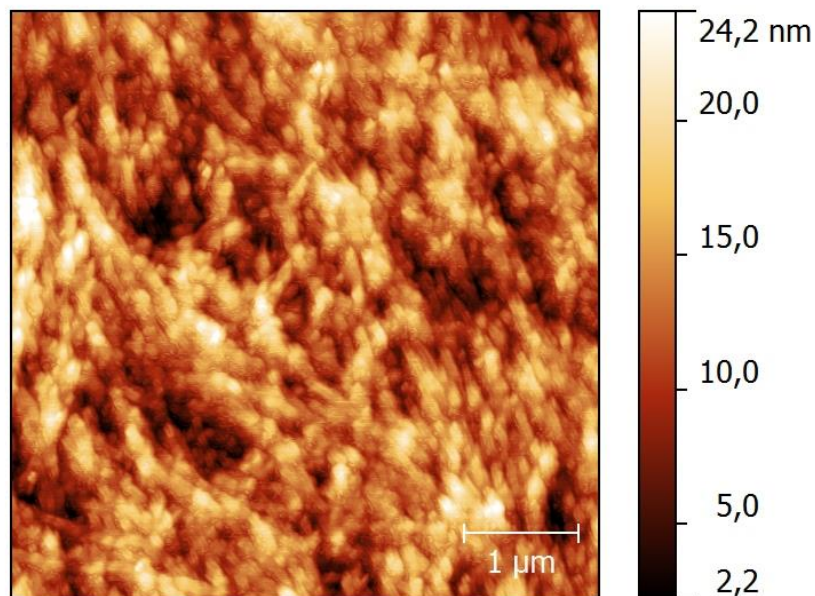
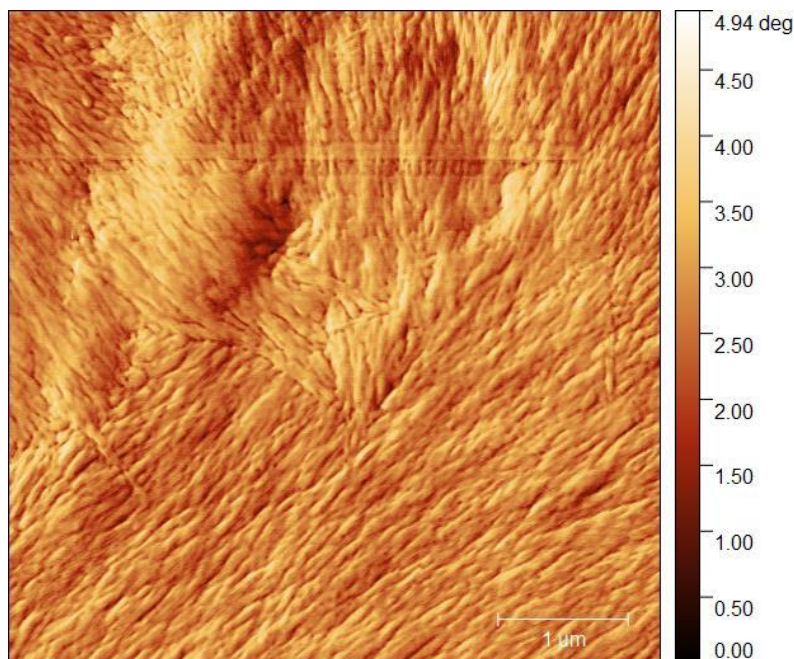


Figure 49 : image AFM en topographie du peptide  $C_{16}\text{-V}_3\text{A}_3\text{K}_3\text{G-NH}_2$  déposé sur une lamelle de verre par drop-casting obtenue en mode contact intermittent (tapping mode)

Cette structure dénaturée relate de la difficulté du dépôt par drop-casting. L'environnement de l'AFM est protégé mais le peptide étant très hygroscopique, la structure est modifiée par l'humidité de l'air. Le problème vient donc de la transition lors du séchage du matériau. Il est donc nécessaire de trouver une méthode qui permet de sécher rapidement le système ou de le fixer lors de l'évaporation du solvant. La méthode pour fixer le système pendant l'évaporation est d'utiliser un support chargé négativement afin d'immobiliser les fibres. Le dépôt a donc été réalisé sur un feuillet de mica fraîchement clivé. Le feuillet est plongé dans une solution de peptide amphiphile à 20 g/L. L'image AFM cf. Figure 50 ci-après montre un alignement très important d'une structure fibreuse. Cette immobilisation permet l'observation de fibres de diamètres compris entre 30 et 35 nm. La méthode de trempage (dip-coating) permet donc l'observation des micelles cylindriques du système avec des fibres plus minces que par méthode de drop-casting. Cependant cette méthode ne permet pas l'obtention de fibres isolées car cette méthode implique une période de séchage trop longue durant laquelle la solution se concentra avant que le solvant ne soit complètement évaporé.

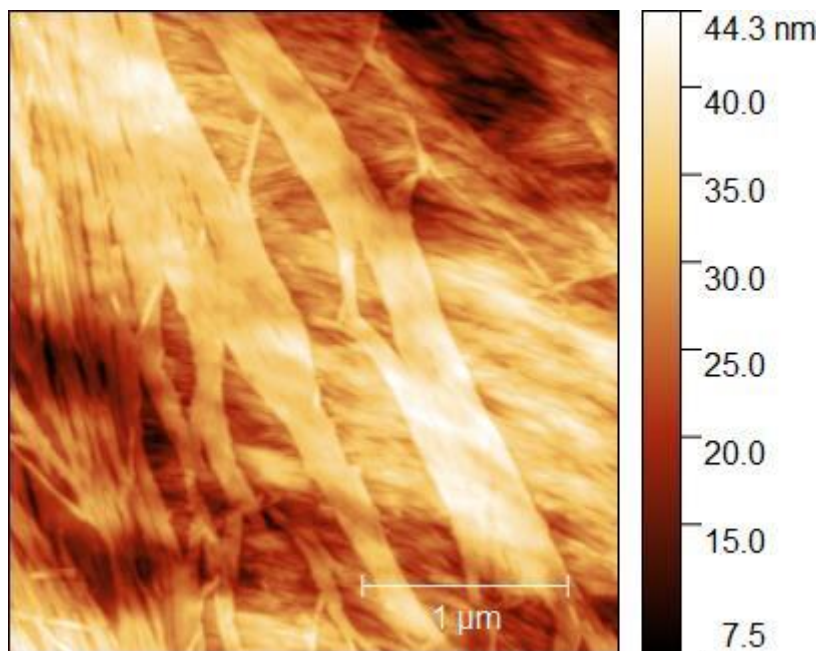


*Figure 50 : Image AFM de phase du peptide  $C_{16}-V_3A_3K_3G-NH_2$  déposé par trempage sur feuillet de mica obtenue en tapping mode*



Il est important de noter que l'image d'amplitude ne permet pas la mesure de diamètres mais est utilisée pour un souci de meilleure définition de l'image.

La dernière méthode de dépôt utilisée afin de préparer les échantillons de peptides pour l'AFM est le spin-coating. Cette méthode permet de déposer une couche extrêmement mince à partir de n'importe quel solvant. A l'instar des autres méthodes de dépôt, cette méthode permet une reproductibilité beaucoup plus importante ainsi qu'un matériau homogène. L'accès à différents paramètres opératoires dans cette méthode de dépôt permet de modifier l'épaisseur ainsi que la vitesse d'évaporation. Ce sont ces paramètres qui rendent cette méthode idéale pour la préparation d'échantillons AFM. Pour cette méthode, une lamelle de verre est utilisée comme support. La vitesse de rotation est de 500 tours par minutes (RPM). Le temps de dépôt est de 300 secondes et l'accélération de 100 RPM/s. L'épaisseur du matériau déposé dépend également de la viscosité de la solution. Les paramètres sont adaptés à une solution de peptide très fluide comme c'est le cas pour une solution à 20 g/L. Sur l'image AFM cf. Figure 51 ci-après, des fibres isolées et assemblées sont observées. Les profils ont montré des diamètres ou largeurs allant de 20 à 375 nm.

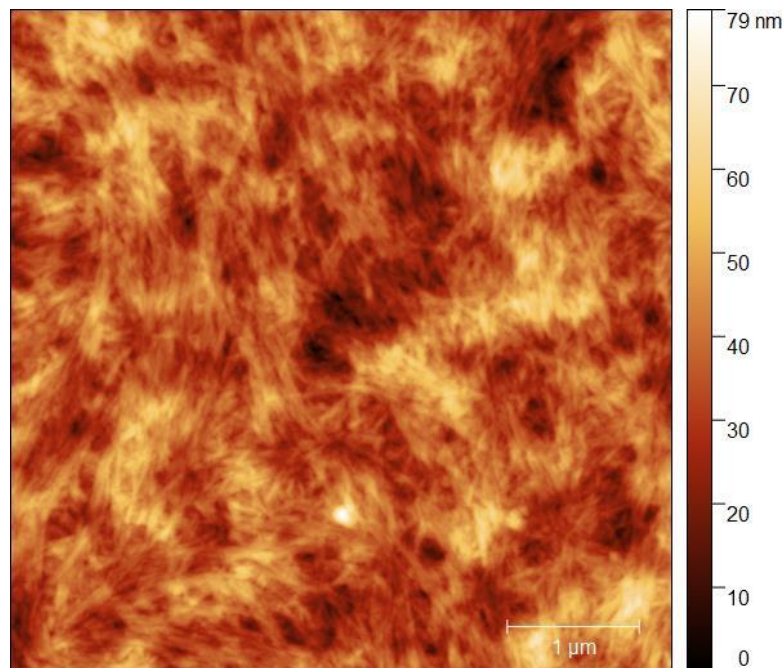


*Figure 51 : Image AFM de topographie du peptide  $C_{16}-V_3A_3K_3G-NH_2$  déposé par spin-coating sur lamelle de verre obtenue en tapping mode*

Ces structures très larges observées sur cette image sont des micelles qui s'associe à plusieurs pour former des assemblages de fibres dont le diamètre est très supérieur à ce qui est attendu. La méthode permet donc d'observer des fibres de diamètre 20 nm mais la présence de ces gros assemblages entraine un matériau non homogène.

### *II-3.b Effet de la concentration*

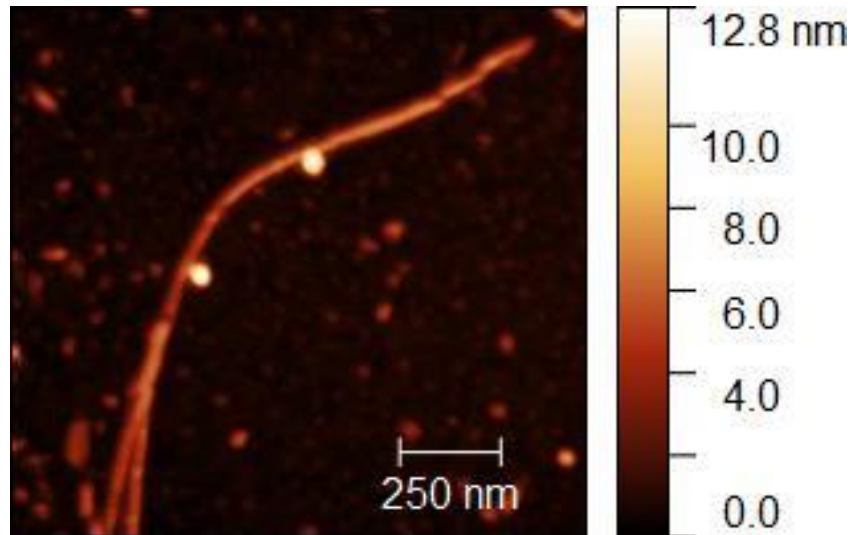
Afin d'observer des fibres isolées et ainsi de mesurer le diamètre exact d'une micelle de peptide amphiphile, la concentration a été diminuée d'un facteur 4 (5g/L). L'image AFM de la Figure 52 montre un système similaire au système concentré précédemment présenté à 20g/L. Des fibres dont le diamètre est comparable aux petites fibres observées lors de la première image obtenue avec le spin-coating. Un diamètre compris entre 20 et 30 nm est observé sur cette image.



*Figure 52 : Image AFM de topographie du peptide  $C_{16}-V_3A_3K_3G-NH_2$  à 5g/L déposé par spin-coating obtenue en tapping mode*

A cette concentration, les assemblages de fibres ont disparu mais il n'est pas encore possible d'isoler une fibre afin d'en déterminer le diamètre exact. En conséquence, la concentration a été encore diminuée jusqu'à 0,05 g/L cf. Figure 53 ci-dessous





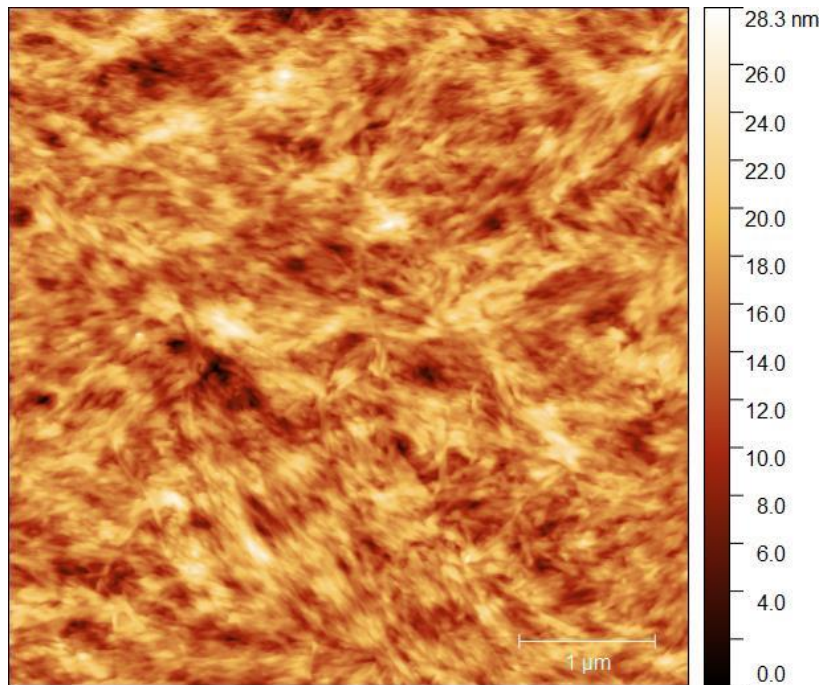
*Figure 53 : Image AFM de topographie du peptide  $C_{16}$ -V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> à 0,05g/L déposé par spin-coating obtenue en tapping mode*

A cette concentration, l'observation de fibres isolées est possible et la mesure de profils est beaucoup plus aisée et précise. Le diamètre observé est de 20 nm.

Toutes les mesures réalisées ont indiqué des diamètres entre 20 et 35 nm pour les fibres plus ou moins isolées. La molécule a été modélisée pour obtenir une conformation optimale et dans cette conformation, le peptide mesure environ 4 nm de long. Cette conformation a été réalisée sur Mercury. Il n'est pas incohérent de penser que la micelle cylindrique possède un diamètre d'environ deux fois la longueur du peptide soit 8 nm. Comme les fibres isolées sont trop grandes elles sont assimilées à des assemblages de micelles et non des micelles isolées. Il est nécessaire de trouver une autre méthode afin d'isoler une micelle cylindrique.

*II-3.c Changement de contre-ion*

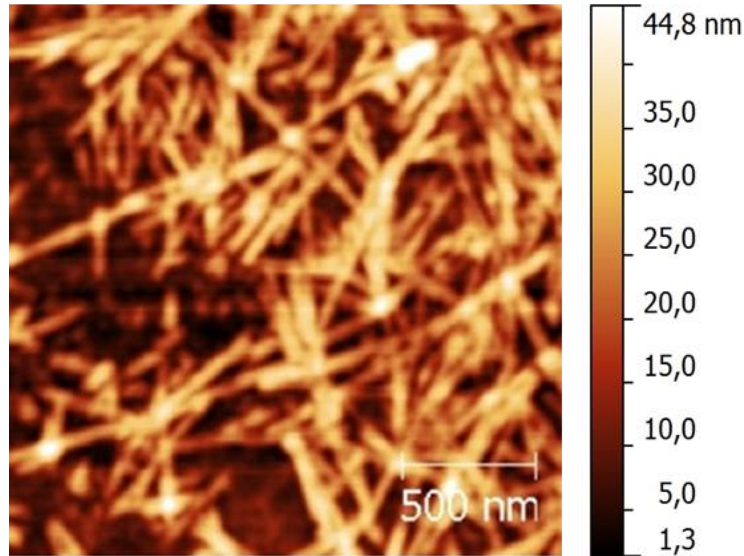
En plus de l'effet direct sur la structure secondaire, l'impact de la nature du contre-ion des unités lysines sur la morphologie a été étudié en AFM.



*Figure 54 : Image AFM de topographie du peptide  $C_{16}-V_3A_3K_3G-NH_2$  à 5 g/L après échange du trifluoroacétate par acétate obtenue en tapping mode*

La Figure 54 ci-dessus présente de nouveau des fibres de diamètres compris entre 22 et 25 nm. L'ion acétate étant très similaire au trifluoroacétate, le résultat est logique.

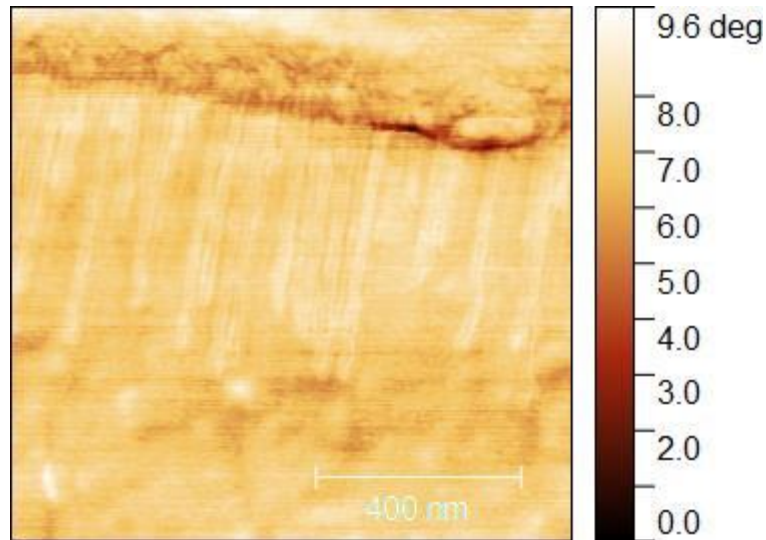
Le dernier échange d'ion opéré avec cette résine Dowex 1X8 est avec  $Cl^-$ . Cette image est présentée sur la Figure 55 ci-après.



*Figure 55 : Image AFM de topographie du peptide C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> à 5 g/L après échange du trifluoroacétate avec Cl<sup>-</sup> obtenue en tapping mode*

Sur cette image, les fibres de peptides sont plus isolées et leur diamètre compris entre 19 et 22 nm. La présence du chlore induit probablement une répulsion plus forte entre les fibres mais la petite taille du contre-ion doit diminuer la taille globale des fibres. La répulsion des chlorures permet d'observer ce système plus aéré mais les micelles s'associent encore pour former des assemblages plus larges.

La toute dernière modification opérée sur le peptide pour enlever le trifluoroacétate est l'utilisation d'une résine portant des groupements sulfonates chargés négativement. La résine utilisée pour cette expérience est la Dowex WX8. Dans ce cas, la résine va accrocher le peptide à sa surface. Après le traitement sur cette résine, le surnageant est observé en LC-MS et aucun peptide n'est détecté comme attendu. Le peptide est bien resté accroché à la résine et c'est ce qui est observé sur la figure 24 ci-après. Cette image présente un élément de la résine en haut de l'image et le long de ce fragment des fibres de peptides qui s'organisent tel un peigne. Le diamètre de ces fibres est de 10 nm.



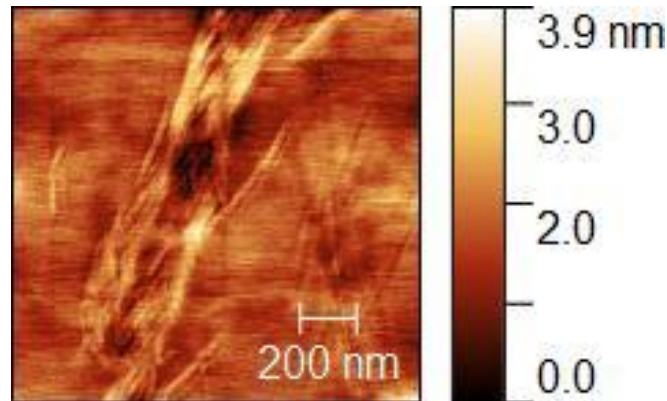
*Figure 56 : Image AFM de phase du peptide  $C_{16}$ -V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> accroché sur la résine sulfonaté échangeuse d'ions obtenue en tapping mode*

L'idée de déposer le peptide sur les feuillets de mica, également chargés négativement, a été réalisée après cette découverte. Il est toutefois important de noter que le dépôt du peptide sur la résine sulfonate est très peu réversible. Cette association électrostatique est très forte, et seul un changement de pH de la solution permet de déprotomer le peptide afin de le décrocher de la résine. Le dépôt sur mica ne permet pas l'isolement car la surface est plane et beaucoup de fibres sont déposées. Sur la résine échangeuse d'ions, des petites billes de résines sont observées et le peptide est alors plus isolé.

## Conclusion

La synthèse a tout d'abord été optimisée pour obtenir les quantités de peptides amphiphiles  $C_{16}$ -V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> nécessaires aux études suivantes. Il est possible de comparer le peptide synthétisé avec celui présenté dans la littérature. Il diffère des peptides précédemment présentés par la présence d'une glycine uniquement présente comme espaceur. Toutefois la robustesse de l'autoassemblage a d'abord été prouvée en dichroïsme circulaire. Même en subissant de légères modifications ou des compétitions, l'association en feuillet- $\beta$  persiste. Cette association est le garant de la formation de micelles cylindriques. Les conditions d'analyse en AFM entraînent beaucoup d'incertitudes quant à l'obtention d'images

dans chaque cas. Il est donc nécessaire de prendre en compte que l'optimisation du dépôt a également été réalisée afin d'obtenir une certaine répétabilité des images. Il a donc été encore plus compliqué d'isoler une micelle cylindrique afin d'en mesurer le diamètre. Le concours de circonstance a permis d'observer un morceau de résine isolé présentant des micelles encore attachées. D'autres images ont permis d'observer des micelles isolées mais la qualité ne permet pas l'exploitation de ces images cf. Figure 57.



*Figure 57 Image AFM de topographie du peptide  $C_{16}-V_3A_3K_3G-NH_2$  après échange d'ion mais mesure de fibres isolée non faisable obtenue en tapping mode*

Pour terminer une association a été réaliser avec un matériau extérieur. Certes le matériau choisi est déjà solide et ne permet pas d'effectuer une mise en forme mais l'association entre les fonctions sulfonates et le peptide amphiphile est si forte que même en conditions basiques, le peptide n'a pas été décroché ce qui laisse à penser que ce type d'interactions est très propice à la formation de matériaux.

Association Peptides

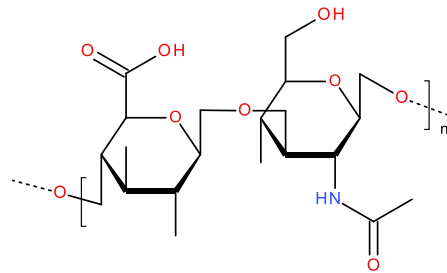
Polymères

I-Choix du polymère .....	87
I-1 Rappel sur l'association peptide polymère .....	87
I-2 Polystyrène sulfonate de sodium .....	88
II-Observations à l'état solide.....	90
II-1 Etude de l'équivalence .....	90
II-1.a Equivalence en nombre de charges .....	90
II-1.b Autour de l'équivalence .....	92
II-2 Avant l'équivalence .....	94
II-3 Après l'équivalence .....	95
III-Propriétés mécaniques .....	98

## I-Choix du polymère

### I-1 Rappel sur l'association peptide polymère

Plusieurs candidats ont été étudiés dans la littérature. Le plus présent est l'acide hyaluronique. C'est un polymère naturel dont l'unité de base est un disaccharide d'acide D-glucuronique et de D-N-glucosamine (Schéma 7).

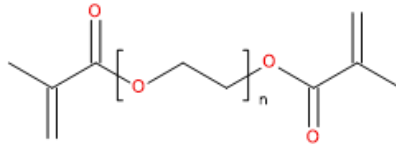


*Schéma 7 : schéma de l'acide hyaluronique*

Ce polymère est utilisé car c'est un composé naturel, il peut avoir une masse molaire allant jusqu'à  $10^7$  kDa *in vivo* et enfin il présente des sites ionisables. Ces sites ionisables sont les emplacements favorisés pour l'association avec le peptide amphiphile. Pour rappel, le peptide amphiphile synthétisé ( $C_{16}$ -V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub>) présente des sites également ionisables grâce aux lysines et plus particulièrement les amines primaires présentes sur les chaînes latérales. Les travaux de Capito et al. décrivent de manière exhaustive cette association permettant de créer un gel plus ou moins solide selon le pH des deux solutions. Ces deux solutions sont mises en contact pour former ce gel qui se forme premièrement à l'interface des deux milieux avant de se propager dans les deux milieux. Il est également possible de varier sur la taille du polymère pour former une association plus ou moins solide. Le souci de ce polymère est qu'il est biodégradable et présente donc une tenue mécanique faible il fait donc un candidat inadéquat pour l'application de matériau membranaire.

Un autre polymère a été associé à des peptides amphiphiles ionisables, le poly(éthylène glycol) diméthacrylate (PEGDMA) (Schéma 8) dans les travaux de Goktas et al.





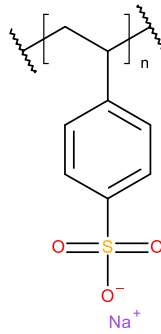
*Schéma 8 : schéma du PEGDMA*

Dans le cas présent, le peptide amphiphile ne va pas directement s'associer avec le polymère mais deux types de peptides amphiphiles dont les parties hydrophiles possèdent une polarité opposée sont mis en présence du PEGDMA. Ils vont alors s'associer autour du polymère pour former un solide très compact (voir partie bibliographie). Cette association qui n'en est finalement pas une ne convient pas non plus à l'utilisation sous forme de membrane car potentiellement le peptide peut se retirer du polymère car l'association n'est pas assez solide. Il est donc nécessaire de trouver un meilleur candidat.

## I-2 Polystyrène sulfonate de sodium

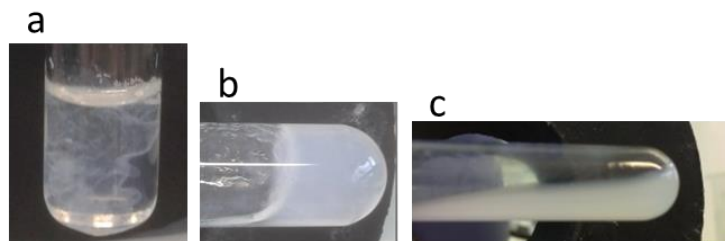
Dans l'étude précédente (partie synthèse) le peptide  $C_{16}$ -V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> a montré une affinité très forte pour un certain type de fonctions. En effet, la fonction sulfonate semble entraîner une suppression totale de l'affinité du peptide avec le trifluoroacétate. De plus cette association a prouvé qu'elle était très résistante même pour des conditions basiques. Il existe un polymère qui présente cette fonction il s'agit du polystyrène sulfonate de sodium.

(Schéma 9). Il se présente sous la forme d'une poudre jaune, particulièrement soluble dans l'eau grâce à la présence d'une fonction sulfonate sur chaque unité. La masse molaire moyenne utilisée est 70000 g/mol. Sa température de transition vitreuse (T<sub>g</sub>) est de 140°C.



*Schéma 9 : schéma du PSSNa*

La masse molaire choisie (70000 g/mol) a été déterminée pour favoriser les interactions peptide amphiphile – polymère mais pas trop élevée afin de ne pas avoir des interactions trop fortes empêchant la mise en forme du matériau. Au même titre que Capito et al., l'association peptide amphiphile - polymère s'est faite à l'interface de deux solutions aqueuses pour ensuite être homogénéisées. La solution se trouble dès l'ajout de l'une des solutions sur l'autre. Lorsque l'ajout est complet, un précipité se forme et il tend à figer le système sous la forme d'un gel. L'interaction est favorisée lorsque le mélange est très légèrement agité et un gel est observé. Lorsque le mélange est passé au vortex, le système passe d'un état de gel solide à complètement liquide (Figure 58).



*Figure 58 : photos du mélange C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> 15 mg dans 0,5 mL d'eau mQ et PSSNa 6 mg dans 0,5 mL d'eau mQ en solutions aqueuses (a) juste après ajout complet, (b) après légère agitation et (c) après vortex*

D'après ces observations visuelles, le passage au vortex semble casser les interactions qui permettaient de stabiliser le milieu. L'association a alors complètement précipité et le gel ne

se reforme pas. Après une longue attente, le système a décanté et la phase solide est bien séparée de la phase liquide.

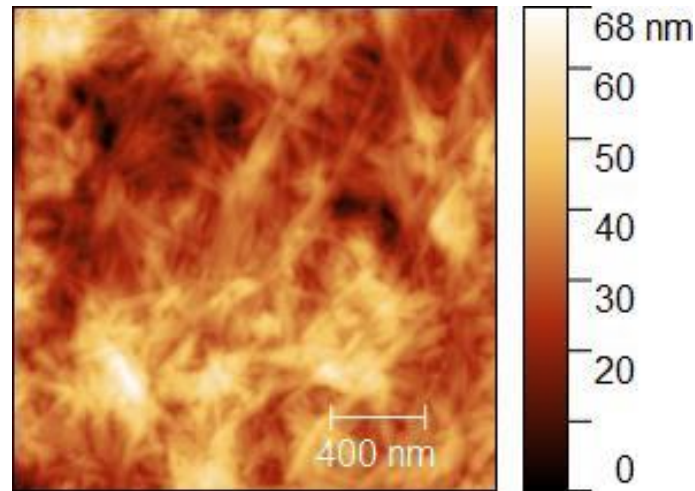
## II-Observations à l'état solide

### II-1 Etude de l'équivalence

L'AFM ayant fait ses preuves pour l'observation du peptide amphiphile seul, et afin de pouvoir comparer les résultats, c'est la méthode utilisée pour observer l'association C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub>/PSSNa. Pour rappel, l'observation en AFM se fait sur un matériau sec, le plus plan possible et propre. Les dépôts ont donc été réalisés au spin-coating sur une surface de verre comme pour la partie précédente toutefois la vitesse de rotation lors du spin-coating doit être ajustée pour chaque cas car le gel formé est plus ou moins solide.

#### *II-1.a Equivalence en nombre de charges*

Ce qui est étudié dans cette partie est le ratio entre le nombre de charges positives apportées par le peptide et de charges négatives apportées par le polymère. L'équivalence est donc obtenue lorsqu'il y a autant de charges négatives que positives. L'intérêt de travailler à l'équivalence est la maximisation des interactions entre le peptide amphiphile et le polymère. Le mélange a donc été fait dans les proportions suivantes : 15 mg de C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> dans 0,5 mL d'eau auxquels sont ajoutés 6 mg de PSSNa dans 0,5 mL d'eau. De cette manière la solution est à 2% massique. La structure fibreuse observée lors de l'étude du peptide amphiphile seul est conservée en présence du polymère (Figure 59).

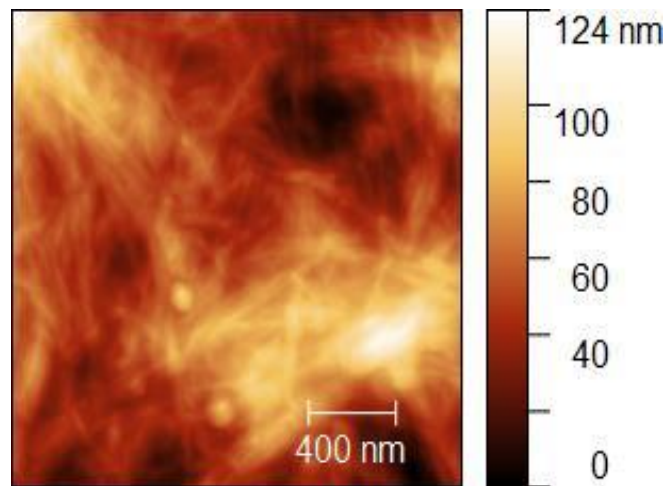


*Figure 59 : Image AFM de topographie de l'association peptide  $C_{16}$ -V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub>/polymère 15 mg/6mg obtenue en tapping mode*

Afin de comparer au peptide amphiphile seul, les diamètres des fibres sont mesurés. Pour rappel, le peptide seul avait été isolé en solution et mesure en moyenne 20 nm. Le diamètre observé ici est de 59 nm. L'ajout de PSSNa a donc dans un premier temps permis de créer un gel grâce à la formation d'un réseau 3D polymère – peptide amphiphile mais ce dernier est détruit sous l'effet d'une sollicitation mécanique. Le résultat est la formation d'un précipité dont la structure reste constituée de fibres. Ces données sont cohérentes avec les travaux de Capito et al. et de Goktas et al. dans la mesure où en associant un peptide amphiphile et un polymère, le polymère s'organise autour du peptide, celui-ci renforce la structure et la morphologie des micelles cylindriques est conservée. Ces résultats démontrent que des micelles cylindriques sont formées dès que le peptide amphiphile est en milieu aqueux, et perdureront en présence des polymères même s'ils interagissent avec la partie ionique ou la partie structurante pour le PEGDMA, sauf dans le cas particulier de l'ajout d'un élément destructurant comme par exemple l'HFIP (cf. partie bibliographique). Ainsi, ce système a permis d'émettre l'hypothèse suivante : lorsque la même quantité de charges positives et négatives sont présentes, le recouvrement des micelles cylindriques de peptide amphiphile par le polymère devrait être total. Cela signifie que les fibres présenteront le diamètre le plus grand. La formation transitoire d'un gel en l'absence de cisaillement peut s'expliquer par la formation de ponts inter-micellaires via les chaînes de polymère. Pour vérifier cette hypothèse, un changement du ratio de charge a été effectué.

*II-1.b Autour de l'équivalence*

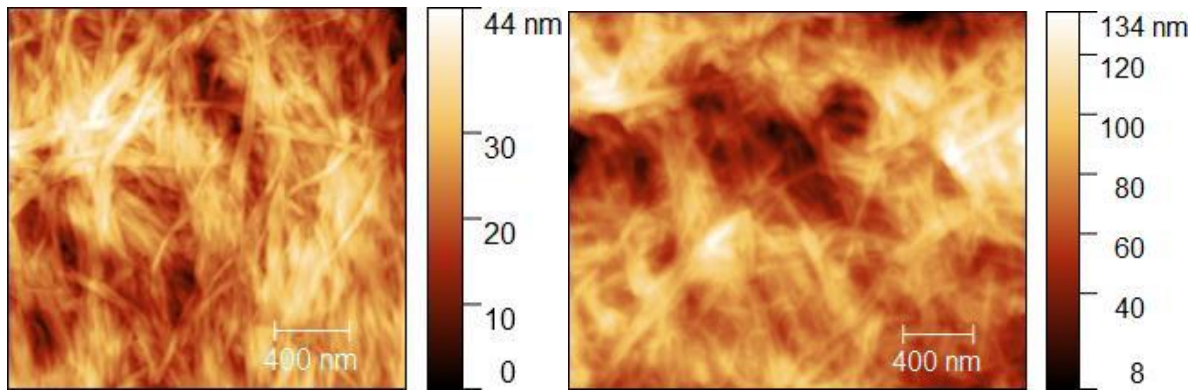
Pour modifier le ratio de charge, la concentration en peptide est fixée et la concentration en PSSNa est modulée. Le ratio inférieur est réalisé à partir 15 mg de peptide et 5 mg de PSSNa. Le ratio de charges (peptide amphiphile/polymère) est alors de 1,2. La structure fibreuse est identique à celle observée à l'équivalence. Le diamètre moyen mesuré est de 53 nm, ce qui est légèrement inférieur à celui observé à l'équivalence. En présence d'un excès de charges provenant du peptide amphiphile, le polymère recouvrira comme précédemment les micelles cylindriques sans toutefois entièrement les compenser.



*Figure 60 : Image AFM en topographie du mélange Peptide amphiphile/PSSNa (ratio de charge 1,2 (15 mg/5 mg)) obtenue en tapping mode*

Si à l'inverse, la quantité de polymère est augmentée par rapport au peptide amphiphile, la logique voudrait que le diamètre des fibres n'augmente plus car il n'y a plus de charges de peptides disponibles. Afin de vérifier ce postulat, des ratios de charge (peptide amphiphile – polymère) égaux à 0,6 et 0,4 ont été étudiés. Dans les deux cas, la structure est encore une fois identique, une structure fibreuse homogène (Figure 61). Contrairement à ce qui était attendu, les diamètres mesurés des fibres sont de 70 nm pour le ratio 0,6 (image de gauche) et 76 nm pour le ratio 0,4 (image de droite). Il semblerait qu'une adsorption des chaînes polymères autour des fibres de peptides amphiphiles soit observée au-delà de la première couche. Il est plus certainement probable que l'excès de polymère dans la solution

entraîne une adsorption partielle des chaînes polymères sur les micelles de peptides amphiphiles. Ainsi, une chaîne polymère serait en partie liée à la micelle via des interactions électrostatiques tandis que l'autre partie resterait ionisée en solution.

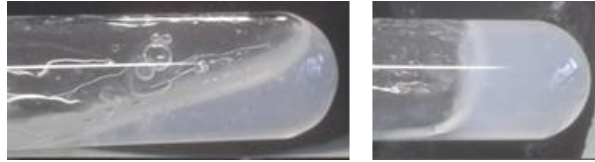


*Figure 61 : image AFM en topographie de l'association peptide/PSSNa ratio de charge 0,6 (gauche) et 0,4 (droite)*

En étude préliminaire aux propriétés mécaniques traitées dans la partie suivante, les mélanges sont tout d'abord observés à l'œil nu. La méthode de dépôt permet également d'étudier la viscosité du gel. Les paramètres de la méthode de dépôt, le spin-coating, doivent être modifiés pour que le dépôt soit plan. La vitesse de rotation et l'accélération sont augmentées pour ces nouveaux ratios. La rotation est augmentée à 1200 RPM et l'accélération à 150 RPM/s. Pour le mélange à l'équivalence, ces valeurs étaient de 1000 RPM et 100 RPM/s. Il est important d'augmenter ces valeurs pour des matériaux plus visqueux car, comme présenté dans la partie peptide amphiphile, la vitesse de rotation influe sur la vitesse d'évaporation du solvant. Comme le solvant est piégé dans le gel, il est nécessaire d'augmenter la vitesse de rotation pour défaire ce gel pour libérer le solvant. L'augmentation du diamètre avec la diminution du ratio signifie que à l'équivalence, toutes les charges ne sont pas écrantées et qu'il existe des regroupements de charges négatives du polymère qui ne sont pas associées. Ce n'est qu'avec un mélange plus riche en polymère que toutes les charges peuvent être écrantées. La taille du diamètre tend vers une valeur maximale comprise entre 75 et 80 nm (voir Figure 67).

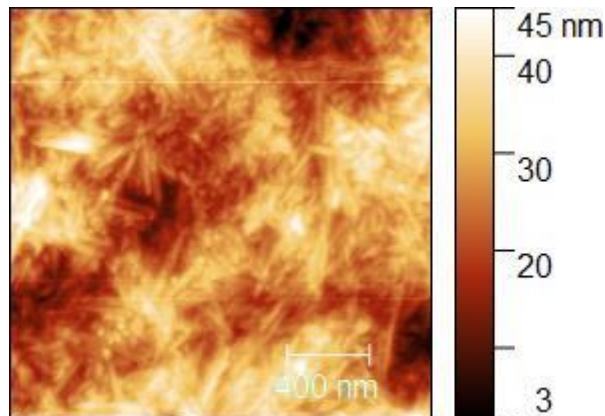
## II-2 Avant l'équivalence

Le système a également été étudié avant l'équivalence quand les charges du peptide sont majoritaires. Le ratio le plus haut étudié est de 3. Pour ce ratio, 2 mg de polymère sont ajoutés à 15 mg de peptide. Ce ratio mène vers un gel très peu solide (Figure 62).



*Figure 62 : photo des gel peptide polymère ratio 3 (à gauche) et 1 (à droite)*

Comparé au ratio 1 ce gel est beaucoup plus fluide. La méthode de dépôt confirme ce constat car la vitesse de rotation utilisée lors du spin-coating est de 500 RPM. Pour des systèmes trop fluides, il est important de ne pas appliquer une vitesse de rotation trop élevée car le liquide peut ne pas tenir sur le support.



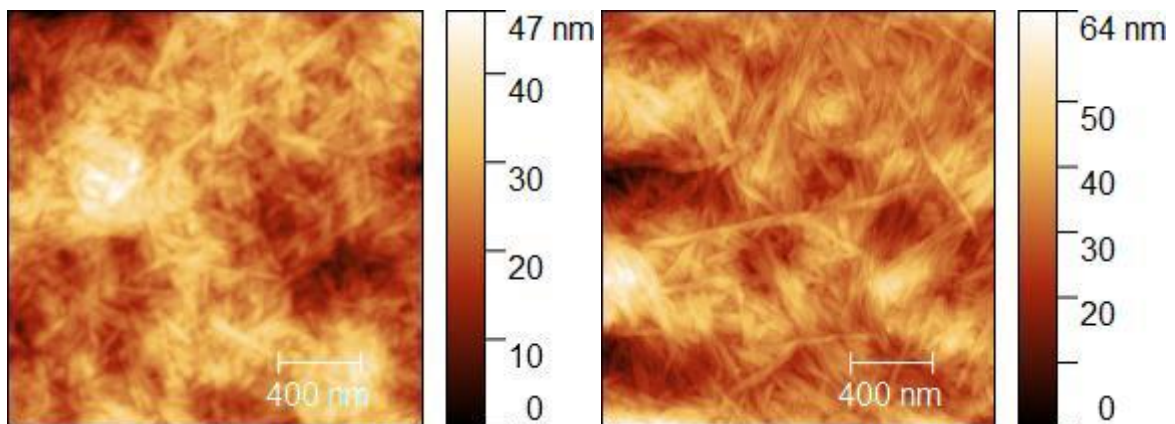
*Figure 63 : Image AFM en topographie du mélange peptide/PSSNa ratio de charge 3  
(15 mg/2 mg) obtenue en tapping mode*

Les fibres sur la Figure 63 ci-dessus sont plus fines que dans les ratios inférieurs. Le diamètre moyen mesuré est de 32 nm. Cet autoassemblage possède un diamètre similaire aux assemblages fibreux de peptides amphiphiles seuls. Le comportement est également semblable. Il s'agit d'un liquide légèrement visqueux dont les fibres sont de même taille. La



différence est que l'assemblage précipite en milieux aqueux contrairement au peptide seul. On peut supposer que la stabilité des micelles cylindriques en solution est principalement due à la présence des charges superficielles. Ainsi, en présence du polymère et jusqu'à l'équivalence, les charges du peptide amphiphile sont graduellement compensées, diminuant d'autant la stabilité de l'assemblage.

Un ratio légèrement plus faible entraîne une légère augmentation du diamètre des fibres et de la viscosité du mélange. Les ratios 2 et 1,5 ont été réalisés. Les diamètres mesurés sont de 38 et 45 nm (Figure 64).



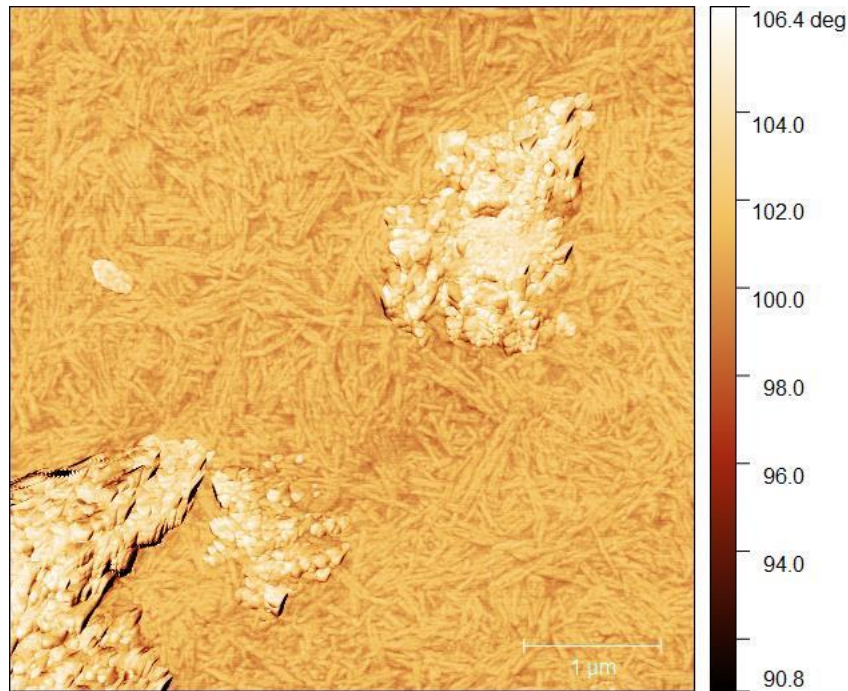
*Figure 64 : Images AFM en topographie du mélange peptide/PSSNa ratio 2 (15 mg/3 mg) (à gauche) ratio 1,5 (15 mg/4 mg) (à droite) obtenue en tapping mode*

L'augmentation de la quantité de PSSNa entraîne donc une augmentation de la viscosité, la vitesse de rotation nécessaire au dépôt par spin-coating est de 700 RPM. L'augmentation du diamètre est cette fois-ci linéaire.

### II-3 Après l'équivalence

L'étude après l'équivalence présente encore une différence aux deux régimes présentés avant et à l'équivalence. Le ratio 0,3 a été établi avec 20 mg de PSSNa et 15 mg de peptide. Ce faible ratio entraîne la formation d'un liquide visqueux. La vitesse de rotation est aussi de 700 RPM pour ce ratio.

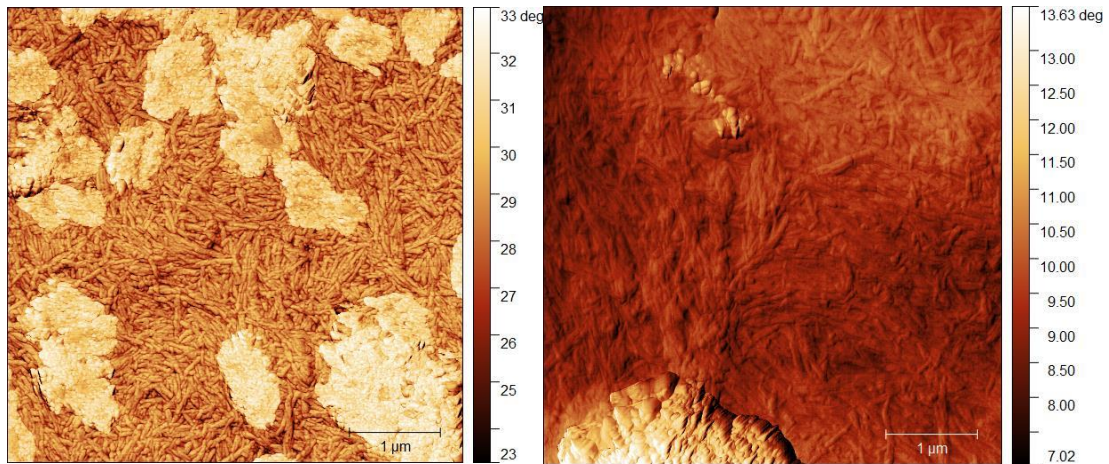




*Figure 65 : Image AFM en phase de phase du mélange peptide/PSSNa ratio 0,3 (15 mg/20 mg) obtenue en tapping mode*

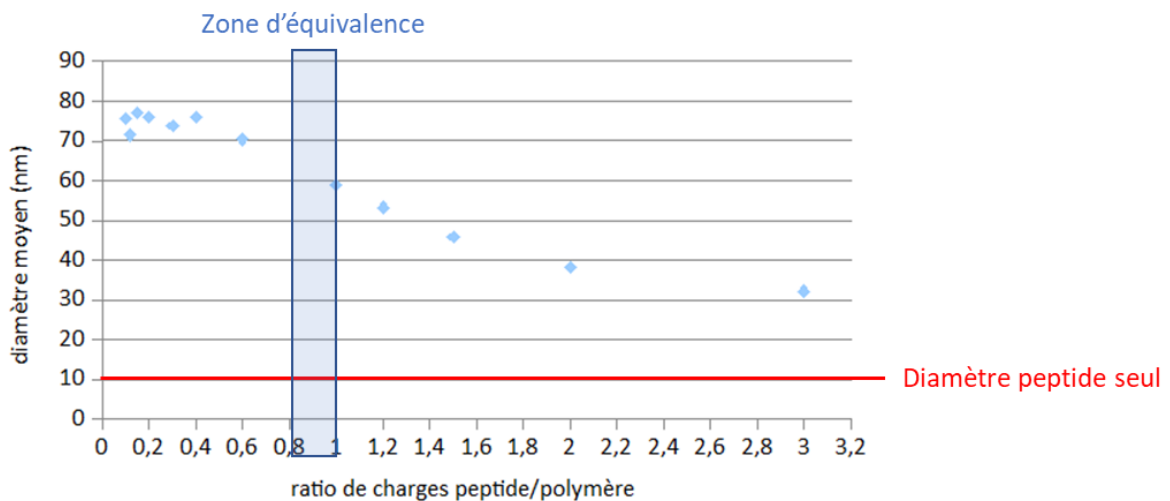
L'observation AFM en phase est plus appropriée pour ce type de mélange. En effet l'image de phase a permis dans une étude précédente (cf. partie peptide amphiphile) d'observer des objets très fins (10 nm). Dans le cas présent l'image de phase est utilisée pour démontrer la présence de deux milieux distincts. Le premier milieu est le système fibreux observé dans les ratios précédemment présentés composé de fibres de peptides entourés par le PSSNa. Le second milieu est le polymère seul formant des nodules. Il s'agit de la partie claire sur la Figure 65. L'image de phase permet de différencier ces deux milieux car ils possèdent une dureté différente. Le diamètre moyen des fibres mesuré pour ce ratio est de 74 nm. L'apparition de ces deux milieux et la stabilisation de la valeur du diamètre des fibres montrent que l'association a atteint son point le plus haut et l'équivalence est même dépassée.

L'augmentation de la quantité de polymère après la limite de 15 mg, limite à partir de laquelle le diamètre des fibres n'augmente plus, entraîne une autre modification du milieu (Figure 66).



*Figure 66 : Images AFM en phase du mélange peptide/PSSNa ratio 0,12 (gauche) et ratio 0,1 (droite) obtenue en tapping mode*

Ces ratios présentent un milieu plus homogène. La structure observée en tant que polymère est maintenant quasiment présente partout. Les diamètres mesurés sont respectivement de 71 et 76 nm. L'évolution du diamètre des fibres pour les différents ratios est présentée sur la Figure 67. Un ratio élevé est symbolisé par de faibles quantités de PSSNa et inversement.



*Figure 67 : Taille du diamètre des fibres en fonction du ratio de charge peptide amphiphile/polymère mélange à 2% massique*

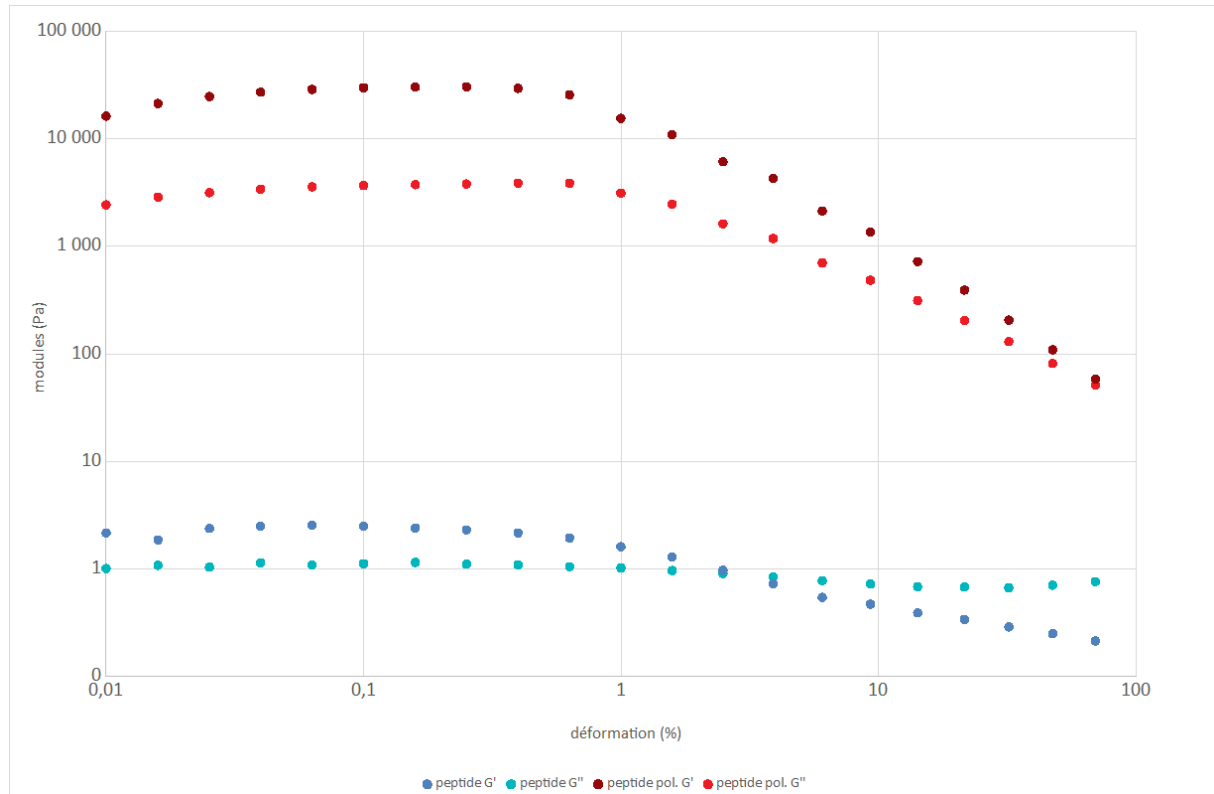
Pour rappel, plus les ratios sont bas et plus la quantité de polymère est élevée par rapport à la quantité de peptide amphiphile. Trois régimes sont observés. Pour des ratios élevés, la taille des diamètres diminue mais se stabilise à une valeur proche des assemblages de peptides amphiphiles seuls observés précédemment. Pour des ratios faibles, la taille augmente jusqu'à atteindre un plateau aux alentours de 80 nm. Pour finir, l'équivalence ne peut être définie comme un seul ratio car le peptide n'est pas pur à 100%. L'équivalence définie par le même nombre de charges de peptides amphiphile et de PSSNa est alors comprise entre deux valeurs. Une zone d'équivalence est alors définie entre les ratios 0,8 et 1.

Afin de maximiser les surfaces de contact entre le peptide amphiphile et le polymère, il est plus judicieux de se placer à l'équivalence. C'est donc dans cet optique que le mélange sera ensuite fait pour former le matériau.

### III-Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des solutions ont été étudiées au rhéomètre. Lors de cette étude, le mélange peptide amphiphile - polymère a été comparé au peptide seul. Avant de commencer, il est nécessaire de définir les différents paramètres modifiables et étudiables en rhéologie. Tout d'abord nous travaillons avec un mobile d'une géométrie cône-plan, circulaire de 50 mm de diamètre et d'angle  $1^\circ$ , à  $25^\circ\text{C}$  et positionné à une distance de 0,101 mm. La viscosité traduit de la capacité à un fluide ou gel à s'écouler. Plus la viscosité est élevée, plus le fluide s'écoule lentement et inversement. Les modules de conservation et de perte sont des données traduisant du caractère viscoélastique du matériau. Le module de conservation ( $G'$ ) porte sur le caractère solide dit élastique et le module de perte ( $G''$ ) traite du comportement liquide dit visqueux. Ces deux paramètres sont mesurés en même temps et sont comparés. Si l'un est supérieur à l'autre le matériau est dans l'état prédominant du module : matériau plutôt solide si  $G' > G''$  et matériau plutôt liquide si  $G'' > G'$ . Le taux de cisaillement est défini par la vitesse de rotation que l'on applique au mobile afin de déformer le matériau. Il est également possible de travailler en oscillation. Lors de ces tests, il y a également la fréquence d'oscillation qui entre en jeu ainsi que l'amplitude d'oscillation. La première étape d'une étude

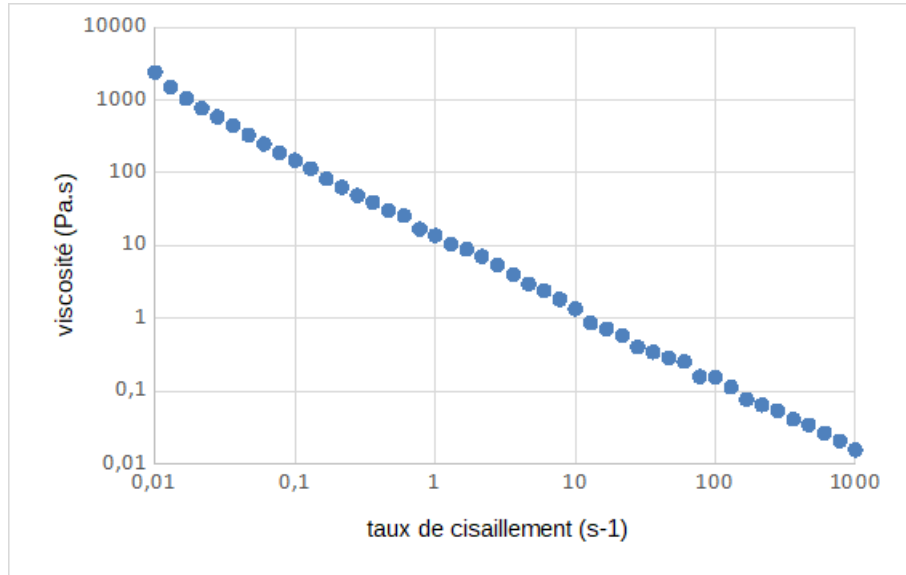
en rhéologie est la détermination du domaine de linéarité dans lequel la déformation n'influe pas sur la viscosité ou sur les modules de conservation et de perte.



*Figure 68 : Détermination du domaine de linéarité pour le peptide seul (bleu) et pour le mélange peptide polymère (rouge) à l'équivalence à 10% massique*

Le domaine de linéarité du mélange peptide amphiphile/polymère est comparé au peptide amphiphile seul. Le plateau s'étend jusqu'à 0,6% et pour le mélange peptide polymère, les modules sont élevés (>1000 Pa). Pour ce qui est du peptide seul, son comportement est typique d'un gel très fluide. Pour cette étude et pour les suivantes, les solutions ont été réalisées à 10% massique sauf pour l'étude en concentration (cf. fin de partie). Le domaine de linéarité étant déterminé, les études suivantes seront réalisées avec une déformation de 0,1%, valeur située au milieu du plateau. On peut noter également que le croisement des courbes  $G'$  et  $G''$  a lieu pour des valeurs de déformation plus importante lorsque le polymère est présent. Ajouté au fait que les valeurs de modules sont très largement supérieures en présence du polymère, on peut en déduire que la présence de polymère renforce mécaniquement le gel.

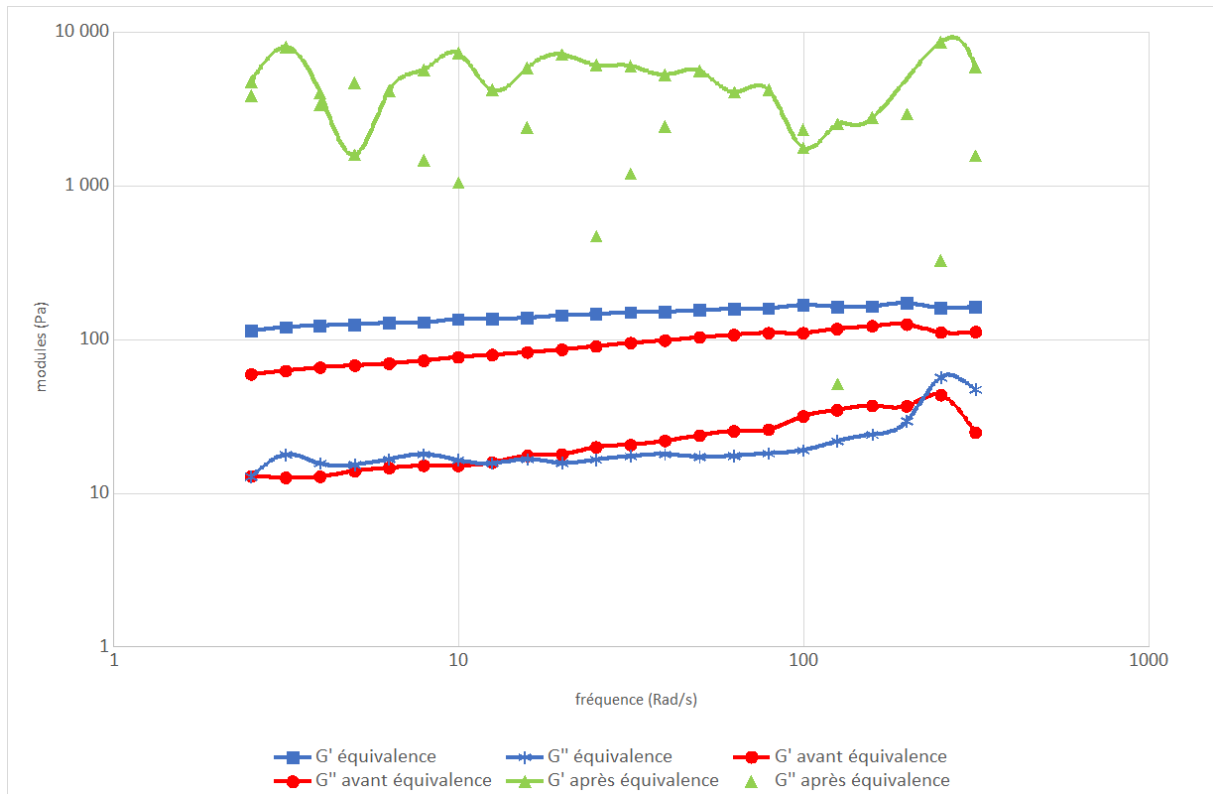
Le second test réalisé en rhéologie est la détermination de la vitesse d'écoulement grâce à l'étude de la viscosité en fonction du taux de cisaillement (Figure 69).



*Figure 69 : Courbe de vitesse d'écoulement à l'équivalence mélange fait à 10% massique démontrant d'un comportement rhéofluidifiant*

La viscosité la plus haute mesurée est de 2400 Pa/s et tend vers 0 Pa/s. Ce type de courbe est typique d'un rhéofluidifiant. Ce phénomène avait déjà été observé lors des essais préliminaires : lorsque le mélange avait été agité, le système était passé d'un gel à un liquide peu visqueux ou quand le dépôt au spin-coating avait été réalisé, les propriétés rhéofluidifiantes ont été utilisées pour que le dépôt soit très fin, plan et pour que le solvant s'évapore rapidement. L'écoulement est le plus élevé pour des vitesses de cisaillement élevées.

Le troisième test de rhéologie est le balayage de la fréquence. La déformation appliquée est ici toujours de 0,1%. L'étude des modules en fonction de la fréquence permet de déterminer l'état du mélange. Pour cette étude les trois systèmes testés sont situés avant (ratio=2), à l'équivalence (ratio=1), et après l'équivalence (ratio=0,6) (Figure 70).



*Figure 70 : étude des modules en fonction d'un balayage de fréquence pour des ratio faible en vert des ratio élevés en rouge et à l'équivalence en bleu mélange à 10% massique*

Une première observation est que l'analyse du système au-delà de l'équivalence est impossible, les données étant erratiques en raison de la précipitation de l'assemblage peptide amphiphile-polymère de façon concomitante avec l'analyse. Avant et à l'équivalence, le module de conservation se situe dessus du module de perte confirmant l'observation d'un gel. Toutefois les valeurs des modules sont très basses pour des solides, également largement inférieures à celles rapportées précédemment dans la Figure 68. Ces valeurs basses peuvent être expliquées par la méthode de dépôt sur la platine du rhéomètre. Si le mélange est réalisé avant le dépôt, aucune déformation n'est appliquée au gel il est donc plus résistant et présente un module de conservation plus élevé. Si le mélange est réalisé avant le dépôt, une déformation est appliquée avant l'étude et le gel est par conséquent moins solide. Finalement cela démontre deux choses. D'une part, le système est très sensible et donc le dépôt et la manipulation de l'association sont très compliqués car un petit changement du milieu va complètement changer les propriétés viscoélastiques du matériau. D'autre part si le gel est

déjà formé, il est plus sensible aux déformations alors que la formation in situ du gel va le rendre plus résistant.

Ainsi, la dernière étude vise à déterminer le temps de gélification du système. Pour cela, le mélange est directement fait lors du dépôt. Les mesures sont courtes et espacées toutes les 10 minutes de sorte à minimiser l'impact du cisaillement qu'elles provoquent sur le temps de gélification mesuré.

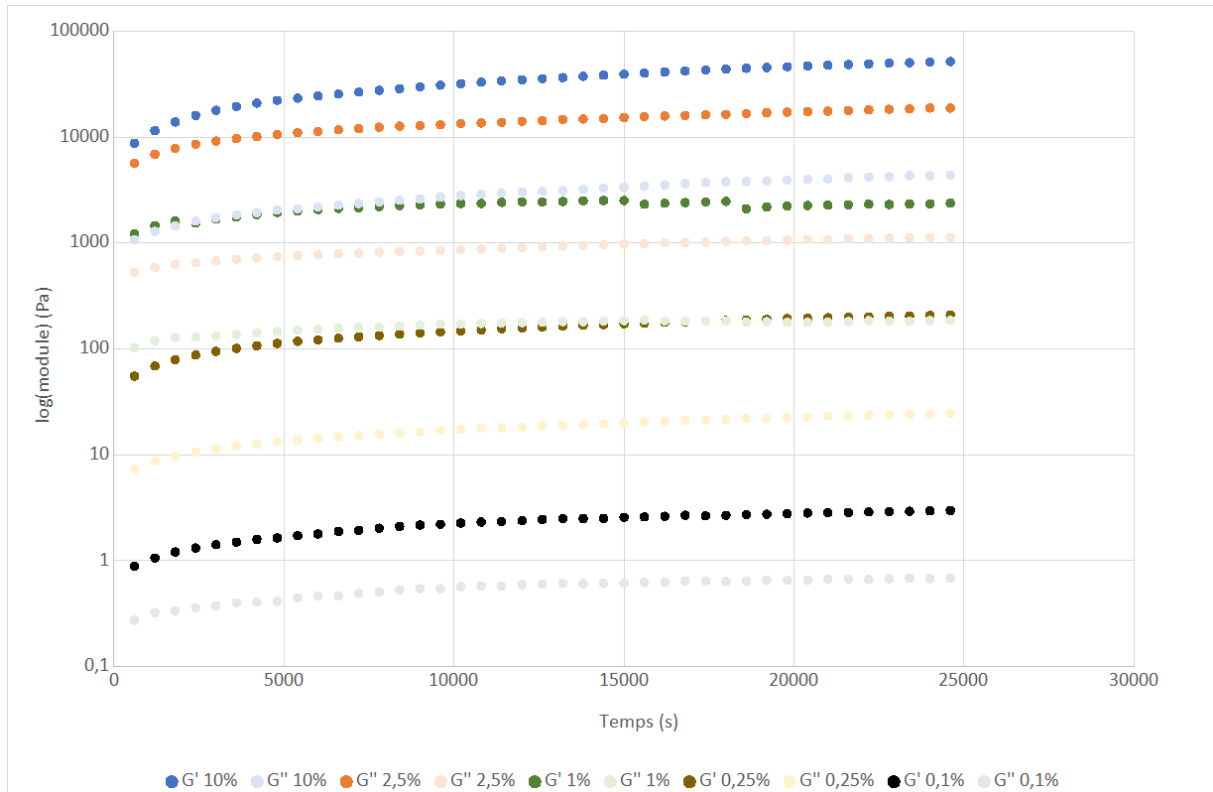
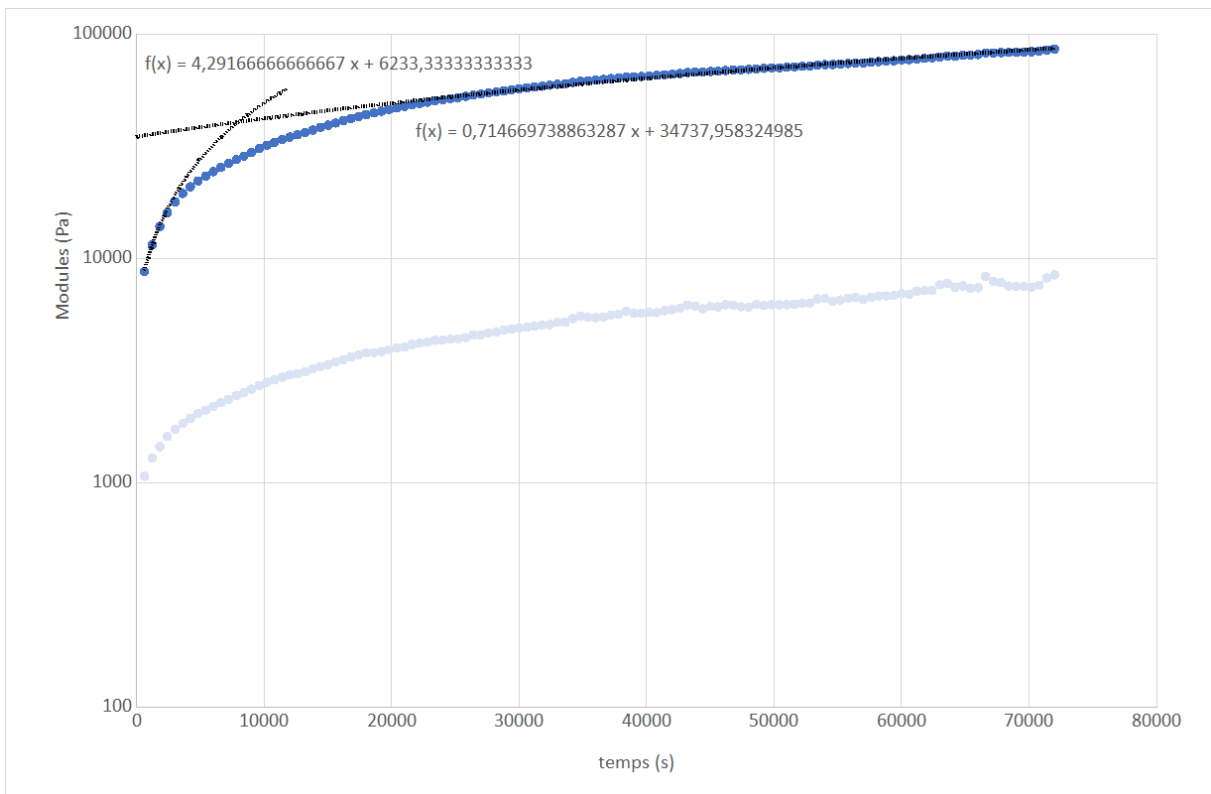


Figure 71 : Etude de gélification en fonction de la concentration en assemblage peptide/polymère à l'équivalence

L'étude présentée sur la Figure 71 montre que quelle que soit la concentration, le mélange peptide/polymère a un caractère solide marqué et celui-ci augmente avec la concentration. Même si décrire cette étude comme la détermination du temps de gélification n'est pas exacte, deux régimes sont observés, un régime où les modules augmentent rapidement et un régime où l'augmentation est très légère. C'est le temps pour atteindre ce régime qui est déterminé comme nécessaire à la solidification du gel. Dans les travaux de Capito et al.<sup>28</sup>, l'association se propage dans les deux milieux afin de former une interface. Le temps du



régime « rapide » a été hypothétiquement déterminé comme le temps pour former cette interface. En effet cette interface est un solide formé à partir de deux solutions aqueuses comme l'est le solide formé dans notre cas il n'est donc pas aberrant d'associer les deux phénomènes. La Figure 72 ci-dessous permet le calcul précis de ce temps de gélification. La droite de tendance pour la partie rapide est recourbée car l'échelle des ordonnées est logarithmique. La résolution des équation de courbes de tendance permet de déterminer le temps de gélification comme étant de 8530s soit 2h et 22min.



*Figure 72 : calcul du temps de gélification pour un mélange fait à 10% massique à l'équivalence*

Cette étude a permis de déterminer un temps de gélification (2h 22min) utilisé pour la création de matériau (voir partie suivante). L'information principale est que le système créé est solide quel que soit la concentration ou la déformation appliquée. Pour résumer, le système est un gel formé de micelles cylindriques de peptides amphiphiles, renforcé par une association avec le PSSNa. Il nous semble pertinent dans ce cas de travailler à l'équivalence de sorte à assurer une reproductibilité et répétabilité satisfaisante.



## Conclusion

L'association peptide amphiphile est donc à son paroxysme lorsque toutes les charges sont écrantées. Les interactions sont maximisées tout en laissant le temps au matériau de se former. Dans cette étude, plutôt que de varier la taille du polymère, pour faire varier les forces d'interaction, c'est le ratio de charge qui a été modifié. Le compromis est donc obtenu pour former un matériau solide. L'AFM s'est révélé être la meilleure méthode pour comparer ces différents ratios mais la gélification rend le dépôt plus délicat.

En effet, il est possible de créer un matériau avec des propriétés mécaniques très élevées module de conservation pouvant atteindre  $10^5$  Pa mais ce caractère très solide n'est atteint que pour des temps très élevés. Le caractère solide ne fait plus aucun doute quand les modules de conservation et de perte sont comparés. Toutefois le comportement de rhéofluidifiant peut poser un problème si les contraintes apportées au matériau sont trop importantes. Mais ce comportement peut faciliter la mise en forme du matériau. Sans surprise, la résistance mécanique est meilleure pour des concentrations de mélange plus élevées.

Afin de former un matériau solide né de l'association de peptide amphiphiles et de polystyrène sulfonate il est donc nécessaire d'effectuer un mélange à l'équivalence des charges à une concentration massique de mélange de 10% ou plus et enfin le temps d'attente pour obtention de ce matériau est de 2h et 22min. Une dernière étape est nécessaire pour former le matériau membranaire. Une méthode de mise en forme adaptée doit alors être employée afin de combiner tous ces paramètres pour obtenir une membrane.

Matériau  
Membranaire

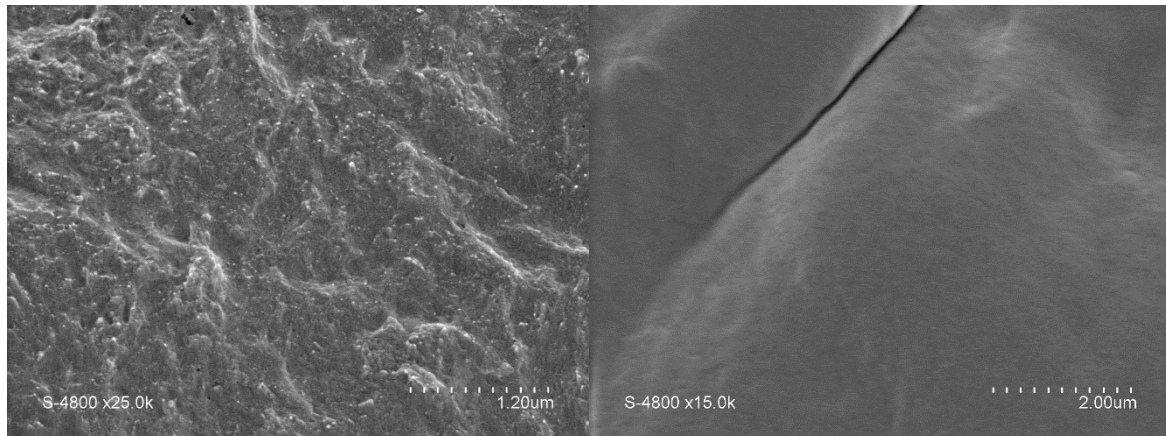
Conclusion .....	104
Matériau Membranaire .....	105
I-Mise en forme du matériau .....	107
I-1 Membranes autosupportées.....	107
I-1.a Drop-casting .....	107
I-1.b Tape-casting .....	110
I-1.c Bain de coagulation et dip-coating.....	111
I-1.d Spray-coating .....	112
I-2 Support de membrane .....	114
I-2.a Imprégnation puis tape-casting .....	115
I-2.b Tape casting puis spray-coating.....	116
II-Etude du matériau membranaire.....	118
II-1 Calcul de flux et résistance à la pression.....	118
II-2 Seuil de coupure.....	121

## I-Mise en forme du matériau

### I-1 Membranes autosupportées

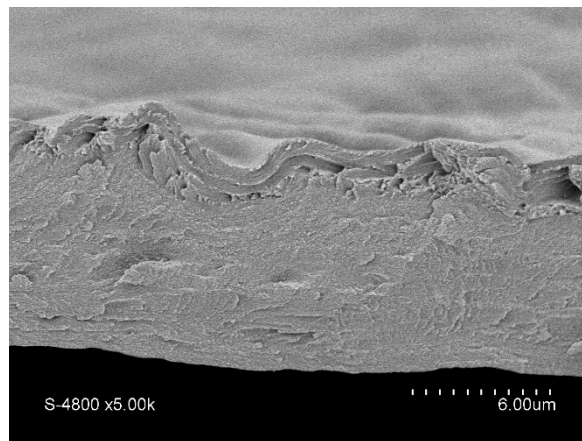
#### *I-1.a Drop-casting*

Les essais de dépôts ont été réalisés en premier lieu sur des supports de verre afin de former des membranes autosupportées. La première méthode de mise en forme du matériau a été celle précédemment utilisée pour les observations et analyses des propriétés mécaniques, à savoir le dépôt d'une couche par-dessus l'autre en drop-casting des solutions de peptide et de polymère. Les matériaux ont toujours été réalisés avec des solutions dont les concentrations permettent de travailler à l'équivalence du nombre de charges. Néanmoins, il faut noter que l'interaction recherchée se manifeste d'abord à l'interface des solutions dès leur contact avant de se propager vers le cœur des solutions. La notion d'équivalence des charges est donc ici moyennée à l'ensemble des solutions alors qu'une déviation à l'interface est tout à fait possible. Pour tendre vers des applications en filtration membranaire, la technique du « tape-casting » a été préférée dans un second temps. L'étalement d'une des deux solutions à l'aide d'un couteau calibré permet de contrôler l'épaisseur du matériau et d'obtenir ainsi une membrane plus homogène. Deux variantes ont été explorées selon l'ordre de dépôts des solutions de PSSNa et de peptide amphiphile.



*Figure 73 : Image MEB du matériau de filtration formé par tape-casting d'une solution de PSSNa 6 mg dans 0,1 mL d'eau mQ puis drop-casting d'une solution de peptide amphiphile 15 mg dans 0,1 mL d'eau mQ, face du dessous (gauche) et face du dessus (droite)*

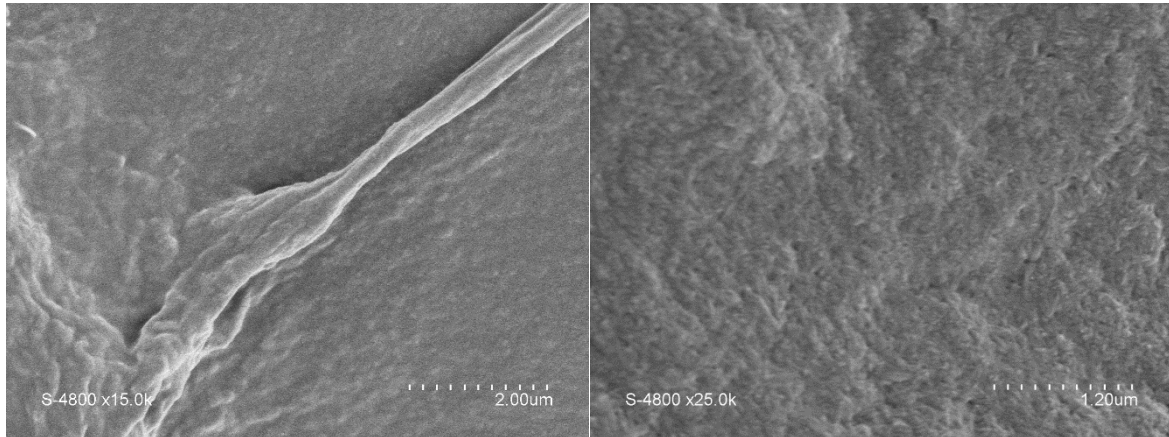
Grâce à l'étude des propriétés mécaniques réalisée précédemment en rhéologie, un temps déterminé comme le temps de « solidification » du matériau a été déterminé et ce temps (2h22min) a été utilisé lors de la création des matériaux présentés dans cette partie. Il est nécessaire d'attendre ce temps de solidification ou de stabilisation avant d'opérer toutes modifications. Une fois ce temps dépassé, les matériaux sont immergés dans de l'eau déionisée pour désorber le polymère et les peptides amphiphiles n'ayant pas interagi suffisamment, avant d'être conservés dans l'eau déionisée. Dans un premier temps, la solution de PSSNa a été étalée sur un support en verre pour une épaisseur de 400  $\mu\text{m}$  avant d'être recouverte par la solution de peptide amphiphile. Le matériau obtenu, mécaniquement fragile, a été fracturé dans l'azote liquide avant d'être observé par Microscopie Électronique à Balayage (MEB) (Figure 73). Ces échantillons n'ont pu être observés en AFM comme dans les parties précédentes car le matériau n'est pas plan et l'observation des sections n'est pas permise par l'appareil en notre possession.



*Figure 74 : Image MEB d'une section transversale du matériau de filtration formé par tape-casting d'une solution de PSSNa puis drop-casting d'une solution de peptide amphiphile*

L'image MEB de la section transversale (Figure 74 ci-dessus)) montre une épaisseur d'environ 9  $\mu\text{m}$  alors que la méthode de tape-casting utilisée dépose une couche de 400  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Cette différence d'épaisseur est due à la formation du matériau. Les travaux de Zha et al<sup>29</sup> ont montré que l'épaisseur du matériau dépend de la force d'interaction existant entre les deux espèces à l'interface. Dans le cas d'une interaction plus faible, une inter-diffusion des solutions est observée et l'interface s'épaissit pour atteindre une dizaine de micromètres. C'est ce qu'il se passe pendant les 2 h22 min d'attente avec immersion dans l'eau. Dans notre cas, le film

obtenu ne mesure que 9  $\mu\text{m}$ , attestant d'une interaction forte entre PSSNa et peptide amphiphile. Sur la face du dessus qui était côté peptide, un matériau très dense et lisse est observé. La face du dessous présente une paroi plus irrégulière mais tout aussi dense. Un matériau dense, ou en tout cas ne présentant aucune macroporosité, ainsi que fragile ne permet pas d'envisager une application en tant que membrane.



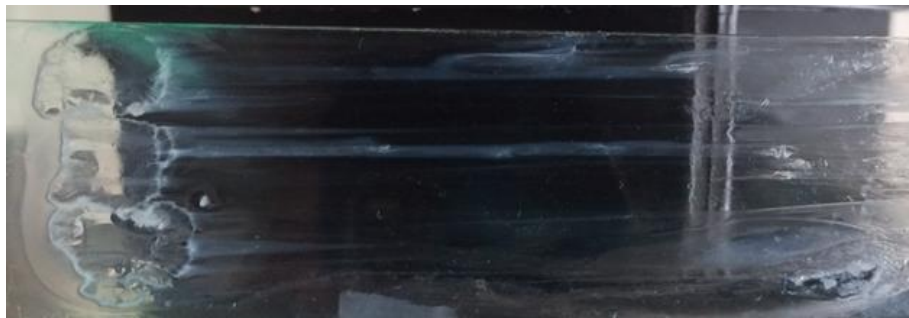
*Figure 75 : Image MEB du matériau de filtration formé par tape-casting d'une solution de  $C_{16}-V_3A_3K_3G-NH_2$  puis drop-casting d'une solution de PSSNa, face du dessous et face du dessus*

La seconde façon utilisée pour former une membrane est la même que précédemment mais en inversant l'ordre d'application des couches. La solution de peptide amphiphile est d'abord étalée par « tape-casting » avant d'être recouverte par une solution de PSSNa. La fragilité observée précédemment est également présente sur le matériau. L'observation en MEB ne montre pas de différences significatives avec le premier matériau (Figure 75). Le matériau n'est pas assez solide pour être observé en AFM et pour envisager une application en tant que membrane. En raison d'une plus grande homogénéité du film obtenu dans ce dernier cas, nous avons décidé de conserver cet ordre d'application des solutions sur le support pour la suite des expériences. La méthode de drop-casting est en revanche inadaptée pour ce type de mise en forme. D'une part, même si la quantité de solution ajoutée est contrôlée, elle reste peu précise. D'autre part, l'ajout de la seconde solution par drop-casting de sorte à recouvrir la première tend à créer des motifs au matériau final sous la forme de disques. En effet, la goutte de solution de PSSNa qui tombe crée très rapidement une forte interaction à l'interface avec la solution de peptide amphiphile en dessous et le film formé gardera en partie la trace de la forme sphérique des gouttes. Notons qu'une diminution de

l'épaisseur de la couche déposée par tape-casting à 250µm n'a conduit à aucune amélioration. Les films obtenus sont ainsi morcelés en plusieurs parties sans cohésion entre elles et par conséquent le résultat est un ensemble de disques observables en MEB mais ne pouvant être utilisés pour de la filtration.

#### *1-1.b Tape-casting*

Le tape-casting permettant un contrôle de l'épaisseur de la couche de solution déposée, nous avons exploré la possibilité de déposer les deux couches de solutions par tape-casting, l'une sur l'autre. Pour cela, la solution de peptide amphiphile est d'abord étalée sur un support en verre pour une épaisseur de 250 µm. La solution de PSSNa est ensuite étalée sur cette première couche également par tape-casting mais cette fois avec un couteau disposant d'une hauteur totale de 400 µm. L'épaisseur de la seconde solution étalée sera alors de 150 µm. Comme la formation du solide à l'interface est très rapide au démarrage de l'interaction, la solution de PSSNa est déposée en amont du front de la solution de peptide amphiphile étalée afin que le contact ne se fasse uniquement que quand le PSSNa est étalé par le couteau et non avant. Il est à noter que les difficultés éventuelles d'étalement dues à la différence notable de viscosité entre les deux solutions semblent être compensées par une grande réactivité à l'interface.



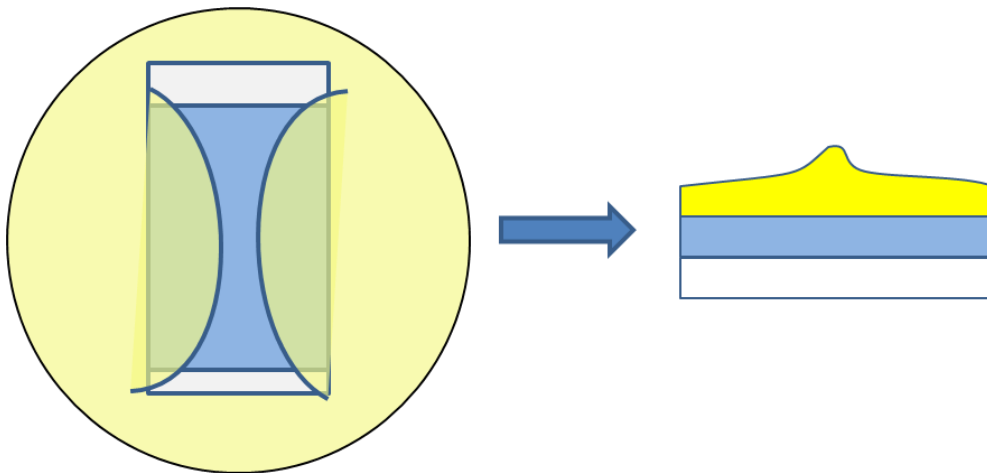
*Figure 76 : photo de la lame de verre sur laquelle a été réalisée les dépôts successifs de peptide et de PSSNa par tape-casting*

Ce premier essai a été réalisé (Figure 76) avec les dépôts de PSSNa directement sur la première couche avant l'étalement. L'observation principale est que l'interaction rapide entraîne la formation avant l'étalement de solide autoassemblé (zones opaques). Cela empêche donc la formation d'un film homogène. Un dépôt en inversant l'ordre d'étalement des solutions a été

réalisé mais le résultat est similaire. Cette méthode ne permet pas de former de film ou de matériau du tout. La seconde observation est que l'interaction rapide va former un solide qui est ensuite entraîné par le couteau lors du deuxième passage pour étaler la solution de polymère. Cette méthode n'a pas donné de membranes observables et n'a donc pas été retenue pour former le matériau.

#### *1-1.c Bain de coagulation et dip-coating*

Il n'est pas totalement exact d'appeler cette méthode un bain de coagulation car celle-ci consiste à plonger un matériau encore liquide dans un non-solvant afin de le précipiter. Dans le cas présent, le non-solvant est remplacé par une solution du PSSNa. La précipitation va donc opérer mais en se créant à l'interface des deux milieux pour ensuite diffuser et former la membrane souhaitée. De la même manière, il est possible d'imaginer une technique de dip-coating : plonger la couche de peptide verticalement dans une solution de PSSNa et la retirer aussitôt. Cette seconde méthode semble difficilement mise en œuvre dans la mesure où la solution de peptide même concentrée (plus 15% en masse) n'est pas visqueuse du tout et ne tient pas sur un support tel que le verre ou un wafer de silicium.



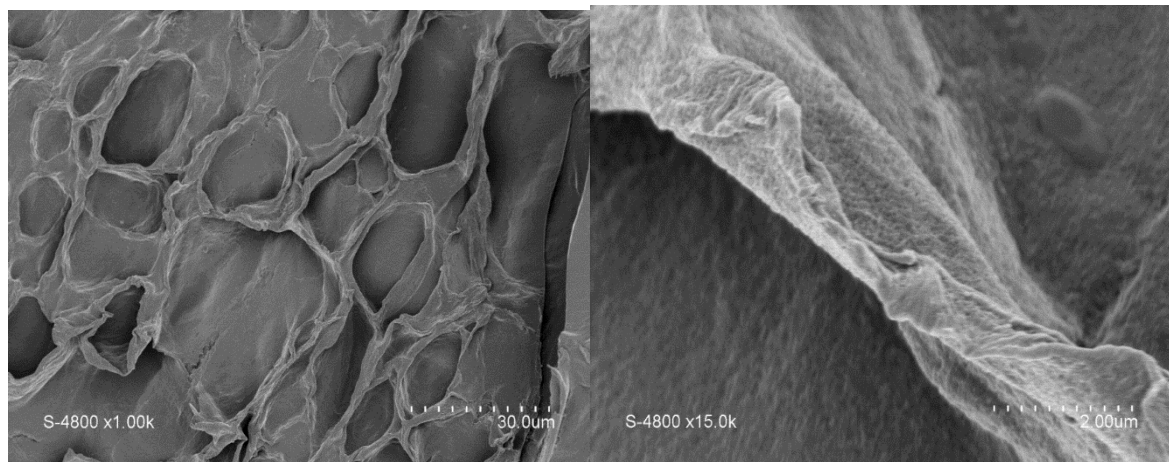
*Figure 77 : schéma de formation de la membrane pendant le bain de coagulation*

Cette méthode de dépôt présente également un inconvénient majeur. Le front de solvant créé quand la lame de verre est plongée dans le bain forme une crête au milieu ou en haut de film. Cette crête rend le matériau inhomogène non plat comme représenté sur la Figure 77 ci-dessus. Pour des applications de filtration, il est nécessaire d'obtenir un matériau homogène.



*I-1.d Spray-coating*

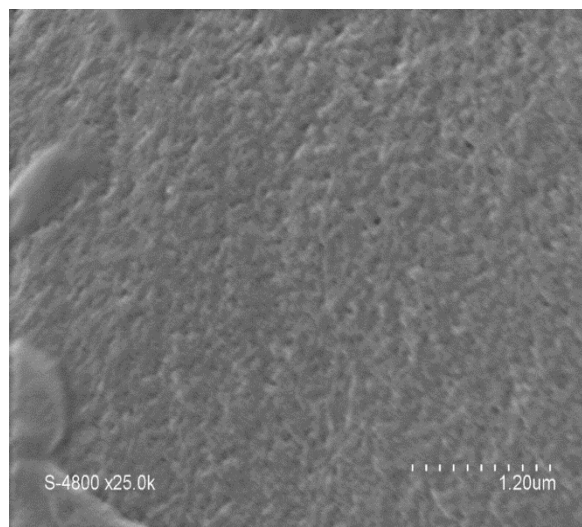
La dernière méthode de dépôt étudiée est le spray-coating. Pour cette dernière méthode, la solution de peptide est déposée par tape casting avec une épaisseur de 250 $\mu$ m. Sur cette couche est déposée par spray-coating le PSSNa. Le principe du spray-coating est un fluide injecté dans une buse qui va projeter de très fines gouttelettes. Les gouttelettes vont coalescer pour former une couche homogène. Différents paramètres peuvent être ajustés pour modifier l'épaisseur de la couche formée. Cette méthode semble la plus adaptée au premier abord car il n'y a pas d'effet direct sur la couche de peptide amphiphile et donc pas de modifications majeures. Les paramètres modifiables sont la hauteur de la buse d'injection, la vitesse de passage de la buse, le débit d'injection et le nombre de couches déposées. Les paramètres utilisés pour cette méthode sont : une seule couche avec trois sections verticales, une buse au niveau le plus bas (60 mm de la surface) pour limiter l'impact des gouttelettes sur la couche de peptide, un débit d'injection faible pour permettre de augmenter la taille des gouttelettes leur permettant de fusionner plus facilement et enfin une vitesse de déplacement de la buse faible pour permettre d'accumuler plus de gouttes sur une même surface ce qui augmente légèrement l'épaisseur de la couche déposée.



*Figure 78 : Image MEB du matériau de filtration former par tape-casting d'une solution de  $C_{16}-V_3A_3K_3G-NH_3$  30 mg dans 0,2 mL puis spray-coating d'une solution de PSSNa*

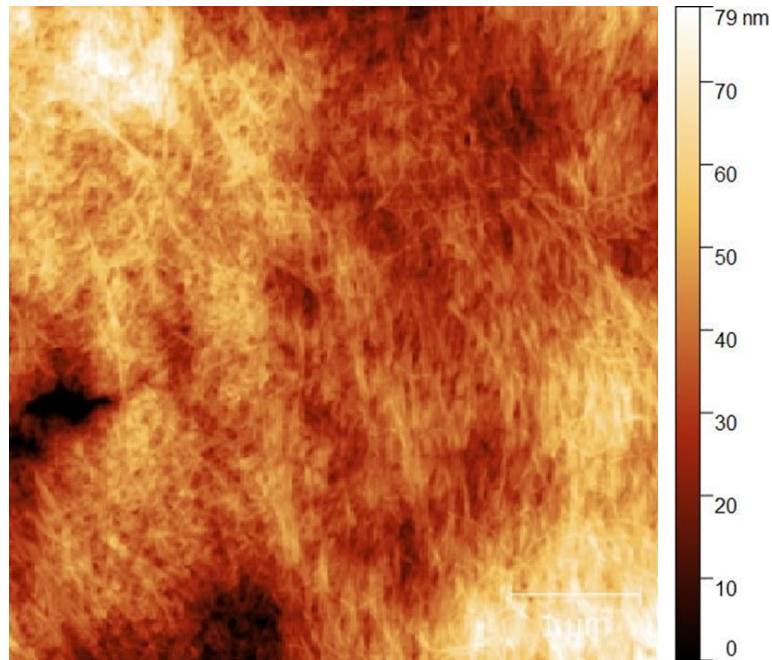
La Figure 78 ci-dessus montre les impacts des gouttelettes. Au même titre que pour le drop-casting et le bain de coagulation, la vitesse d'interaction fige le système rapidement. Les

gouttes de solution aqueuse de PSSNa pénètrent légèrement dans la couche de solution aqueuse de peptide amphiphile. La solution de peptide remonte entre les gouttelettes et cela va former des parois solides de même nature que la membrane elle-même. Cette paroi est visible plus en détail sur l'image de droite. On remarque que l'épaisseur de cette membrane est très faible : environ 300 nm. Cette épaisseur n'est pas conditionnée uniquement par la force d'interaction des espèces. L'espacement entre les gouttes va aussi influencer sur cette paroi. Au fond de chaque point d'impact, la surface observée est a priori poreuse et très similaire à la membrane formée avec le drop-casting (Figure 79).



*Figure 79 : Image MEB du matériau de filtration formé par tape-casting d'une solution de C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>3</sub> 30 mg dans 0,2 mL puis spray-coating d'une solution de PSSNa image observée au fond d'un cratère formé par un impact de gouttelette de solution de PSSNa*

Cette méthode permet la formation d'un film homogène qui est observable en AFM mais le matériau obtenu reste tout de même faible mécaniquement.



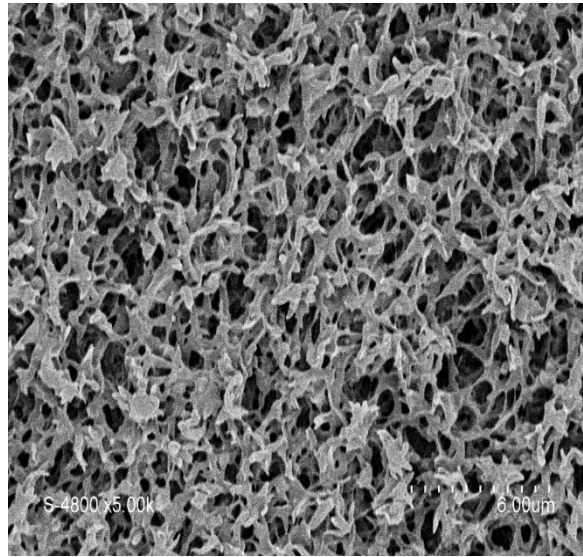
*Figure 80 : Image AFM en topographie au fond des points d'impact des gouttelettes de PSSNa obtenue en tapping mode, dépôt sur verre*

Sur l'image AFM (Figure 80) la structure fibreuse du peptide est observée et le diamètre moyen des fibres est de 43 nm. La membrane créée est très fragile ce qui nous empêche de l'utiliser telle quelle en filtration. Le système peptide amphiphile/polystyrène sulfonate ne permet pas la formation de membranes autosupportées. Il est donc nécessaire de trouver un support adéquat.

## I-2 Support de membrane

Le support de membrane choisi pour déposer la membrane est le poly(fluorure de vinylidène) (PVDF) hydrophile. Cette membrane est choisie pour sa structure très poreuse, son caractère hydrophile important. La structure très poreuse permet de ne pas modifier la perméabilité de la membrane peptide/polymère. Le caractère hydrophile permet de fixer le peptide puis la membrane une fois créée. La membrane PVDF hydrophile est opaque il est donc difficile de voir à l'œil nu l'association peptide amphiphile - polymère une fois sur le PVDF. Grâce à ce support la membrane peut être observée en AFM et en MEB. La fracture

dans l'azote liquide est beaucoup plus aisée et les tests de filtrations peuvent être réalisés. La Figure 81 ci-dessous montre la structure poreuse de la membrane en PVDF hydrophile.



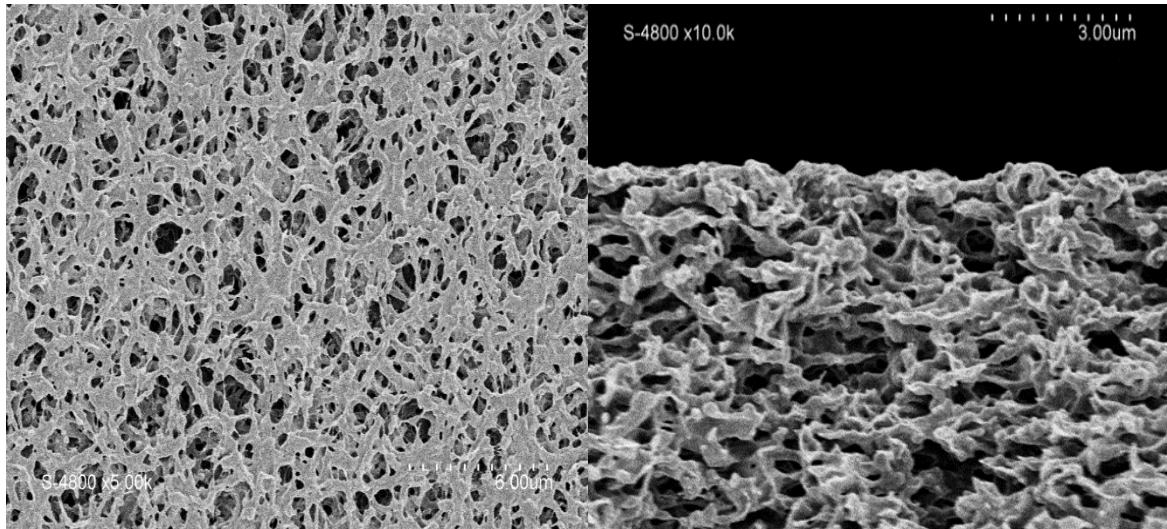
*Figure 81 : Image MEB de la membrane en PVDF hydrophile*

Avec cette structure très aérée et la méthode de dépôt, il est vraisemblable que la solution aqueuse de peptide amphiphile s'infiltrera pour partie dans la structure poreuse et hydrophile de la membrane avant de réagir avec le polymère ce qui devrait assurer une excellente cohésion entre le support et la membrane nouvellement formée.

#### *1-2.a Imprégnation puis tape-casting*

Afin de tester la stratégie précédemment énoncée, une première méthode de dépôt a été réalisée : le film de PVDF est immergé dans une solution de peptide amphiphile et la solution de polymère est ajoutée par tape-casting dessus.



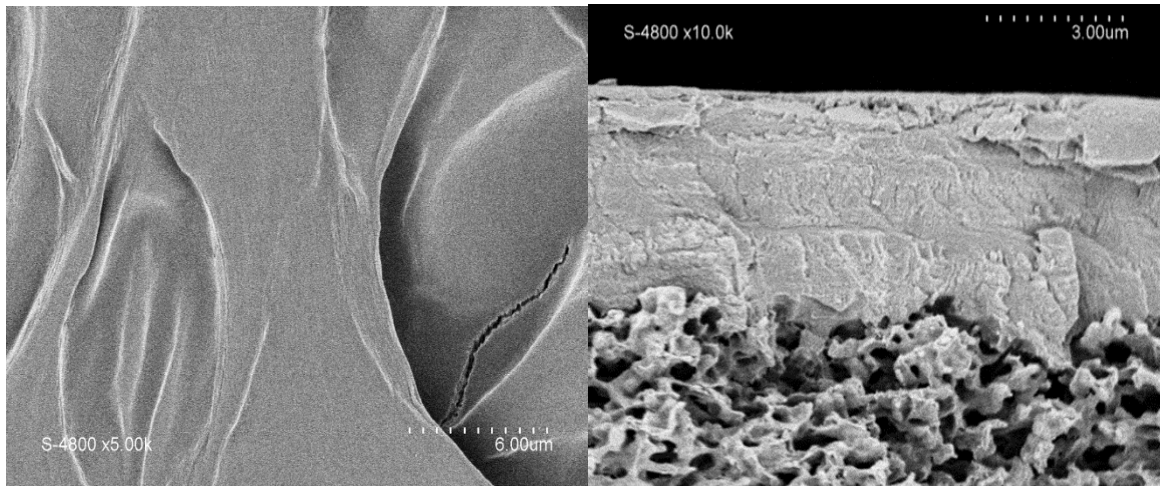


*Figure 82 : Image MEB du film déposé sur PVDF hydrophile imprégnation du peptide puis tape-casting PSSNa, face du dessus et section*

L'image de la surface (Figure 82 gauche) montre que le matériau s'est bien incorporé dans la structure du PVDF mais l'image en section (Figure 82 droite) montre que cette insertion ne s'est pas faite dans l'épaisseur du PVDF, uniquement en surface. Sans recouvrir la totalité de la surface de la membrane PVDF, la formation à la surface de cette très fine couche montre tout de même une très bonne interaction entre le PVDF et la membrane. Il est à noter que la membrane PVDF, de nature hydrophobe, est traitée en surface pour le rendre hydrophile en faisant apparaître des charges négatives. Ces dernières peuvent ainsi interagir avec les cations présents sur le peptide amphiphile.

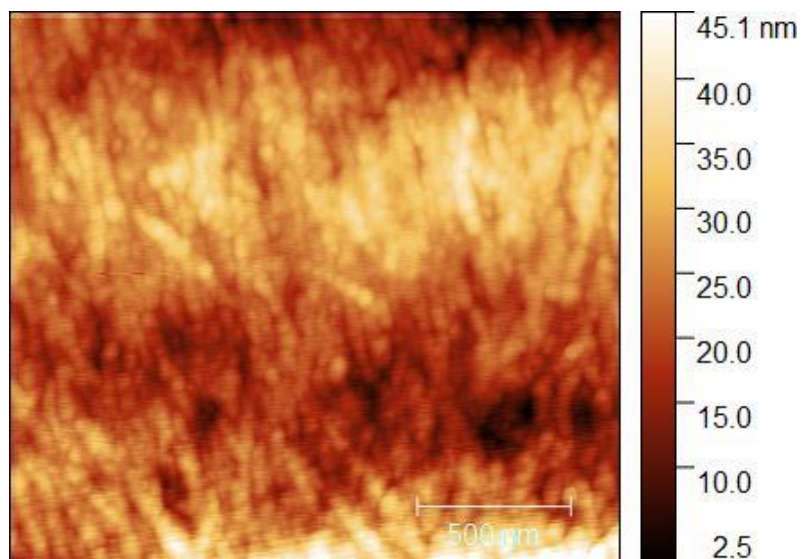
#### *1-2.b Tape casting puis spray-coating*

La méthode utilisée est la même que le dépôt sur verre. Avec l'épaisseur de la membrane en PVDF, l'épaisseur de la solution de peptide amphiphile déposée est plus faible car la même hauteur de couteau que précédemment (250 $\mu$ m) est utilisée.



*Figure 83 : Image MEB du matériau de filtration formé par tape-casting d'une solution de C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>3</sub> 30 mg dans 0,2 mL puis spray-coating d'une solution de PSSNa face du dessus (gauche) et section (droite)*

Sur la Figure 83 ci-dessus, une épaisseur de 3 μm semblant bien insérée dans la membrane PVDF est observée. Des traces d'impacts de gouttelettes sont tout de même présentes mais leur nombre et leur profondeur sont bien moins marqués que lors du dépôt sur verre. Cela est due à la diminution de l'épaisseur de la couche de peptide. Ces impacts étant moins profonds, le matériau est plus adéquat pour des mesures de filtration car il est plus plan et l'observation en AFM est également plus aisée. La surface supérieure (Figure 83 gauche) semble plus dense à cette échelle mais l'observation en AFM (Figure 84) montre la structure fibreuse attendue. Le diamètre des fibres mesuré sur cette image AFM est de l'ordre de 45 nm.



*Figure 84 : : Image AFM en topographie matériau de filtration formé par tape-casting d'une solution de C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>3</sub> 30 mg dans 0,2 mL puis spray-coating d'une solution de PSSNa (fond de cratère formé par impact de gouttelette de PSSNa)*

Les différentes méthodes de dépôt testées nous ont permis de cheminer vers un matériau supporté par une membrane en PVDF. Le tape-casting a été déterminé comme la meilleure méthode pour le dépôt du peptide amphiphile. Le spray-coating est la meilleure méthode pour le dépôt d'un liquide sur un liquide.

## II-Etude du matériau membranaire

### II-1 Calcul de flux et résistance à la pression

La membrane est un disque de diamètre 25 mm. Il est déposé au fond d'une cellule de filtration en configuration frontale pouvant contenir 10 mL. Le flux doit arriver du côté de la membrane peptide amphiphile/polymère pour éviter que celle-ci se détache. Sur le disque est déposée une couche de polyester non tissé afin de protéger le film peptide amphiphile polymère. Grâce à sa faible résistance au flux d'eau, cette couche non tissée ne va influencer en rien sur la valeur du flux mesuré. Pour mesurer la résistance à la pression, le flux et la perméabilité du matériau, il est nécessaire de faire tout en faisant passer de l'eau au travers de la membrane des montées et descentes en pression. On effectue alors plusieurs cycles comme représenté sur la Figure 85 ci-dessous.

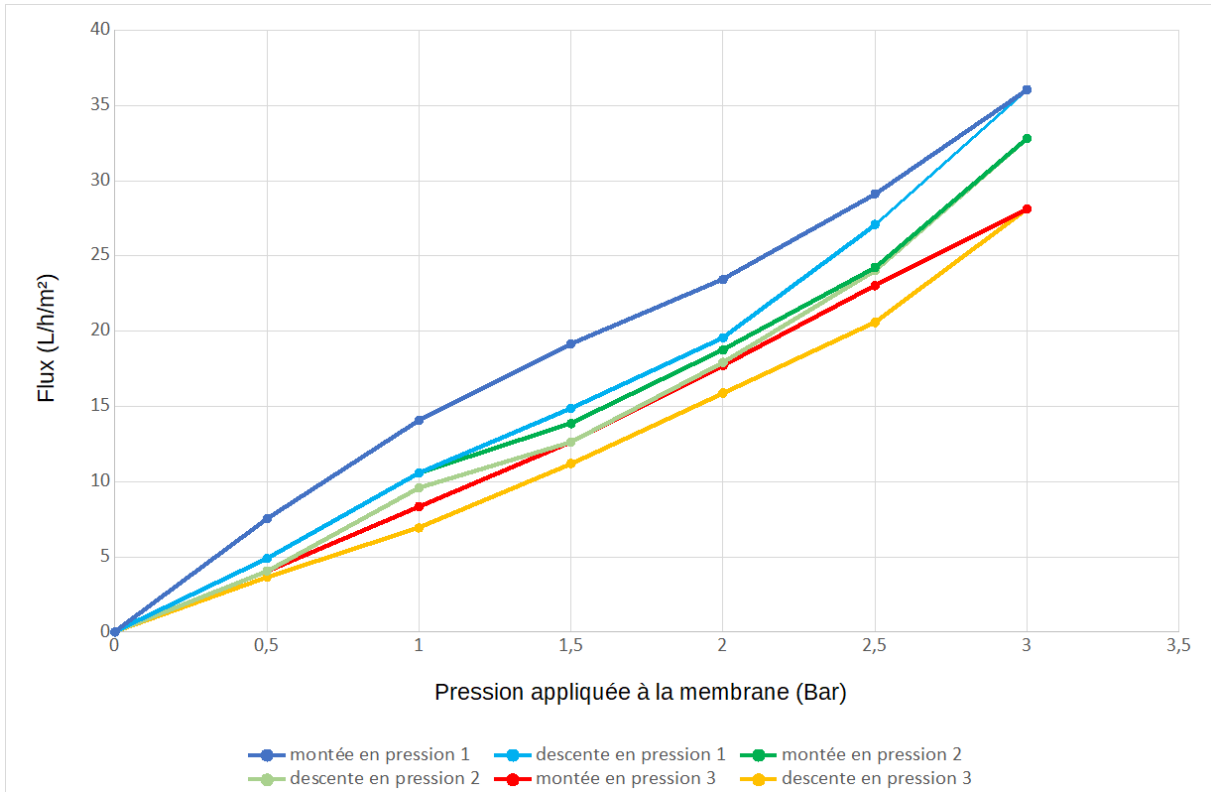


Figure 85 : cycles de montée et descente en pression pour la membrane de filtration premier cycle en bleu second cycle en vert troisième cycle en rouge

Sur ce graphique les différents cycles de montée et descente en pression entraîne une diminution du flux d'eau passant par la membrane mais cette diminution est de moins en moins significative au fur et à mesure que les cycles avancent. C'est une fois que le flux ne change plus que la membrane est dite stable. Il est tout de même important de noter que les flux sont faibles.

Équation 1 : Calcul du flux

$$J = Q / S$$

Flux (L/h/m<sup>2</sup>)
Débit (L/h)
Surface (m<sup>2</sup>)

Un maximum de 36 L/h/m<sup>2</sup> est atteint pour une différence de pression de 3 bar lors du premier cycle. Cela signifie que pour la surface de notre membrane, pour obtenir 10 mL de perméat, il faut 35 min à une pression de 3 bar. Ce résultat peut s'expliquer par une porosité de la membrane très réduite et/ou une faible taille des pores.



Équation 2 : calcul de la perméabilité

$$L_p = J / P$$

Perméabilité (L/h/m<sup>2</sup>/bar) Flux (L/h/m<sup>2</sup>) Pression (bar)

Une certaine linéarité des courbes de flux présentées nous permet d'estimer la perméabilité moyenne des membranes pour chaque cycle (Figure 86). Pour que la membrane soit reconnue comme étant stable, la perméabilité ne doit plus diminuer.

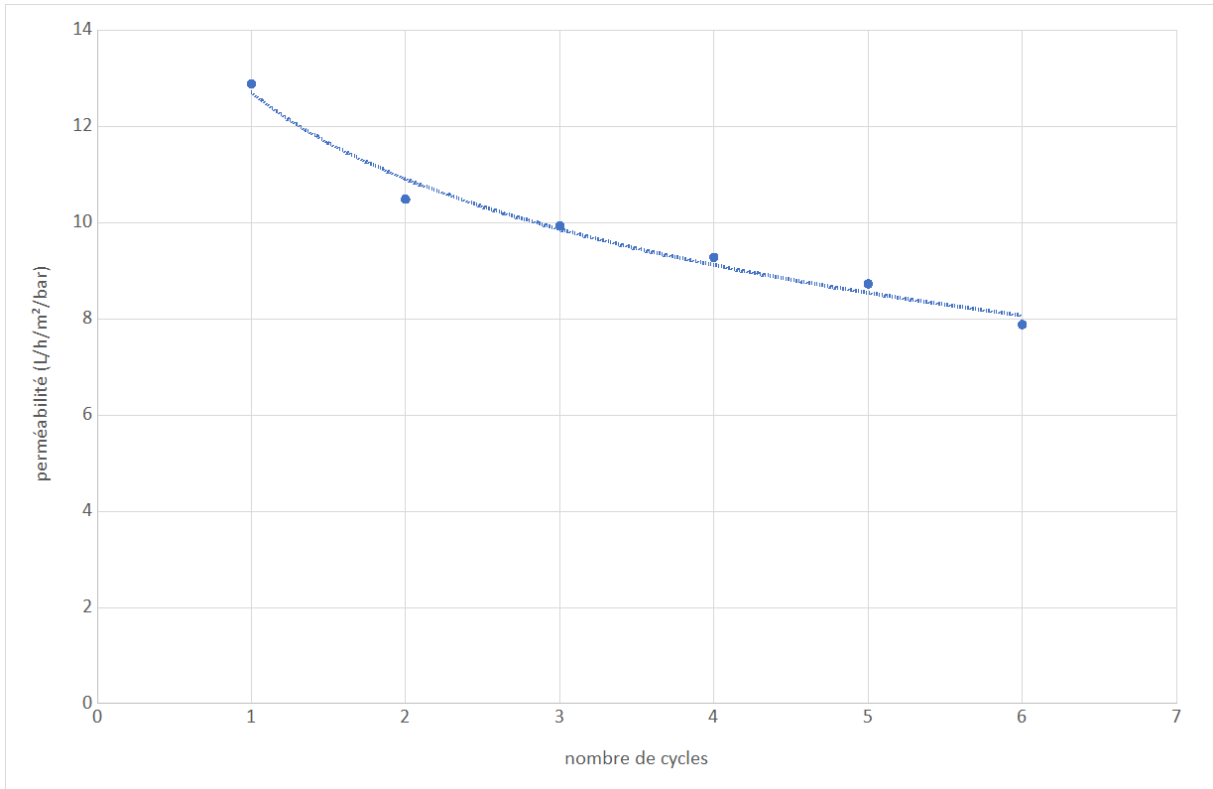


Figure 86 : graphique de la perméabilité en fonction du nombre de passages

La diminution observée sur la figure ci-dessus tend à se stabiliser après trois cycles. Cette étude démontre donc la résistance de la membrane à des pressions allant jusqu'à 3 bar. La stabilité relative de la perméabilité permet de passer à l'étude suivante mais est obligatoire pour chaque membrane formée. Il est nécessaire d'avoir une membrane stable pour opérer la filtration membranaire.

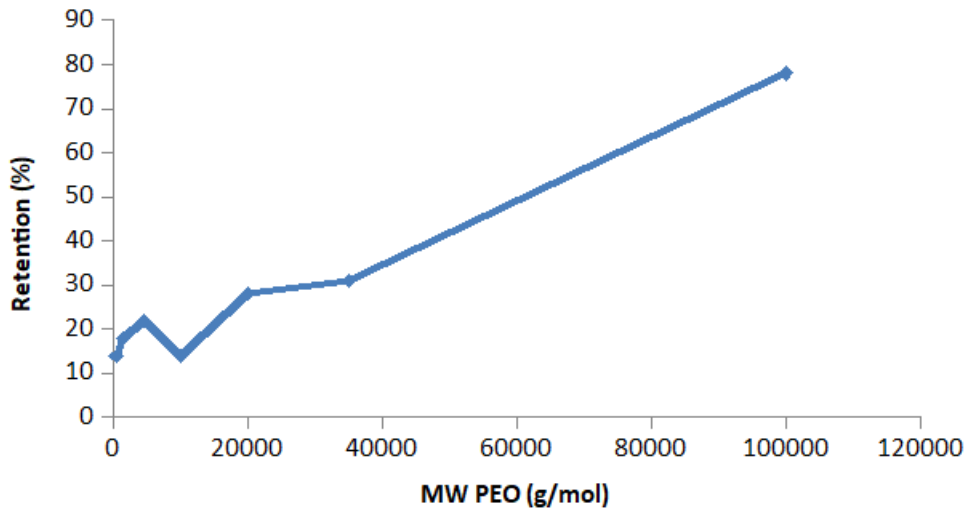
## II-2 Seuil de coupure

La mesure du seuil de coupure donne une indication sur la taille des pores de la membrane. Des éléments (molécules, polymères ...) de tailles différentes sont filtrés au travers de la membrane et seront plus ou moins retenus en fonction de leur taille. En reportant dans un graphique le taux de rétention des objets en fonctions de leur masse molaire, nous pouvons déterminer un seuil de coupure, étant défini pour un taux de rétention de 90%. Pour cela le perméat et le rétentat sont analysés en HPLC dans l'eau mais sans colonne afin de calculer la rétention grâce à la formule suivante :

*Équation 3 : Calcul de la rétention*

$$R = 1 - \frac{\text{Concentration en perméat}}{\text{Concentration en rétentat}}$$

Les  $C_p$  et  $C_R$  sont mesurés en fonctions des aires des chromatogrammes. La pression de travail pour cette étude est 1 bar. Même si la membrane peut résister à des pressions plus élevées, il est nécessaire de baisser la pression lorsque des éléments autres que de l'eau passe au travers de la membrane. Les éléments choisis pour cette étude sont des polyéthylène glycol (PEG). Ils n'interagissent pas ou peu avec la membrane et il existe une très large gamme de taille. Les masses molaires des PEG testés sont compris entre 400 g/mol et 100 000 g/mol (Figure 87).



*Figure 87 : Détermination du seuil de coupure de la membrane*

Comme énoncé précédemment, le seuil de coupure d'une membrane est défini par la masse molaire correspondant à 90% de rétention. Pour une membrane classique, la courbe obtenue devrait prendre la forme d'un « S ». Dans le cas d'une membrane peu performante, la courbe se transforme en une droite croissante. Ces résultats démontrent de la difficulté des travaux de filtration réalisés sur cette membrane. Lors des toutes premières études, la rétention calculée était la même quelle que soit la taille des PEG utilisés. De plus la membrane est sollicitée à chaque passage des PEG car en premier lieu, les PEG ne pouvaient être passés tous ensembles. Quelques aberrations sont aussi apparues telles que des rétentions très élevées pour des masses molaires basses : une rétention de plus de 80% observée pour un PEG de masse de 200 g/mol. Ces résultats laissent penser que la perméabilité est trop faible pour espérer un tri efficace des objets à filtrer en fonction de leur taille. En effet lorsque le flux d'eau est faible, les chaînes de PEG peuvent se déformer et s'allonger pour passer dans les pores ce qui empêche toute interprétation basée uniquement sur la taille hydrodynamique des pelotes statistiques de polymère.

Afin de compléter cette étude une colonne a été montée sur l'HPLC initialement utilisée sans colonne pour séparer les masses et observer si le rétentat et le perméat sont différents et qu'aucun élément de la membrane ne s'est détaché ce qui aurait pu également fausser la mesure. Lors de cette étude, il a été possible de filtrer des mélanges de PEG de taille différente car les échantillons de perméats et de rétentats sont ensuite séparés dans la

colonne. Il est alors possible de les reconnaître grâce à leur temps de rétention si des standards sont analysés au préalable nous permettant de déterminer ces temps de rétentions spécifiques.

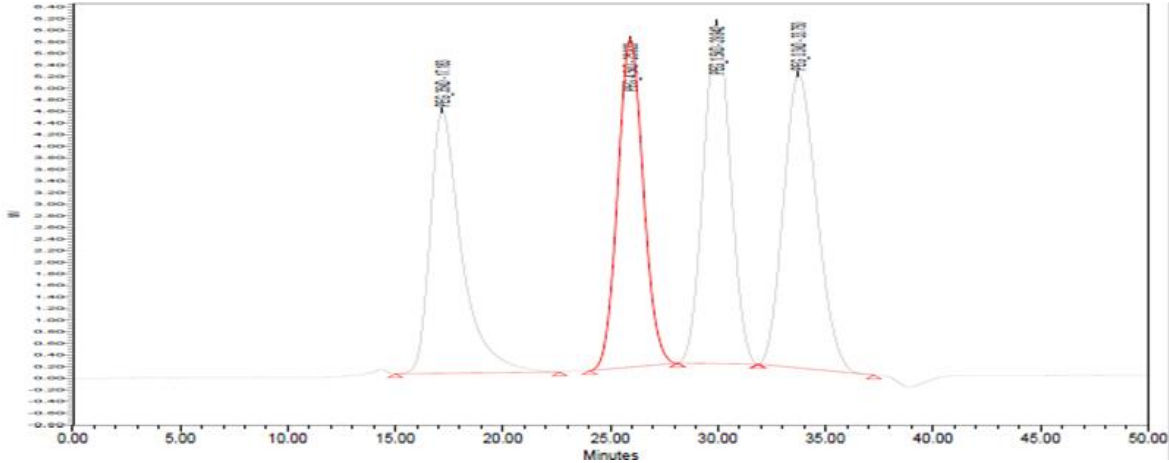


Figure 88 : chromatogramme présentant les temps de rétention des standards

Les masses molaires doivent être sensiblement différentes lors du mélange et ne doivent pas être trop proches pour éviter la coélution. Les masses molaires choisies présentées de gauche à droite sur la Figure 88 ci-dessus sont 35000 g/mol ; 4500 g/mol ; 1500 g/mol ; 300 g/mol. Une masse molaire égale 100000 g/mol a également été rajoutée et son temps de rétention est de 14,78 minutes. Les temps de rétentions étant déterminés, le mélange est filtré par la membrane et les chromatogrammes suivant sont obtenus (Figure 89 et Figure 90).

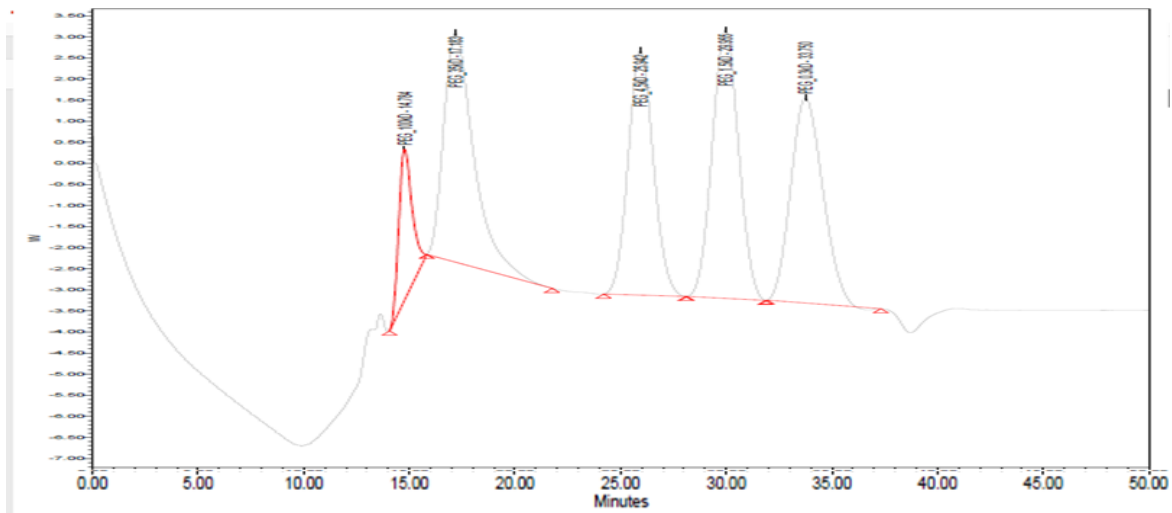
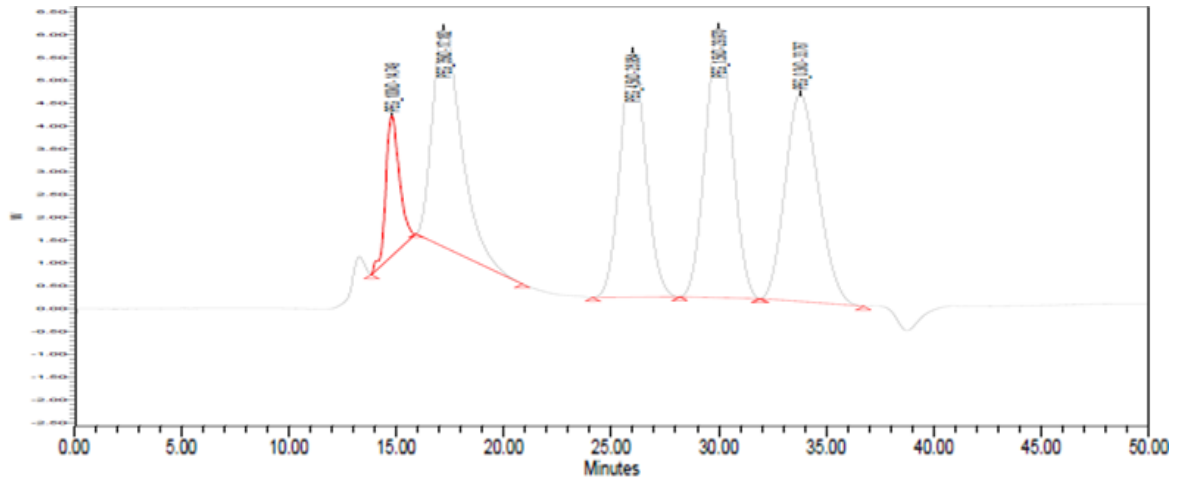


Figure 89 : Chromatogramme du rétentat du mélange de PEG injecté dans la membrane



*Figure 90 : Chromatogramme du perméat du mélange de PEG injecté dans la membrane*

Lors de l'étude de ces chromatogrammes, les aires ont été mesurées pour calculer le taux de rétention et il est quasi nul. De plus les pics identiques sont présents dans le perméat et le rétentat. Il n'y a pas de pic additionnel dans le perméat ce qui indique qu'aucun composé n'est arraché de la membrane.

Le seuil de coupure n'a pas pu être déterminé pour la membrane formée. Toutefois, l'intégrité de la membrane est prouvée par les derniers tests réalisés. Il sera donc nécessaire de trouver une façon d'augmenter la perméabilité de la membrane, par exemple en diminuant l'épaisseur du dépôt superficiel peptide amphiphile/PSSNa. Plusieurs explications peuvent être proposées. La première étant que la pression appliquée pour de la nanofiltration est trop faible et le flux est donc trop faible ce qui induit que les PEO ont le temps de se réorienter afin de passer en long et non en pelote comme ils sont censés le faire. Pour pallier ce problème il est nécessaire d'appliquer une pression supplémentaire. La seconde explication proposée est que l'utilisation des PEO endommage la membrane mais cette possibilité est réfutée par un flux qui reste constant même après filtration des PEO. La dernière explication est que les pores de la membrane ne sont pas nombreux mais très volumineux ce qui explique un flux bas mais une rétention très faible. Cette explication est réfutée par l'observation en microscopie qui mettrait en évidence la présence de ces pores volumineux et peu nombreux. La solution donc à apporter serait donc d'appliquer une pression plus grande lors de la filtration mais nous sommes limités par l'épaisseur de notre couche active. En effet les couches actives de membrane de nanofiltration présentent une épaisseur maximale de 100 nm et la couche sélective créée

ici mesure 3  $\mu\text{m}$ . Une pression trop élevée ne permettra donc pas d'obtenir une meilleure rétention si la couche active n'est pas réduite.



Partie  
expérimentale



Partie expérimentale .....	127
I-Synthèse .....	129
I-1 Synthèse C <sub>16</sub> -V <sub>3</sub> A <sub>3</sub> K <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub> .....	129
I-2 Synthèse C <sub>16</sub> -V <sub>3</sub> A <sub>3</sub> K <sub>3</sub> G-NH <sub>2</sub> .....	130
I-3 Synthèse C <sub>2</sub> V <sub>3</sub> A <sub>3</sub> K <sub>3</sub> G-NH <sub>2</sub> .....	131
I-4 Synthèse C <sub>16</sub> V <sub>3</sub> A <sub>4</sub> K <sub>3</sub> G-NH <sub>2</sub> .....	131
I-5 Produits chimiques.....	132
II-Echange d'ions .....	133
II-1 Echange d'ions avec l'acétate .....	133
II-2 Echange d'ion Cl <sup>-</sup> .....	134
II-3 Echange sur résine négative.....	134
III-Analyses .....	134
III-1 Dichroïsme circulaire.....	134
III-2 Infrarouge à transformé de Fourier.....	134
III-3 RMN.....	135
III-4 LC-MS .....	135
III-5 Chromatographie .....	136
IV-Observation à l'état solide .....	136
IV-1 Dépôt.....	136
IV-1.a Spin-coating .....	136
IV-1.b Tape-casting.....	136
IV-1.c Spray-coating .....	136
IV-2 Microscopie.....	137
IV-2.a Microscopie à Force Atomique .....	137
IV-2.b Microscopie Electronique à Balayage.....	137
IV-3 Mélange .....	137

IV-4 Propriétés mécaniques ..... 137

V-Filtration ..... 138

## I-Synthèse

### I-1 Synthèse C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>

Le peptide C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> est obtenu en synthèse en phase solide classique effectuée sur une résine Rink amide AM-PS qui est vendu protégé par des groupement Fmoc (0,87 mmol/g, 1 mmol, 1,15 g). Les groupement protecteur Fmoc sont clivé dans une solution de DBU/Pipéridine/DMF (2/2/96%volumique). Elle est alors nettoyée successivement avec du DCM et du méthanol. Les acides aminés sont ajoutés sans purification préalable en trois équivalents pour chaque couplage Fmoc-Lysine(Boc) (1,405 g ; 3 mmol) ; Fmoc-Alanine (0,934 g ; 3 mmol) ; Fmoc-Valine (1,018 g ; 3 mmol). Le solvant est ensuite ajouté et enfin l'agent de couplage BOP (1,327 g ; 3 mmol). LE tout est mélangé dans le réacteur présenté dans la partie synthèse pendant 4h. Après chaque couplage le test de Kaiser est effectué avec une goutte de chaque solution sur un grain de résine placé dans un tube à essai. Si le test est positif, il est nécessaire d'effectuer le même couplage avec les quantités diminuées de moitié. Après trois couplages non complets il est nécessaire d'acétyler les fonctions amines restantes avec l'anhydride acétique (0,284 g ; 3 mmol) avec de la NMM (0,330 g ; 3 mmol) dans un mélange DCM/DMF (50/50% volumique). Le mélange est agité pendant 15h. Après une dernière étape de clivage, le chlorure de palmitoyle (Palm-Cl) (0,91 g ; 3 mmol) et, la NMM (0,33 g ; 3 mmol) sont ajoutés à la résine dans un mélange DCM/DMF et mélangés dans le réacteur pendant la nuit. La résine est lavée trois fois avec DCM et méthanol. Le test de Kaiser est réalisé. Le test est négatif donc la résine est déprotégée. Une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) de triisopropylsilane (TIPS) et d'eau (90/5/5%volumique) est ajoutée à la résine et le mélange est agité pendant 5h. Le mélange est filtré et le filtrat est précipité dans l'éther diéthylique (éther). Le solide est lyophilisé. Une infime partie du solide est dissoute dans de l'eau mQ pour une analyse LC-MS. La masse confirme que le produit est le bon. Le rendement est calculé sur la masse obtenue pure en fin de synthèse après lyophilisation. La pureté est calculée avec les aires du chromatogramme obtenu en LC-MS

M/z : 1150 g/mol

Rendement : 19%

Produit insoluble, analyse après centrifugation et observation de fragments cf. partie peptide amphiphile

## I-2 Synthèse $C_{16}$ -V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub>

La synthèse est identique à celle présentée précédemment mais les agent de couplage et additif sont modifié : l'HOBt (0,405 g ; 3 mmol) et la DIC (0,465 g ; 3 mmol). La solution acide utilisée pour le clivage final est modifiée en TFA/H<sub>2</sub>O (90/10% volumique).

M/z : 1207 g/mol

Rendement : 83%

Pureté : 80%

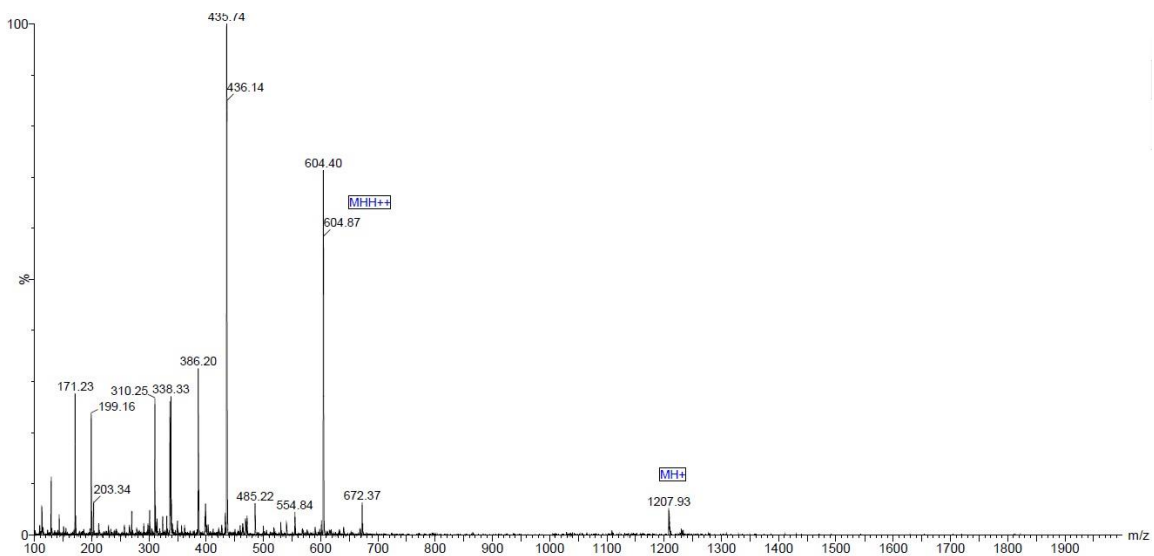


Figure 91 : spectre de masse du peptide  $C_{16}$ -V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub>

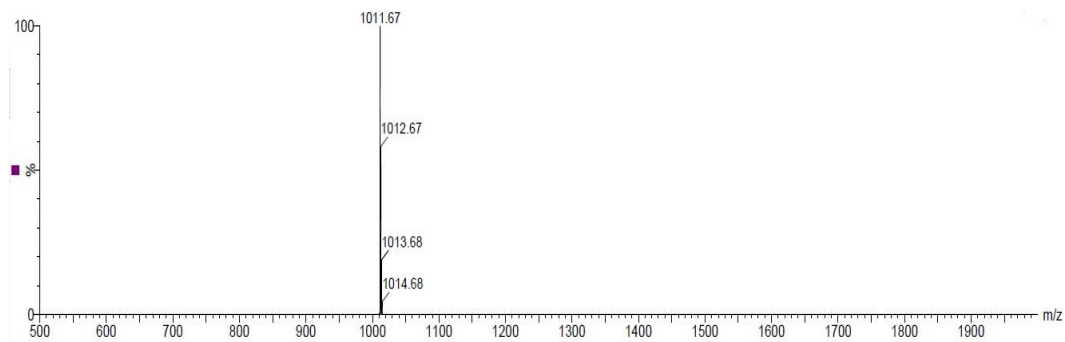
### I-3 Synthèse C<sub>2</sub>V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub>

La synthèse est identique à celle présentée précédemment mais les agent de couplage et additif sont modifié : K-Oxyma (0,540 g ; 3 mmol) et la DIC (0,465 g ; 3 mmol). La solution acide utilisée pour le clivage final est modifiée en TFA/H<sub>2</sub>O (90/10% volumique).

M/z : 1011 g/mol

Rendement : 93%

Pureté : 88 %



*Figure 92 : spectre de masse du C<sub>2</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub>*

### I-4 Synthèse C<sub>16</sub>V<sub>3</sub>A<sub>4</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub>

La synthèse est la même que la précédente mais cette fois-ci HOBt est utilisé pour les couplages de la glycine, des alanines et des valines. K-Oxyma est utilisé pour les couplages des lysine.

M/z : 1278 g/mol

Rendement : 86%

Pureté : 98 %

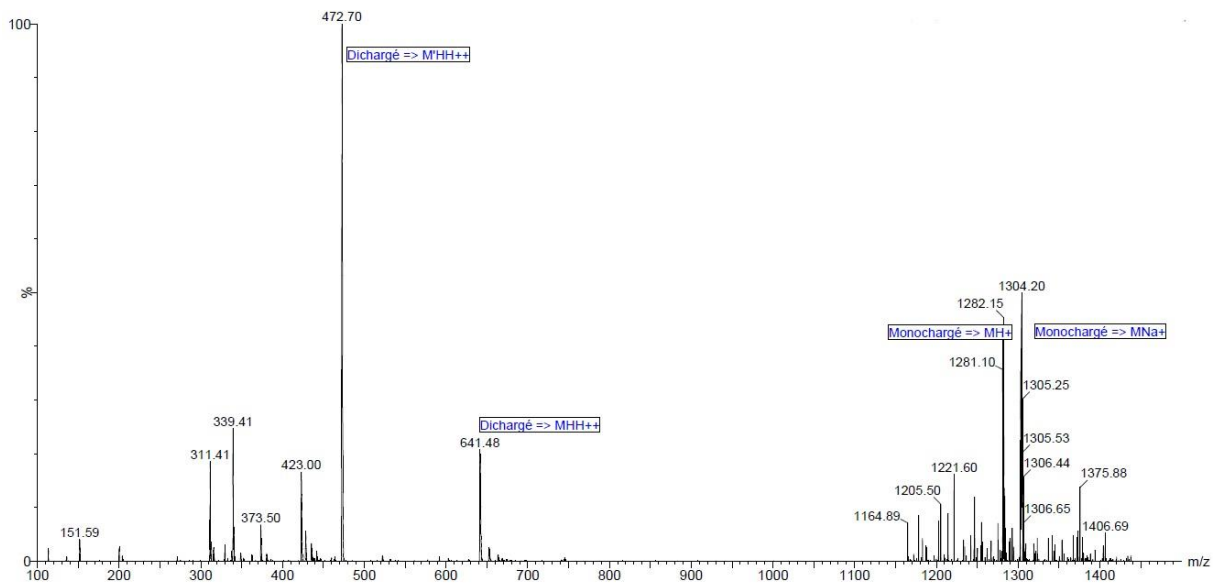


Figure 93 : spectre de masse de  $C_{16}$ -VVVAANKKKG-NH<sub>2</sub>

## I-5 Produits chimiques

Résine : Rink amide AM-PS crosslinked 1% DVB 100-200 mesh 0,87 mmol/g (SENN CHEMICALS)

Glycine : Fmoc-Gly-OH  $\geq$  98% (ALDRICH)

Lysine : Fmoc-Lys(Boc)-OH  $\geq$  98% (ALDRICH)

Alanine : Fmoc-Ala-OH 95% (ALDRICH)

Valine : Fmoc-Val-OH  $\geq$  98% (ALDRICH)

BOP : benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate  $\geq$  99,0% (ALDRICH)

DIC : Diisopropylcarbodiimide 99% (ALDRICH)

DCC : Dicyclohexylcarbodiimide 99% (ALDRICH)

HOBt : Hydroxybenzotriazole  $\geq$  97% (ALDRICH)

K-Oxyma : Ethyl (hydroxyimino)cynoacétate de potassium 97% (ALDRICH)

Palm-Cl : Chlorure de palmitoyle  $\geq$  98% (ALDRICH)

NMM : N-methylmorpholine  $>$  99,5% (ALDRICH)

Ac<sub>2</sub>O : Anhydride acétique  $\geq$  98% (ALDRICH)

TFA :  $\geq$  99% (ALDRICH)

PSSNa : Polystyrène sulfonate de sodium Mw 70 000 (ALDRICH)

Aucune purification supplémentaire n'a été effectuée dans l'utilisation de ces produits chimiques.

## II-Echange d'ions

### II-1 Echange d'ions avec l'acétate

La résine Dowex 1X4 (245 mg) est déposée dans le réacteur. A trois reprises, une solution d'acide acétique (10mL ; 1,6 mol/L) est mélangée avec la résine. De même pour une deuxième solution d'acide acétique (10 mL ; 0,16 mol/L) mélangée trois fois à la résine. Une solution de 20 mg de peptide C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> dans 4mL d'eau est mélangée à la résine préalablement préparée. Le mélange est agité pendant 1h. Le tout est filtré et la résine est nettoyée deux fois avec 1mL d'eau. Les filtrats sont rassemblés et lyophilisés.

## II-2 Echange d'ion Cl<sup>-</sup>

Pour cet échange d'ions, la résine n'est pas préparée au préalable car les anions présents sont déjà des chlorures. Une solution de 20 mg de peptide C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> dans 4mL d'eau est mélangée à la résine préalablement préparée. Le mélange est agité pendant 1h. Le tout est filtré et la résine est nettoyée deux fois avec 1mL d'eau. Les filtrats sont rassemblés et lyophilisés.

## II-3 Echange sur résine négative

Pour cet échange d'ions, la résine Dowex 50WX8 (50-100 mesh) n'est pas préparée au préalable car il s'agit d'une résine anionique dont le cation est un proton. Une solution de 20 mg de peptide C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> dans 4mL d'eau est mélangée à la résine préalablement préparée. Le mélange est agité pendant 1h. Le tout est filtré et la résine est nettoyée deux fois avec 1mL d'eau. Les filtrats sont rassemblés et lyophilisés. Aucun résultat n'a été obtenu après analyse en LC-MS. Le filtrat a été centrifugé et déposé sur lame de verre pour observation en AFM.

## III-Analyses

### III-1 Dichroïsme circulaire

Les solutions en dichroïsme circulaire ont été réalisées dans de l'eau mQ. Les peptides (4 mg) ont été dissouts dans 1mL d'eau. La cuve utilisée pour cette analyse présente un trajet optique de 0,2 mm. Les analyses en dichroïsme circulaire ont été réalisé sur les appareils suivant : PMS450 ; MOS450 ; ALX250 ; MM450 de chez ScienceInstrument.

### III-2 Infrarouge à transformer de Fourier

Les spectres infrarouges des membranes PVA72 ont été mesurés sur un Spectromètre Nicolet 710 à transformée de Fourier (FTIR) avec réflexion totale atténuée (ATR). Les spectres ont été acquis dans la gamme de nombres d'ondes allant de 4000 à 650 cm avec 64 balayages à une résolution de 2 cm. Les solutions préparées sont faites à 5% massique avant d'être déposées sur le rubis et laissée évaporées pendant 30min.

### III-3 RMN

Les spectres de RMN ont été acquis dans du  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  en utilisant un spectromètre Bruker 300 MHz.  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  0.82-0.91 (21H, 0.86 (t,  $J = 7.0$  Hz), 0.87 (d,  $J = 6.8$  Hz), 0.87 (d,  $J = 6.8$  Hz), 0.89 (d,  $J = 6.8$  Hz), 0.89 (d,  $J = 6.8$  Hz), 0.87 (d,  $J = 6.8$  Hz), 0.87 (d,  $J = 6.8$  Hz)), 1.15-1.62 (46H, 1.51 (tt,  $J = 7.4, 7.3$  Hz), 1.54 (tt,  $J = 7.7, 7.4$  Hz), 1.54 (tt,  $J = 7.7, 7.4$  Hz), 1.36 (tt,  $J = 7.8, 7.4$  Hz), 1.23 (quint,  $J = 6.9$  Hz), 1.26 (tt,  $J = 6.9, 6.6$  Hz), 1.26 (tt,  $J = 6.9, 6.6$  Hz), 1.40 (d,  $J = 7.2$  Hz), 1.40 (d,  $J = 7.2$  Hz), 1.39 (d,  $J = 7.2$  Hz), 1.23 (tt,  $J = 6.9, 6.6$  Hz), 1.23 (tt,  $J = 6.9, 6.6$  Hz), 1.25 (tt,  $J = 7.7, 6.9$  Hz), 1.25 (tt,  $J = 7.7, 6.9$  Hz), 1.23 (quint,  $J = 6.9$  Hz), 1.23 (quint,  $J = 6.9$  Hz), 1.36 (tt,  $J = 7.8, 7.4$  Hz), 1.39 (tt,  $J = 7.8, 7.4$  Hz), 1.36 (tt,  $J = 7.8, 7.4$  Hz), 1.36 (tt,  $J = 7.8, 7.4$  Hz), 1.28 (h,  $J = 7.0$  Hz), 1.28 (h,  $J = 7.0$  Hz), 1.24 (quint,  $J = 7.0$  Hz), 1.24 (quint,  $J = 7.0$  Hz), 1.23 (quint,  $J = 7.0$  Hz), 1.23 (quint,  $J = 7.0$  Hz), 1.23 (quint,  $J = 7.0$  Hz), 1.23 (quint,  $J = 7.0$  Hz), 1.23 (quint,  $J = 7.0$  Hz), 1.23 (quint,  $J = 7.0$  Hz), 1.23 (quint,  $J = 7.0$  Hz), 1.23 (tt,  $J = 7.0, 6.9$  Hz), 1.23 (tt,  $J = 7.0, 6.9$  Hz), 1.51 (tt,  $J = 7.4, 7.3$  Hz), 1.51 (tt,  $J = 7.4, 7.3$  Hz), 1.51 (tt,  $J = 7.4, 7.3$  Hz), 1.51 (tt,  $J = 7.4, 7.3$  Hz)), 1.23 (1H, quint,  $J = 6.9$  Hz), 1.86-1.99 (6H, 1.93 (td,  $J = 7.8, 7.5$  Hz), 1.93 (td,  $J = 7.8, 7.5$  Hz), 1.93 (td,  $J = 7.8, 7.5$  Hz), 1.92 (td,  $J = 7.8, 7.5$  Hz), 1.92 (td,  $J = 7.8, 7.5$  Hz), 1.93 (td,  $J = 7.8, 7.5$  Hz)), 2.02-2.14 (3H, 2.07 (dsept,  $J = 7.3, 6.8$  Hz), 2.08 (dsept,  $J = 7.3, 6.8$  Hz), 2.08 (dsept,  $J = 7.3, 6.8$  Hz)), 2.17-2.25 (2H, 2.21 (t,  $J = 7.4$  Hz), 2.21 (t,  $J = 7.4$  Hz)), 2.59-2.67 (6H, 2.63 (t,  $J = 7.3$  Hz), 2.63 (t,  $J = 7.3$  Hz), 2.63 (t,  $J = 7.3$  Hz), 2.63 (t,  $J = 7.3$  Hz), 2.63 (t,  $J = 7.3$  Hz), 2.63 (t,  $J = 7.3$  Hz)), 3.73-3.73 (2H, 3.73 (s), 3.73 (s)), 4.17-4.26 (3H, 4.19 (d,  $J = 7.3$  Hz), 4.22 (d,  $J = 7.3$  Hz), 4.23 (d,  $J = 7.3$  Hz)), 4.31-4.40 (3H, 4.36 (t,  $J = 7.5$  Hz), 4.36 (t,  $J = 7.5$  Hz), 4.35 (t,  $J = 7.5$  Hz)), 4.43-4.48 (3H, 4.45 (q,  $J = 7.2$  Hz), 4.45 (q,  $J = 7.2$  Hz), 4.45 (q,  $J = 7.2$  Hz))

### III-4 LC-MS

Analyse HPLC – ESI – MS. La CLHP-SM a été réalisée avec une pompe Waters 2695, un échantillonneur automatique avec une boucle de 20  $\mu\text{l}$ , un module de séparation Waters 2695 (HPLC) et un spectromètre de masse Waters Micromass (Wythenshawe, Manchester, Royaume-Uni) équipé du système ESI. La CLHP a été réalisée sur une taille de particules Waters - XSelect HSST3 de 100 mm \* 2,1 mm - 2,5  $\mu\text{m}$ ; la température de la colonne était de 25 ° C. La phase mobile était constituée d'un tampon A (eau de qualité HPLC + 0,1% d'acide formique) et d'un tampon B (acétonitrile de qualité HPLC + 0,05% d'acide formique). Le débit était constant à 0,25 ml / min vers le spectromètre de masse.



### III-5 Chromatographie

Le système de chromatographie utilisé est un WATERS avec une pompe 1515, un dégazeur, un autosampler 2707 et un détecteur à indice de réfraction 2414.

## IV-Observation à l'état solide

### IV-1 Dépôt

#### *IV-1.a Spin-coating*

Lors des dépôts par spin-coating, l'accélération et le temps nécessaire à faire le dépôt sont fixés à 100 RPM/s et 300 s. La quantité déposée est toujours la même : 10  $\mu$ L. La solution est déposée à l'aide d'une micropipette après passage au vortex pendant 30 s. La vitesse de rotation dépend de la viscosité de la solution déposée cf. partie peptide amphiphile et partie peptide-polymère. Le spin-coating a été réalisé avec un Spin150 de chez APT

#### *IV-1.b Tape-casting*

300  $\mu$ L de solution sont déposés avec un couteau de hauteur 250  $\mu$ m. La vitesse de déplacement du couteau est de 1 cm/s. Les solutions sont déposées à l'aide d'une seringue sur une bande de 3 mm de large et 18 mm de long. Cette solution est étalée soit directement sur une lame de verre soit sur un filtre en PVDF hydrophile de 25 mm de diamètre. Le tape-casting a été réalisé sur un Elcometer 4350.

#### *IV-1.c Spray-coating*

La solution de PSSNa injectée est à 6 g/L. Le schéma de dépôt est un rectangle de 30 mm sur 75 mm. Ce rectangle est divisé en trois sections dans la largeur (30 mm). La buse effectue un passage sur chaque section. La buse est située à 60 mm de l'échantillon, la vitesse 250 mm/min et le flux est réglé sur 100 mL/h. Le spray-coating a été réalisé sur un ND-SP de Nadetech

## IV-2 Microscopie

### *IV-2.a Microscopie à Force Atomique*

Les images AFM ont été réalisées avec des pointes oscillant à la fréquence de 300kHz en mode contact intermittent. La vitesse de scan est de 0,74 ligne par seconde Les paramètres tels que le gain, le setpoint ou le drive sont déterminés pour chaque image et aucune valeur n'est prédéfinie. Un setpoint et un drive faible sont cela dit favorisés ainsi qu'un gain proche de 30% pour les valeurs intégrale et proportionnelle. Le pourcentage d'approche est fixé à 90%. Les analyses AFM ont été réalisées sur un PicoSPM II.

### *IV-2.b Microscopie Electronique à Balayage*

Les analyses MEB ont été effectuées à l'aide d'un instrument Hitachi S-4500 fonctionnant à une résolution spatiale de 1,50 nm à une énergie de 15 kV. Les échantillons ont été séchés et recouverts d'une couche ultra mince de conductrice électrique Platine déposé par évaporation sous vide poussé.

## IV-3 Mélange

Les mélanges sont effectués dans un tube à essai. Les deux solutions sont préparées dans deux tubes séparés. La solution de PSSNa est toujours ajoutée à la solution de peptide lors des mélanges faits pour l'observation d'AFM. Afin de maximiser les interactions et avoir un matériau le plus homogène pour l'observation en AFM uniquement le mélange est passé au vortex à la vitesse maximale. Une fois ce mélange passé au vortex il est aisé de le déposer sur lamelle de verre au spin-coating. La vitesse de spin-coating peut être légèrement réduite comme pour des système liquides comme le peptide seul.

## IV-4 Propriétés mécaniques

Les analyses de rhéologie ont été réalisées sur un Physica MCR 301 de chez Anton Paar avec un mobile conique : CP50-1. Les mélanges sont effectués directement sur la platine du rhéomètre pour minimiser les modifications du milieu.

## V-Filtration

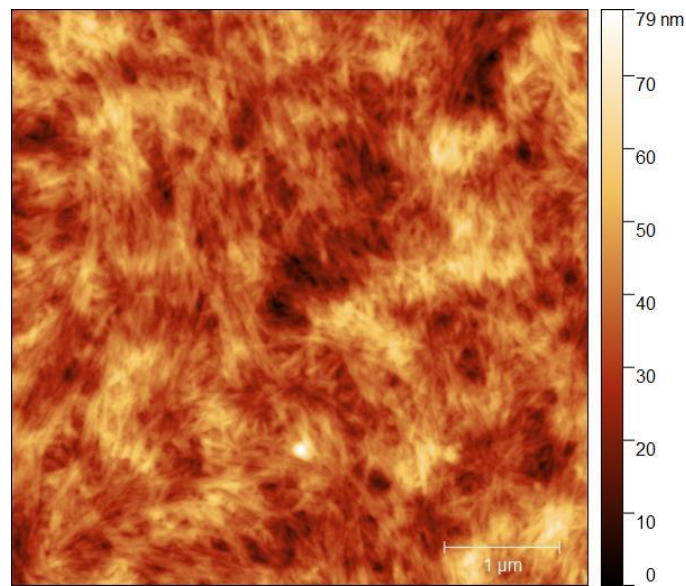
Les études de filtration ont été réalisées dans une cellule de filtration de 10 mL avec 25 mm de diamètre. Le fluide est poussé au travers de la membrane grâce à de l'air comprimé dont le débit est réglable. Les pressions étudiées sont comprises entre 0 et 3 bar.

Les mélanges de PEG ont été réalisés à 1 g/L quel que soit la taille des PEG étudiés. Lors de cette étude, 10 mL de solution sont préparés. 2 mL forment le perméat, 6 mL forment le rétentat et 2 mL forment la solution mère. Ces trois solutions sont passées en chromatographie.

Pour les tests de filtration, la membrane préparée ( $d = 2,5$  cm) a été installée dans une cellule de filtration de 10 ml (cellule agitée Amicon 8010). Puis la filtration cellule a été raccordée à un réservoir d'eau et à une conduite d'air comprimé. Les mesures ont ensuite été effectuées à des pressions comprises entre 0 et 4 bars. La masse de l'eau traversant la membrane (perméat) était enregistré avec le logiciel SartoConnect à intervalles réguliers. Toutes les expériences de filtration ont été effectuées à la température ambiante avec de la poussière eau ultrapure libre (filtrée à travers un filtre de 400  $\mu\text{m}$ ).

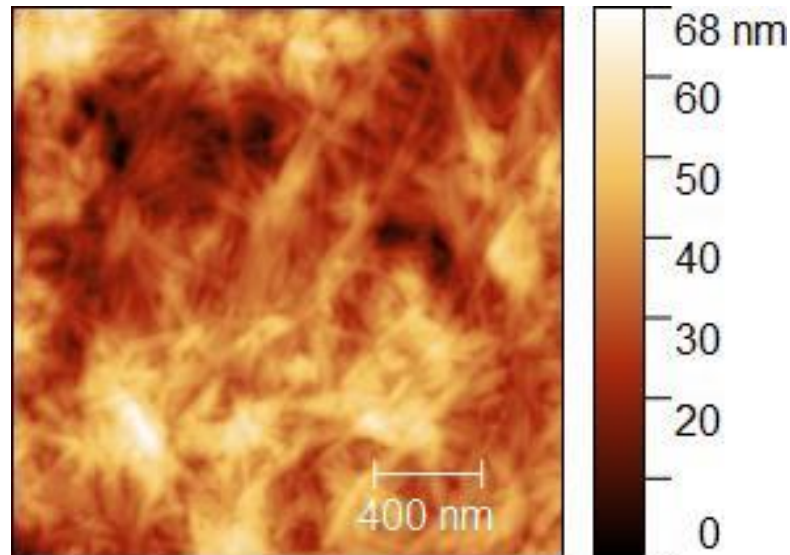
Conclusion Générale et  
perspectives

Au cours de ces travaux, nous avons pu mettre en évidence un autoassemblage fait d'un peptide amphiphile d'une part et d'un polymère (le polystyrène sulfonate de sodium). Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à la synthèse du peptide C<sub>16</sub>-V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>K<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> avec quelques dérivés présentés dans le second chapitre. Ce chapitre repose sur la caractérisation de l'autoassemblage du peptide que ce soit en solution ou à l'état solide. Le comportement dans ces deux milieux est dans un sens corrélé mais il n'a guère été possible avec les observations faites de déterminer la véritable forme de l'assemblage lorsque le peptide amphiphile est dans l'eau.



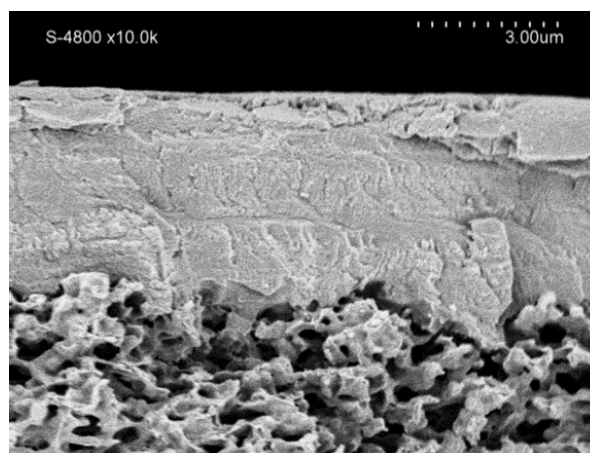
*Figure 94 : Image AFM du peptide à 5g/L*

En solution il a tout de même été possible de tester la robustesse de chaque partie constitutive du peptide amphiphile. Ces parties (partie hydrophobe, partie hydrophile et partie structurante) ont été déterminées comme essentielles à l'assemblage. Le peptide amphiphile perd toutefois légèrement son caractère feuillet- $\beta$  lorsqu'un tensioactif est ajouté dans le milieu. A l'état solide, les micelles cylindriques ont été isolées afin d'en mesurer le diamètre mais cette étude a mené à un peptide bloqué sur une résine. Toutefois cette association très forte avec la résine a permis de mettre en évidence dans le troisième chapitre que le polymère idéal pour l'association peptide polymère est le polystyrène sulfonate de sodium.



*Figure 95 : Image AFM de l'association peptide polymère à l'équivalence*

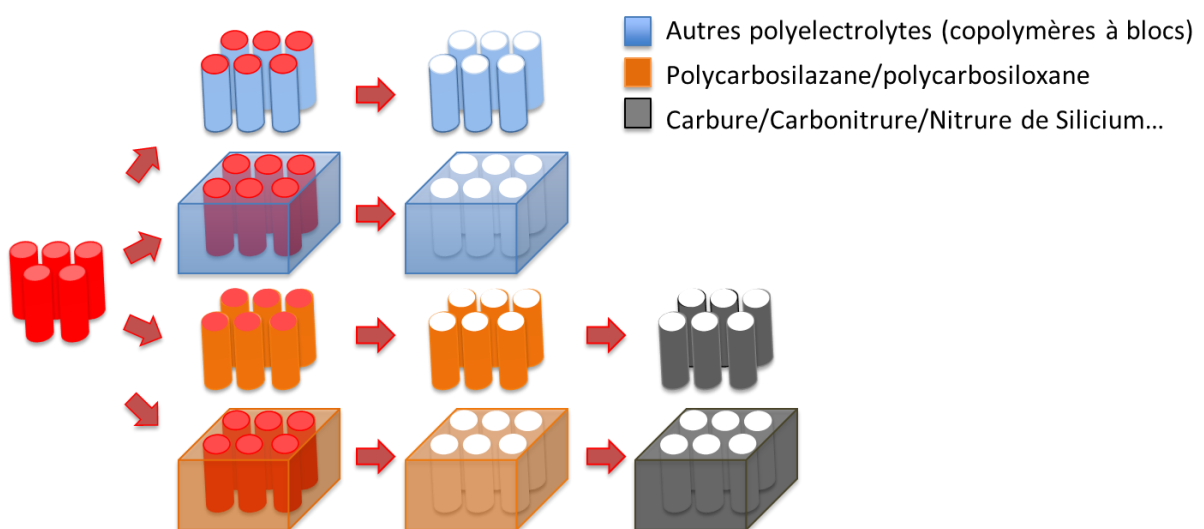
L'étude de l'association peptide polymère et plus précisément à l'équivalence a permis de déterminer que l'association peptide polymère forme un solide qui précipite en solution aqueuse. Ce mélange à l'équivalence s'est avéré, grâce aux tests de propriétés mécaniques, être un gel très solide pour des faibles déformations mais qui perd en résistance avec des déformations plus grandes. Il a donc été nécessaire pour permettre au matériau de résister lors des tests de filtration de déposer le matériau sur un support hydrophile (quatrième chapitre). Le film déposé sur PVDF a permis d'établir une membrane de filtration (Figure 96) testé dans ce quatrième chapitre.



*Figure 96 : Image MEB de la section de la membrane déposée sur PVDF hydrophile*

Le matériau résiste donc très bien à des pressions d'eau allant jusqu'à 3 bar toutefois lorsque le matériau est mis en présence d'éléments à filtrer, il casse facilement. Il est donc nécessaire soit de continuer les tests de filtration en augmentant beaucoup la taille des éléments filtrés par la membrane soit de trouver un système qui rendra l'association encore plus solide pour éviter que la membrane ne se fissure lors du passage de molécules au travers.

Comme précisé dans la partie filtration membranaire, le matériau présente quelques aspects problématiques tels que son épaisseur de couche active trop élevée ou encore son incapacité à séparer efficacement des PEO de tailles diverses. Plusieurs options sont possibles pour palier à ces problèmes. Une nouvelle méthode de mise en forme pourrait engendrer la formation d'une couche sélective plus fine et permettre la filtration pour des pressions plus élevées. Une autre possibilité est la modification du polymère pour des masses molaires plus élevées et ainsi augmenter les forces d'interaction pour engendrer un matériau qui se forme plus rapidement et donc plus mince. Le temps nécessaire à la formation du matériau peut être modifié car dès le début, un matériau solide est formé. Tous ces paramètres peuvent donc influencer directement sur l'épaisseur de cette couche sélective qui est le principal problème pour l'utilisation de notre matériau comme membrane de filtration. Une fois cette limite dépassée il est possible d'imaginer toute sortes d'application de nanofiltration.



*Figure 97 Schéma de projet avec d'autres polymères*

A plus long termes, il est possible de se séparer du polystyrène sulfonate de sodium pour des polymère d'intérêt autre comme des polymères précéramiques cf. Figure 97. Il est également possible d'imaginer bloquer les micelles cylindriques afin d'obtenir une forme souhaitée verticale par exemple. Les micelles donneraient alors une toute autre fonction qui est celle de former directement les pores. Elles pourraient ensuite être retirées. Beaucoup de possibilités s'ouvrent grâce aux travaux préliminaires réalisés dans cette étude.





Références  
bibliographiques

- (1) Levitt, M. Conformational Preferences of Amino Acids in Globular Proteins. *Biochemistry* **1978**, *17* (20), 4277–4285. <https://doi.org/10.1021/bi00613a026>.
- (2) Zhang, Y.; Sargent, J. L.; Boudouris, B. W.; Phillip, W. A. Nanoporous Membranes Generated from Self-Assembled Block Polymer Precursors: *Quo Vadis ? Journal of Applied Polymer Science* **2015**, *132* (21), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/app.41683>.
- (3) Kunitake, T.; Okahata, Y.; Shimomura, M.; Yasunami, S.; Takarabe, K. Formation of Stable Bilayer Assemblies in Water from Single-Chain Amphiphiles. Relationship between the Amphiphile Structure and the Aggregate Morphology. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103* (18), 5401–5413. <https://doi.org/10.1021/ja00408a021>.
- (4) Murakami, Y.; Nakano, A.; Yoshimatsu, A.; Uchitomi, K.; Matsuda, Y. Characterization of Molecular Aggregates of Peptide Amphiphiles and Kinetics of Dynamic Processes Performed by Single-Walled Vesicles. *Journal of the American Chemical Society* **1984**, *106* (12), 3613–3623. <https://doi.org/10.1021/ja00324a034>.
- (5) Sankaram, M. B. Membrane Interaction of Small N-Myristoylated Peptides: Implications for Membrane Anchoring and Protein-Protein Association. *Biophys J* **1994**, *67* (1), 105–112.
- (6) Moyer, T. J.; Kassam, H. A.; Bahnson, E. S. M.; Morgan, C. E.; Tantakitti, F.; Chew, T. L.; Kibbe, M. R.; Stupp, S. I. Shape-Dependent Targeting of Injured Blood Vessels by Peptide Amphiphile Supramolecular Nanostructures. *Small* **2015**, *11* (23), 2750–2755. <https://doi.org/10.1002/sml.201403429>.
- (7) Cui, H.; Cheetham, A. G.; Pashuck, E. T.; Stupp, S. I. Amino Acid Sequence in Constitutionally Isomeric Tetrapeptide Amphiphiles Dictates Architecture of One-Dimensional Nanostructures. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (35), 12461–12468. <https://doi.org/10.1021/ja507051w>.
- (8) Israelachvili, J. N. Intermolecular and Surface Forces. 706.
- (9) Pashuck, E. T.; Cui, H.; Stupp, S. I. Tuning Supramolecular Rigidity of Peptide Fibers through Molecular Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (17), 6041–6046. <https://doi.org/10.1021/ja908560n>.
- (10) Dasgupta, A. Exploring Architectures at the Nanoscale: The Interplay between Hydrophobic Twin Lipid Chains and Head Groups of Designer Peptide Amphiphiles in the Self-Assembly Process and Application. *Soft Matter* **2016**, *12* (19), 4352–4360. <https://doi.org/10.1039/C6SM00147E>.
- (11) Hartgerink, J. D.; Beniash, E.; Stupp, S. I. Peptide-Amphiphile Nanofibers: A Versatile Scaffold for the Preparation of Self-Assembling Materials. *PNAS* **2002**, *99* (8), 5133–5138. <https://doi.org/10.1073/pnas.072699999>.
- (12) Behanna, H. A.; Donners, J. J. J. M.; Gordon, A. C.; Stupp, S. I. Coassembly of Amphiphiles with Opposite Peptide Polarities into Nanofibers. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (4), 1193–1200. <https://doi.org/10.1021/ja044863u>.
- (13) Matson, J. B.; Newcomb, C. J.; Bitton, R.; Stupp, S. I. Nanostructure-Templated Control of Drug Release from Peptide Amphiphile Nanofiber Gels. *Soft Matter* **2012**, *8* (13), 3586–3595. <https://doi.org/10.1039/C2SM07420F>.
- (14) Biesalski, M. A.; Knaebel, A.; Tu, R.; Tirrell, M. Cell Adhesion on a Polymerized Peptide–Amphiphile Monolayer. *Biomaterials* **2006**, *27* (8), 1259–1269. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.08.002>.

- (15) Hsu, L.; Cvetanovich, G. L.; Stupp, S. I. Peptide Amphiphile Nanofibers with Conjugated Polydiacetylene Backbones in Their Core. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (12), 3892–3899. <https://doi.org/10.1021/ja076553s>.
- (16) Korevaar, P. A.; Newcomb, C. J.; Meijer, E. W.; Stupp, S. I. Pathway Selection in Peptide Amphiphile Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (24), 8540–8543. <https://doi.org/10.1021/ja503882s>.
- (17) Chen, Y.; Gan, H. X.; Tong, Y. W. PH-Controlled Hierarchical Self-Assembly of Peptide Amphiphile. *Macromolecules* **2015**, *48* (8), 2647–2653. <https://doi.org/10.1021/ma502572w>.
- (18) Ahmed, S.; Mondal, J. H.; Behera, N.; Das, D. Self-Assembly of Peptide-Amphiphile Forming Helical Nanofibers and in Situ Template Synthesis of Uniform Mesoporous Single Wall Silica Nanotubes. *Langmuir* **2013**, *29* (46), 14274–14283. <https://doi.org/10.1021/la4024986>.
- (19) Sargeant, T. D.; Aparicio, C.; Goldberger, J. E.; Cui, H.; Stupp, S. I. Mineralization of Peptide Amphiphile Nanofibers and Its Effect on the Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Acta Biomaterialia* **2012**, *8* (7), 2456–2465. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.03.026>.
- (20) Greenfield, M. A.; Hoffman, J. R.; Olvera de la Cruz, M.; Stupp, S. I. Tunable Mechanics of Peptide Nanofiber Gels. *Langmuir* **2010**, *26* (5), 3641–3647. <https://doi.org/10.1021/la9030969>.
- (21) Cao, M.; Wang, Y.; Ge, X.; Cao, C.; Wang, J.; Xu, H.; Xia, D.; Zhao, X.; Lu, J. R. Effects of Anions on Nanostructuring of Cationic Amphiphilic Peptides. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (41), 11862–11871. <https://doi.org/10.1021/jp205987w>.
- (22) Hartgerink, J. D.; Beniash, E.; Stupp, S. I. Self-Assembly and Mineralization of Peptide-Amphiphile Nanofibers. *Science* **2001**, *294* (5547), 1684–1688. <https://doi.org/10.1126/science.1063187>.
- (23) Loh, X. J.; Barrio, J. del; Lee, T.-C.; Scherman, O. A. Supramolecular Polymeric Peptide Amphiphile Vesicles for the Encapsulation of Basic Fibroblast Growth Factor. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (23), 3033–3035. <https://doi.org/10.1039/C3CC49074B>.
- (24) Elder, A. N.; Dangelo, N. M.; Kim, S. C.; Washburn, N. R. Conjugation of  $\beta$ -Sheet Peptides to Modify the Rheological Properties of Hyaluronic Acid. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (7), 2610–2616. <https://doi.org/10.1021/bm200393k>.
- (25) Bulut, S.; Erkal, T. S.; Toksoz, S.; Tekinay, A. B.; Tekinay, T.; Guler, M. O. Slow Release and Delivery of Antisense Oligonucleotide Drug by Self-Assembled Peptide Amphiphile Nanofibers. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (8), 3007–3014. <https://doi.org/10.1021/bm200641e>.
- (26) Rajangam, K.; Behanna, H. A.; Hui, M. J.; Han, X.; Hulvat, J. F.; Lomasney, J. W.; Stupp, S. I. Heparin Binding Nanostructures to Promote Growth of Blood Vessels. *Nano Lett.* **2006**, *6* (9), 2086–2090. <https://doi.org/10.1021/nl0613555>.
- (27) Goktas, M.; Cinar, G.; Orujalipoor, I.; Ide, S.; Tekinay, A. B.; Guler, M. O. Self-Assembled Peptide Amphiphile Nanofibers and PEG Composite Hydrogels as Tunable ECM Mimetic Microenvironment. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (4), 1247–1258. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00041>.
- (28) Capito, R. M.; Azevedo, H. S.; Velichko, Y. S.; Mata, A.; Stupp, S. I. Self-Assembly of Large and Small Molecules into Hierarchically Ordered Sacs and Membranes. *Science* **2008**, *319* (5871), 1812–1816. <https://doi.org/10.1126/science.1154586>.

- (29) Zha, R. H.; Velichko, Y. S.; Bitton, R.; Stupp, S. I. Molecular Design for Growth of Supramolecular Membranes with Hierarchical Structure. *Soft Matter* **2016**, *12* (5), 1401–1410. <https://doi.org/10.1039/C5SM02381E>.
- (30) Berndt, P.; Fields, G. B.; Tirrell, M. Synthetic Lipidation of Peptides and Amino Acids: Monolayer Structure and Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (37), 9515–9522. <https://doi.org/10.1021/ja00142a019>.
- (31) El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (11), 6557–6602. <https://doi.org/10.1021/cr100048w>.
- (32) Rouse, C. K.; Martin, A. D.; Easton, C. J.; Thordarson, P. A Peptide Amphiphile Organogelator of Polar Organic Solvents. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1). <https://doi.org/10.1038/srep43668>.

