



HAL
open science

Auto-assemblage de peptides assisté par enzyme au sein d'hydrogels

Jean-Yves Runser

► **To cite this version:**

Jean-Yves Runser. Auto-assemblage de peptides assisté par enzyme au sein d'hydrogels. Autre. Université de Strasbourg, 2022. Français. NNT : 2022STRAE019 . tel-04044001

HAL Id: tel-04044001

<https://theses.hal.science/tel-04044001v1>

Submitted on 24 Mar 2023

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE ET CHIMIE PHYSIQUE

INSERM U1121

CNRS – Institut Charles Sadron UPR22

THÈSE présentée par :

Jean-Yves RUNSER

soutenue le : 16 Septembre 2022

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

Discipline/ Spécialité : Chimie-Physique

**AUTO-ASSEMBLAGE DE PEPTIDES
ASSISTÉ PAR ENZYME AU SEIN
D'HYDROGELS**

THÈSE dirigée par :
Pr. SCHAAF Pierre

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr. DEMOUSTIER-CHAMPAGNE Sophie
Dr. FITREMANN Juliette

Professeur, Université Catholique de Louvain
Chargée de recherche, CNRS, Toulouse

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr. HOSSEINI Mir Wais
Pr. JIERRY Loïc

Professeur, Université de Strasbourg
Professeur, Université de Strasbourg (membre invité)

« L'esprit emprunte à la matière les perceptions d'où il tire sa nourriture, et les lui rend sous forme de mouvement, où il a imprimé sa liberté » Henri Bergson

Pour les Harengs et les amis.

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, Pierre Schaaf, Professeur à l'Université de Strasbourg, pour m'avoir encadré dans les meilleures conditions tout au long de ce travail. Je le remercie pour toutes les discussions riches, quelquefois passionnées mais toujours passionnantes que nous avons eues. Je n'oublierais jamais sa profonde bienveillance, ses nerfs d'acier (il en fallait avec un olibrius comme moi) et son enseignement que je pourrais, je l'espère, transmettre un jour à mon tour. Je suis très heureux et honoré de l'avoir eu comme directeur de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Loïc Jierry, Professeur à l'Université de Strasbourg, qui a participé activement à la réalisation de ce travail. Je le remercie pour ses encouragements tout au long de ces trois années, notamment la dernière qui a été très chargée pour moi et où il a été très présent. Ses qualités humaines et son optimisme sans faille ont bien souvent été mon phare dans la nuit.

Mes remerciements vont également à Philippe Laval, Directeur de recherche à l'INSERM (U 1121, Strasbourg) et à Fouzia Boulmedais, Directrice de recherche au CNRS (ICS PECMAT-IMI) pour m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires respectifs et permis de réaliser mon travail dans les meilleures conditions.

Je suis très sensible à l'honneur que me font les membres du jury en acceptant de juger ce travail. Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Madame Sophie Demoustier-Champagne, Professeure à l'Université Catholique de Louvain, Madame Juliette Fitremann, Chargée de recherche au CNRS de Toulouse et Monsieur Mir Wais Hosseini, Professeur à l'Université de Strasbourg. Toute ma reconnaissance également à Loïc Jierry qui s'est joint à ce jury en tant que membre invité. Je leur adresse mes sincères remerciements.

Je remercie énormément Miryam Criado-Gonzalez qui m'a enseigné tant de choses qu'il serait vain de toutes les citer ici, j'en oublierai trop. Son amour de la recherche, qu'elle a su me transmettre, et la confiance qu'elle m'a accordé ont grandement participé à ma décision d'entreprendre un doctorat.

Je remercie amicalement Bernard Senger, pour toute l'aide qu'il a pu m'apporter, mais également pour toutes nos discussions, qu'elles soient scientifiques, échiquiennes ou jardinières, ainsi que Dominique Vautier pour toutes nos discussions et pour m'avoir enseigné

l'immunomarquage, Vincent Ball, pour la rhéologie, la nanoindentation et surtout pour les discussions scientifiques et musicales toujours passionnantes et Youri Arntz pour les excellents moments passés en sa compagnie. Nos rencontres fortuites me manqueront.

J'en arrive à mes compagnons de bureau, je suis très heureux d'avoir passé du temps en leur compagnie ces dernières années, merci pour ces moments de travail, détente et galère parfois : Agata, Miryam, Suresh, Alexis, Ana, Senem, Shahaji, Sophie, Jordan, Julie, Léa, Vincent, Kévin et Youri. Toutes nos discussions scientifiques, informatiques, philosophiques, humoristiques et musicales vont bien me manquer !

Un merci particulier à mes stagiaires Lucille et Timothée que j'ai eu le plaisir d'encadrer et avec lesquels j'ai pu partager projets, discussions et apéros !

Je remercie chaleureusement toute l'équipe PECMAT/IMI et les membres de l'unité 1121, présents et passés, Jennifer, Miguel, Julien, Cyprien, Aymeric, Quentin, Mehdi, Rémi, Eulalie, Capucine, Jean, Laurie, Sarah, Christine, Eya, Florence, Cosette, Eric, Karim, Claire E., Claire M., Arielle, Varvara, Haseeb, Naji, Eloïse, Benjamin, Marie-Hélène, Florent, Laurianne, Arielle, Lydie, Lisa et tous ceux que j'oublie ! Merci à tous pour votre contribution à l'ambiance au labo et au bon temps passé en dehors.

Je tiens tout particulièrement à remercier mes amis, Manuel, Oussama, Ziyad, Karina, Tapas, Meltem, Yves, Jérôme, Gilles, Gaston, Soline, Victor, Thomas, Nicolas, Olivia, Mehdi, Guillaume. Tous les moments passés en votre compagnie sont gravés en moi à jamais. Hélène (ma 'grande soeur'), Marc, et vos familles, votre présence depuis toutes ces années m'est précieuse.

Je n'oublie pas ma famille, Maman, Pap's, Odeleine, Alaïs, Louissette, Salomé, François, Radu, Valentin, Margaux, Adèle, Livia, Vladimir, Carole, Marina, Sévérina, Cédric, Myriam, tontons, tatas, cousins et cousines. Votre amour me porte et sans votre soutien je ne serais pas parvenu jusqu'ici.

Enfin je terminerai en remerciant ma compagne, complice et meilleure amie Ana pour tout ce qu'elle m'a apporté depuis notre rencontre et pour tout ce qu'elle m'apporte au quotidien. C'est une nouvelle aventure qui commence maintenant avec Alice !

Table des matières

Liste des abréviations et notations principales	i
Introduction générale.....	1
Chapitre 1 : Etat de l'art et contexte.....	9
I - Introduction	11
II - Auto-assemblage localisé de peptides induit par des enzymes	12
1 - Genèse du sujet	12
2 - Auto-assemblage de peptides induit enzymatiquement (EASA).....	14
3 - Auto-assemblage de peptides induit enzymatiquement dans des gels hôtes	17
III - Structuration de la matière à partir de processus de type réaction-diffusion	22
1 - Processus de type Turing	23
2 - Processus de type Liesegang.....	26
a. Les modèles mathématiques décrivant les processus de type Liesegang.....	27
b. Quelques lois empiriques dérivées des structures de Liesegang.....	31
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes.....	41
I - Matériel.....	43
1 - Fluorophores, solutions et tampons	43
a. Tampon Borax	44
b. Tampon Hepes.....	44
c. Tampon Phosphate	44
2 - Polymère, hydrogélisateur et enzyme.....	45
II - Méthodes	46
1 - Greffages.....	46
a. Marquage de la phosphatase alcaline par un fluorophore	46
b. Fabrication de nanoparticules de silice et greffage d'enzymes à leur surface	47
2 - Protocole de préparation des gels.....	48
3 - Caractérisation des échantillons.....	50
a. Spectroscopie UV-Visible	50
b. Rhéologie	51
c. Nano Indentation	54
d. Microscopie Confocale à balayage.....	58
Chapitre 3 : Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.	63

I - Introduction au chapitre.....	64
II - Abstract	65
III - Introduction.....	66
IV - Material and methods	68
1 - Experimental	68
a. Chemicals and abbreviations	68
b. Solutions and buffers preparation	69
c. Host hydrogel cross-linking conditions and diffusion of Fmoc-FFpY within this host gel	69
d. UV/Vis spectroscopy.....	70
e. Rheology measurements.....	70
f. Nanoindentation measurements	71
g. Confocal laser scanning microscopy	71
2 - Simulation	72
V - Results and discussion	73
1 - Self-assembly pattern in the drop configuration	73
2 - Rheology measurements in the drop configuration	73
3 - Self-assembly profile on a flat interface	75
4 - Dependence of the self-assembly profile on peptide and enzyme concentrations.....	77
5 - Origin of the self-assembly pattern.....	77
VI - Conclusion	82
VII - Supporting Information	86
1 - Model Description	87
2 - Supplementary Figures	100
Chapitre 4 : Transition d'une forme continue d'auto-assemblages assistés par enzyme à une forme microglobulaire par un mécanisme de type Liesegang.....	107
I - Introduction au chapitre.....	109
II - Abstract	111
III - Introduction.....	112
IV - Results and discussion	116
V - Supporting Information.....	123
1 - Material and methods.....	124
a. Material.....	124

b. CLSM monitoring	124
c. Preparation of 1.5% w/v AP-HPMC and diffusion of Fmoc-FFpY within this host hydrogel.....	125
d. Heat shock AP treatment and evaluation of the phosphatase activity.....	126
2 - Supplementary Figures	127
Chapitre 5 : Nanoparticules fonctionnalisées par des enzymes pour diriger l'auto-assemblage de peptides dans un hydrogel avec un contrôle spatial 3D	133
I - Introduction au chapitre.....	135
II - Abstract	137
III - Introduction.....	138
IV - Results and discussion	140
V - Conclusion	146
VI - Supporting Information	150
1 - Material and methods.....	151
a. Material.....	151
b. Synthesis of silica nanoparticles, NPs, NPs@AP and NPs@AP ^{RHO}	151
c. Preparation of 1.5% w/v HPMC hydrogels and diffusion of Fmoc-FFpY within this host hydrogel.....	152
d. UV spectroscopy	153
e. Infrared spectroscopy	153
f. Fluorescence spectroscopy.....	153
g. Rheology measurements	153
h. Confocal laser scanning microscopy (CLSM)	154
i. Cryo-Scanning Electron Microscopy (Cryo-SEM).....	155
2 - Supplementary Figures	156
Conclusion générale	169
Annexes	177
Résumé.....	198
Abstract	198

Liste des abréviations et notations principales

AP	Phosphatase alcaline
Cryo-SEM	Cryo microscopie électronique à balayage
CLSM	Microscopie confocale à balayage laser
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EASA	Auto-assemblage assisté par enzyme
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
LEASA	Auto-assemblage localisé assisté par enzyme
LMWH	Hydrogélateur de faible poids moléculaire
E	Module de Young
G'	Module d'élasticité
G''	Module de viscosité
RHO	Rhodamine B
ThT	Thioflavine T
AP ^{RHO}	Phosphatase alcaline marquée avec de la rhodamine B
RD	Réaction-diffusion
HPMC	gel d'hydroxypropylmethyl Cellulose
AP-HPMC	gel d'HPMC contenant de l'AP
AP ^{RHO} -HPMC	gel d'HPMC contenant de l'AP ^{RHO}
NPs	Nanoparticules de silice
NPs@AP	NPs fonctionnalisées par de l'AP
PNPP	para-Nitrophenyl-Phosphate
PNP	para-Nitrophenol

Introduction générale

En 1987, le prix Nobel de chimie a été décerné à Cram, Lehn et Pedersen pour leur exploration de la "chimie au-delà de la liaison chimique", qui a conduit au développement de la chimie supramoléculaire. Un concept important de cette chimie est l'auto-assemblage, qui a récemment conduit à l'émergence d'un nouveau type de matériau, à savoir les hydrogels supramoléculaires, formés par l'auto-assemblage d'hydrogélateurs de faible poids moléculaire (LMWH). Les matériaux supramoléculaires peuvent être considérés comme des systèmes chimiques vivants puisqu'ils reposent sur des liaisons dynamiques non covalentes et peuvent donc être sensibles à des stimuli externes. Ils devraient trouver de nombreuses applications dans les biomatériaux. Par exemple, les hydrogels auto-assemblés à base de peptides différencient les cellules en contact ou incorporées dans les gels. Le caractère dynamique des hydrogels supramoléculaires permet également d'imiter les propriétés viscoélastiques de ces gels hybrides proches de celles trouvées dans le cartilage. Cet aspect est important étant donné que les propriétés viscoélastiques des matériaux ont une influence directe sur les cellules en contact avec le matériau. La nature fibrillaire des hydrogels supramoléculaires dérivés de peptides imite étroitement la structure tridimensionnelle de la matrice extracellulaire. Associés à la possibilité de régler finement les propriétés mécaniques du gel, ces systèmes ouvrent de nouvelles stratégies pour moduler le destin des cellules dans le cadre d'applications en ingénierie tissulaire.

Le caractère non permanent des assemblages supramoléculaires a été judicieusement exploité par la nature permettant aux cellules de répondre à leur environnement : les fibres d'actine jouent un rôle essentiel dans la motilité cellulaire et le fuseau des microtubules dans la séparation des chromosomes, par exemple (Figure 1). La nature contrôle l'assemblage supramoléculaire à la fois dans l'espace et dans le temps par le biais d'auto-assemblages initiés par des enzymes, ces dernières transformant localement les protéines d'un état de "non-interaction" en un état d'"interaction".

Les cellules stromales mésenchymateuses incorporées dans des gels constituent un bon exemple d'application de l'ingénierie tissulaire. De telles cellules enfouies dans des gels ont été utilisées pour réparer le myocarde endommagé dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Cependant, la faiblesse des interactions entre les molécules constitutives du gel a pour inconvénient que les matériaux présentent souvent une faible résistance mécanique. Cette difficulté a été contournée en incorporant des hydrogels supramoléculaires dans des gels (hôtes) "permanents" (gels d'agarose ou de dextran par exemple) ce qui permet d'ajuster finement les

propriétés mécaniques du matériau, propriétés qui sont d'une grande importance dans le destin des cellules et en particulier des cellules souches.

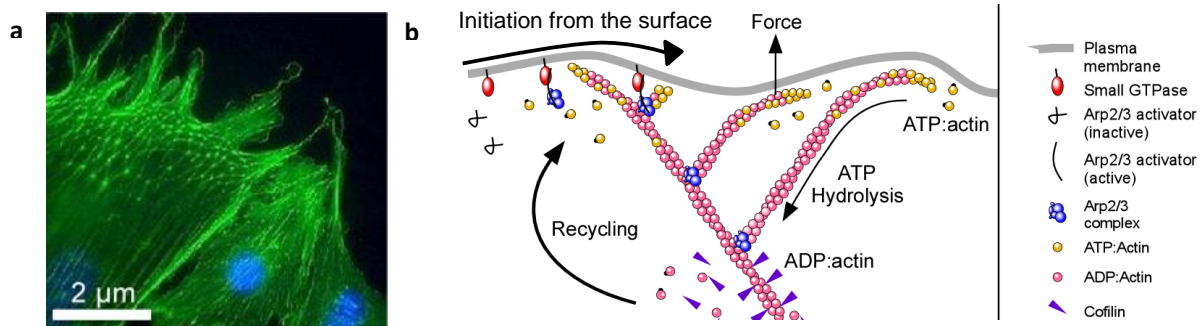


Figure 1: (a) Visualisation des fibres de F-actine (en vert) et du noyau (en bleu) de cellules de fibroblastes par microscopie à fluorescence grâce au marquage par fluorescence et (b) représentation schématique des réseaux d'actine réticulés, qui conduisent le mouvement cellulaire, initié depuis la surface de la membrane cellulaire. Arp2/3 construit ces réseaux en se liant aux côtés des filaments d'actine existants et nucléarise la croissance de nouveaux filaments à partir de leurs côtés, ce qui donne lieu à un réseau de filaments dendritiques.

Le contrôle spatial de ces auto-assemblages s'effectue par la localisation spécifique des enzymes (i) aux interfaces biologiques ou (ii) par des distributions locales de gradients de concentration dans les cellules ou les tissus. Le contrôle temporel est assuré par la production d'enzymes à un moment approprié. De tels processus ont été récemment imités par des scientifiques qui ont introduit l'auto-assemblage enzymatique (EASA pour *Enzyme-Assisted Self-Assembly*) d'hydrogélateurs de faible poids moléculaire. Dans l'EASA, les enzymes sont utilisées pour transformer des molécules non auto-assemblées en molécules auto-assemblées et initier la formation de réseaux supramoléculaires. En confinant les enzymes sur une surface, cette approche permet de localiser le processus d'auto-assemblage à l'interface (Figure 2), un nouveau concept récemment démontré et maîtrisé par mon laboratoire d'accueil.

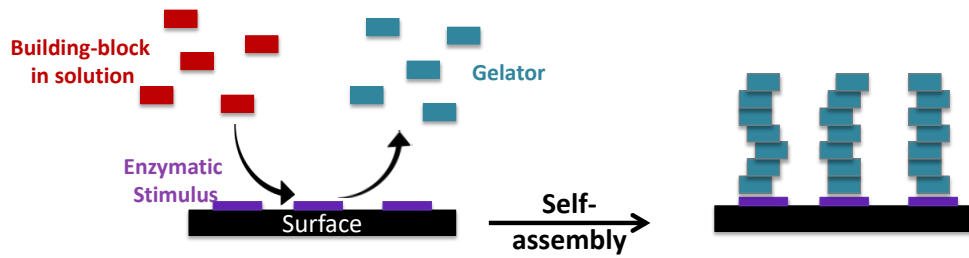


Figure 2: Représentation schématique de l'EASA localisée : en présence d'enzymes adsorbées sur un substrat (violet), les espèces non interagissantes (rectangles rouges) se transforment en espèces interagissantes (rectangles bleus) qui s'auto-assemblent finalement à l'interface pour former des fibres.

En 2019, il avait été démontré qu'en incorporant les enzymes dans un gel hôte et en faisant diffuser des précurseurs d'hydrogélateurs, on peut induire un processus EASA dans le gel hôte. Ce résultat a ouvert la voie à un projet de recherche bénéficiant d'un soutien de la part de l'Agence Nationale de la Recherche (Acronyme « EASA », 2018 – 2023) en collaboration avec l'équipe du Professeur Pierre Weiss de l'UMR 1229 de Nantes. Mon travail de thèse s'inscrit dans ce projet. L'objectif du projet était de développer des hydrogels dans lesquels sont localisés des enzymes. Ces hydrogels sont préparés par impression 3D. La réalisation de ces hydrogels est confiée à l'équipe de Nantes. Par diffusion de peptides précurseurs sur ces gels et par réactions avec les enzymes, il était prévu que ces peptides se transforment en hydrogélateurs qui forment alors des auto-assemblages au sein des hydrogels. Etant donné que les enzymes devaient être localisés dans les hydrogels, les auto-assemblages devaient également y être localisés. Ces matériaux étaient destinés à une utilisation en ingénierie tissulaire. Les équipes de Strasbourg (Unité INSERM U1121 et Institut Charles Sadron UPR22) étaient en charge de l'étude de l'auto-assemblage par un processus EASA au sein de ces hydrogels. C'est ce qui constituait mon travail de thèse. Le projet est représenté sur la Figure 3.

Les premières études devaient s'effectuer sur des gels d'hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) au sein desquels étaient enfouis des enzymes d'alcaline phosphatase et sur lesquels on venait faire diffuser des peptides de type Fmoc-FFpY (Fmoc: 9-Fluorenylmethoxycarbonyl ; F : phenylalanine ; Y : tyrosine ; p : groupement phosphate). Il s'agissait, dans un premier temps, d'étudier le profil d'auto-assemblage de Fmoc-FFY dans le gel hôte, profil que l'on s'attendait à être uniforme étant donné que les enzymes étaient susceptibles de diffuser dans le gel. Mais nos premières observations faisaient apparaître un profil d'auto-assemblage beaucoup

plus complexe présentant deux maxima d'auto-assemblage. Nous avons alors compris que ce profil résultait de processus de réaction-diffusion qui peuvent conduire à une organisation de la matière et en particulier des structures de type Liesegang. L'objectif de ma thèse devenait donc de comprendre et d'analyser plus finement ce processus d'auto-assemblage induit enzymatiquement dans des gels hôtes contenant des enzymes qui pouvaient y diffuser, processus qui résultait d'un couplage entre diffusion, réaction et auto-assemblage.

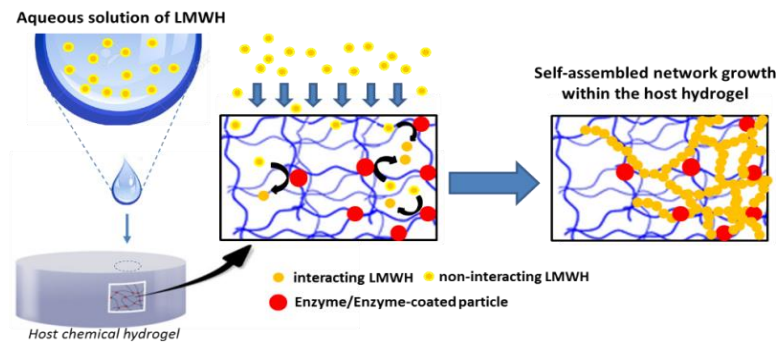


Figure 3: Représentation schématique du projet EASA. Le réseau d'auto-assemblage localisé qui en résulte dépend directement de la distribution des enzymes dans l'hydrogel hôte.

Ainsi dans le premier chapitre de cette thèse je décrirai d'abord brièvement l'état de l'art dans le domaine de l'auto-assemblage localisé de peptides induit enzymatiquement. J'y introduirai également les processus de réaction/diffusion conduisant à la structuration hiérarchique de la matière en mettant principalement l'accent sur les structures de type Liesegang.

Ce premier chapitre sera suivi d'un deuxième chapitre présentant les composés et les techniques utilisées au cours de mes travaux doctoraux. J'ai utilisé des gels chimiques comme matériaux hôtes à base d'hydroxypropylmethylcellulose dont les composants étaient fournis par l'équipe de Nantes. Dans ces matériaux j'ai incorporé l'alcaline phosphatase (AP) et utilisé le précurseur tripeptidique Fmoc-FF p Y (Fmoc: 9-Fluorenylmethoxycarbonyl; F: phenylalanine; Y: tyrosine; p: groupement phosphate). Le choix du couple enzyme/précurseur était guidé par la grande expérience que notre laboratoire a acquis avec ce système. L'auto-assemblage des peptides Fmoc-FFY a été visualisé en ajoutant au système de la Thioflavine T qui devient fluorescente en présence du peptide Fmoc-FFY auto-assemblé en feuillets β . J'ai principalement utilisé la microscopie confocale pour la détermination de la localisation de l'auto-assemblage et en particulier pour la détermination du profil d'auto-assemblage au sein de l'hydrogel hôte, mais aussi pour suivre sa formation au cours du temps. La diffusion du peptide

précurseur Fmoc-FFpY dans le gel hôte a été déterminée de deux façons différentes : d'une part, nous avons déposé une goutte de solution de peptides précurseurs sur un gel hôte et, d'autre part, nous avons amené la solution de peptides précurseurs uniformément au contact du gel hôte (Figure 4).

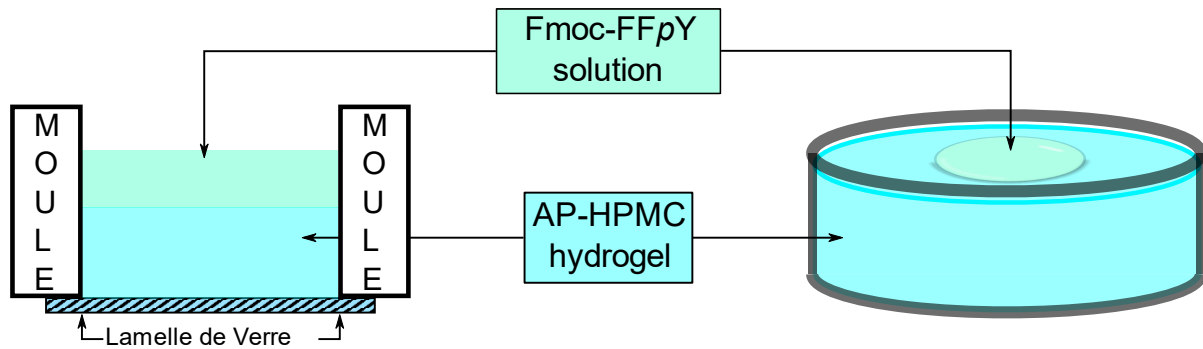


Figure 4: (gauche) Coupe transversale du moule utilisé pour la conduite des expériences et contenant l'hydrogel hôte couvert entièrement par la solution de peptide et (droite) représentation schématique d'une boîte de pétri contenant l'hydrogel hôte sur lequel une goutte de solution peptidique est déposée.

Dans le premier cas j'ai observé, tout autour de la goutte, parallèlement à l'interface gel/solution, un fort maximum d'auto-assemblage suivi d'une zone déplétée en auto-assemblage suivi d'un second maximum d'auto-assemblage. La compréhension de ce profil d'auto-assemblage ainsi que ses caractéristiques en fonction de paramètres comme les concentrations en peptides précurseurs et en enzymes font l'objet du chapitre trois. J'y aborderai également l'élaboration d'un modèle permettant de rendre compte qualitativement des phénomènes observés. Ce travail a donné lieu à une publication dans *Journal of Colloids and Interface Science* qui représente l'essentiel du chapitre.

Mais l'histoire ne s'arrête pas là. J'ai également observé que lorsque la concentration en enzymes diminue dans le gel hôte il se forme des "spots" sphériques de peptides auto-assemblés au sein du profil continu d'auto-assemblage. Ces spots apparaissent tardivement dans le gel. Enfin, lorsque la concentration en enzymes est encore diminuée, seuls les "spots" subsistent et le profil d'auto-assemblage présentant deux maxima disparaît. Un tel phénomène est également observé en dénaturant petit à petit les enzymes par chauffage. La compréhension de cette transition entre un profil continu d'auto-assemblage et un ensemble de "spots" fera l'objet du chapitre quatre.

Afin de nous affranchir de la diffusion des enzymes dans le gel et, étant donné qu'il est très difficile de coupler les enzymes de manière covalente directement au gel d'hydroxypropylmethyl cellulose, nous avons opté pour un greffage d'AP sur des nanoparticules de silice. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Miryam Criado-Gonzalez, post-doctorante au laboratoire. Nous avons ensuite introduit des nano-objets fonctionnalisés dans le gel au moment de sa préparation. En mettant un tel gel au contact d'une solution de peptides Fmoc-FFpY nous n'observons plus le profil continu d'auto-assemblage mais nous obtenons de l'auto-assemblage uniquement au voisinage des clusters de nanoparticules. Enfin, en partant d'un gel d'hydroxypropylmethyl cellulose sans nanoparticules enzymatiques mais contenant du peptide précurseur, nous avons injecté localement ces billes et nous avons observé un auto-assemblage de peptides bien localisé précisément au lieu d'injection. Ce travail est actuellement en cours de rédaction. Il fait l'objet du chapitre cinq.

Enfin je conclurai cette thèse en y présentant les perspectives de ce travail.

Chapitre 1 : Etat de l'art et contexte

I - Introduction

Mon travail de thèse se situant à l'interface de deux domaines, l'auto-assemblage localisé de peptides induit par des enzymes et la structuration de la matière par des processus de réaction-diffusion, ce chapitre sera divisé en deux parties. Dans une première partie je mettrai mon travail dans le contexte des travaux du laboratoire et je présenterai les aspects essentiels de l'auto-assemblage localisé induit par des enzymes. Dans la seconde partie, je présenterai brièvement les processus de structuration de la matière par des processus de réaction-diffusion et plus particulièrement par des processus conduisant à des structures de type Liesegang étant donné que nous rencontrerons ce type de processus au cours de mon travail.

II - Auto-assemblage localisé de peptides induit par des enzymes

1 - Genèse du sujet

Le laboratoire a beaucoup travaillé, dans le passé, dans le domaine des multicouches de polyélectrolytes. Ces multicouches sont obtenus par dépôt alterné de polyanions et de polycations.¹ Dans les années 2010 on s'est interrogé au laboratoire s'il était possible de construire des films à base de deux polymères ou polyélectrolytes en une seule étape. Ce défi a été relevé par voie électrochimique près d'une interface en utilisant deux types de polymères, l'un portant un groupement azide et l'autre un groupement alkyne, ces deux groupements réagissant en présence de Cu(I) pour former une liaison triazole.² Ce type de réaction est connu dans la littérature sous le nom de "réaction click". Le Cu(I) est formé à l'interface d'une électrode par réduction de Cu(II), puis diffuse de l'interface vers la solution en induisant la réaction "click". Cela permet ainsi de déposer des films de polymères contenant deux composés réticulés par des liaisons triazole. Cette technique a été grandement étudiée au laboratoire avec différents systèmes de polyélectrolytes modifiés par les groupements alcyne et azide.^{3, 4}

Etant donné que l'on forme des entités, le Cu(I), qui diffusent et induisent la réaction, ce processus a aussi été appelé "auto-construction morphogénique de film", Cu(I) représentant ici le morphogène. Ce processus morphogénique a ensuite été étendu aux protons créés électrochimiquement à l'interface. Ainsi en utilisant des polyélectrolytes dont la charge change de signe lorsque le milieu devient acide, il a été possible de former des films de polyanion/polycation en une seule étape.^{5, 6} Bien que très élégantes, les techniques par voie électrochimique présentent cependant l'inconvénient de devoir utiliser des surfaces conductrices ce qui limite grandement le champ de leurs applications. Afin d'étendre la possibilité d'auto-construire des films au voisinage de surfaces à d'autres supports que des supports conducteurs, le laboratoire a eu l'idée d'utiliser des enzymes comme moyen de transformer des agents qui n'interagissent pas, en molécules ou macromolécules qui s'assemblent.

En 2004, Bing Xu a introduit le concept d'auto-assemblage de peptides induit par des enzymes (EASA : Enzyme-Assisted Self-Assembly).⁷ J'expliquerai en détail ce concept dans le paragraphe suivant. Ce concept a connu un essor considérable, notamment à cause de ses applications biologiques. En 2009, Williams et Ulijn ont montré que l'EASA peut être localisé à l'interface en greffant des enzymes sur une surface.⁸ L'auto-assemblage de peptides conduit alors à la formation de fibres présentes uniquement à la surface. Ce concept d'auto-assemblage localisé induit enzymatiquement (LEASA: Localized EASA) n'a cependant pas été repris après les travaux de Williams et Ulijn avant que notre laboratoire ne s'en empare en 2016⁹, sauf pour l'auto-assemblage induit autour de cellules qui a connu un vif succès¹⁰. Différemment des travaux de Williams et Ulijn notre laboratoire n'a pas greffé les enzymes sur la surface, mais les a adsorbées sur des multicouches de polyélectrolytes. Au contact de peptides cela a conduit à la formation de films de fibres de peptides auto-assemblés de plusieurs dizaines de micromètres d'épaisseur. D'abord utilisée avec de l'alkaline phosphatase (AP) comme enzyme et des réactions de déphosphorylation pour induire la transformation de peptides qui ne s'auto-assemblent pas en hydrogélateurs, la technique a ensuite été étendue à d'autres systèmes enzymes/peptides.^{11, 12} Avec l'idée de fonctionnaliser les gels pouvant servir à l'ingénierie tissulaire c'est-à-dire à la croissance maîtrisée de tissus à partir de cellules, le laboratoire a ensuite voulu étendre le concept de LEASA sur des surfaces à la localisation d'auto-assemblage dans des gels hôtes. Les peptides peuvent être choisis pour leur intérêt biologique (groupement d'adhésion cellulaire, facteur de croissance..) et les gels hôtes pour la tenue mécanique. Ainsi, les premiers travaux concernant les processus de LEASA sur des gels hôtes ont montré qu'il était possible d'induire enzymatiquement l'auto-assemblage de peptides dans des gels hôtes et que ce processus conduit d'une part à un changement des propriétés mécaniques de ces gels et que la présence des peptides est compatible avec une bonne viabilité cellulaire.^{13, 14} Il était ensuite prévu de construire des gels hôtes par impression 3D en y faisant varier localement les concentrations d'enzymes voire en y incorporant localement différents types d'enzymes dans le but d'induire localement l'auto-assemblage de peptides présentant des gradients de concentrations d'auto-assemblage. Ce projet soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche (acronyme : EASA, 2018-2023) s'effectue en collaboration avec l'équipe du Professeur Weiss de l'UMR 1229 de Nantes, celle-ci étant chargée de la mise au point de l'impression 3D et les équipes de Strasbourg (INSERM U1121 et ICS UPR22-CNRS), au sein desquelles se déroulent ma thèse, chargées d'étudier l'auto-assemblage dans ces gels. Mon projet doctoral s'inscrit totalement dans le projet EASA. Il s'agit d'étudier en détails comment s'effectue cet auto-

assemblage de peptide au sein du gel hôte. Comme cet auto-assemblage résulte de la diffusion de peptides précurseurs dans le gel, de leur réaction avec des enzymes suivi de leur auto-assemblage, les structures qui en résultent relèvent de processus de réaction-diffusion comme nous allons le voir. Au démarrage de ma thèse ces phénomènes n'étaient pas anticipés et nous nous attendions à la formation d'un gel hôte uniformément rempli d'auto-assemblages de peptides, mais il n'en a rien été.

2 - Auto-assemblage de peptides induit enzymatiquement (EASA)

Nous allons maintenant nous concentrer sur les processus d'auto-assemblage de peptides induit par des enzymes. Ce concept fut introduit en 2004 par Bing Xu.⁷ Celui-ci l'appliqua au système AP/Fmoc-*p*Y (AP: alcaline phosphatase; *p*: groupement phosphate; Y: tyrosine). Fmoc-*p*Y est une molécule hydrosoluble grâce à la présence du groupement phosphate. Sous l'action de AP, Fmoc-*p*Y se transforme en Fmoc-Y qui est plus hydrophobe que son précurseur Fmoc-*p*Y et qui s'auto-assemble en formant des fibres (Figure 4).

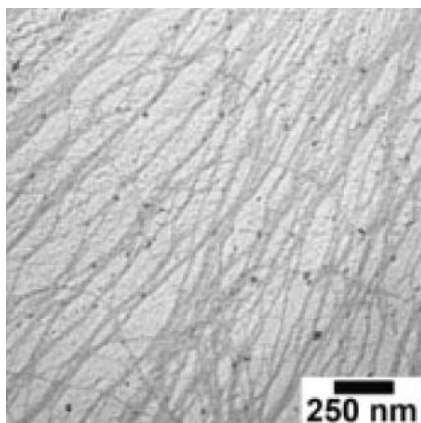


Figure 4: *Fibres de Fmoc-Y auto-assemblé observées par TEM (image reproduite de Enzymatic formation of supramolecular hydrogels⁷ avec autorisation de Wiley-VCH)*

Par la suite d'autres systèmes enzyme/peptides qui conduisent à l'auto-assemblage ont été rapportés. On pourra citer entre autre les systèmes AP/Nap-*p*YYY, AP/Nap-Y*p*YY, Nap-YY*p*Y où Nap représente le groupement N-Naphtalène¹⁵ qui fonctionnent sur le même principe que le système original de Bing Xu et le système α -chymotrypsine/KL-OEt (K: Lysine; L: Leucine; OEt groupement éthyl ester) et qui conduit par action enzymatique à la formation

d'hydrogélateurs de type $(KL)_n$ ¹⁶. Ce dernier système fonctionne donc, non pas par une réaction d'hydrolyse, mais par une réaction d'oligomérisation induite enzymatiquement. Citons également le système Fmoc-AA (A: alanine) qui, en diminuant le pH sous l'action de glucose oxydase en présence d'oxygène, s'auto-assemble.¹² Parmi les nombreux autres systèmes qui ont été décrits mentionnons enfin le système AP/Fmoc-FFpY qui est celui utilisé dans ce travail. Il fonctionne, là encore par déphosphorylation du peptide. Il a été introduit par Wang et *al.*¹⁷ et ultérieurement par notre laboratoire pour développer les systèmes LEASA¹⁸. La réaction relative à ce système est représentée sur la Figure 5:

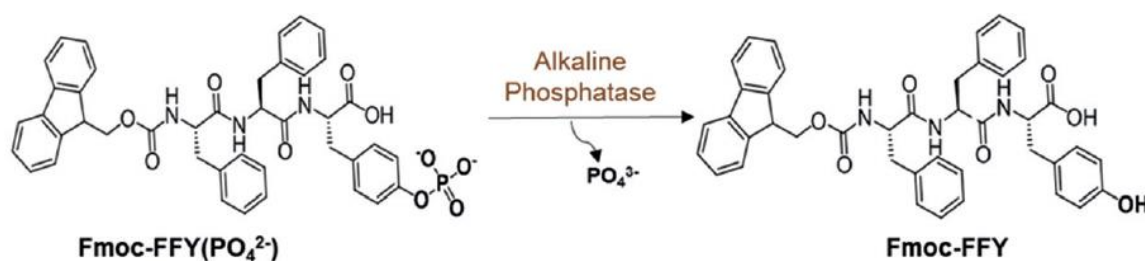


Figure 5: Représentation de la transformation de FmocFFpY en Fmoc-FFY sous l'action de l'enzyme alcaline phosphatase

L'auto-assemblage de peptides et en particulier celui de Fmoc-FFY conduit généralement à la formation de fibres d'une dizaine voire davantage de nanomètres de diamètre.^{11, 19-21} En solution, ces fibres peuvent former des hydrogels.

Une des caractéristiques importantes de l'auto-assemblage de peptides induit enzymatiquement est l'existence d'un temps d'induction avant que l'auto-assemblage ne démarre, malgré la présence d'hydrogélateurs présents avant ce démarrage. Ainsi, Yang et *al.* ont trouvé un temps d'induction de 10 minutes avec le système AP/Fmoc-pY avant d'observer la formation d'un gel.⁷ De même, Williams et *al.*, qui ont étudié l'auto-assemblage de Fmoc-L₃ à partir de Fmoc-L et de dipeptides LL (L: Leucine) en présence de thermolysine.⁸ Ils ont observé l'existence d'un temps d'induction de l'auto-assemblage bien que l'enzyme était déjà active. Ce temps d'induction était inversement proportionnel à la concentration en enzymes présentes en solution. Ce temps d'induction est interprété par la nécessité d'atteindre une concentration critique d'hydrogélateur avant que l'auto-assemblage ne démarre. Le processus de formation des agrégats peut ainsi être comparé à un processus de nucléation et croissance nécessitant une concentration critique de composés qui s'agrègent ou cristallisent. Thorter et *al.* ont également étudié les premiers instants menant à l'auto-assemblage pour le système

AP/Fmoc-pY.²² Ils ont proposé un mécanisme en trois étapes: Tout d'abord une étape rapide de déphosphorylation des peptides précurseurs. Au-dessus d'une certaine concentration ceux-ci s'associent sous forme de micelles. Ces micelles se réorganisent dans un troisième temps pour former des nano-fibres. Dans ce modèle il faut que la concentration en hydrogélateurs atteigne la concentration critique micellaire pour que l'auto-assemblage puisse démarrer. De plus ces micelles doivent interagir pour former des fibres. Nous ferons usage de ces résultats pour le développement de modèles rendant compte de nos expériences.

On peut également se poser la question de savoir où démarre l'auto-assemblage dans les processus EASA. Un élément de réponse est apporté par le groupe de Ulijn qui a greffé des enzymes sur des surfaces.^{8, 23} Ils ont observé la présence de fibres sur la surface, ces fibres démarrant souvent sur des clusters (Figure 6).

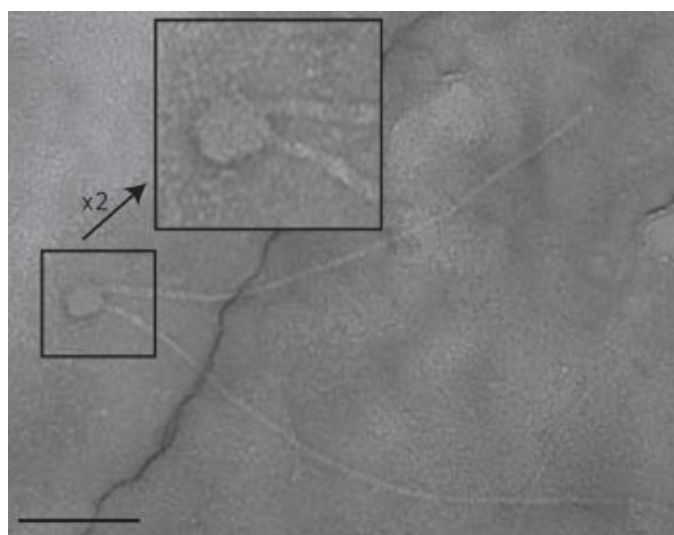


Figure 6: Observation par microscopie TEM de fibres d'auto-assemblage de Fmoc-Y à partir de Fmoc-pY et d'AP greffé sur la surface. La barre représente 100 nm. Image tirée de Enzyme-assisted self-assembly under thermodynamic control⁸ avec autorisation de Wiley-VCH

La question qui se pose et qui n'a pas reçu de réponse est la nature de ces clusters. On peut supposer que ce sont des clusters d'enzymes mais il pourrait peut-être également s'agir d'agrégats de peptides précurseurs dont l'existence a également été attestée.^{24, 25}

Il est également important de savoir si ces auto-assemblages de peptides sont des entités en équilibre avec la solution de peptides déphosphorylés. La réponse à cette question semble négative. En effet les gels de peptides auto-assemblés obtenus par EASA peuvent généralement

aussi être obtenus directement à partir des hydrogélateurs en chauffant les solutions pour les solubiliser puis en formant l'auto-assemblage par abaissement de température. Dans certains cas on peut également procéder par changement de pH d'une solution d'hydrogélateurs. De nombreuses expériences montrent alors que les propriétés du gel de même que la structure des objets auto-assemblés dépendent de "l'histoire" du gel, histoire thermique ou évolution du pH. Ainsi Z. Yang *et al.* ont étudié le système NBD-GFFpY/AP (NBD: nitrobenzoxadiazole). Alors que le contact de NBD-GFFpY et AP à 37°C conduit à la formation de nanoparticules, la même solution forme des fibres à 4°C, l'observation se faisant toujours avec la solution à 20°C.²⁶ Ces différences de morphologie dans les objets auto-assemblés peuvent être attribuées, par exemple, à la cinétique de formation des agrégats. Toujours est-il que ces assemblages ne se restructurent pas avec le temps pour atteindre une structure unique à 20°C, indiquant clairement qu'elles ne constituent pas des structures d'équilibre. On peut également citer l'exemple de Fmoc-GFFpYGHpY (H: Histidine) qui sous l'action d'AP se transforme en Fmoc-GFFYGHY qui s'auto-assemble sous la forme d'un gel. Ce gel a la particularité de présenter une forte activité estérase.²⁷ Lorsque ce processus EASA est réalisé dans un matériau poreux en adsorbant l'AP à la surface des pores on obtient un matériau poreux catalytique qui peut être utilisé pour effectuer de la catalyse en continu sous flux. En menant ces expériences il n'a pas été observé de relargage de peptides déphosphorylés dans la solution malgré les contraintes hydrodynamiques créées par le flux de la solution. Cela prouve que les peptides présents dans l'auto-assemblage ne sont pas en équilibre avec des peptides libres en solution. Si tel était le cas, en présence d'une solution vierge de tout peptide, l'auto-assemblage devrait se défaire petit à petit. Le fait que les enzymes s'adsorbent irréversiblement sur les structures auto-assemblées est une propriété qui sera utilisée pour le développement de nos modèles.

3 - Auto-assemblage de peptides induit enzymatiquement dans des gels hôtes

Notre laboratoire a d'abord commencé à s'intéresser à l'auto-assemblage de peptides induit enzymatiquement et localisé à des interfaces (LEASA : Localized Enzyme-Assisted Self-Assembly). Pour ce faire, des enzymes étaient déposées de manière non-covalente sur des multicouches de polyélectrolytes elles-mêmes adsorbées sur une surface. Différents systèmes

enzyme/peptide ont été explorés : AP/Fmoc-FFpY¹⁸, AP/Fmoc-GFFpY-GHpY²⁷, α -chymotrypsine/KL-OEt²⁸, Glucose Oxidase/Fmoc-AAOH¹², protéine/(Fmoc-GFFYENH-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-NHCO-(CH₂)₂-CO-EE-OH)¹¹. Dans ce dernier cas les protéines pouvant induire l'auto-assemblage étaient l'albumine bovine, l'AP et la glutathion réductase. L'auto-assemblage n'était pas directement dû à une transformation enzymatique du peptide précurseur mais à son adsorption sur les protéines, suivi d'un auto-assemblage de Fmoc-GFFYENH-(CH₂)₂-SH sur ce peptide précurseur. Cet auto-assemblage déplace alors l'équilibre en solution entre GFFYENH-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-NHCO-(CH₂)₂-CO-EE-OH et Fmoc-GFFYENH-(CH₂)₂-SH + HS-(CH₂)₂-NHCO-(CH₂)₂-CO-EE-OH permettant à l'auto-assemblage de continuer jusqu'à épuisement du peptide précurseur de la solution. L'ensemble de ces systèmes ont conduit à la formation de films d'auto-assemblage de peptides sous forme de fibres (Figure 7).

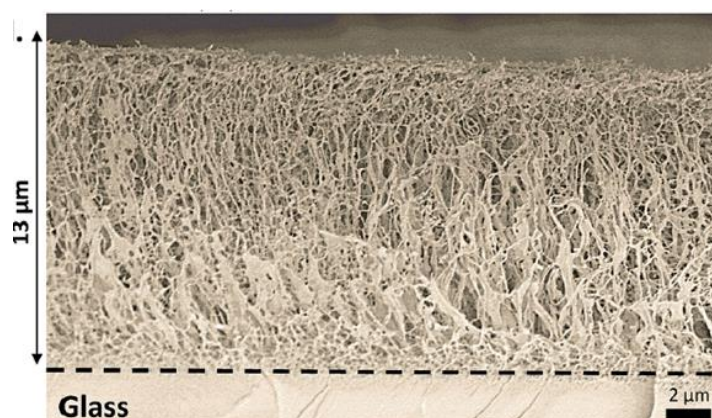


Figure 7: Image de cryo-SEM d'un film de fibres auto-assemblées de Fmoc-GFFYENH-(CH₂)₂-SH après contact de GFFYENH-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-NHCO-(CH₂)₂-CO-EE-OH avec une surface recouverte d'AP sur une multicouche de polyélectrolytes. Image tirée de Protein-induced low molecular weight hydrogelator self-assembly through a self-sustaining process¹¹ avec autorisation de Wiley-VCH.

On observe clairement les fibres qui sont au demeurant orientées en moyenne perpendiculairement au substrat. Une telle orientation a été observée sur d'autres auto-assemblages induits à partir d'enzymes déposées sur des multicouches.

Après avoir exploré les processus LEASA à partir de surfaces, notre laboratoire a été le premier à s'intéresser, à partir de 2019, aux processus de type EASA dans des gels hôtes.^{13, 14} Le concept est représenté schématiquement sur la Figure 8.

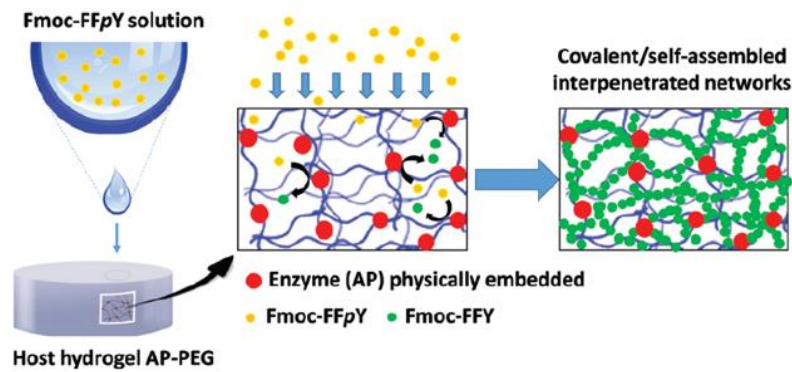


Figure 8: Représentation schématique du concept d'auto-assemblage induit par des enzymes dans des gels hôtes: points rouges : les enzymes, points jaunes : peptides précurseurs, points verts : hydrogélateurs. Tirée de Enzyme assisted peptide self-assemblies trigger cell adhesion in high density oxime based host gels ¹⁴ avec l'autorisation de RSC.

Le premier système étudié utilisait des gels de polyéthylène glycol (PEG) comme gel hôte. Dans ce gel était enfoui de l'alcaline phosphatase. Au contact de solutions de Fmoc-FFpY il se formait des fibres d'auto-assemblage de Fmoc-FFY à l'intérieur du gel (Figure 9).

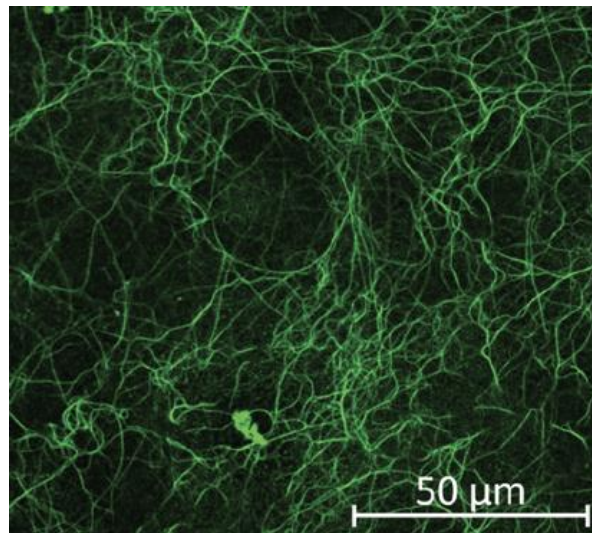


Figure 9: Fibres de Fmoc-FFY formées dans un gel de PEG dans lequel étaient enfouies des enzymes (AP). Image tirée de Enzyme-assisted self-assembly within a hydrogel induced by peptide diffusion¹³ avec autorisation de RSC.

L'auto-assemblage de Fmoc-FFY était également attesté par spectroscopie IR et par spectroscopie à émission de fluorescence. Enfin, il a été montré que la présence de l'auto-assemblage de Fmoc-FFY au sein du gel hôte conduisait à une augmentation du module d'élasticité G' du gel de 310 Pa à 430 Pa. Dans un second travail il a été fait usage d'un gel de poly(DMA-co-DAAM) réticulé par des chaînes de dialkoxamine-PEG (DMA : *N,N*-diméthylacrylalide; DAAM: diacétone acrylamide) dans lequel étaient enfoui de l'AP.¹⁴ Là, des solutions de Fmoc-FFpY ont été ajoutées pour diffuser dans le gel et former des auto-assemblages de Fmoc-FFY. L'auto-assemblage a, là encore, été visualisé par microscopie confocale. La Figure 10 montre une série d'images représentant des coupes du gel de haut en bas avec un espacement entre plan de coupe de 20 μm . On observe de l'auto-assemblage dans l'ensemble du gel. Dans ce cas, aucune modification significative des propriétés mécaniques du gel n'a pu être observée après induction de l'auto-assemblage de peptides. Il faut cependant observer que les gels hôtes présentaient déjà des modules d'élasticité de 1750 Pa, donc bien supérieur à la valeur correspondante au gel de PEG de la ref¹³. Ces gels ont ensuite été utilisés pour des études de viabilité cellulaire. Il a été montré que la présence de l'auto-assemblage de peptides favorise l'adhésion cellulaire et ce d'autant plus que des peptides de type Fmoc-F-RGD (R: arginine; G: glycine; D: acide aspartique) sont ajoutés à la solution de peptides précurseurs Fmoc-FFpY déposée sur le gel hôte.

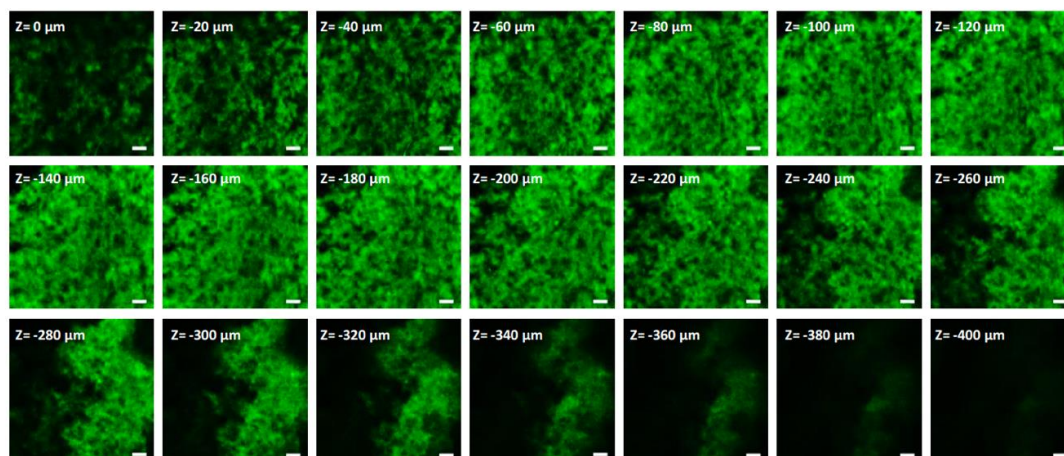


Figure 10: Différents plans de coupe d'un gel poly(DMA-co-DAAM) fonctionnalisé avec AP et dans lequel ont diffusé des peptides Fmoc-FFpY. Les structures vertes correspondent à l'auto-assemblage de Fmoc-FFY visualisé par ajout de Thioflavine T. Tirée de Enzyme assisted peptide self-assemblies trigger cell adhesion in high density oxime based host gels¹⁴ avec autorisation de RSC.

A notre connaissance cela constitue les seuls travaux relatifs au processus EASA dans des gels hôtes au démarrage de ma thèse. On remarquera que dans ces deux travaux la mobilité éventuelle des enzymes dans le gel n'a pas été déterminée. Bien que des plans de coupe ont été réalisés par microscopie confocale dans la ref¹⁴, le profil de concentration d'auto-assemblage n'a pas été déterminé avec précision. C'est ce profil qui nous intéressera plus particulièrement au cours de ma thèse.

III - Structuration de la matière à partir de processus de type réaction-diffusion

La nature regorge de structures plus ou moins périodiques. On en trouve à toutes les échelles de longueur, du micromètre dans les cellules aux kilomètres dans les structures géologiques, voire aux années lumières dans les structures de l'espace. Pour les décrire, de nombreux modèles mathématiques ont été développés. En chimie, ces structurations résultent généralement de processus de réaction-diffusion dans lesquels les substances chimiques sont soumises à deux phénomènes : des processus de diffusion qui tendent à homogénéiser les distributions des espèces dans l'espace et des processus de réactions, précipitation et/ou agrégation impliquant ou non la transformation locale de ces espèces chimiques.

La mise en équation la plus simple que l'on puisse trouver des processus de type réaction-diffusion porte sur la concentration d'une seule espèce chimique dans un espace à une dimension. L'équation de réaction-diffusion relative à un tel système a été énoncée séparément en 1937 par Fischer d'une part²⁹ et Kolmogorov, Petrovsky, Piskunov (KPP) d'autre part³⁰. Cette équation, dite KPP, s'écrit :

$$\partial_t u = D \partial_x^2 u + R(u)$$

où u représente la concentration d'une substance, D sa constante de diffusion et $R(u)$ le facteur de réaction chimique. Si ce dernier terme vient à s'annuler ($R(u) = 0$) il reste une simple équation de diffusion connue sous le nom de loi de Fick. Si $R(u) = u(1 - u)$ on obtient l'équation telle qu'énoncée par Fischer dans son article *The wave of advance of advantageous genes* utilisée à l'origine dans le contexte de l'étude de la dynamique de populations pour y décrire la propagation d'un allèle avantageux.

A contrario des équations de réaction-diffusion à une composante de type Fischer ou KPP, les systèmes de réaction-diffusion à deux composantes ou plus permettent la description d'un plus grand nombre de phénomènes. Ces systèmes de réaction-diffusion se classent à ce jour en deux grandes familles. La première rend compte des phénomènes de type Liesegang. Il s'agit de phénomènes de type nucléation-croissance que l'on rencontre le plus souvent en chimie, en physique, en géologie mais également en biologie et même en médecine pour certains cas particuliers de formation de kystes ou calculs rénaux.³¹⁻³⁷ La caractéristique principale de ces

phénomènes est de conduire à des structures qui se figent dans le temps. Ce type de processus jouent un rôle important dans mon travail de thèse.

La deuxième famille de processus de réaction-diffusion correspond à ceux menant aux « patternings » de Turing, décrits pour la première fois dans son article fondateur de 1952, *The chemical basis of morphogenesis*.³⁸

Nous allons commencer par décrire brièvement cette seconde famille de processus avant de détailler davantage les processus de type Liesegang.

1 - Processus de type Turing

Le concept introduit par Turing décrit la formation spontanée depuis un état homogène et uniforme de motifs de type rayures et taches observés dans la nature (le zèbre, le léopard ou encore certains poissons en constituent des exemples, Figure 11).

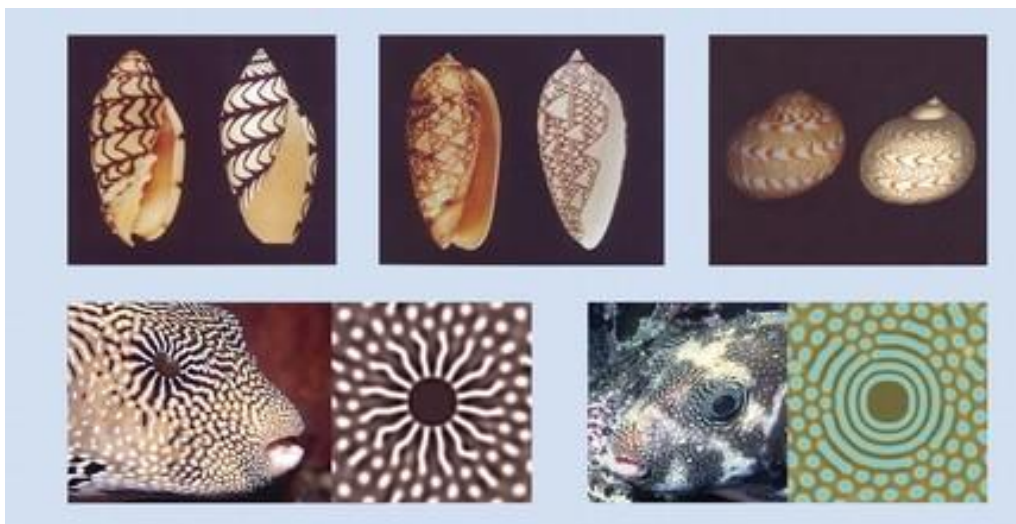


Figure 11: Images de motifs de RD observés dans la nature et confrontées à des simulations de RD de type Turing montrant que ceux-ci peuvent reproduire les motifs complexes observés chez certains organismes vivants. Image extraite de Reaction-diffusion model as a framework for understanding biological pattern formation³⁹ avec l'autorisation de AAAS.

Dans son article, Turing s'attache à examiner le comportement d'un système dans lequel deux substances diffusantes interagissent. Il y démontre théoriquement qu'un système de ce type est en mesure de générer un motif spatial à partir d'une distribution initiale homogène et même uniforme des espèces réactives. Turing diffère de ses prédécesseurs dans la construction de ses équations de réaction-diffusion dans le sens où il fait intervenir des termes d'activation

et d'inhibition de réactions. La forme générale de ses équations pour deux composantes est la suivante :

$$\frac{\partial A}{\partial t} = F(A, B) + D_A \nabla^2 A$$
$$\frac{\partial B}{\partial t} = G(A, B) + D_B \nabla^2 B$$

Dans ce jeu d'équations, on retrouve deux termes de diffusion $D_A \nabla^2 A$ et $D_B \nabla^2 B$ où D_A et D_B représentent les coefficients de diffusion des espèces A et B. Or l'effet de ces termes tend à homogénéiser les espèces chimiques en présence. Afin d'observer la formation de motifs, c'est à dire des variations spatiales dans les concentrations d'espèces chimiques, il faut l'intervention d'autres mécanismes basés sur leur activation et leur inhibition. Dans le jeu d'équations ci-dessus, ceci est assuré par les termes de réaction $F(A, B)$ et $G(A, B)$ qui traduisent les propriétés suivantes :

- L'espèce A est auto-activatrice
- L'espèce A active également la production de l'espèce B
- L'espèce B inhibe la production de l'espèce A

Il faut de plus que l'espèce B diffuse plus vite que l'espèce A.

Turing suggère dans son article que ces processus physico-chimiques qui, bien que simplifiés et idéalisés, peuvent être à l'origine de la morphogénèse animale et végétale. Etant conscient du manque de preuves expérimentales, il ne dit pas qu'il s'agit du seul phénomène possible expliquant la morphogénèse ni même qu'il se retrouve de façon certaine dans un système vivant en particulier. Il est à souligner néanmoins que d'importants efforts ont été produits pour montrer que les différentes structures observées dans le vivant et notamment dans la variété de motifs présents sur les pelages, écailles ou coquillages pouvaient être obtenues *in silico* par des systèmes de réaction-diffusion de type Turing.³⁹ Cette analogie présente cependant des limites. En effet, Meinhardt et *al.* ont montré que la structure en bandes des embryons de drosophiles, bien que présentant de nombreuses similarités avec les patterns de Turing, en diffèrent dans le sens où chaque bande est composée de morphogènes qui lui est spécifique.⁴⁰

Il fallut attendre 40 ans pour qu'une mise en évidence expérimentale d'une structure de Turing soit réalisée par Castets et *al.* en 1990 dans l'article *Experimental evidence of a sustained standing Turing-type Non equilibrium Chemical pattern.*⁴¹ Cette mise en évidence relativement tardive par rapport aux travaux théoriques publiés par Turing et complétés de façon extensive entre temps (par Pearson principalement)⁴² est due au fait que les conditions nécessaires à la réalisation de telles structures sont extrêmement strictes (voir conditions listées ci-dessus). Ce

tour de force réussi par l'équipe de De Kepper a été réalisé dans un réacteur composé d'une pièce rectangulaire d'hydrogel de polyacrylamide dans lequel une ligne de taches périodiques a été observée consécutivement à la diffusion d'espèces A et B dans le réservoir (voir Figure 12).

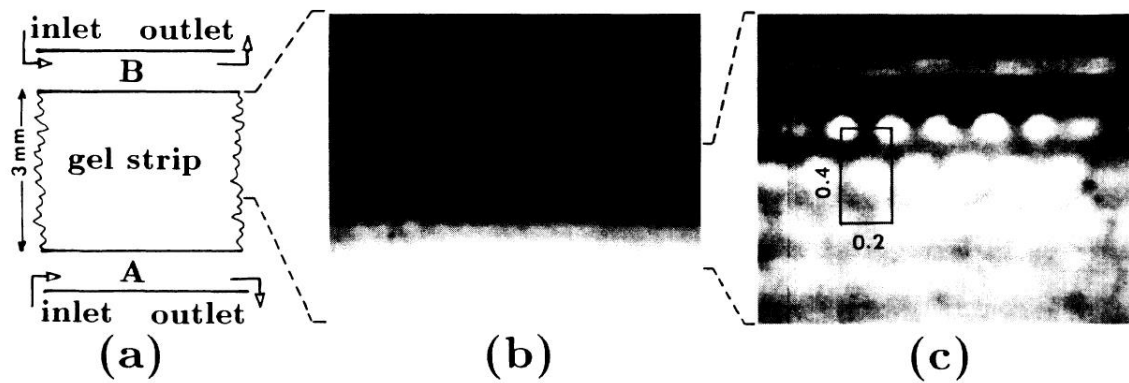


Figure 12: Image tirée de *Experimental evidence of a sustained standing Turing-type Non equilibrium Chemical pattern*⁴¹ présentant les premiers patterns de Turing obtenus expérimentalement (avec l'autorisation de American Physical Society)

Il est à noter que de nombreux modèles dérivés des équations de Turing ont vu le jour par après. On peut citer les modèles de Hodgkin-Huxley⁴³ ainsi que leur simplification établie par Fitzhugh-Nagumo^{44, 45} utilisée pour décrire des circuits excitables de façon périodique (utilisés pour la compréhension des dynamiques d'activation et désactivation de neurones ou cellules cardiaques).

En simulation pure, le modèle de Gray-Scott⁴⁶ permet d'observer les patterns atteignables par les équations de Turing. De tels patterns de réaction-diffusion ont même été observés en optique non linéaire dans les systèmes de Lugiato-Lefever.⁴⁷ Cela nous montre leurs très larges domaines d'application.

Dans le cas des systèmes de réaction-diffusion à trois ou plus de composantes, des systèmes expérimentaux et leur contrepartie théorique ont également vu le jour. On retient particulièrement le cas des réactions oscillantes de type Belousov Zhabotinsky. Historiquement, la découverte du phénomène est attribuée à Boris Belousov en 1951 qui essayait de découvrir une réaction non organique analogue au cycle de Krebs. Il remarqua que dans un mélange de bromate de potassium, sulfate de cerium IV, acide malonique et acide citrique dans de l'acide sulfurique, le ratio de la concentration en cerium IV et cerium III oscillait, résultant en une oscillation de couleur de la solution entre jaune et incolore. Belousov essaya de publier ces

résultats plusieurs fois mais fut rejeté à chaque tentative avant de finalement publier dans un compte-rendu de conférence à laquelle il participa en 1958.⁴⁸ Le processus fut étudié en détail par Zhabotinsky à partir de manuscrits dont l'auteur était, à l'époque, inconnu et qui circulaient en Union Soviétique.⁴⁹

2 - Processus de type Liesegang

Les phénomènes d'auto-assemblage et d'auto-organisation sont courants dans la nature. Ils sont retrouvés lors de la formation de motifs complexes à l'équilibre ou hors équilibre et ce à différentes échelles.⁵⁰ Cette formation de patterns/motifs correspond en réalité à l'émergence de profils de concentration non homogènes d'une ou plusieurs espèces chimiques dans l'espace car en effet, les motifs obtenus par réaction-diffusion sont une des catégories de motifs obtenus par la diffusion et la réaction d'espèces chimiques. La plus ancienne formation de motifs de ce type, décrite dans la littérature correspond au phénomène de Liesegang (ou phénomène de précipitation périodique) qui fut découverte par F.F. Runge⁵¹ en 1855 mais plus profondément décrite par R.E. Liesegang en 1896.⁵² Ces motifs sont non seulement observés en chimie mais également dans les structures géologiques (Figure 13).

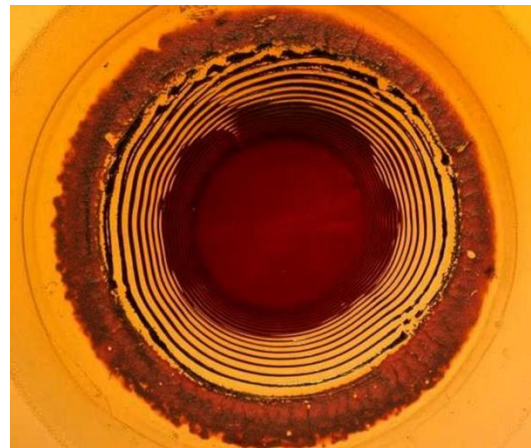


Figure 13: (gauche) Exemple de structure de type Liesegang observé dans les roches (Origine Wikipédia [https://en.wikipedia.org/wiki/Liesegang_rings_\(geology\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Liesegang_rings_(geology))). (droite) Anneaux de précipité de chromate d'argent dans une couche de gélatine (Origine Wikipédia https://en.wikipedia.org/wiki/Liesegang_rings).

Ces objets typiques de Liesegang correspondent à la formation de structures de précipitation par un front mouvant de réactions chimiques. Une expérience type qui, lors de sa mise en place, amène à la formation de tels motifs est la suivante : (i) dans un gel chimique est dissout un réactif (on appelle ce réactif l'électrolyte interne). (ii) un deuxième réactif en solution (on l'appelle électrolyte externe) est versé sur cette matrice. Il y diffuse et réagit avec l'électrolyte interne. (iii) Le produit de la réaction entre les électrolytes interne et externe précipite et, très fréquemment, on observe les motifs de précipitation sous la forme de bandes ou d'anneaux (suivant la géométrie du système étudié) qui sont séparés dans la direction perpendiculaire à la diffusion. Bien que les patterns de Liesegang soient connus depuis plus de 150 ans, il n'existe pour le moment aucun consensus expliquant pleinement le phénomène sous-jacent. Cet état de fait est principalement dû au manque de théorie qui pourrait être **quantitativement** comparé aux expériences.

Deux grandes familles de modèles se dégagent néanmoins pour expliquer le phénomène. Ils seront décrits dans la prochaine partie de ce chapitre.

a. Les modèles mathématiques décrivant les processus de type Liesegang

Il n'existe à ce jour pas de modèle standard expliquant pleinement la diversité des structures de Liesegang observées. Les modèles proposés jusqu'à présent peuvent être classifiés en deux catégories : pré-nucléation et post-nucléation.

Les différences critiques entre ces deux familles de modèles reposent sur les étapes menant à la formation des structures périodiques observées dans les systèmes de Liesegang. Les deux modèles commencent par la diffusion de l'électrolyte externe que nous appellerons A dans le milieu contenant l'électrolyte interne que nous appellerons B qui y est distribué de façon homogène. La concentration de A doit être largement en excès par rapport à celle de B.

Le modèle de pré-nucléation postule que la diffusion de l'électrolyte externe A est accompagnée par la nucléation et la croissance du précipité AB, produit de la réaction de A avec B, dans la région où le produit des concentrations de A et B excède la concentration critique de nucléation de AB, elle-même supérieure au produit de solubilité de AB. Comme la concentration des réactifs B décroît localement en raison du processus de nucléation et croissance, on y observe une zone de déplétion de B et donc de AB. Cependant, comme la concentration de A est bien supérieure à celle de B, A continue de diffuser plus avant dans le gel si bien qu'après le zone de déplétion on retrouve des conditions propices à la nucléation et

croissance et le phénomène se reproduit ainsi dans l'ensemble du gel (à moins que A ne soit épuisé). La répétition de ces zones nucléées et déplétées mènent aux structures de Liesegang.

Le modèle de post-nucléation quant à lui, et bien que possédant les mêmes conditions initiales, postule que le front de réaction mène à une distribution constante de particules du produit de la réaction dans le milieu. Ainsi, ce n'est pas durant la diffusion de l'espèce que la structure de Liesegang se forme, mais par après. Ici, la formation spontanée de zones répétées de particules et de zones de déplétion provient de l'instabilité dynamique ou de la compétitivité dans la croissance des particules dans la distribution initialement homogène du produit de la réaction entre A et B. Ces deux modèles sont schématiquement représentés ci-dessous dans la Figure 14.

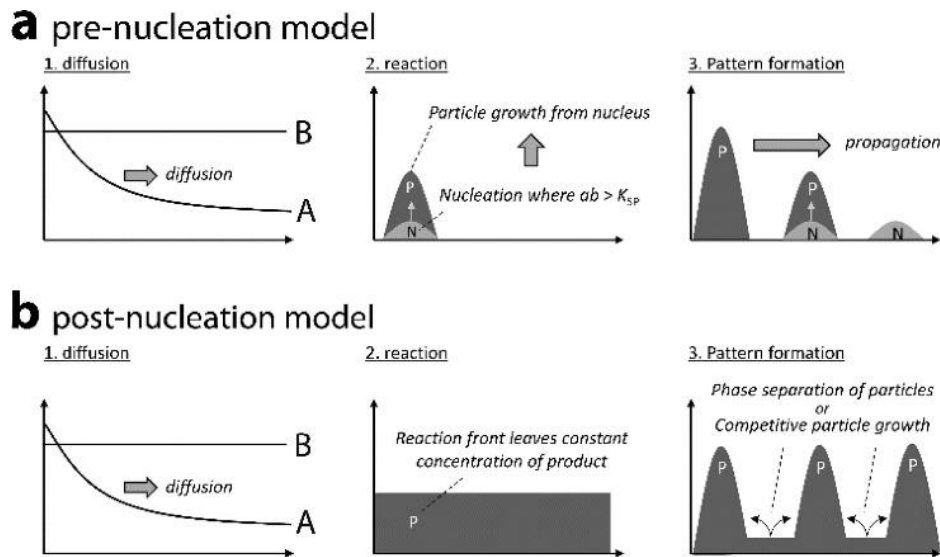


Figure 14: Représentation schématique des modèles pré et post-nucléation. Image tirée de Pattern Formation in Precipitation Reactions: The Liesegang Phenomenon.⁵³

Nous allons maintenant détailler plus avant ces modèles

i) Les modèles de type pré-nucléation

◆ La théorie faisant appel à la sursaturation

Le premier modèle, qui correspond également à la première tentative de mise en équation du phénomène, fut introduit par Wilhelm Ostwald (directeur de thèse de R.E.

Liesegang) qui publia une explication possible du phénomène de précipitation quasi périodique dans un livre de chimie générale en 1897. Il s'agit de la théorie de sursaturation.

Ce cas très simple faisant intervenir la réaction $A + B \rightarrow D$ est basé sur l'hypothèse que la précipitation de l'espèce D à un temps t et à une position x se produit si le produit des concentrations $[A](x, t) \times [B](x, t)$ dépasse une valeur seuil qui correspond au seuil critique de sursaturation q :

$$[A](x, t) \times [B](x, t) \geq q$$

Les équations décrivant ce processus de réaction-diffusion sont données par :

$$\begin{aligned} \frac{\partial[A]}{\partial t} &= D_A \frac{\partial^2[A]}{\partial x^2} - k\theta([A][B] - q) - \lambda[A][B][D] \\ \frac{\partial[B]}{\partial t} &= D_B \frac{\partial^2[B]}{\partial x^2} - k\theta([A][B] - q) - \lambda[A][B][D] \\ \frac{\partial[D]}{\partial t} &= k\theta([A][B] - q) + \lambda[A][B][D] \end{aligned}$$

où D_A et D_B sont les constantes de diffusion des espèces A et B , et $\theta(x)$ est la fonction échelon définissant un seuil parfaitement net pour la précipitation avec k la constante de précipitation et λ la constante d'aggrégation. Le dernier terme sur la partie droite des équations représente la croissance des espèces D de concentration $[D](x, t)$. Les concentrations initiales des concentrations des différentes espèces sont données par $[A](x, 0) = [A]_0\theta(-x)$, $[B](x, 0) = [B]_0\theta(x)$ et $[D](x, 0) = 0$. Il est à noter que au cours de ma thèse nous avons introduit un modèle proche de celui-ci pour expliquer les motifs observés lors de la diffusion de peptides capables d'auto-assemblage sous action enzymatique dans des hydrogels hôtes.

◆ Théorie faisant appel à la nucléation et croissance

Ce modèle, qui ajoute un niveau de complexité supérieur à celui introduit par Ostwald, est connu comme la théorie de « nucleation and droplet growth » établie par G.T. Dee en 1986 dans *Patterns Produced by Precipitation at a Moving Reaction Front*.⁵⁴ Il postule que la réaction $A + B$ mène au précipitat D à travers un composé intermédiaire C . Ce composé C peut en principe être une molécule AB mais cela peut également être une molécule formée par A , B et certains ions présents en solution. Cette situation plus compliquée se comprend en faisant la supposition que les C peuvent être traités comme des espèces diffusantes qui vont précipiter si leur concentration dépasse une valeur seuil c . Le précipitat D croît alors en collectant et agrégeant les C environnants. Il est à noter que différents raffinements de cette théorie existent et diffèrent dans la sophistication apportée au processus de nucléation et croissance.

◆ La théorie ‘‘induced sol-coagulation’’

Un troisième modèle a été introduit généralisant la théorie de nucléation et croissance. Il est appelé « induced sol-coagulation theory » et a été introduit par Dhar et Chatterji en 1924 dans leur article *Theorien der Liesegangringbildung*.⁵⁵ Dans ce modèle, le substrat C est produit au front de la réaction entre A et B et s'agrège si deux conditions sont satisfaites :

- $[C]$ doit dépasser un seuil critique de coagulation c .
- la concentration $[A]$ de l'électrolyte externe A doit être supérieure au seuil critique de coagulation .

Cette seconde condition prend place dans les systèmes où les ions A écrantent les interactions de répulsion électrostatique parmi les substrats C .

ii) Les modèles de type post-nucléation

Comme nous l'avons montré plus haut, les modèles de type pré-nucléation (sursaturation, nucléation et croissance et sol-coagulation), bien que différents dans les processus impliqués, partagent la caractéristique suivante : le motif de Liesegang se forme à partir d'une étape de nucléation (voir Figure 14). Dans les modèles de type post-nucléation, le motif de Liesegang se forme par après et émerge d'une distribution homogène des colloïdes (précipité) dans le milieu. Ce processus peut être décrit soit par la théorie DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) donnant les probabilités et la dynamique d'agrégation, soit par la théorie du mûrissement d'Ostwald (Ostwald rippening) qui décrit comment de petits cristaux en suspension dans un milieu se dissolvent au profit des plus gros cristaux qui croissent.

Ortoleva et *al.* ont proposé en 1978 un modèle basé sur cette compétition entre croissance et dissolution et ont montré qu'il pouvait résulter en l'obtention de bandes périodiques sans prédétermination de la position des bandes durant l'étape de nucléation. Ce modèle est connu sous l'acronyme CPG (Competitive Particle Growth).^{56, 57}

Un dernier modèle plus récent reste à mentionner. Celui-ci est basé sur la décomposition spinodale et a été proposé en 1999.⁵⁸ Il enrichit la discussion en montrant que la formation de motifs de Liesegang peut également émerger de l'instabilité thermodynamique de l'état de dispersion.

Je n'entrerai pas ici dans les détails des équations des modèles de post-nucléation car je ne les ai pas employés dans ce travail. Il apparaît cependant important de mentionner que ces modèles de post-nucléation sont d'un avantage significatif dans le sens où ils permettent de simuler des géométries complexes en se basant sur les fluctuations thermiques. *A contrario*, les modèles de pré-nucléation excluent ces fluctuations car ils sont basés sur une approche déterministe dans laquelle les fluctuations sont ignorées.

Au cours de l'histoire des motifs de Liesegang, de nombreuses expériences ont été menées afin de dégager des lois empiriques sur la formation des bandes et ceci afin de raffiner les expériences menées *in silico* citées ci-dessus.

b. Quelques lois empiriques dérivées des structures de Liesegang

Les motifs de Liesegang ont l'avantage de pouvoir être étudiés et mesurés sans équipement spécifique. En effet, un simple appareil photo numérique permet d'acquérir les informations essentielles à l'établissement de certaines règles intrinsèques à la formation des bandes de Liesegang (Figure 15). Ces règles sont au nombre de trois et peuvent être décrites de façon très succincte.

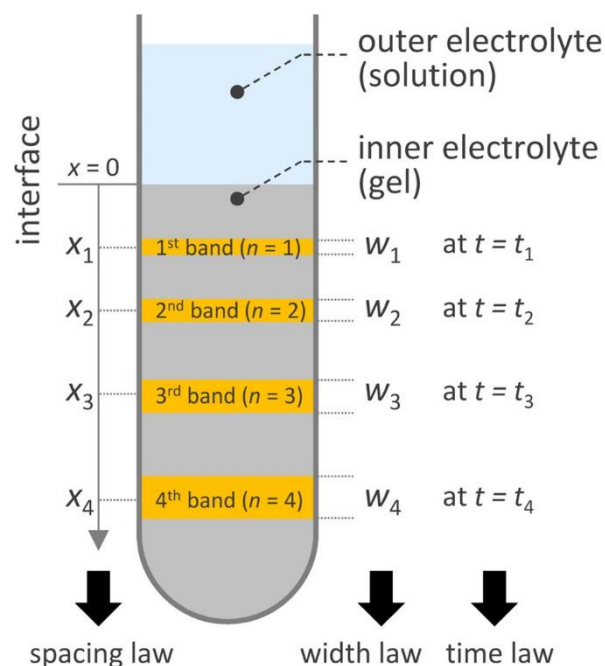


Figure 15: Représentation schématique des trois lois empiriques dérivées des structures de Liesegang (extrait de Pattern Formation in Precipitation Reactions: The Liesegang Phenomenon⁵³)

i) Dépendance temporelle

Après une certaine période transitoire, la position x_n de la $n^{\text{ième}}$ bande est reliée au temps t_n de sa formation à travers la loi de dépendance temporelle $x_n \sim \sqrt{t_n}$ introduite par Morse et Pierce en 1903 dans l'article *Diffusion and Supersaturation in Gelatine*.⁵⁹

ii) Dépendance d'espace

Pour n grand, le ratio entre la position de deux bandes consécutives approche une valeur constante :

$$\frac{x_n}{x_{n-1}} \rightarrow 1 + p, \text{ avec } 0.005 < p < 0.4$$

Cette dépendance est également appelée loi de Jablczynski⁶⁰ où la quantité $1 + p$ est appelée coefficient d'espace. Il est à noter que le coefficient d'espace $1 + p$ est une quantité non universelle qui dépend grandement des concentrations $[A]$ et $[B]$ des électrolytes externe et interne.

En se basant sur différentes expériences, Matalon et Packter énoncèrent une loi éponyme concluant que :

$$p = F([B]_0) + \frac{G([B]_0)}{[A]_0}, \text{ où } F \text{ et } G \text{ décroissent avec l'augmentation de leur argument.}$$

Un problème avec cette loi est qu'il est compliqué expérimentalement de changer les concentrations $[A]_0$ et $[B]_0$ d'un facteur supérieur à 10 (pour des raisons de solubilité). De plus, p a lui-même une barre d'erreur conséquente car il est déterminé à partir d'un nombre fini de bandes (généralement $10 \leq n \leq 20$). Il est à noter cependant que de nombreuses études expérimentales et numériques ont confirmé cette loi^{61, 62} et qu'une étude en particulier a même montré que parmi les modèles de type pré-nucléation, les équations de la théorie "induced sol-coagulation" sont les plus à même de décrire les observations expérimentales menant à la loi de Matalon-Packter.⁶³

iii) Dépendance sur les largeurs de bandes

Cette dernière loi, appelée "width law" postule que l'épaisseur w_n de la $n^{\text{ième}}$ bande est une fonction croissante de n . En général, $w_n \sim x_n^\alpha$ avec $\alpha > 0$.⁶⁴ Il est à noter que la définition de w_n étant sujette à débat et que les barres d'erreur résultant des mesures de cette quantité sont très grandes, cette dernière a très largement été ignorée dans les discussions entourant les phénomènes de Liesegang.

On pourra remarquer que ces règles sont devenues un protocole standard pour la caractérisation des motifs de Liesegang. Elles ont été établies à travers l'étude d'expériences

impliquant des espèces inorganiques comme des cations métalliques tels que Ag^+ , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} ou encore Mg^{2+} , avec leurs contre-anions $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, CrO_4^{2-} , I^- , F^- , S^{2-} , OH^- et SO_4^{2-} pour ne citer qu'eux. Dans la plupart de ces expériences, les cations métalliques sont l'électrolyte externe *A*, tandis que les anions sont distribués de façon homogène dans un gel et sont l'électrolyte interne *B*. Leur très grande diversité impliquant un nombre très important de ces systèmes inorganiques exhibant des structures de Liesegang, il paraît ici inutile de tous les citer.

A contrario, les systèmes organiques dans lesquels des structures de type réaction-diffusion^{41, 65-68} et plus particulièrement des structures de Liesegang ont pu être décrites sont bien plus rares⁶⁹.

Enfin, dans les auto-assemblages supramoléculaires le phénomène n'a été évoqué qu'une seule fois à ma connaissance. Van Esch et ses collaborateurs y ont fait référence en 2017 sans apport de preuve formelle.⁷⁰ Ils ont fait diffuser un aldéhyde dans un gel d'agar contenant une hydrazine. L'aldéhyde réagissait avec l'hydrazine pour former une hydrazone qui s'auto-assemblait et dont l'auto-assemblage pouvait être visualisé par microscopie confocale à fluorescence. Ils ont observé un profil d'auto-assemblage non monotone présentant une petite zone de déplétion d'auto-assemblage près de l'interface gel/solution (Figure 16). Ils ont commenté cette déplétion ainsi " Surprisingly, the gradient (gradient de fluorescence) was not completely gradual, but showed the formation of a band [...] This phenomenon was observed in repeated experiments [...] and may have an origin similar to the Liesegang patterns observed in precipitation systems." sans en apporter plus de preuve. Ils ont développé un modèle de réaction-diffusion rendant compte d'autres structures observées mais ils n'ont pas essayé de confronter leur modèle au profil non-monotone observé.

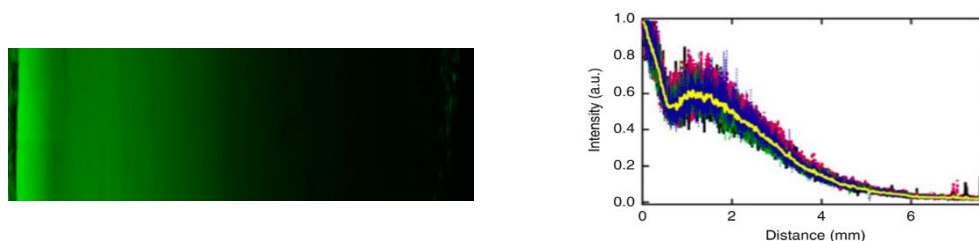


Figure 16: (gauche) Image du profil d'auto-assemblage. (droite) Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la distance. Tiré de Free-standing supramolecular hydrogel objects by reaction-diffusion⁷⁰ avec autorisation de Springer.

J'ai observé dans ce travail de thèse, et ce de façon fortuite, que des auto-assemblages supramoléculaires assistés par enzyme résultants de la diffusion de peptides précurseurs dans un hydrogel hôte menait à l'émergence de structures de type réaction-diffusion. Nous avons développé un modèle pour rendre compte de ces expériences qui s'avère être proche de celui basé sur le modèle de supersaturation d'Ostwald.⁷¹ Il s'agit à notre connaissance de la première démonstration expérimentale de l'émergence de structures de Liesegang dans des systèmes de type EASA.

Références

1. Decher, G., *Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites*. Science, 1997. **277**(5330): p. 1232-1237.
2. Rydzek, G., Jierry, L., Parat, A., Thomann, J. S., Voegel, J. C., Senger, B., Hemmerle, J., Ponche, A., Frisch, B., Schaaf, P., and Boulmedais, F., *Electrochemically Triggered Assembly of Films: A One-Pot Morphogen-Driven Buildup*. Angewandte Chemie-International Edition, 2011. **50**(19): p. 4374-4377.
3. Rydzek, G., Thomann, J. S., Ben Ameer, N., Jierry, L., Mesini, P., Ponche, A., Contal, C., El Haitami, A. E., Voegel, J. C., Senger, B., Schaaf, P., Frisch, B., and Boulmedais, F., *Polymer Multilayer Films Obtained by Electrochemically Catalyzed Click Chemistry*. Langmuir, 2010. **26**(4): p. 2816-2824.
4. Rydzek, G., Polavarapu, P., Rios, C., Tisserant, J. N., Voegel, J. C., Senger, B., Lavalley, P., Frisch, B., Schaaf, P., Boulmedais, F., and Jierry, L., *Morphogen-driven self-construction of covalent films built from polyelectrolytes and homobifunctional spacers: buildup and pH response*. Soft Matter, 2012. **8**(40): p. 10336-10343.
5. Dochter, A., Garnier, T., Pardieu, E., Chau, N. T. T., Maerten, C., Senger, B., Schaaf, P., Jierry, L., and Boulmedais, F., *Film Self-Assembly of Oppositely Charged Macromolecules Triggered by Electrochemistry through a Morphogenic Approach*. Langmuir, 2015. **31**(37): p. 10208-10214.
6. Garnier, T., Dochter, A., Chau, N. T. T., Schaaf, P., Jierry, L., and Boulmedais, F., *Surface confined self-assembly of polyampholytes generated from charge-shifting polymers*. Chemical Communications, 2015. **51**(74): p. 14092-14095.
7. Yang, Z., Gu, H., Fu, D., Gao, P., Lam, J. K., and Xu, B., *Enzymatic Formation of Supramolecular Hydrogels*. Advanced Materials, 2004. **16**(16): p. 1440-1444.
8. Williams, R. J., Smith, A. M., Collins, R., Hodson, N., Das, A. K., and Ulijn, R. V., *Enzyme-assisted self-assembly under thermodynamic control*. Nat. Nanotechnol., 2009. **4**(1): p. 19-24.
9. Vigier-Carriere, C., Boulmedais, F., Schaaf, P., and Jierry, L., *Surface-Assisted Self-Assembly Strategies Leading to Supramolecular Hydrogels*. Angewandte Chemie-International Edition, 2018. **57**(6): p. 1448-1456.
10. Yang, Z. M., Liang, G. L., Ma, M. L., Gao, Y., and Xu, B., *In vitro and in vivo enzymatic formation of supramolecular hydrogels based on self-assembled nanofibers of a beta-amino acid derivative*. Small, 2007. **3**(4): p. 558-562.
11. Fores, J. R., Criado-Gonzalez, M., Schmutz, M., Blanck, C., Schaaf, P., Boulmedais, F., and Jierry, L., *Protein-induced low molecular weight hydrogelator self-assembly through a self-sustaining process*. Chemical Science, 2019. **10**(18): p. 4761-4766.
12. Fores, J. R., Mendez, M. L. M., Mao, X. Y., Wagner, D., Schmutz, M., Rabineau, M., Lavalley, P., Schaaf, P., Boulmedais, F., and Jierry, L., *Localized Supramolecular Peptide Self-Assembly Directed by Enzyme-Induced Proton Gradients*. Angewandte Chemie-International Edition, 2017. **56**(50): p. 15984-15988.
13. Criado-Gonzalez, M., Rodon Fores, J., Wagner, D., Schroder, A. P., Carvalho, A., Schmutz, M., Harth, E., Schaaf, P., Jierry, L., and Boulmedais, F., *Enzyme-assisted self-assembly within a hydrogel induced by peptide diffusion*. Chemical Communications, 2019. **55**(8): p. 1156-1159.
14. Criado-Gonzalez, M., Loftin, B., Fores, J. R., Vautier, D., Kocgozlu, L., Jierry, L., Schaaf, P., Boulmedais, F., and Harth, E., *Enzyme assisted peptide self-assemblies trigger cell adhesion in high density oxime based host gels*. Journal of Materials Chemistry B, 2020. **8**(20): p. 4419-4427.

15. Wang, Z. Y., Liang, C. H., Shang, Y. N., He, S. S., Wang, L., and Yang, Z. M., *Narrowing the diversification of supramolecular assemblies by preorganization*. Chemical Communications, 2018. **54**(22): p. 2751-2754.
16. Qin, X., Xie, W. C., Tian, S., Cai, J. L., Yuan, H., Yu, Z., Butterfoss, G. L., Khuong, A. C., and Gross, R. A., *Enzyme-triggered hydrogelation via self-assembly of alternating peptides*. Chemical Communications, 2013. **49**(42): p. 4839-4841.
17. Wang, W. J., Qian, J. C., Tang, A. M., An, L. N., Zhong, K., and Liang, G. L., *Using Magnetic Resonance Imaging to Study Enzymatic Hydrogelation*. Analytical Chemistry, 2014. **86**(12): p. 5955-5961.
18. Vigier-Carriere, C., Garnier, T., Wagner, D., Lavalle, P., Rabineau, M., Hemmerle, J., Senger, B., Schaaf, P., Boulmedais, F., and Jierry, L., *Bioactive Seed Layer for Surface-Confining Self-Assembly of Peptides*. Angewandte Chemie-International Edition, 2015. **54**(35): p. 10198-10201.
19. Smith, A. M., Williams, R. J., Tang, C., Coppo, P., Collins, R. F., Turner, M. L., Saiani, A., and Ulijn, R. V., *Fmoc-Diphenylalanine self assembles to a hydrogel via a novel architecture based on pi-pi interlocked beta-sheets*. Adv. Mater., 2008. **20**(1): p. 37-+.
20. Yang, Z. M., Gu, H. W., Fu, D. G., Gao, P., Lam, J. K., and Xu, B., *Enzymatic formation of supramolecular hydrogels*. Adv. Mater., 2004. **16**(16): p. 1440-+.
21. Fores, J. R., Criado-Gonzalez, M., Chaumont, A., Carvalho, A., Blanck, C., Schmutz, M., Boulmedais, F., Schaaf, P., and Jierry, L., *Autonomous Growth of a Spatially Localized Supramolecular Hydrogel with Autocatalytic Ability*. Angewandte Chemie-International Edition, 2020. **59**(34): p. 14558-14563.
22. Thornton, K., Abul-Haija, Y. M., Hodson, N., and Ulijn, R. V., *Mechanistic insights into phosphatase triggered self-assembly including enhancement of biocatalytic conversion rate*. Soft Matter, 2013. **9**(39): p. 9430-9439.
23. Hirst, A. R., Roy, S., Arora, M., Das, A. K., Hodson, N., Murray, P., Marshall, S., Javid, N., Sefcik, J., Boekhoven, J., van Esch, J. H., Santabarbara, S., Hunt, N. T., and Ulijn, R. V., *Biocatalytic induction of supramolecular order*. Nat. Chem., 2010. **2**(12): p. 1089-1094.
24. Zhou, J., Du, X. W., Li, J., Yamagata, N., and Xu, B., *Taurine Boosts Cellular Uptake of Small D-Peptides for Enzyme-Instructed Intracellular Molecular Self-Assembly*. Journal of the American Chemical Society, 2015. **137**(32): p. 10040-10043.
25. Baillet, J., Gaubert, A., Verget, J., Latxague, L., and Barthelemy, P., *beta-Galactosidase instructed self-assembly of supramolecular bolaamphiphiles hydrogelators*. Soft Matter, 2020. **16**(33): p. 7648-7651.
26. Zhan, J., Cai, Y. B., Ji, S. L., He, S. S., Cao, Y., Ding, D., Wang, L., and Yang, Z. M., *Spatiotemporal Control of Supramolecular Self-Assembly and Function*. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2017. **9**(11): p. 10012-10018.
27. Fores, J. R., Criado-Gonzalez, M., Chaumont, A., Carvalho, A., Blanck, C., Schmutz, M., Serra, C. A., Boulmedais, F., Schaaf, P., and Jierry, L., *Supported Catalytically Active Supramolecular Hydrogels for Continuous Flow Chemistry*. Angewandte Chemie-International Edition, 2019. **58**(52): p. 18817-18822.
28. Vigier-Carriere, C., Wagner, D., Chaumont, A., Durr, B., Lupattelli, P., Lambour, C., Schmutz, M., Hemmerle, J., Senger, B., Schaaf, P., Boulmedais, F., and Jierry, L., *Control of Surface-Localized, Enzyme-Assisted Self-Assembly of Peptides through Catalyzed Oligomerization*. Langmuir, 2017. **33**(33): p. 8267-8276.
29. Fisher, R. A., *The Wave of Advance of Advantageous Genes*. Annals of Eugenics, 1937. **7**(4): p. 355-369.

30. Kolmogorov, A., Petrovskii, I., and Piscunov, N., *A study of the equation of diffusion with increase in the quantity of matter, and its application to a biological problem*. Byul. Moskovskogo Gos. Univ., 1937. **1**(6): p. 1--25.
31. Nakouzi, E. and Steinbock, O., *Self-organization in precipitation reactions far from the equilibrium*. Science advances, 2016. **2**(8): p. e1601144.
32. Cross, M. C. and Hohenberg, P. C., *Pattern formation outside of equilibrium*. Reviews of modern physics, 1993. **65**(3): p. 851.
33. Bradford, S., *The Liesegang Phenomenon and Concretionary Structure in Rocks*. Nature, 1916. **97**(2421): p. 80-81.
34. Boudreau, A. E., *Pattern Formation During Crystallization and the Formation of Fine-Scale Layering*. In *Origins of Igneous Layering*; Parsons, I. 1987, Reidel Publishing Company.
35. Meinhardt, H. and Klingler, M., *A model for pattern formation on the shells of molluscs*. Journal of theoretical Biology, 1987. **126**(1): p. 63-89.
36. Brenner, M. P., Levitov, L. S., and Budrene, E. O., *Physical mechanisms for chemotactic pattern formation by bacteria*. Biophysical journal, 1998. **74**(4): p. 1677-1693.
37. Sun, Y., Yang, Z., Shen, G., Zhou, Y., Zhou, X., Wu, J., and Xu, G., *Progress in the study on the composition and formation mechanism of gallstone*. Science in China Series B: Chemistry, 2001. **44**(5): p. 449-456.
38. Turing, A. M., *The Chemical Basis of Morphogenesis*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., 1952. **237**: p. 37--72.
39. Kondo, S. and Miura, T., *Reaction-diffusion model as a framework for understanding biological pattern formation*. Science, 2010. **329**(5999): p. 1616-20.
40. Smith, J. M. and Smith, J., *Shaping life: genes, embryos, and evolution*. 1999: Yale University Press.
41. Castets, V., Dulos, E., Boissonade, J., and De Kepper, P., *Experimental evidence of a sustained standing Turing-type nonequilibrium chemical pattern*. Physical Review Letters, 1990. **64**(24): p. 2953-2956.
42. Pearson, J. E., *Complex Patterns in a Simple System*. Science, 1993. **261**(5118): p. 189-192.
43. Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F., *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*. The Journal of physiology, 1952. **117**(4): p. 500-44.
44. FitzHugh, R., *Impulses and Physiological States in Theoretical Models of Nerve Membrane*. Biophysical Journal, 1961. **1**(6): p. 445-466.
45. Nagumo, J., Arimoto, S., and Yoshizawa, S., *An Active Pulse Transmission Line Simulating Nerve Axon*. Proceedings of the IRE, 1962. **50**(10): p. 2061-2070.
46. Gray, P. and Scott, S. K., *Autocatalytic reactions in the isothermal, continuous stirred tank reactor: Isolates and other forms of multistability*. Chemical Engineering Science, 1983. **38**(1): p. 29-43.
47. Lugiato, L. A. and Lefever, R., *Spatial Dissipative Structures in Passive Optical Systems*. Physical Review Letters, 1987. **58**(21): p. 2209-2211.
48. Belousov, B. P., *Periodicheski deistvuyushchaya reaktsia i ee mekhanizm [Periodically acting reaction and its mechanism]*. Sbornik referatov po radiatsionnoi meditsine, 1958 [Collection of abstracts on radiation medicine, 1958](Moscow: Medgiz) 1959: p. pp 145-147
49. Zhabotinskii, A. M., *Periodic Course of the Oxidation of Malonic Acid in a Solution (Studies on the Kinetics of Belusov's Reaction)*. Biofizika, 1964. **9**: p. 306-11.

50. John, K. and Bär, M., *Alternative Mechanisms of Structuring Biomembranes: Self-Assembly versus Self-Organization*. Physical Review Letters, 2005. **95**(19): p. 198101.
51. Runge, F. F., *Der Bildungstrieb der Stoffe, veranschaulicht in selbstständig gewachsenen Bilder*. Self-Edited, 1855.
52. Liesegang, R. E., *Ueber einige Eigenschaften von Gallerten*. Naturwissenschaftliche Wochenschrift, 1896. **11**(30).
53. Nabika, H., Itatani, M., and Lagzi, I., *Pattern Formation in Precipitation Reactions: The Liesegang Phenomenon*. Langmuir, 2020. **36**(2): p. 481-497.
54. Dee, G., *Patterns produced by precipitation at a moving reaction front*. Physical review letters, 1986. **57**(3): p. 275.
55. Dhar, N. and Chatterji, A., *Theorien der Liesegangringbildung*. Kolloid-Zeitschrift, 1925. **37**(2): p. 89-97.
56. Feinn, D., Ortoleva, P., Scalf, W., Schmidt, S., and Wolff, M., *Spontaneous pattern formation in precipitating systems*. The Journal of Chemical Physics, 1978. **69**(1): p. 27-39.
57. Feeney, R., Schmidt, S. L., Strickholm, P., Chadam, J., and Ortoleva, P., *Periodic precipitation and coarsening waves: Applications of the competitive particle growth model*. The Journal of Chemical Physics, 1983. **78**(3): p. 1293-1311.
58. Antal, T., Droz, M., Magnin, J., and Rácz, Z., *Formation of Liesegang Patterns: A Spinodal Decomposition Scenario*. Physical Review Letters, 1999. **83**(15): p. 2880-2883.
59. Morse, H. W. and Pierce, G. W., *Diffusion and Supersaturation in Gelatine*. Physical Review (Series I), 1903. **17**(3): p. 129-150.
60. Jablczynski, C., *Memoires presentes à la société chimique. Les anneaux de Liesegang*. Bulletin Société Chimie de France, 1923. **33**: p. 1592-1602.
61. Büki, A., Kárpáti-Smidróczki, É., and Zrínyi, M., *Computer simulation of regular Liesegang structures*. The Journal of Chemical Physics, 1995. **103**(23): p. 10387-10392.
62. Kárpáti-Smidróczki, É., Büki, A., and Zrínyi, M., *Pattern forming precipitation in gels due to coupling of chemical reactions with diffusion*. Colloid and Polymer Science, 1995. **273**(9): p. 857-865.
63. Antal, T., Droz, M., Magnin, J., Rácz, Z., and Zrinyi, M., *Derivation of the Matalon-Packter law for Liesegang patterns*. The Journal of Chemical Physics, 1998. **109**(21): p. 9479-9486.
64. Mueller, S. C., Kai, S., and Ross, J., *Periodic precipitation patterns in the presence of concentration gradients. I. Dependence on ion product and concentration difference*. The Journal of Physical Chemistry, 1982. **86**(20): p. 4078-4087.
65. Wei, Y., Han, S., Walker, D. A., Fuller, P. E., and Grzybowski, B. A., *Nanoparticle Core/Shell Architectures within MOF Crystals Synthesized by Reaction Diffusion*. Angewandte Chemie International Edition, 2012. **51**(30): p. 7435-7439.
66. Schlichter, L., Piras, C. C., and Smith, D. K., *Spatial and temporal diffusion-control of dynamic multi-domain self-assembled gels*. Chemical Science, 2021. **12**(11): p. 4162-4172.
67. Semenov, S. N., Markvoort, A. J., de Greef, T. F. A., and Huck, W. T. S., *Threshold Sensing through a Synthetic Enzymatic Reaction-Diffusion Network*. Angewandte Chemie International Edition, 2014. **53**(31): p. 8066-8069.
68. Padirac, A., Fujii, T., Estévez-Torres, A., and Rondelez, Y., *Spatial Waves in Synthetic Biochemical Networks*. Journal of the American Chemical Society, 2013. **135**(39): p. 14586-14592.
69. Babicheva, T. S., Konduktorova, A. A., Shmakov, S. L., and Shipovskaya, A. B., *Formation of Liesegang Structures under the Conditions of the Spatiotemporal*

-
- Reaction of Polymer-Analogous Transformation (Salt \rightarrow Base) of Chitosan*. The Journal of Physical Chemistry B, 2020. **124**(41): p. 9255-9266.
70. Lovrak, M., Hendriksen, W. E. J., Maity, C., Mytnyk, S., van Steijn, V., Eelkema, R., and van Esch, J. H., *Free-standing supramolecular hydrogel objects by reaction-diffusion*. Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 15317.
71. Runser, J. Y., Criado-Gonzalez, M., Fneich, F., Rabineau, M., Senger, B., Weiss, P., Jierry, L., and Schaaf, P., *Non-monotonous enzyme-assisted self-assembly profiles resulting from reaction-diffusion processes in host gels*. J Colloid Interface Sci, 2022. **620**: p. 234-241.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

I - Matériel

1 - Fluorophores, solutions et tampons

Tous les tampons et solutions aqueuses sont préparés dans de l'eau Milli-Q ultrapure (Milli-Q Plus system, Millipore, Billerica, MA) possédant une résistivité intrinsèque de 18,2 Ω . Le pH des solutions tampon est contrôlé à l'aide d'un pH/mV mètre (HANNA instruments) et ajusté par l'addition goutte à goutte de solutions d'HCl/NaOH à 0,1M.

Nom	Formule	Fournisseur	M(g.mol ⁻¹)	C(mol.L ⁻¹)
Rhodamine B isothiocyanate	C ₂₉ H ₃₀ ClN ₃ O ₃ S	Sigma Aldrich	536.08	--
Thioflavine T	C ₁₇ H ₁₉ ClN ₂ S	Sigma Aldrich	318.86	--
Carbonate de Sodium, pH=8,5	Na ₂ CO ₃	Sigma Aldrich	105.98	0.1
Ammoniac	NH ₄ OH	Sigma Aldrich	35.04	2.0
Borax, pH=9,5	Na ₂ B ₄ O ₇	Acros Organics	201.22	25 mM
Hepes, pH=3,6	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	Fisher Bioreagents	238.30	64 mM

PBS, pH=7,4	NaH ₂ PO ₄	Sigma	142.1	1.76
	Na ₂ HPO ₄		120	10
	NaCl		58.44	137
	KCl		74.55	2.7

Toutes ces solutions sont stockées à 4°C.

a. Tampon Borax

Le tampon borax est préparé en dissolvant 1g de sodium tetraborate anhydre dans 200mL d'eau Milli-Q. Après une nuit sous agitation magnétique, c'est-à-dire jusqu'à complète dissolution, le pH est ajusté par l'emploi d'une solution de NaOH à 0,1 mol.L⁻¹.

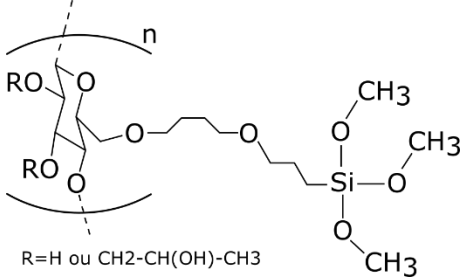
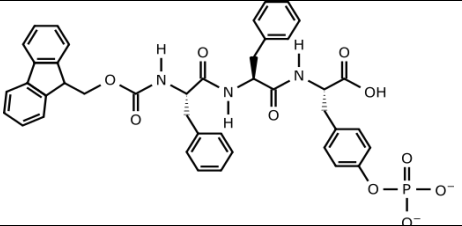
b. Tampon Hepes

Le tampon Hepes (pH 3.6) est préparé en dissolvant 3,1g de Hepes et 1,46g de NaCl dans 100mL d'eau Milli-Q. Après une nuit sous agitation magnétique ou complète dissolution, le pH est ajusté à 3,6 par l'emploi d'une solution de HCl à 0,1 mol.L⁻¹.

c. Tampon Phosphate

Le tampon phosphate (PBS, pH = 7,4) est préparé en dissolvant une tablette de PBS dans 200mL d'eau Milli-Q. On obtient ainsi une solution aqueuse contenant 0,01 mol.L⁻¹ de phosphate, 0,0027 mol.L⁻¹ de chlorure de potassium et 0,137 mol.L⁻¹ de chlorure de sodium.

2 - Polymère, hydrogélisateur et enzyme

Nom	Structure	Fournisseur	M(g.mol ⁻¹)
Hydroxypropylmethyl Cellulose Silanisé (Si-HPMC)	 <p>R=H ou CH₂-CH(OH)-CH₃</p>	Laboratoire ONIRIS (Nantes)	--
Fmoc-FFpY		Pepmic	777.25
Phosphatase alcaline		Sigma	160000

Le polymère employé est basé sur de l'hydroxypropylmethylcellulose fonctionnalisé par des silanes (Si-HPMC). Sa préparation se fait de la façon suivante :

- 6 g de polymère Si-HPMC sont dissous dans 194 mL d'une solution de NaOH à 0.2M. Cette solution est placée sous agitation magnétique avec un barreau aimanté pendant 48 h à température ambiante.
- Après complète dissolution, la solution est dialysée pendant 15-16 h contre 4L d'une solution de NaOH à 0.09M.
- Après cette première dialyse, une deuxième dialyse contre 4L d'une solution de NaOH à 0.09M est effectuée pendant 2 h.
- On obtient ainsi une solution de polymère de Si-HPMC à 3% wt (Si-HPMC-PS). Le pH final de Si-HPMC-PS est de 12,9.
- Cette solution est stockée dans un flacon de 200mL hermétiquement fermé au réfrigérateur à 4°C.

II - Méthodes

1 - Greffages

a. Marquage de la phosphatase alcaline par un fluorophore

Afin de connaître la distribution des enzymes au sein des hydrogels hôtes, il est nécessaire de les marquer à l'aide d'un fluorophore. Ceci permet de les visualiser durant les expériences de microscopie confocale à balayage réalisées dans le cadre de ce travail.

Pour ce faire, la sonde fluorescente Rhodamine B a été employée. Elle permet de former le couple enzyme (AP) greffée à un fluorophore, qui sera appelé AP^{RHO} dans la suite de ce manuscrit, et qui a été obtenu de la façon suivante :

- Dissolution de l'enzyme (AP) à 10mg.mL⁻¹ dans une solution aqueuse de Na₂CO₃ (0,1M, pH=8,5).
- Dissolution de Rhodamine B isothiocyanate dans du Diméthylsulfoxyde (DMSO) à 10mg.mL⁻¹.
- Mélange de ces deux solutions sous agitation magnétique à température ambiante pendant 1h en utilisant un rapport de 1mg de Rhodamine B pour 10mg d'AP.
- Purification par dialyse à 4°C pendant plusieurs jours avec changement régulier du bain de dialyse.
- En fin de dialyse, vérification de l'absence de Rhodamine B libre en solution par spectroscopie UV/Vis.
- Lyophilisation de la solution d'AP^{RHO} (cryogénisation à l'azote liquide puis évaporation de l'eau sous vide pendant 12h) avant entreposage à 4°C.

b. Fabrication de nanoparticules de silice et greffage d'enzymes à leur surface

Les nanoparticules de silice (NPs) ont été synthétisées en suivant la procédure décrite par Chang.¹ De plus, le greffage des enzymes sur ces mêmes NPs a été réalisé selon les recommandations de Wu.²

En détail, la synthèse des nanoparticules a été réalisée en suivant les étapes suivantes :

- Mélange de 80mL d'éthanol, 4,85mL d'eau Milli-Q et 3,6mL de NH₄OH dans un ballon à deux cols sous agitation magnétique et chauffage à 55°C.
- Lorsque la température est atteinte, 8mL d'éthanol et 3,1mL de tétraéthyle orthosilicate (TEOS) mélangés dans un pilulier séparé sont ajoutés rapidement à la solution préparée précédemment. Cette solution est alors maintenue à la température de 55°C sous agitation pendant 5h. À la fin de cette étape on obtient des NPs d'un diamètre moyen de 80 nm.
- Dans un deuxième temps et afin d'obtenir des NPs de plus grande taille par rapport à la première synthèse (≈ 80 nm), 10 mL de la suspension colloïdale préparée précédemment sont mélangés dans un ballon à deux cols avec 70 mL d'éthanol, 13mL d'eau Milli-Q et 7.5 mL de NH₄OH sous agitation magnétique et chauffés à 55°C.
- Une fois la température de 55°C atteinte, un mélange de 10 mL d'éthanol et 1mL de TEOS est ajouté goutte-à-goutte à la solution et maintenu à 55°C sous agitation magnétique pendant 5 h. On obtient alors des NPs d'un diamètre moyen de 120 nm.
- Ensuite, cette solution est centrifugée (6000 rpm, 20 mn) car les NPs sont en suspension. Le précipitat obtenu est rincé avec de l'éthanol (pour redispersion des NPs) puis centrifugé (6000 rpm, 20 mn). Cette opération est répétée trois fois afin de se débarrasser de toute trace de solvant autre que l'éthanol.

Pour l'immobilisation covalente des enzymes sur ces NPs, la procédure suivante a été suivie :

- Séchage de 2 mL de NPs à 100°C sous atmosphère d'argon pendant 2h dans un ballon de 50 mL.
- Après le séchage, une solution de 10 mL de (3-glycidyloxypropyl)triméthoxysilane (GPTMS) à 5% v/v dans du toluène anhydre est ajoutée sur les NPs.
- Cette suspension est placée au sonicateur pendant 10 mn puis gardée sous agitation orbitale à 720 rpm et température ambiante pendant 12 h.

- Les NPs obtenues qui sont donc à ce point fonctionnalisées par des groupements époxy sont centrifugées et le précipitat obtenu est rincé 6 fois. Les 3 premiers rinçages sont effectués dans du toluène anhydre (dispersion, centrifugation, redispersion) et les 3 derniers rinçages sont effectués dans de l'éthanol.
- Ces dernières NPs sont dispersées dans 0.5 mL d'éthanol ajoutées goutte-à-goutte à une solution aqueuse d'AP (1 mg.mL^{-1}) dans du tampon borax (25 mM, pH = 9,5) maintenue sous agitation magnétique durant l'opération. Cette solution est ensuite placée sous agitation orbitale pendant 24 h à 4°C.
- Les NPs sont ensuite centrifugées et rincées 5 fois dans du tampon borax (25 mM, pH = 9,5) pour retirer les enzymes non liées aux NPs.
- Finalement, les NPs@AP sont redispersées dans 1 mL de tampon borax (25 mM, pH = 9,5) et conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

2 - Protocole de préparation des gels

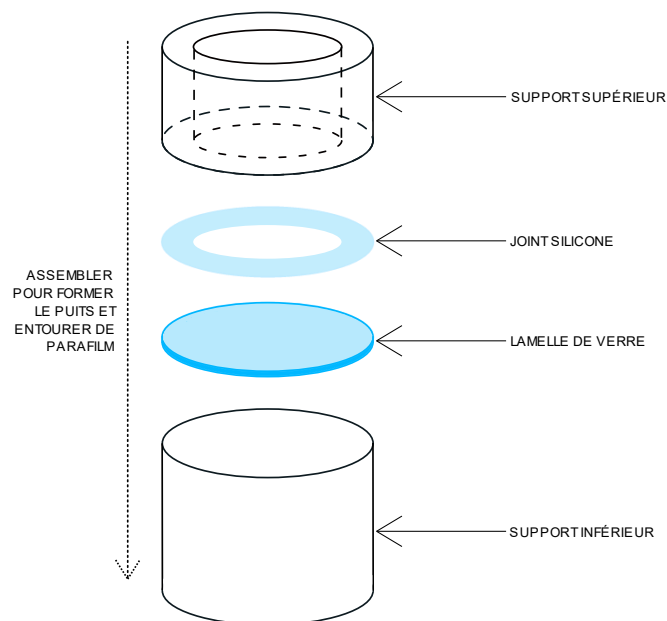


Figure 1: *Vue schématique du moule utilisé pour la conception des hydrogels.*

Les gels HPMC sont préparés en mélangeant à volume équivalent la solution de Si-HPMC-PS avec la solution de Hepes (pH = 3,6). Après deux jours à température ambiante, le gel hôte est

formé. Il est à noter que suivant l'expérience envisagée, cette préparation est effectuée dans un vial pour les tests d'inversion, un moule spécialement conçu pour les études de rhéologie et d'imagerie confocale (voir Figure 2 ci-dessous) ou encore dans une boîte de pétri pour les expériences de nanoindentation.

Les gels de HPMC contenant de l'AP ou des NPs@AP (gels AP-HPMC ou NPs@AP-HPMC) sont préparés en dissolvant l'AP (ou l'AP^{RHO}) ou les NPs@AP dans un pilulier avec du Hepes (pH = 3,6) suivant la concentration finale désirée en AP (ou NPs@AP) dans le gel AP-HPMC (ou NPs@AP-HPMC). La concentration en AP (ou NPs@AP) dissoute dans le Hepes dépend de la concentration finale en AP (ou NPs@AP) recherchée. Cette solution de AP (ou NPs@AP) dans le Hepes est ensuite mélangée à rapport équivalent avec la solution de Si-HPMC-PS (dans le moule 100 μ L/100 μ L et dans la boîte de pétri, 1mL/1mL). Les moules et boîtes de pétri sont systématiquement scellées à l'aide de parafilm et ceci afin d'éviter toute évaporation.

Après réticulation complète (48h à température ambiante), 50 μ L de Fmoc-FFpY dissous à la concentration voulue dans du borax (25mM, pH = 9,5) sont déposés en surface des hydrogels de AP-HPMC (ou NPs@AP-HPMC) dans le cas du moule ou une goutte de 4 μ L dans le cas de la boîte de pétri.

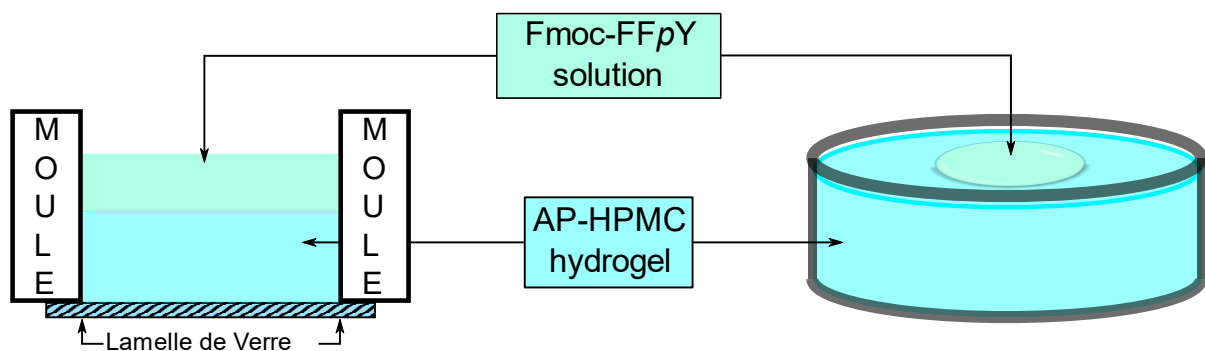


Figure 2: *Vision schématique de a) coupe transversale du moule présenté au schéma 1 et contenant l'hydrogel hôte couvert entièrement de la solution de peptide et b) boîte de pétri contenant l'hydrogel hôte sur lequel une goutte de solution peptidique est déposée.*

Cette solution de peptide ajoutée en surface des hydrogels y diffuse pendant 12h à température ambiante avant toute autre expérience de caractérisation. Les moules et boîtes de pétri sont systématiquement scellées à l'aide de parafilm et ceci afin d'éviter toute évaporation. Cependant, lorsque les expériences entreprises se font en cinétique (dans le cas de l'imagerie confocale notamment), l'expérience est entreprise directement après ajout du peptide sur

l'hydrogel hôte AP-HPMC. Il est à noter que la visualisation des auto-assemblages au microscope confocal a été rendue possible par l'ajout d'une solution de Thioflavine T (ThT) déposée en surface des hydrogels 2H avant de les imager. Dans le cas des expériences en cinétique, la ThT est encapsulée dans l'hydrogel hôte de la même manière que l'AP.

3 - Caractérisation des échantillons

a. Spectroscopie UV-Visible

Spectroscopies d'absorbance et de fluorescence sont réalisées sur le même appareil (FLX-Xenius®, SAFAS, Monaco) qui est un lecteur de plaques. Ainsi nous pouvons réaliser des contrôles d'activité enzymatique en réalisant des spectres d'absorption mais également prouver l'auto-assemblage des hydrogélateurs étudiés.

i) Mesure d'activité enzymatique

Cette mesure permet de déterminer la quantité de substrat (en mole) convertie en produit par les enzymes par minute. Ainsi, on peut connaître la quantité d'enzyme nécessaire à la conversion d'1 μmol de substrat en produit par minute.

Les mesures d'activité enzymatique de AP sont effectuées en utilisant du para-Nitrophényl Phosphate (p-NPP). En effet, AP est capable de convertir le p-NPP incolore en un composé jaune, le para-Nitrophenol (p-NP), présentant une absorbance à $\lambda = 405 \text{ nm}$ (Figure 3).

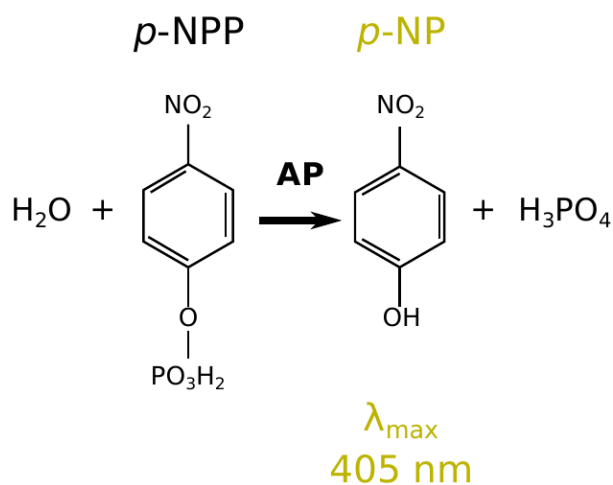


Figure 3: Hydrolyse enzymatique du para-Nitrophenyl Phosphate (p-NPP) par la phosphatase alcaline.

Au préalable, on détermine des courbes de calibration en ajoutant de l'AP à différentes concentrations à 150 μ L de p-NPP (à 1mM dans du tampon borax). Concentrations et volumes utilisés assurent toujours un large excès du substrat pour la réaction enzymatique.

Ceci fait, on peut déterminer l'activité enzymatique de l'AP encapsulée dans les hydrogels hôte AP-HPMC et NPs@AP-HPMC.

ii) Mesure de formation d'excimer

La fluorescence émise par Fmoc-FFpY en solution lorsqu'il est excité à 290nm apparaît à 310nm. Cette émission de fluorescence est due au groupe Fmoc dans son état non assemblé. Lorsque le peptide en solution est mis en présence de phosphatase alcaline, le peptide est déphosphorylé autorisant la production de l'auto-assemblage. On observe alors un décalage de la longueur d'onde de fluorescence vers les grandes longueurs d'onde prouvant la formation d'excimer (Figure 4).³

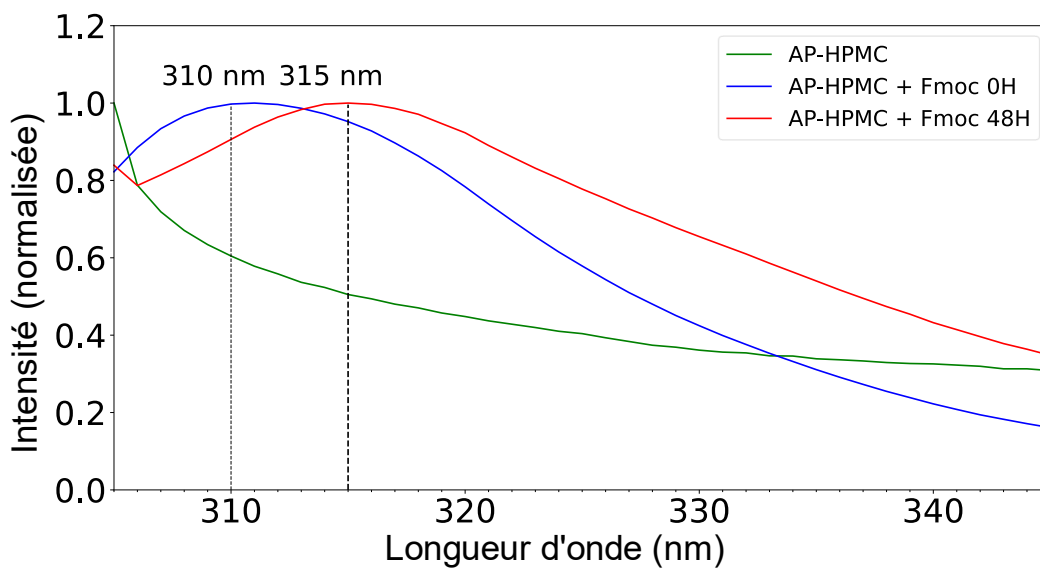


Figure 4: Exemple de spectre de fluorescence où l'on observe le décalage de 310nm à 315nm du maximum d'émission. Ce décalage est une signature typique de la formation des auto-assemblages de peptides de type Fmoc-X où X représente une séquence d'acides aminés.

b. Rhéologie

La rhéologie permet, sous l'effet d'une contrainte appliquée, l'étude de la déformation et de l'écoulement de la matière.

De nombreux systèmes existent pour réaliser les mesures de rhéologie dont l'objectif principal est de déterminer la relation entre contrainte et déformation appliquées à un matériau. Le système utilisé dans ce travail est un rhéomètre rotatif, très utile à la caractérisation des propriétés spécifiques à la matière molle et dans notre cas des hydrogels.

i) Principe de fonctionnement

Dans cette étude j'ai pu avoir accès à un rhéomètre rotatif. Il est à noter que les rhéomètres rotatifs sont de deux types. Le premier comprend les rhéomètres à contrainte imposée tandis que le second comprend les rhéomètres à déformation imposée. Dans les deux cas, un moteur impose une contrainte ou une déformation au matériau via une géométrie spécifique qui selon la mesure effectuée et le type de matériau étudié sera conique ou plate. Les déplacements consécutifs au mouvement du moteur sont par la suite enregistrés par le logiciel contrôlant l'appareil. Il est ainsi permis de caractériser les propriétés mécaniques du matériau à travers certaines grandeurs. Les principales informations extraites des mesures de viscoélasticité linéaire par rhéologie sont les modules dynamiques, c'est à dire le module de stockage (G') et le module de perte (G''). G' est une mesure de l'élasticité du matériau tandis que G'' est une mesure de son caractère dissipatif. Pour faire simple, un solide viscoélastique est caractérisé par $G'(\omega) > G''(\omega)$ avec $\omega \rightarrow 0$ tandis qu'un liquide viscoélastique est caractérisé par $G'(\omega) < G''(\omega)$ avec $\omega \rightarrow 0$. Il est à noter qu'il est possible de déterminer le caractère mou ou rigide d'un solide viscolélastique par l'amplitude du module complexe :

$|G^*(\omega)| = \sqrt{G'(\omega)^2 + G''(\omega)^2}$. De façon similaire, les liquides viscoélastiques peuvent être comparés en calculant leur viscosité complexe : $\eta^*(\omega) = \frac{G^*(\omega)}{\omega}$.

Dans le cas d'une déformation γ_0 imposée, l'appareil est en mesure de mesurer la contrainte résultante appliquée au matériau au cours du temps $\sigma(t)$. Ces deux grandeurs sont reliées par la relation suivante :

$$G(t) = \frac{\sigma(t)}{\gamma_0} \quad (1)$$

Il est à noter que dans le cas décrit ici d'une mesure en oscillation, la déformation γ imposée a pour conséquence une contrainte résultante σ dont l'amplitude varie sinusoïdalement avec un déphasage δ par rapport au déplacement de la façon suivante :

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cdot \sin(\omega t) \quad , \quad \dot{\gamma}(t) = \gamma_0 \omega \cdot \cos(\omega t) \quad (2)$$

$$\sigma(t) = \sigma_0(\omega) \cdot \sin[\omega t + \delta(\omega)] \quad (3)$$

Sachant de plus que :

$$G^* = G' + iG'' \quad (4)$$

Il est possible d'établir :

$$\sigma(t) = \gamma_0[G'(\omega) \sin(\omega t) + G''(\omega) \cos(\omega t)] \quad (5)$$

Cette dernière relation permet de déterminer les valeurs de G' et G'' caractéristiques du matériau étudié.

ii) Dispositif expérimental

Tous les gels ont été préparés dans un moule en Téflon de 10 mm de diamètre en suivant la procédure décrite en section 1.3.

Les propriétés rhéologiques des gels ont été mesurées sur un rhéomètre Kinexus Malvern (Figure 5) après avoir été déposés entre un support sablé et une géométrie plane de diamètre 10 mm également sablée avec une distance de travail de 2 mm. Les balayages en fréquence ont été réalisés de 0.01 à 20 Hz avec une déformation relative fixe de 0.1%. Les mesures de déformation relative ont été réalisées de 0.01% à 100% avec une fréquence fixe de 1 Hz.



Figure 5: Photographie du rhéomètre employé pour la conduite des expériences de rhéologie.

c. Nano Indentation

La nanoindentation consiste en l'application d'une force sur un indenteur de géométrie et propriétés mécaniques connues (typiquement indenteur de Berkovich, Vickers, cône ou encore sphérique) à la surface d'un matériau afin d'en déduire ses propriétés mécaniques. Cette technique est également appelée indentation instrumentée lorsque la force appliquée au contact et la pénétration qu'elle engendre sont mesurées continûment.

i) Principe de fonctionnement

Dans le cas du nanoindenteur utilisé dans ce projet (Optics11, modèle Chiaro, Pays-Bas), une sphère de diamètre connu, fixée à un cantilever dont la constante de raideur est établie par le constructeur est mise au contact de la surface d'un matériau. Une fois le contact établi, la sonde (sphère sur cantilever) pénètre le matériau avec l'assistance d'un moteur piézoélectrique. De façon très similaire à un microscope AFM il est par la suite possible de connaître la longueur de pénétration exacte de la sphère dans le matériau (voir Figure 6).

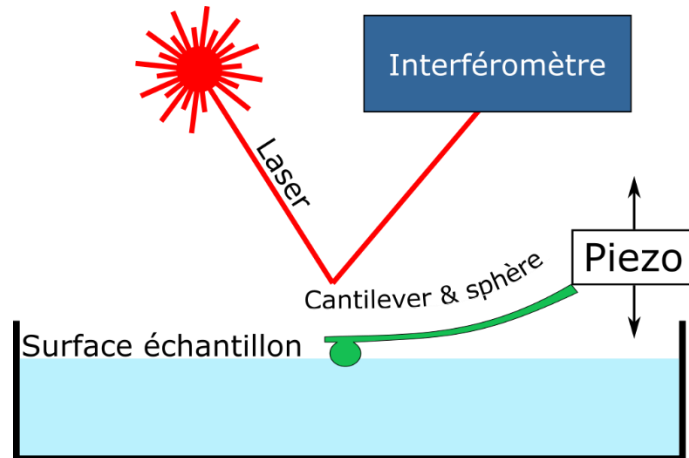


Figure 6: Représentation schématique du principe de fonctionnement du nanoindenteur employé.

Cette technique de nanoindentation qui est donc ici instrumentée (force appliquée au contact et longueur de pénétration mesurées simultanément et continûment) permet d'obtenir des courbes de charge-déplacement telles que celle représentée schématiquement dans la Figure 7.

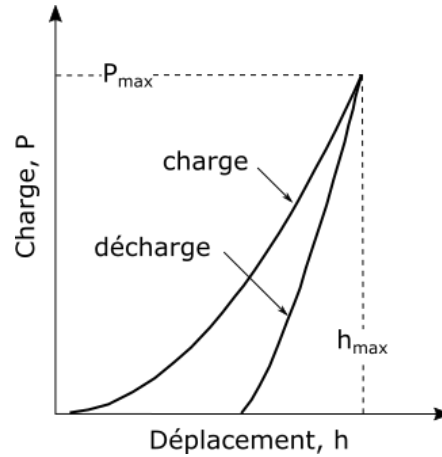


Figure 7: Représentation schématique d'une courbe typique de charge-déplacement. (Adapté de ⁴).

Une fois ces courbes établies, il est possible de déterminer les propriétés viscoélastiques du matériau de deux manières différentes.

La première méthode, qui est également la plus adaptée dans le cas des matériaux faiblement rigides consiste à analyser la courbe de charge en se basant sur le modèle de Hertz.⁵ Ce modèle permet d'exprimer la charge P de la façon suivante :

$$P = \frac{4}{3} \cdot E_{eff} \cdot R^{1/2} \cdot h^{3/2} \quad (1)$$

où R représente le rayon de l'extrémité de l'indenteur sphérique, h représente la profondeur de pénétration de la sphère dans le matériau étudié et E_{eff} représente le module d'élasticité composé de la sonde d'indentation et du matériau étudié.⁶ Ce module d'élasticité composite s'exprime ainsi :

$$\frac{1}{E_{eff}} = \frac{1 - \nu^2}{E} + \frac{1 - \nu'^2}{E'} \quad (2)$$

où E' et ν' représentent respectivement les modules d'élasticité et de Poisson de la sonde de l'indenteur, tandis que E et ν se réfèrent à ceux du matériau étudié.⁶

Il a de plus été montré par Sneddon que dans le cas d'un indenteur sphérique l'équation (1) peut s'exprimer de la façon suivante :⁷

$$\frac{P}{\pi a^2} = \frac{4}{3\pi} \cdot E_{eff} \cdot \left(\frac{a}{R}\right) \quad (3)$$

où a représente le rayon de contact au cours de l'indentation.

Dans le cas des matériaux mous, où $E' \gg E$, l'expression (2) peut se réduire à :

$$\frac{1}{E_{eff}} = \frac{1 - \nu^2}{E} \quad (4)$$

Par conséquent, le module d'élasticité du matériau est déterminé par l'expression :

$$E = \frac{3 \cdot P \cdot (1 - \nu^2)}{4 \cdot R^{1/2} \cdot h^{3/2}} \quad (5)$$

La deuxième méthode consiste à analyser la courbe de décharge en se basant sur le modèle d'Oliver et Pharr. Cette méthode n'étant pas adaptée à l'étude des matériaux très peu rigides,⁸ je ne l'ai pas employée dans ce projet et ne la détaillerai donc pas ici.

ii) Dispositif expérimental

Les échantillons ont été préparés de la façon suivante :

Dans un pilulier, la phosphatase alcaline est dissoute dans du tampon Hepes (pH = 3.6). Cette dernière solution est mélangée avec la solution de Si-HPMC(3%) dans une boîte de Pétri avec un rapport 1 mL/1 mL. Après 48 h de réticulation, une goutte (4 μ L) de Fmoc-FFpY dissous dans du tampon borax (pH = 9,5) à 5 mg.mL⁻¹ est ajoutée en surface de l'hydrogel précédemment formé dans la boîte de Pétri. La boîte de Pétri est fermée à l'aide de parafilm afin d'éviter toute évaporation. Cette goutte de solution peptidique reste au contact de l'hydrogel et y diffuse un minimum de 24h avant de poursuivre avec l'expérience de nanoindentation. Celle-ci est réalisée à l'aide d'un nanoindenteur Chiaro (Optics11, Pays-Bas) équipé d'une sonde dont la constante de raideur du cantilever est de 0,24 N.m⁻¹ et au bout de laquelle se trouve une sphère de rayon 33 μ m.

Les données ont été ajustées en utilisant le modèle de Hertz afin de déterminer le module de Young du matériau. Cet ajustement des données est réalisée directement dans le logiciel fourni par le fabricant de l'appareil (Figure 8). Les courbes ont par la suite été tracées au moyen du logiciel de programmation Python avec l'appui d'un script fait maison.

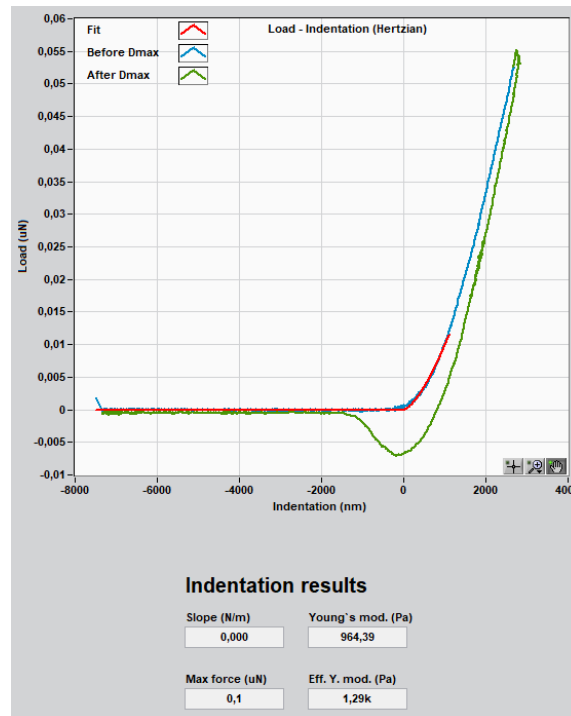


Figure 8: *Courbe typique de nanoindentation obtenue au travers du logiciel fourni par le fabricant de l'appareil. En bleu la courbe de charge, en vert la courbe de décharge (le profil inhabituel de cette courbe est dû au fait que la bille du nanoindenteur reste légèrement collée à l'hydrogel lors de son retrait) et en rouge ajustement de la courbe de charge par le modèle de Hertz.*

iii) Lien entre rhéologie et nanoindentation

Il est à noter que les méthodes de rhéologie décrites ci-dessus nous permettent de déterminer les caractéristiques mécaniques des matériaux étudiés. Les valeurs extraites de ces mesures présentent toutefois une différence fondamentale. En effet en rhéologie rotationnelle, on détermine les modules élastiques et visqueux G' et G'' qui sont obtenus par cisaillement du matériau en mode oscillatoire, tandis qu'en nanoindentation, on détermine le module de Young qui est obtenu par compression longitudinale uniaxiale du matériau en mode non oscillatoire. Dans ce travail de thèse, je n'ai pas vérifié si les valeurs obtenues avec ces deux méthodes de mesures étaient similaires car les gels sur lesquels ces mesures ont été réalisées présentent une hétérogénéité spatiale importante. Cette hétérogénéité spatiale qui résulte d'auto-assemblages non monotones de peptides au sein des hydrogels (voir Chapitres 3 et 4) ne nous permet pas de déterminer localement leur influence sur les propriétés mécaniques des hydrogels par rhéologie

rotative. C'est la raison pour laquelle nous avons employé dans ce projet un nanoindenteur en mesure de réaliser ce type de mesure sur des matériaux très mous.

Cependant, une telle vérification est en théorie possible dans le cas de matériaux homogènes en utilisant la relation suivante :

$$G = \frac{E}{2(1 + \nu)} \quad (6)$$

Où ν représente le facteur de poisson (généralement égal à 0,3 dans le cas des gels).

d. Microscopie Confocale à balayage

i) Principe de fonctionnement

L'inconvénient majeur de la microscopie classique, si l'échantillon observé est épais, est que seule une partie de l'objet se trouvant dans le plan focal sera observable. En effet les plans se trouvant à d'autres profondeurs (en z) rendront l'image floue.

Afin de circonvenir cet inconvénient, le microscope confocal est équipé de diaphragmes et de trous d'épingles au niveau des sources de lumière et des détecteurs afin que seule la lumière provenant du plan focal observé atteigne le détecteur (voir Figure 9)

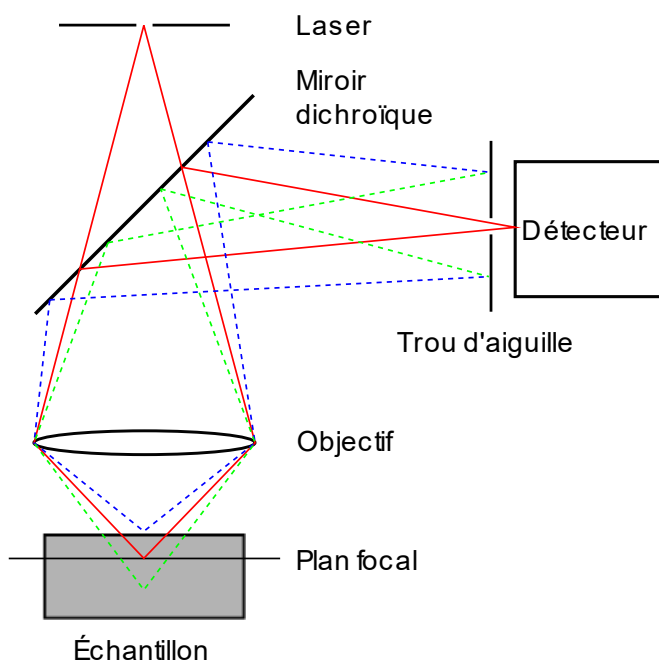


Figure 9: Représentation schématique du fonctionnement d'un microscope confocal à balayage. Grâce à un système de trou d'épingle (pinhole), seule la lumière émise par l'échantillon dans le plan focal est en mesure d'atteindre le détecteur.

L'illumination de l'échantillon se fait par une source laser qui couvre la surface de l'échantillon analysé en effectuant un balayage de l'objet en x et y . Les fluorophores contenus dans l'échantillon vont réémettre des photons par fluorescence qui sont captés par le détecteur permettant une mesure de l'intensité lumineuse émise par chaque point de la surface de l'échantillon balayée. En stockant ces mesures dans un ordinateur on obtient une image à haute résolution du plan observé.

Cette première image obtenue est en 2D. En bougeant la platine du microscope sur laquelle repose l'échantillon d'un pas en z (cet incrément peut être de l'ordre du micromètre) on peut reprendre le scan et obtenir une nouvelle image. Ces différentes coupes peuvent finalement être traitées par un logiciel adéquat afin d'obtenir une vue 3D de l'échantillon (voir Figure 10).

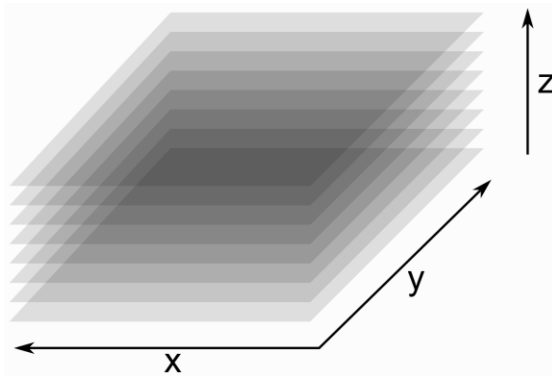


Figure 10: Représentation schématique d'une pile d'images xy obtenues par microscopie confocale. Il est possible à l'aide d'un logiciel adapté d'obtenir des reconstructions 3D de l'échantillon imagé ainsi.

ii) Dispositif expérimental

Les images de microscopie confocale ont été prises avec un microscope LSM 710 (Zeiss, Allemagne) équipé d'une tête de scan GaASP et en utilisant un objectif x20 (LD Plan-Neofluar 20x/0.4 Korr) pour les expériences de FRAP ou un objectif x10 pour les expériences réalisées en cinétique ainsi que pour les acquisitions d'images effectuées 24 h après déposition de la solution de peptide sur les hydrogels. La fluorescence de la Thioflavine T (ThT) a été détectée après excitation par un laser argon avec un miroir dichroïque filtrant de 458 nm et un filtre d'émission de 470-530 nm (émission dans le vert). La fluorescence de la Rhodamine B a été détectée après excitation par une diode laser à 561 nm et un filtre d'émission de 570-650 nm (émission dans le rouge).

Les gels ont été préparés dans un moule spécialement conçu pour leur construction (voir section 1.3) et placés sur un support de microscope conçu pour les accueillir.

Suivant l'expérience et la résolution temporelle requise lors de l'acquisition, celle-ci est effectuée en « line mode » (acquisition plus rapide) ou en « frame mode » (acquisition plus lente)

Les images ont été acquises avec le logiciel ZEN 2011 et analysées à l'aide du logiciel FIJI (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

L'extraction des données (intensités moyennes de fluorescence pour chaque ligne ou frame) est réalisée dans le logiciel FIJI au moyen d'un script maison écrit en Java. Les données ainsi recueillies ont été traitées au moyen de scripts écrits dans le langage de programmation Python (voir Annexe 1).

Références

1. Chang, S. M., Lee, M., and Kim, W.-S., *Preparation of large monodispersed spherical silica particles using seed particle growth*. Journal of Colloid and Interface Science, 2005. **286**(2): p. 536-542.
2. Wu, Y., Chen, C., and Liu, S., *Enzyme-Functionalized Silica Nanoparticles as Sensitive Labels in Biosensing*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(4): p. 1600-1607.
3. Smith, A. M., Williams, R. J., Tang, C., Coppo, P., Collins, R. F., Turner, M. L., Saiani, A., and Ulijn, R. V., *Fmoc-Diphenylalanine Self Assembles to a Hydrogel via a Novel Architecture Based on π - π Interlocked β -Sheets*. Advanced Materials, 2008. **20**(1): p. 37-41.
4. Oliver, W. C. and Pharr, G. M., *An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments*. Journal of Materials Research, 1992. **7**(6): p. 1564-1583.
5. Kontomaris, S. V. and Malamou, A., *Hertz model or Oliver & Pharr analysis? Tutorial regarding AFM nanoindentation experiments on biological samples*. Mater Res Express, 2020. **7**(3).
6. Johnson, K. L., *Contact Mechanics*. 1987: Cambridge University Press.
7. Sneddon, I. N., *The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile*. International Journal of Engineering Science, 1965. **3**(1): p. 47-57.
8. Pathak, S., Kalidindi, S. R., Klemenz, C., and Orlovskaya, N., *Analyzing indentation stress-strain response of LaGaO₃ single crystals using spherical indenters*. Journal of the European Ceramic Society, 2008. **28**(11): p. 2213-2220.

Chapitre 3 : Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

Ce chapitre est la reproduction intégrale de l'article "Non-monotonous enzyme-assisted self-assembly profiles resulting from reaction-diffusion processes in host gels" publié au cours de ce travail de thèse.

Runser, J.Y., M. Criado-Gonzalez, F. Fneich, M. Rabineau, B. Senger, P. Weiss, L. Jierry, and P. Schaaf, *Non-monotonous enzyme-assisted self-assembly profiles resulting from reaction-diffusion processes in host gels*. *J Colloid Interface Sci*, 2022. **620**: p. 234-241.

I - Introduction au chapitre

Comme décrit lors de l'introduction générale de ce manuscrit, l'objectif initial de mon projet doctoral était d'étudier l'auto-assemblage de peptides induit par des enzymes au sein de gels hôtes dans la configuration où les peptides diffusent dans un matériau qui contient les enzymes. Nous avons utilisé des gels hôtes de HPMC et des tripeptides précurseurs de type Fmoc-FFpY qui se transforment, en présence d'une phosphatase, en hydrogélateurs, Fmoc-FFY. Nous nous attendions à observer une distribution homogène d'auto-assemblage dans l'ensemble du gel : nous avons rapidement compris qu'il n'en est rien et que les relations qui régissent à la fois la réaction enzymatique, la diffusion des peptides, celle des enzymes et le processus d'auto-assemblage jouent un rôle majeur dans l'élaboration du profil d'auto-assemblage. En effet, on observe en particulier, un profil non monotone qui présente deux, ou plus, de maxima d'auto-assemblage spatialement résolus dans l'environnement 3D du matériau hôte. La mise en évidence de ce type de profil et l'influence de paramètres comme la concentration en enzymes dans le gel hôte et de peptides précurseurs dans la solution au contact du gel sur ce profil constitue l'objet de ce chapitre qui est le cœur de ma thèse.

Nous avons essentiellement utilisé la microscopie confocale à fluorescence pour observer les auto-assemblages de Fmoc-FFY. Nous avons effectué aussi bien des expériences cinétiques (suivi dans le temps de la formation du profil) que des analyses du profil à la fin du processus. L'auto-assemblage est révélé en ajoutant de la thioflavine T dans le gel. Celle-ci, en interagissant avec les feuillettes β des peptides auto-assemblés, fluoresce dans le vert. Nous avons également suivi la distribution des enzymes au sein du gel en utilisant de la phosphatase alcaline marquée à la rhodamine.

Enfin, nous proposons un modèle basé sur les processus de réaction/diffusion et sur le fait que le démarrage de l'auto-assemblage s'apparente beaucoup à un processus de nucléation homogène pour rendre compte qualitativement de nos expériences. Nous résolvons les équations correspondant à ce modèle de manière numérique pour une confrontation avec les résultats expérimentaux.

II - Abstract

Reaction–diffusion (RD) processes are responsible for surface and in-depth micropatterning in inanimate and living matter. Here we show that enzyme-assisted self-assembly (EASA) of peptides is a valuable tool to functionalize host gels. By using a phosphatase distributed in a host hydrogel, the diffusion of phosphorylated peptides from a liquid/host gel interface leads to the spontaneous formation of a pattern of dephosphorylated peptide self-assembly presenting at least two self-assembly maxima. Variation of enzyme and peptide concentrations change the pattern characteristics. When a peptide drop is deposited on a phosphatase functionalized gel, a self-assembly pattern is also formed both along the gel-solution interface and perpendicular to the interface. This self-assembly pattern induces a local change of the gel mechanical properties measured by nanoindentation. Its appearance relies on the formation of self-assembled structures by nucleation and growth processes which are static in the hydrogel. This process presents great similarities with the Liesegang pattern formation and must be taken into account for the functionalization of hydrogels by EASA. A mechanism based on RD is proposed leading to an effective mathematical model accounting for the pattern formation. This work highlights EASA as a tool to design organic Liesegang-like microstructured materials with potential applications in biomaterials and artificial living systems design.

III - Introduction

Enzymes constitute a powerful tool to induce self-assembly processes, since they can act on soluble molecules and transform them into poorly soluble hydrogelators which then self-assemble.¹ This process, called Enzyme-Assisted Self-Assembly (EASA), has received considerable attention over the last decade.²⁻⁴ For example when Fmoc-FFpY (Fmoc: 9-Fluorenylmethoxycarbonyl; F: phenylalanine; Y: tyrosine; p: phosphate group) peptides are brought into contact with alkaline phosphatase (AP), it transforms them into Fmoc-FFY which self-assemble in the form of long fibers of a few nanometers in diameter.⁵⁻⁷ Mainly studied in solution, EASA has also been developed by immobilizing the enzymes on surfaces of various kinds (planar surfaces, nanoparticles, porous materials).^{5, 8-11} Recently the supramolecular self-assembly of small low molecular weight hydrogelators has started to be investigated in host gels,¹²⁻¹⁴ opening the route to a new method of functionalization of gels for tissue engineering applications for example. In the case of EASA, a host gel containing enzymes is brought into contact with the hydrogelator-precursor solution.^{15, 16} These molecules diffuse into the gel, are transformed into hydrogelators and then self-assemble in the host gel. We have, for example, shown that Fmoc-FFpY brought into contact with a polyethylene glycol (PEG) gel functionalized with AP leads to the formation of self-assembled nanofibers in the host gel and to an accompanying change in the mechanical properties of the hydrogel.¹⁶ Even if such a self-assembly process must result from the interplay between reaction and diffusion (RD) processes, this aspect has not been investigated so far. RD processes are at the origin of a large number of patterns observed in nature in inanimate as well as in living matter.¹⁷ Among them, Liesegang patterns¹⁸ are the first that have been thoroughly investigated. First noticed in 1855 by F.F. Runge,¹⁹ and rediscovered by Liesegang in 1896, a first explanation was given by Ostwald.²⁰ They are observed when a precipitation reaction is coupled with diffusion processes in the absence of convection. Typically, when a soluble salt, A, diffuses into a gel containing another soluble salt, B, and when in addition AB forms a weakly soluble salt, one can observe, at high enough electrolyte concentrations the formation of regular structures such as rings or bands highly concentrated in AB precipitate. The characteristics of these structures (band or ring spacing, width of the bands. . .) depend upon numerous parameters such as the concentrations of the diffusing species or their diffusion coefficients. It is worth noting that B is generally in

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

much lower concentration than A. The formation of this precipitate induces a zone in the gel, near the interface, that is depleted chiefly in B. Then, when A diffuses into the gel, the salt concentrations in this zone are below the critical supersaturation degree at which precipitation starts. The critical degree of supersaturation is again reached further from the interface where the depletion of B is less pronounced leading to a new zone of AB formation. This precipitate formation again generates a new zone depleted in B. Because A continues to diffuse into the gel, this process is likely to take place further in the gel and eventually to produce additional bands. Since their discovery, impressive experimental achievements in the generation of Liesegang microstructured materials have been reported, mainly based on reactions involving inorganic species.^{21, 22} Despite their huge implications in biology, investigations based on the self-assembly of purely organic systems are rare.^{12, 13, 23-25} Here we will show that EASA taking place in enzyme functionalized host gels into contact with a precursor peptide solution leads to self-assembly patterns at the gel/solution interfaces. We will investigate the characteristics of the pattern and propose a simple mechanistic model accounting for the main observed features.

IV - Material and methods

1 - Experimental

a. Chemicals and abbreviations

Name, acronym (abbreviation)	M(g.mol ⁻¹)	Supplier	CAS number	Purity
Alkaline Phosphatase (AP)	160000	Sigma Aldrich	9001-78-9	Used as purchased
Rhodamine-labeled alkaline phosphatase (AP ^{RHO})	Prepared according to ref ²⁶			
Sodium tetraborate anhydrous (borax)	201.22	Acros Organics	1330-43-4	≥ 98%
Hydroxypropylmethyl Cellulose Silanized (Si- HPMC)	Prepared according to ref ²⁷			
Fmoc-FFpY	777.25	Pepmic (Suzhou, China)	--	≥ 99%
4-(2-Hydroxyethyl)-1- Piperazineethanesulfonic Acid (Hepes)	238.305	Fisher Scientific	7365-45-9	≥ 99%
Rhodamin B Isothiocyanate (RHO)	536.08	Sigma Aldrich	3677-69-7	Used as purchased
Thioflavin T (ThT)	318.86	Sigma Aldrich	2390-54-7	≥ 60%
p-Nitrophenyl Phosphate (pNPP)	263.05	Sigma Aldrich	4264-83-9	Used as purchased

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

Phosphate Buffered Saline Tablets (PBS)	--	Sigma	--	Used as purchased
Sodium Chloride	58.44	Fisher Scientific	7647-14-5	≥ 99.5%

b. Solutions and buffers preparation

The Hepes buffer solution (pH 3.6) was prepared by dissolving 3.1 g of Hepes and 1.46 g of sodium chloride in 100 mL MilliQ water. After 1 night stirring, the pH was adjusted to 3.6 using an HCl solution at 0.1 M.

The borax buffer solution (25 mM, pH 9.5) was prepared by dissolving 1 g of anhydrous sodium tetraborate in 200 mL MilliQ water. After 1 night stirring, the pH was adjusted by using a NaOH solution at 0.1 M.

The Phosphate Buffer Saline (PBS) solution (pH 7.4) was prepared by dissolving 1 tablet in 200 mL MilliQ water leading to a solution containing 0.01 M Phosphate Buffer, 0.0027 M potassium chloride and 0.137 M sodium chloride.

c. Host hydrogel cross-linking conditions and diffusion of Fmoc-FFpY within this host gel

Si-HPMC polymer chains and the host hydrogels made from Si-HPMC (called here HPMC gels) were prepared according to reference.²⁷ First, 6 g of Si-HPMC were dissolved in 194 mL of a NaOH solution at 0.2 M and stirred for 48 h. After complete dissolution, two dialysis baths were performed in NaOH solutions at 0.09 M. The first dialysis bath ran for 15–16 h while the second bath ran for 1–2 h. To obtain a Si-HPMC (3% wt) polymer solution (Si-HPMC-PS) at pH 12.9. HPMC gels were prepared by mixing Si-HPMC-PS with Hepes buffer solution (pH 3.6) in a mold at equivolume (100 μ L/100 μ L). AP-HPMC gels, i.e., HPMC gels containing AP, were prepared by first dissolving AP in a vial with Hepes buffer (pH 3.6) at 0.5 mg.mL⁻¹. This solution was then mixed with Si-HPMC-PS in a mold or a petri dish at equivolume: in the

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

molds 100 μL /100 μL , in the petri dish 1 mL/1 mL. Once the host gel was fully cross-linked (after 48 h at room temperature), 50 μL of Fmoc-FFpY at 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in borax (25 mM, pH 9.5) were deposited on the surface of the AP-HPMC gels in the case of the mold or a 4 μL drop was deposited in the case of the petri dish. Peptides from these solutions diffused for 12 h at room temperature before further investigations. To avoid evaporation of the peptide solution during its diffusion within the hydrogel, the mold and petri dish were carefully covered with parafilm. It was verified that the gel was still covered by a thin film of liquid before measurements.

d. UV/Vis spectroscopy

The enzymatic activity was measured in a microplate reader by UV spectroscopy (FLX-Xenius®, SAFAS, Monaco) using a 96-well plate. The AP activity of the AP-HPMC gel was measured by incubation of the substrate, para-nitrophenyl phosphate (PNP) (150 μL at 1 mM in borax buffer). Concentration and volume ensured a large excess of substrate for the enzymatic reaction. PNP is a colorless aqueous solution (commercially available) which leads to para-nitrophenol, a yellow compound absorbing light at $\lambda = 405 \text{ nm}$.

e. Rheology measurements

HPMC, AP-HPMC and AP-HPMC + Fmoc-FFpY gels were prepared as follows:

- HPMC: in a mold, mixing of 100 μL Hepes buffer (pH 3.6) with 100 μL of Si-HPMC (3%).
- AP-HPMC: in a vial, dissolve AP in Hepes buffer (pH 3.6) at 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Mixing in a mold of 100 μL of this last solution with 100 μL of Si-HPMC (3%).
- AP-HPMC + Fmoc-FFpY : same procedure as AP-HPMC.

Subsequently, 50 μL of different Fmoc-FFpY solutions (1 or 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) were put into contact with HPMC and AP-HPMC gels for 12 h at room temperature. Rheological properties were measured with a Kinexus Malvern rheometer using a 10-mm diameter plate geometry and a

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

1.8-mm gap. Strain measurements were carried out from 0.01% to 100% at 1 Hz. Frequency sweeps were performed from 0.01 Hz to 20 Hz at fixed strain of 0.01%. All graphs are given in Fig. S1.

f. Nanoindentation measurements

Samples were prepared as follows: in a vial, we dissolved AP in Hepes buffer (pH 3.6). We mixed this latter solution with Si-HPMC (3%) in a petri dish (1 mL/1 mL). After 48 h cross-linking, we added a drop (4 μ L) of Fmoc-FFpY dissolved in borax (25 mM, pH 9.5) at 5 mg.mL⁻¹.

After 12 h of diffusion of the peptide, the nanoindentation experiment was performed using a Chiaro nanoindenter (Optics11, The Netherlands) equipped with a sensor of 0.24 N.m⁻¹ cantilever spring constant at the end of which a tip of 33- μ m radius was positioned. Data were fitted using the Hertz model to determine the Young modulus of the material by using the software of the nanoindenter.

g. Confocal laser scanning microscopy

All solutions were prepared following the procedure described here by employing alkaline phosphatase labeled with rhodamine B (AP^{RHO}) instead of AP. Depending on the type of acquisition performed, the samples were prepared as follows:

- Kinetics: ThioflavinT-AP^{RHO}-HPMC gels named ThT-AP^{RHO}-HPMC were prepared by dissolving in Hepes buffer (pH 3.6) ThT at 0.5 mg.mL⁻¹ and AP at 0.5 mg.mL⁻¹. This solution was mixed with Si-HPMC (3%) at equivalent volumes (100 μ L/100 μ L) in a mold designed for confocal microscopy. After 48 h of gelation, the gel was placed under a microscope head and acquisition was launched in time series before addition of 50 μ L Fmoc-FFpY at 2 mg.mL⁻¹ in borax (25 mM, pH 9.5).
- Profile views : In this case, we dissolved, in a vial, AP in Hepes buffer (pH 3.6) at 0.5 mg.mL⁻¹. We then mixed 100 μ L of this solution with 100 μ L of Si-HPMC (3%) in a

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

mold. After 48 h of gelation, we added 50 μL of peptide at 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in borax (25 mM, pH 9.5) and let it diffuse for 12 h. 2 h before profile visualization, we added 50 μL of ThT at 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in borax (25 mM, pH 9.5) for self-assembly revealing.

The images were acquired using an inverted LSM 710 confocal scanning microscope (Zeiss, Germany). The ZEN 2.0 software was used for image capture. Samples were excited using a laser at 458 nm for ThT or 561 nm for APRHO. Gels were imaged directly in their containing molds. An EC Plan-NeoFluar 10/0.3 objective was used for imaging.

2 - Simulation

All simulations were performed in 1D using the finite elements method encoded with the Python programming language. This simulation work is extensively described in SI.

V - Results and discussion

1 - Self-assembly pattern in the drop configuration

By studying the EASA in a host hydrogel, we first deposited a drop of a phosphorylated peptide Fmoc-FFpY (Fig. 1a) onto a HPMC host gel²⁷ containing alkaline phosphatase, called AP-HPMC. Alkaline phosphatase (AP) is an enzyme that dephosphorylates Fmoc-FFpY into Fmoc-FFY which is known to self-assemble in solution.⁵⁻⁷ In the presence of Thioflavine T (ThT), a fluorescent marker of a Fmoc-FFY self-assembly,¹⁶ we observed, unexpectedly and by serendipity, around the peptide drop, a non-monotonous self-assembly profile both along the gel-solution interface and perpendicular to this interface in the gel: a chalice shape made of a peptide self-assembly was generated which matches with the geometry of the initial deposited drop (Fig. 1b and Fig. 1c). The observation was made by confocal laser scanning microscopy (CLSM). We will now investigate the origin and characteristics of this pattern formation.

2 - Rheology measurements in the drop configuration

The above mentioned non-monotonous self-assembly profiles should result in local variations of the gel mechanical properties. This has been verified by depositing a drop of Fmoc-FFpY solution on the host gel and measuring radially, along the host gel surface, its local mechanical properties using nanoindentation (Fig. 1c and 1d). The elastic modulus, i.e., the Young modulus E , is increasing when passing from the depleted to the enriched zone of peptide self-assembly which correspond to $E \approx 300$ Pa and $E \approx 700$ Pa, respectively. Remarkably, the length of the second maximum zone (≈ 800 μm) fits the length of the fluorescence emission zone observed by fluorescence microscopy. We also note that the value of the Young modulus measured in the depleted zone is equivalent to that of the naked AP-HPMC gel ($E \approx 3 * G' \approx 300$ Pa, Fig. S1),

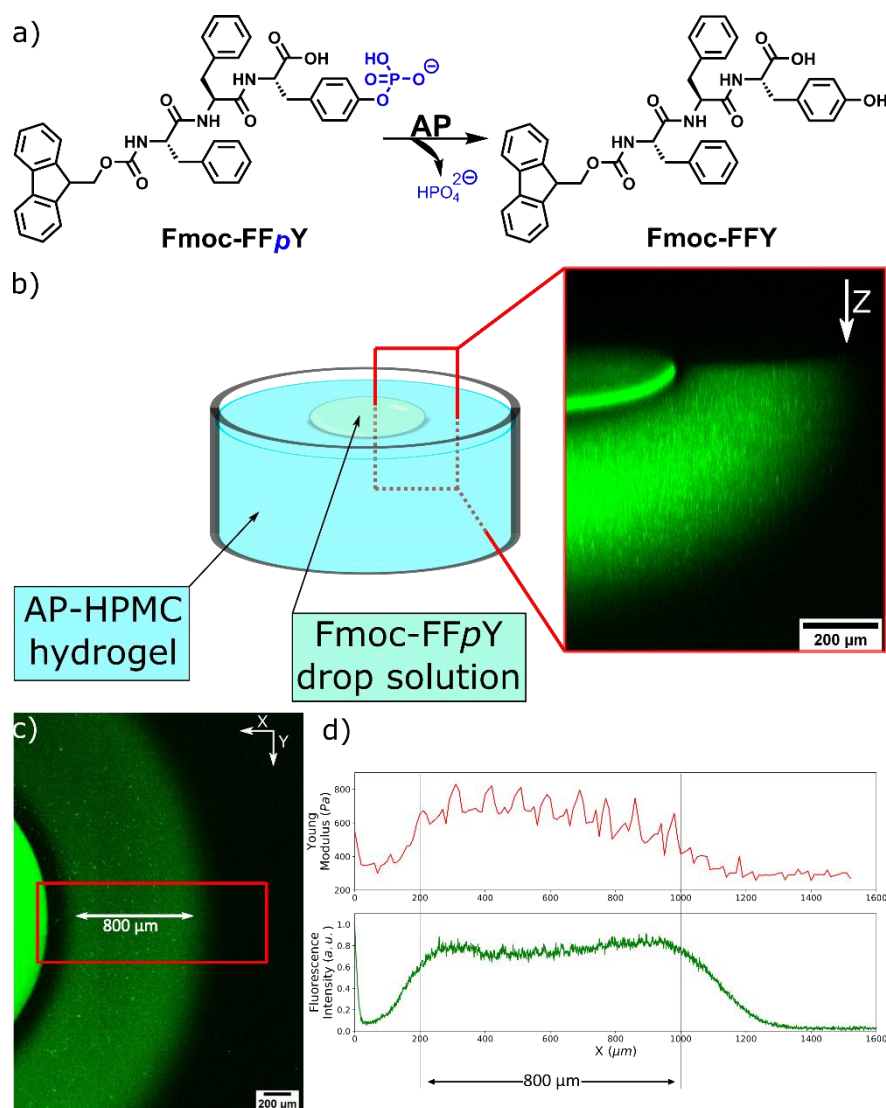


Figure 1: (a) Enzymatic hydrolysis of Fmoc-FFpY in Fmoc-FFY in presence of AP. (b) Cross-sectional view and (c) top view of the AP-HPMC hydrogel observed by CLSM, 12 h after the drop deposition of Fmoc-FFpY solution. ThT was used to reveal a Fmoc-FFY β -sheet assemblies through their green fluorescence emission. The red box in (c) corresponds to the area analyzed by (d) nanoindentation (top) and fluorescence emission measurements (bottom).

showing the quasi-absence of peptide self-assembly in this area. In several previous works^{10, 15} we have reported that the enzymatic dephosphorylation of Fmoc-FFpY leads to self-assembled nanofibers of Fmoc-FFY. The resulting nanofibrous network is able to underpin a supramolecular hydrogel architecture. Thus, when this network is generated within a host hydrogel as described in our work, it leads to the formation of an interpenetrated network

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

resulting in a change of the mechanical properties, as we observed. When the concentration of the precursor Fmoc-FFpY peptide is increased, the resulting Young modulus of the hydrogel also increases (Fig. S1).

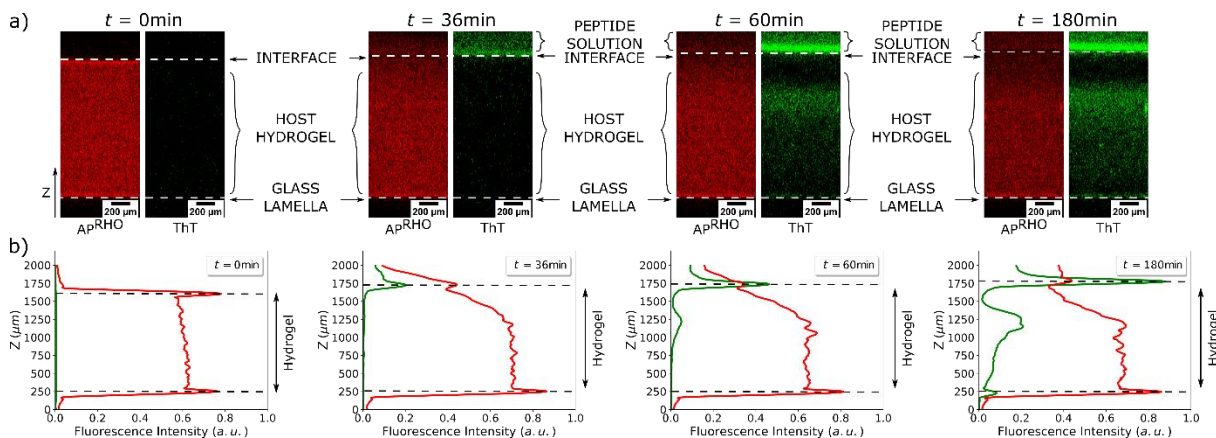


Figure 2: (a) Evolution of both the AP^{RHO} distribution (red) and the Fmoc-FFY self-assembly through ThT fluorescence emission (green) within an enzymatically active HPMC host hydrogel over time: $t = 0$ means before the deposition of the precursor peptide Fmoc-FFpY solution on top of the host hydrogels: $t = 36, 60$ and 180 mean the times in min elapsed after the Fmoc-FFpY solution deposition. (b) Cross-section profiles of the host hydrogel showing the relative fluorescence intensity of AP^{RHO} and ThT at $t = 0, 36, 60$ and 180 min.

3 - Self-assembly profile on a flat interface

To better understand the origin of this pattern we focused on host gel surfaces uniformly brought into contact with a Fmoc-FFpY solution. Through the fluorescence intensity measured along the direction perpendicular to the gel/solution interface, we followed the formation of the localized Fmoc-FFY self-assembly in depth and over time. AP is the trigger of the Fmoc-FFY self-assembly. Using AP^{RHO},²⁶ we have checked the enzyme distribution before the deposition of Fmoc-FFpY (Fig. 2a, $t = 0$ min): AP^{RHO} is homogeneously distributed all over the HPMC host gel, except a slight increase of enzyme density at the interface with the air, i.e., at the top of the HPMC gel, as well as at the gel/lamella interface.

The AP^{RHO} observed in Fig. S2 shows that the enzyme is diffusing in the gel. After deposition of a Fmoc-FFpY solution on top of the gel (containing ThT) we observed the Fmoc-FFY self-

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

assembly pattern formation over time. Typical snapshots of the kinetics of this pattern formation taken at 36, 60 and 180 min after contact with the precursor peptide solution are given (Fig. 2a). Z-stacked images allow to rebuild the so-microstructured gel, showing the distribution of both the AP (red) and the Fmoc-FFY self-assembly (green) (Fig. 2b).

The monitoring of the evolution over time reveals that Fmoc-FFY self-assembly starts instantaneously at the interface between the gel and the precursor peptide solution. This spontaneous process is not due to the presence of the excess of enzymes located at the gel/air interface before the deposition of the Fmoc-FFpY solution because the removal of this excess of AP by rinsing has no significant effect on the resulting self-assembled pattern (Fig. S3). After 40 min of contact with the Fmoc-FFpY solution, a second maximum of Fmoc-FFY self-assembly appears in the host gel, located 500 μm from the interface (Fig. 2a/b).

The self-assembly profile then decreases going from this second maximum to the bottom of the gel over a distance of 800 μm ; 60 min are required to establish entirely the second maximum and the related self-assembly profile. A 400- μm thick zone almost totally depleted in Fmoc-FFY self-assembly is observed between the first and the second maxima. It is interesting to notice the asymmetric shape of the self-assembly in the host gel with a steep increase before reaching the secondary maximum and a slow decrease of the self-assembly concentration towards the end of the gel.

To prove that the existence of the green fluorescence profile is indeed due to the self-assembly process we replaced Fmoc-FFpY in the contacting solution by fluorescein diphosphate (FDP), a molecule that is dephosphorylated in the presence of AP and becomes fluorescent. Neither the depletion zone nor the two fluorescence maxima were observed (Fig. S4). To support these observations, we performed additional control experiments. The presence of self-assembled Fmoc-FFY was also confirmed by using the characteristic red shift fluorescence emission of the stacked Fmoc groups at $\lambda_{\text{em}} = 315 \text{ nm}$ due to the aromatic excimer formation when excited at $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$ (Fig. S5).²⁸ The fact that the appearance of green fluorescence in the host gel is due to the presence of a peptide self-assembly was verified by bringing a gel containing only AP into contact with a ThT solution and by bringing a gel containing ThT but devoid of enzymes into contact with a Fmoc-FFpY solution. In both cases no significant green fluorescence was detected.

4 - Dependence of the self-assembly profile on peptide and enzyme concentrations

Next, we investigated the dependence of the self-assembly profile on the initial conditions. Increasing the concentration of Fmoc-FFpY in the solution from 0.25, 0.50 to 1 mg.mL⁻¹, while the initial enzyme concentration is fixed (0.25 mg.mL⁻¹), results in keeping the position of the self-assembly maximum in the host gel almost fixed while increasing its density and extending further the self-assembly zone towards the bottom of the host gel. This was observed through ThT fluorescence emission (Fig. S6a and S6b). Increasing the enzyme concentration in the host gel from 0.12, 0.25 to 0.5 mg.mL⁻¹ while fixing that of the deposited Fmoc-FFpY solution (1 mg.mL⁻¹) results in a diminution of the depletion zone width corresponding to the distance between the second self-assembly maximum in the gel and the interface (from 300 μm to 100 μm, Fig. S6c and S6d). A concomitant decrease of the self-assembly zone thickness inside the hydrogel is also observed.

5 - Origin of the self-assembly pattern

The central question is why does a depleted zone appear in spite of the diffusion of Fmoc-FFpY through the gel and the presence of AP in this area? In other words, what is the origin of the maximum of self-assembly located within the host gel? The first reason could be the formation of a zone depleted in enzymes in the gel at the gel/solution interface. Such a zone exists and is due to the diffusion of the enzymes into the solution when the gel enters into contact with the solution (Fig. 2a & b). When one monitors the evolution of the enzyme profile as a function of time (Fig. 2a & b), one never and nowhere observes a total depletion in enzymes. This implies that the dephosphorylation reaction should always take place and one should not observe areas

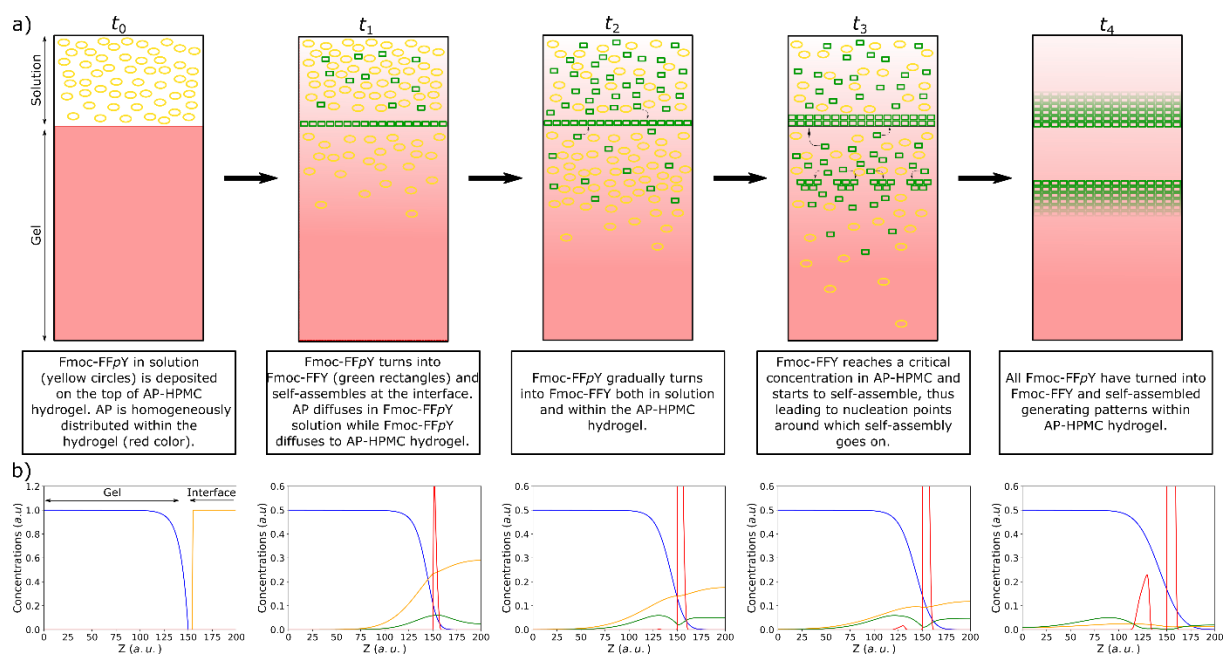


Figure 3: (a) Schematics of the mechanism of Fmoc-FFY self-assembly maximum formation within AP-HPMC hydrogel over time, going from t_0 to t_4 . (b) is showing the simulations of relative concentration of AP (blue), precursor Fmoc-FFpY (orange), free hydrogelator Fmoc-FFY (green) and self-assembled Fmoc-FFY (red) over time, corresponding t_0 , t_1 , t_2 , t_3 and t_4 .

that are totally depleted in self-assembly as it is the case (Fig. 2a & b). The formation of a zone depleted in enzymes is thus not at the origin of the self-assembly depletion zone. Another reason could be an inhibition of AP in this zone. Indeed, the dephosphorylation step is accompanied by the generation of protons and phosphate ions which are both inhibitors of AP. We have performed many investigations in this direction. These inhibitors, largely produced at the gel/solution interface, diffuse into the gel and should be more concentrated close to the hydrogel/solution interface during the first stages of the whole process. Yet, if this would be the case, increasing the initial Fmoc-FFpY concentration would lead to a stronger inhibition of the self-assembly with a larger depletion zone which is not the case (Fig. S6a and S6b). Moreover, if the host AP-HPMC hydrogel is put into contact for 24 h with borax buffer (pH 9.5) or phosphate buffer (pH 7.6) the depletion zone is still observed (Fig. S7). Thus, the production of phosphate ions or protons during the dephosphorylation step is not responsible of the depletion zone formation. The depletion zone of self-assembly must thus have another explanation. We propose the following mechanism schematically represented in Fig. 3 based

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

on a simulation discussed later and fully described in SI Section 1. In solution, when the phosphorylated Fmoc-FF p Y is mixed with AP, the self-assembly of Fmoc-FFY requires a lag time (already reported in the literature) that is a feature of EASA.²⁹⁻³³ This observation agrees with the requirement of a critical concentration of Fmoc-FFY to initiate its own self-assembly, a mechanism close to the nucleation step involved in a crystallization process. When the Fmoc-FF p Y solution is brought into contact with the AP-HPMC hydrogel (Fig. 3a, t0), some AP diffuses from the gel into the solution and the critical Fmoc-FFY concentration threshold is reached very rapidly at the interface (Fig. 3a, t1). Despite this self-assembly of Fmoc-FFY, Fmoc-FF p Y peptides diffuse into the host hydrogel and are gradually dephosphorylated enzymatically to form “free” Fmoc-FFY peptides, *i.e.*, in a non-assembled state. Yet the concentration of free Fmoc-FFY is still too low to initiate the “nucleation” of the self-assembly thus allowing their diffusion in all directions *i.e.*, also towards the self-assembled peak (first maximum) at the gel/solution interface. There, they interact irreversibly with the self-assembled structure which acts as a sink for “free” peptides. Thus, the interplay between the different reaction and diffusion processes can explain the formation of a zone depleted in Fmoc-FFY self-assembly. But all Fmoc-FF p Y that diffuse into the host gel are not transformed enzymatically near the gel/solution interface. Some are transformed further away from the interface and cannot diffuse up to the interface (Fig. 3a, t2). This then leads to the buildup of a Fmoc-FFY profile inside the gel that presents a maximum at a certain distance from the gel/solution interface. When the Fmoc-FFY concentration at this maximum reaches the critical self-assembly concentration, self-assembly starts (Fig. 3a, t3). Because it takes place in the host gel, the self-assembled entities are fix in the gel and a self-assembly maximum builds up at this position. This self-assembly also captures “free” Fmoc-FFY peptides that are produced in the gel between the gel/solution interface and this self-assembly zone. This then accentuates the depletion zone (Fig. 3a, t4). We have developed a simple model that captures the main features of this process namely (Fig. 3b and Section 1 in SI): (i) diffusion of enzymes and precursors, (ii) transformation of precursor molecules into “free” hydrogelators in the presence of enzymes, (iii) self-assembly of hydrogelators when reaching a critical “free” hydrogelator concentration, (iv) capturing of “free” hydrogelators by the self-assemblies. We assume that the peptide self-assemblies remain fix (*i.e.*, do not diffuse) and that the transformation of precursors into hydrogelators is more rapid in the solution than in the gel. This latter assumption seems reasonable since the presence of the host gel should somehow hinder the diffusion of the enzymes and the peptides in the gel compared to the solution. The model is given in more detail

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

in SI. It must be kept in mind that it is not intended to reproduce in its full details the system under investigation, in particular to reproduce precisely the enzyme kinetics or the nucleation kinetics but only to capture the main ingredients of the process responsible for the formation of the self-assembly profile, i.e., the formation of two self-assembly maxima. It comes out that these assumptions lead to the buildup of a self-assembly peak at the gel/solution interface followed by a depletion zone and a self-assembly secondary maximum in the gel (Fig. 3b). The model also predicts that, with specific kinetic parameters, increasing the initial peptide concentration can lead to the appearance of multiple self-assembly maxima (SI, Section 1). Preliminary experimental results show indeed, that by increasing the Fmoc-FFpY concentration at 20 mg.mL^{-1} one can observe the presence of two self-assembly maxima (Fig. 4) in the host gel. One should notice that this result is obtained in two different experimental setups; first in depth (3D) using a mold containing AP-HPMC host hydrogel fully covered by $50 \text{ }\mu\text{L}$ of the Fmoc-FFpY solution at 20 mg.mL^{-1} (Fig. 4a), but also along the surface (2D) using a petri dish containing AP-HPMC host hydrogel on top of which a drop of Fmoc-FFpY solution ($5 \text{ }\mu\text{L}$ at 20 mg.mL^{-1}) is deposited leading to the formation of two concentric rings of self-assembly surrounding the drop (Fig. 4b). This spatiotemporally controlled self-assembly process presents strong analogies with the one leading to Liesegang ring patterns which result from inorganic salts precipitation.^{18, 34} The model that we have developed is also close to those developed to describe the formation of Liesegang pattern for inorganic systems.^{35, 36} The similarity between our and the Liesegang pattern formation is that both are due to the formation of static objects by a nucleation and growth process. The main difference is that in the Liesegang processes the objects are due to the reaction between two entities forming the nuclei whereas in our case the enzymatic reaction forms one entity that is at the origin of the pattern formation. One-dimensional Liesegang processes usually result in the formation of Liesegang rings, i.e., several maxima of inorganic material which is also the case in our system. It must also be noticed that even if Liesegang patterns are usually observed with inorganic salts, more rarely for organic systems,¹² they have never been reported for EASA processes. Our work thus opens the EASA processes to the field of Liesegang patterns in host materials.

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

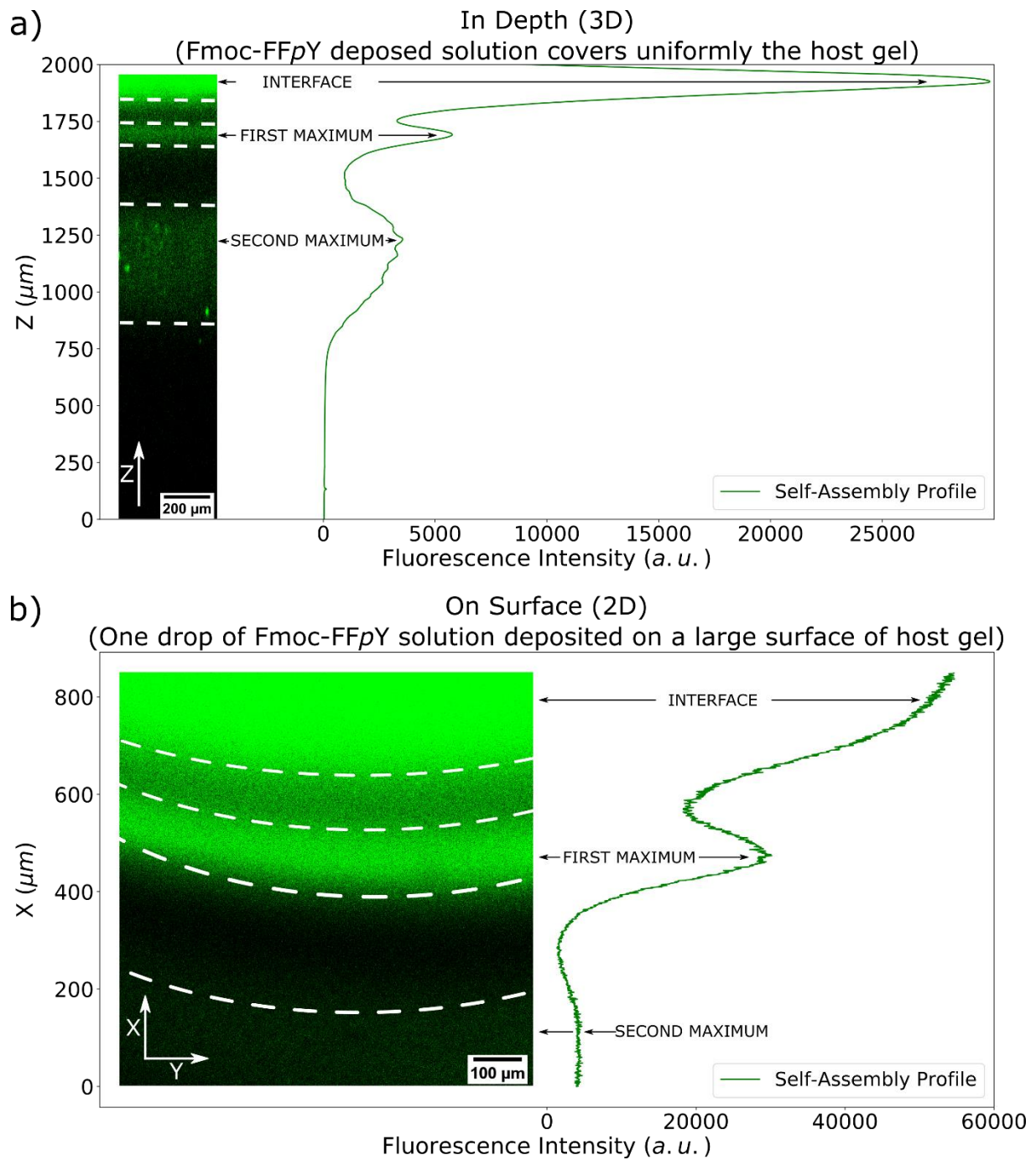


Figure 4: (a) Cross-sectional and (b) surface view of the self-assembly profile where the high concentration of Fmoc-FFpY ($20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) allows the formation of two maxim in the host hydrogel.

VI - Conclusion

We have found that an enzyme-assisted self-assembly (EASA) process taking place in a host gel results in the formation of a self-assembly pattern at the gel-solution interface when a precursor peptide solution contacts the gel. The self-assembly pattern appears also along the interface when a drop of precursor solution is deposited on top of the gel. This pattern formation along the interface is accompanied by a local change of the mechanical properties of the hydrogel which closely follows the self-assembly pattern. It results from the coupling between the diffusion of the precursor peptides into the gel, their enzymatic transformation into self-assembling peptides which still diffuse in the gel and self-assemble when they reach a critical local concentration through a nucleation and growth process. This self-assembly remains immobile in the gel. The growth leads to a local depletion of self-assembling building blocks and this is the principal ingredient of the pattern formation in addition to directional flow and low diffusion rate. This process resembles a Liesegang-type process discovered with inorganic salts.^{18, 34-36} As in Liesegang's experiments, our two interacting molecules diffuse (precursor peptides and enzymes). Though, there is a main difference: in a Liesegang's experiment the two reagents are used up whereas in the present work only the phosphorylated peptides are consumed while the enzymes are not. Indeed, it comes out that the self-assembly location is not a mirror image of the enzyme location in the host gel, but that the complex reaction-diffusion processes must be taken into account to predict the final self-assembly pattern. We have developed a model, based on the processes supposed to be at the origin of our observations, and aimed at accounting for the gross features of our findings. To become quantitatively and not only qualitatively predictive, the model developed here has to be improved, with a special emphasis on predicting the "exact" form of the self-assembly pattern. Our finding allows to envisage a way to tune both the mechanical features and the chemistry as well, in the three dimensions of a material with a spatiotemporal control. This aspect is particularly appealing since new properties can arise from the peptides self-assembled state. Indeed, catalytic or biological activities have been largely reported to emerge from supramolecular self-assemblies^{3, 37} and thus opens new avenues for applications in the fields of chemosensors design, cell-related applications (3D cultures, cell adhesion), drug delivery and tissue engineering.

References

1. Yang, Z., Gu, H., Fu, D., Gao, P., Lam, J. K., and Xu, B., *Enzymatic Formation of Supramolecular Hydrogels*. *Advanced Materials*, 2004. **16**(16): p. 1440-1444.
2. Williams, R. J., Mart, R. J., and Ulijn, R. V., *Exploiting biocatalysis in peptide self-assembly*. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 2010. **94**(1): p. 107-117.
3. Du, X., Zhou, J., Shi, J., and Xu, B., *Supramolecular Hydrogelators and Hydrogels: From Soft Matter to Molecular Biomaterials*. *Chemical Reviews*, 2015. **115**(24): p. 13165-13307.
4. Baillet, J., Gaubert, A., Verget, J., Latxague, L., and Barthélémy, P., *β -Galactosidase instructed self-assembly of supramolecular bolaamphiphiles hydrogelators*. *Soft matter*, 2020.
5. Vigier-Carrière, C., Garnier, T., Wagner, D., Lavalle, P., Rabineau, M., Hemmerlé, J., Senger, B., Schaaf, P., Boulmedais, F., and Jierry, L., *Bioactive Seed Layer for Surface-Confining Self-Assembly of Peptides*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015. **54**(35): p. 10198-10201.
6. Wang, W. J., Qian, J. C., Tang, A. M., An, L. N., Zhong, K., and Liang, G. L., *Using Magnetic Resonance Imaging to Study Enzymatic Hydrogelation*. *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(12): p. 5955-5961.
7. Hai, Z., Li, J., Wu, J., Xu, J., and Liang, G., *Alkaline Phosphatase-Triggered Simultaneous Hydrogelation and Chemiluminescence*. *Journal of the American Chemical Society*, 2017. **139**(3): p. 1041-1044.
8. Williams, R. J., Smith, A. M., Collins, R., Hodson, N., Das, A. K., and Ulijn, R. V., *Enzyme-assisted self-assembly under thermodynamic control*. *Nat Nanotechnol*, 2009. **4**(1): p. 19-24.
9. Conte, M. P., Sahoo, J. K., Abul-Haija, Y. M., Lau, K. H. A., and Ulijn, R. V., *Biocatalytic Self-Assembly on Magnetic Nanoparticles*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018. **10**(3): p. 3069-3075.
10. Criado-Gonzalez, M., Fores, J. R., Carvalho, A., Blanck, C., Schmutz, M., Kocgozlu, L., Schaaf, P., Jierry, L., and Boulmedais, F., *Phase Separation in Supramolecular Hydrogels Based on Peptide Self-Assembly from Enzyme-Coated Nanoparticles*. *Langmuir*, 2019. **35**(33): p. 10838-10845.
11. Fores, J. R., Criado-Gonzalez, M., Chaumont, A., Carvalho, A., Blanck, C., Schmutz, M., Serra, C. A., Boulmedais, F., Schaaf, P., and Jierry, L., *Supported Catalytically Active Supramolecular Hydrogels for Continuous Flow Chemistry*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2019. **58**(52): p. 18817-18822.
12. Lovrak, M., Hendriksen, W. E. J., Maity, C., Mytnyk, S., van Steijn, V., Eelkema, R., and van Esch, J. H., *Free-standing supramolecular hydrogel objects by reaction-diffusion*. *Nature Communications*, 2017. **8**(1): p. 15317.
13. Schlichter, L., Piras, C. C., and Smith, D. K., *Spatial and temporal diffusion-control of dynamic multi-domain self-assembled gels*. *Chemical Science*, 2021. **12**(11): p. 4162-4172.
14. Cooke, H. S., Schlichter, L., Piras, C. C., and Smith, D. K., *Double diffusion for the programmable spatiotemporal patterning of multi-domain supramolecular gels*. *Chemical Science*, 2021. **12**(36): p. 12156-12164.

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

15. Criado-Gonzalez, M., Loftin, B., Fores, J. R., Vautier, D., Kocgozlu, L., Jierry, L., Schaaf, P., Boulmedais, F., and Harth, E., *Enzyme assisted peptide self-assemblies trigger cell adhesion in high density oxime based host gels*. Journal of Materials Chemistry B, 2020. **8**(20): p. 4419-4427.
16. Criado-Gonzalez, M., Rodon Fores, J., Wagner, D., Schroder, A. P., Carvalho, A., Schmutz, M., Harth, E., Schaaf, P., Jierry, L., and Boulmedais, F., *Enzyme-assisted self-assembly within a hydrogel induced by peptide diffusion*. Chemical Communications, 2019. **55**(8): p. 1156-1159.
17. Epstein, I. R. and Xu, B., *Reaction–diffusion processes at the nano- and microscales*. Nature Nanotechnology, 2016. **11**(4): p. 312-319.
18. Liesegang, R. E., *Ueber einige Eigenschaften von Gallerten*. Naturwissenschaftliche Wochenschrift, 1896. **11**(30).
19. Runge, F. F., *Der Bildungstrieb der Stoffe, veranschaulicht in selbstständig gewachsenen Bilder*. Self-Edited, 1855.
20. Ostwald, W., *Lehrbuch der allgemeinen Chemie*. Vol. 1. 1910: W. Engelmann.
21. Castets, V., Dulos, E., Boissonade, J., and De Kepper, P., *Experimental evidence of a sustained standing Turing-type nonequilibrium chemical pattern*. Physical Review Letters, 1990. **64**(24): p. 2953-2956.
22. Wei, Y., Han, S., Walker, D. A., Fuller, P. E., and Grzybowski, B. A., *Nanoparticle Core/Shell Architectures within MOF Crystals Synthesized by Reaction Diffusion*. Angewandte Chemie International Edition, 2012. **51**(30): p. 7435-7439.
23. Babicheva, T. S., Konduktorova, A. A., Shmakov, S. L., and Shipovskaya, A. B., *Formation of Liesegang Structures under the Conditions of the Spatiotemporal Reaction of Polymer-Analogous Transformation (Salt → Base) of Chitosan*. The Journal of Physical Chemistry B, 2020. **124**(41): p. 9255-9266.
24. Semenov, S. N., Markvoort, A. J., de Greef, T. F. A., and Huck, W. T. S., *Threshold Sensing through a Synthetic Enzymatic Reaction–Diffusion Network*. Angewandte Chemie International Edition, 2014. **53**(31): p. 8066-8069.
25. Padirac, A., Fujii, T., Estévez-Torres, A., and Rondelez, Y., *Spatial Waves in Synthetic Biochemical Networks*. Journal of the American Chemical Society, 2013. **135**(39): p. 14586-14592.
26. Mertz, D., Vogt, C., Hemmerlé, J., Mutterer, J., Ball, V., Voegel, J.-C., Schaaf, P., and Lavallo, P., *Mechanotransductive surfaces for reversible biocatalysis activation*. Nature Materials, 2009. **8**(9): p. 731-735.
27. Trojani, C., Weiss, P., Michiels, J.-F., Vinatier, C., Guicheux, J., Daculsi, G., Gaudray, P., Carle, G. F., and Rochet, N., *Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel*. Biomaterials, 2005. **26**(27): p. 5509-5517.
28. Smith, A. M., Williams, R. J., Tang, C., Coppo, P., Collins, R. F., Turner, M. L., Saiani, A., and Ulijn, R. V., *Fmoc-Diphenylalanine Self Assembles to a Hydrogel via a Novel Architecture Based on π - π Interlocked β -Sheets*. Advanced Materials, 2007. **20**(1): p. 37-41.
29. Yang, Z. and Xu, B., *A simple visual assay based on small molecule hydrogels for detecting inhibitors of enzymes*. Chemical Communications, 2004(21): p. 2424-2425.
30. Thornton, K., Abul-Haija, Y. M., Hodson, N., and Ulijn, R. V., *Mechanistic insights into phosphatase triggered self-assembly including enhancement of biocatalytic conversion rate*. Soft Matter, 2013. **9**(39): p. 9430-9439.

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

31. Qin, X., Xie, W. C., Tian, S., Cai, J. L., Yuan, H., Yu, Z., Butterfoss, G. L., Khuong, A. C., and Gross, R. A., *Enzyme-triggered hydrogelation via self-assembly of alternating peptides*. Chemical Communications, 2013. **49**(42): p. 4839-4841.
32. Williams, R. J., Gardiner, J., Sorensen, A. B., Marchesan, S., Mulder, R. J., McLean, K. M., and Hartley, P. G., *Monitoring the Early Stage Self-Assembly of Enzyme-Assisted Peptide Hydrogels*. Australian Journal of Chemistry, 2013. **66**(5): p. 572-578.
33. Vigier-Carriere, C., Wagner, D., Chaumont, A., Durr, B., Lupattelli, P., Lambour, C., Schmutz, M., Hemmerle, J., Senger, B., Schaaf, P., Boulmedais, F., and Jierry, L., *Control of Surface-Localized, Enzyme-Assisted Self-Assembly of Peptides through Catalyzed Oligomerization*. Langmuir, 2017. **33**(33): p. 8267-8276.
34. Sultan, R., Ortoleva, P., DePasquale, F., and Tartaglia, P., *Bifurcation of the Ostwald-Liesegang supersaturation-nucleation-depletion cycle*. Earth-Science Reviews, 1990. **29**(1): p. 163-173.
35. Nabika, H., Itatani, M., and Lagzi, I., *Pattern Formation in Precipitation Reactions: The Liesegang Phenomenon*. Langmuir, 2020. **36**(2): p. 481-497.
36. Polezhaev, A. A. and Muller, S. C., *Complexity of precipitation patterns: Comparison of simulation with experiment*. Chaos (Woodbury, N.Y.), 1994. **4**(4): p. 631-636.
37. Zozulia, O., Dolan, M. A., and Korendovych, I. V., *Catalytic peptide assemblies*. Chemical Society Reviews, 2018. **47**(10): p. 3621-3639.

VII - Supporting Information

Non-Monotonous Enzyme-Assisted Self-Assembly Profiles Resulting from Reaction-Diffusion Processes in Host Gels

Runser, J.Y., M. Criado-Gonzalez, F. Fneich, M. Rabineau, B. Senger, P. Weiss, L. Jierry, and P. Schaaf, *Non-monotonous enzyme-assisted self-assembly profiles resulting from reaction-diffusion processes in host gels*. J Colloid Interface Sci, 2022. **620**: p. 234-241.

1 - Model Description

We have developed a model that accounts for the main features leading to the formation of a zone depleted in self-assembly and a secondary self-assembly maximum in addition to the main peak formed at the gel/solution interface. The model is based on the following assumptions: Initially we have a gel that contains enzymes E (Alkaline phosphatase) in contact with a solution that contains phosphorylated peptides PP (Fmoc-FFpY). The initial enzyme profile is close to that determined experimentally and the solution contains a uniform concentration of PP outside a small region at the gel/solution interface, in the solution, that does not contain peptides (Figure 1). This zone is introduced to avoid abrupt changes of concentrations at time $t = 0$.

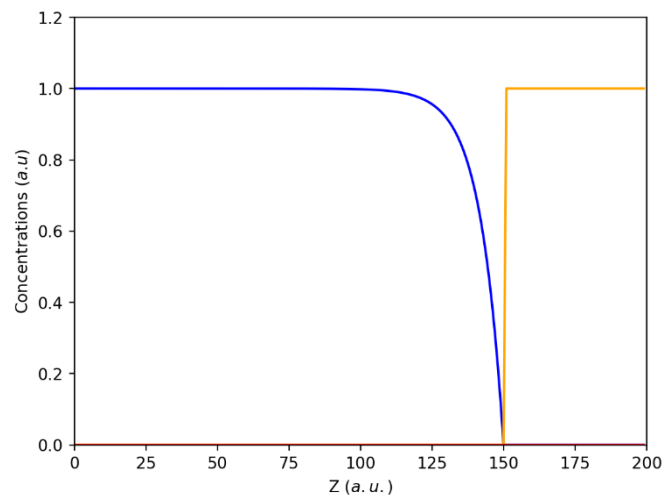
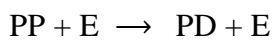


Figure 1: Initial concentration profiles as a function of the position in the gel + solution system. Blue: enzyme concentration $[E]$ (multiplied by 7000 for visualization); orange: phosphorylated peptide concentration $[PP]$. The interface sol-gel is located at $z = 150$ a. u.

Both E and PP diffuse in the gel and in the solution with diffusion coefficients denoted respectively as D_E and D_{PP} . The diffusion coefficients of the peptides in the solution are assumed to be larger than in the gel by a factor x . PP transforms into dephosphorylated peptides PD under the influence of the enzymes according to the reaction



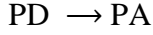
with a rate constant k_1 following the kinetic laws:

$$\frac{d[PD]}{dt} = k_1[PP][E]$$

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

$$\frac{d[PP]}{dt} = -k_1[PP][E]$$

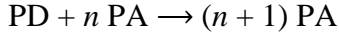
This rate constant is taken γ times higher in solution than in the gel. This is assumed since molecules are less constrained in the solution than in the gel. Once a critical concentration of PD molecules is locally reached, they start to self-assemble through a nucleation process according to the reaction



The kinetic law governing the formation of PA through the nucleation process is chosen empirically as an exponential function. This leads to the following kinetic laws:

$$\begin{aligned} \frac{d[PA]}{dt} &= k_a \cdot [PD] \exp\left(\frac{[PD]-P_0}{P_1}\right) \\ \frac{d[PD]}{dt} &= -k_a \cdot [PD] \exp\left(\frac{[PD]-P_0}{P_1}\right) \end{aligned}$$

P_0 is the critical nucleation concentration and P_1 is a free parameter. Once self-assemblies consisting of n PA molecules are formed, they can aggregate other PD peptides according to the reaction:



The following kinetic laws apply:

$$\begin{aligned} \frac{d[PA]}{dt} &= k_{as} \cdot [PD] \cdot [PA] \\ \frac{d[PD]}{dt} &= -k_{as} \cdot [PD] \cdot [PA] \end{aligned}$$

where k_{as} represents the association constant. This mechanism constitutes the growth of the self-assemblies. The PD peptides diffuse in the gel and in the solution with a diffusion coefficient D_{PD} that is smaller than D_{PP} . This is assumed since PD can already partially aggregate in solution. The PA do not diffuse. As for PP, the diffusion coefficient of the PD is assumed to be x times larger in the solution than in the gel. It is the existence of a critical PD concentration to aggregate, the diffusion process of PD and their aggregation on static PA that is responsible for the formation of the depletion zone of PA as will be shown below.

Thus, introducing the diffusion of the species E, PP and PD, we arrive to the following set of equations to be solved:

$$\frac{\partial[E]}{\partial t} = D_E \frac{\partial^2[E]}{\partial x^2} \quad (1)$$

Equation (1) describes diffusion of the enzymes in the system.

$$\frac{\partial[PP]}{\partial t} = D_{PP} \frac{\partial^2[PP]}{\partial x^2} - k_1[PP][E] \quad (2)$$

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

The first term on the right-hand side of equation (2) describes the diffusion of phosphorylated peptides in the system and the second term accounts for the enzymatic transformation of PP into PD.

$$\frac{\partial[PD]}{\partial t} = D_{PD} \frac{\partial^2[PD]}{\partial x^2} + k_1[PP][E] - k_a[PD] \exp\left(\frac{[PD]-P_0}{P_1}\right) - k_{as}[PD][PA] \quad (3)$$

The first term on the right-hand side of equation (3) describes the diffusion of dephosphorylated peptides in the system, the second term accounts for the enzymatic production of PD; the third term accounts for the association of PD onto self-assemblies (growth of the self-assembled structures) and the last term represents the loss of PD through the formation of self-assemblies by a nucleation process.

$$\frac{\partial[PA]}{\partial t} = k_a[PD] \exp\left(\frac{[PD]-P_0}{P_1}\right) + k_{as}[PD][PA] \quad (4)$$

The first term on the right-hand side of equation (4) describes the association of PD peptides onto self-assemblies (growth of the self-assembled structures) and the last term represents the formation of self-assemblies through a nucleation process.

In these equations the diffusion coefficients and reaction constants are functions of the positions as follows:

$D_E = D_{E0}$ in the gel and in the solution,

$D_{PP} = D_{PP0}$ in the gel and $D_{PP} = x \cdot D_{PP0}$ in the solution,

$D_{PD} = D_{PD0}$ in the gel and $D_{PD} = x \cdot D_{PD0}$ in the solution,

$k_1 = k_0$ in the gel and $k_1 = y \cdot k_0$ in the solution.

These equations are solved numerically (using a home-made Python code) based on a finite element integration method. Both space and time are discretized. Our model is a one-dimensional model: space is divided into thin slices. Typically, to account for the experimental ratio of the volume of the gel to that of the solution (3/1), the gel is divided into 151 slices (from slice 0 to slice 150) and the solution is divided into 50 slices (numbered from 151 to 200). Initially, the Fmoc-FFpY peptides are uniformly distributed over slices 158-200. The different diffusion coefficients depend upon the position of the slice. Let us call these diffusion coefficients $D(i)$ for a given species. Then the diffusion coefficient of this species from slice i to slice $i + 1$, $D(i, i + 1)$ is taken as the harmonic mean of $D(i)$ and $D(i + 1)$:

$$\frac{1}{D(i,i+1)} = \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{1}{D(i)} + \frac{1}{D(i+1)} \right) \quad (5)$$

This is required to ensure a uniform species distribution at equilibrium for non-interacting species, as required by statistical mechanics. At both borders of the system (one border for the

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

gel, one border for the solution) we apply perfect reflection conditions. These equations lead to the evolution of the different concentrations with time shown in Figures 2.

At time $t = 0$ we have the initial density profiles represented in Figure 2a (concentration of enzymes 1.0/7000 in each slice). The enzyme profile is given by:

$$[E(i)] = E_0 \left(1 - \exp\left(\frac{i-i_1}{8}\right) \right) \text{ for } i \leq i_1 \text{ and } 0 \text{ otherwise, where } i \text{ represents the index}$$

of the slice and i_1 that of the last slice in the gel.

The different parameters used to perform the simulation and obtain the results displayed below are the following:

- initial concentration of phosphorylated peptides (PP) in the solution: 1.0, in the gel: 0,
- diffusion coefficient of PP in the gel: 0.2,
- diffusion of "free" dephosphorylated peptides (PD) in the gel: 0.07,
- initial concentration of enzymes far from the interface in the gel E_0 : 1.0/7000,
- diffusion coefficient of the enzymes in the gel: 0.01,
- ratio between the diffusion coefficient of both PP and PD in the solution versus gel: $x = 5.0$,
- critical concentration of self-assembly P_0 : 0.06,
- coefficient P_1 : 0.0001,
- enzymatic constant in the gel k_1 : 0.5,
- ratio between the enzymatic constant in the solution and in the gel: $y = 100$,
- self-assembly constant during the nucleation process k_a : 0.2,
- association constant between PD and PA k_{as} : 0.015.

We give different snapshots of the concentration profiles at different times which also correspond to different percentages of dephosphorylated peptides with respect to the initial PP

concentration: $\left(\frac{\sum_i ([PD(i)] + [PA(i)])}{\sum_i [PP_{ini}(i)]} \right)$ and to different percentages of self-assembled peptides :

$\left(\frac{\sum_i ([PA(i)])}{\sum_i [PP_{ini}(i)]} \right)$ where the sums extend over all slices

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

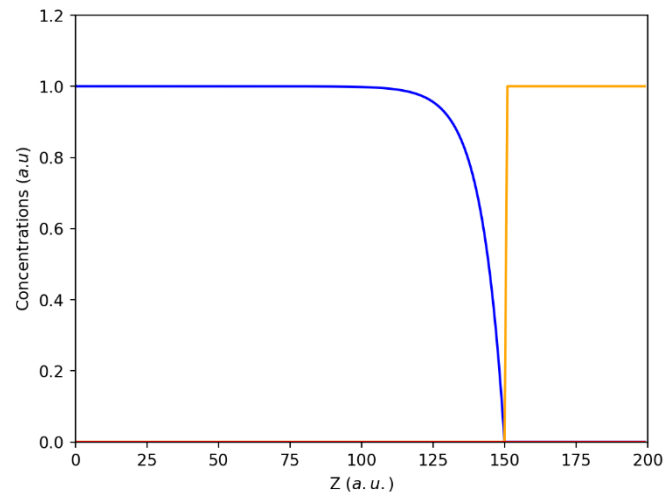


Figure 2a: Initial profiles: enzymes (blue, $\times 7000$); PP (orange)

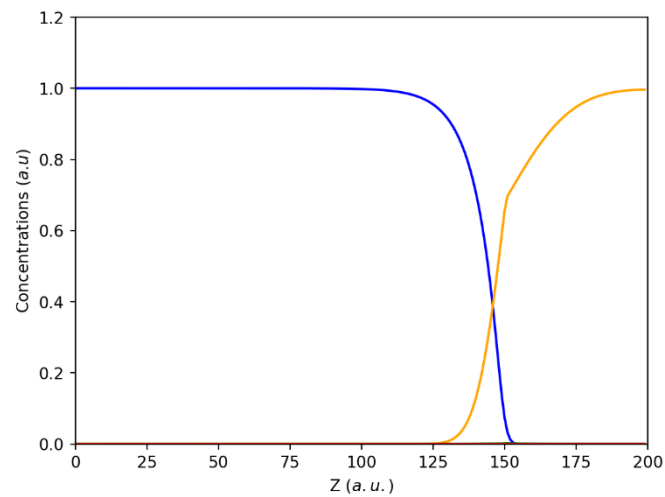


Figure 2b: A few "seconds" after contact. Percentage of dephosphorylated peptides PD: 0.1% (not visible). Percentage of self-assembled peptides: 0%. Observe the diffusion of PP into the gel (slices ≤ 150).

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

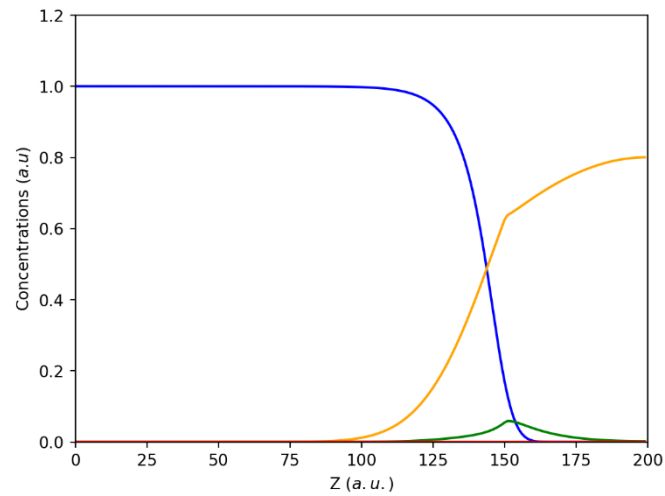


Figure 2c: Percentage of dephosphorylated peptides PD: 2.3% (green). Percentage of self-assembled peptides PA: 0%. Observe the formation of dephosphorylated peptides at the interface and the diffusion of PP (orange) and PD into the solution and in the gel.

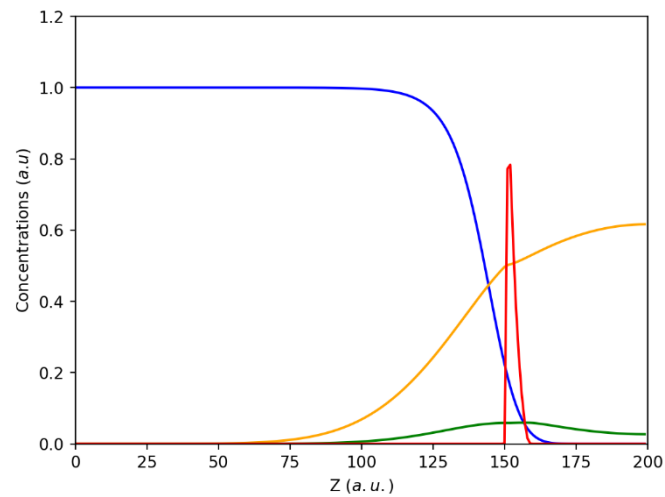


Figure 2d: Percentage of dephosphorylated peptides: 14.4% (green + red). Percentage of self-assembled peptides PA: 6.05% (red). Beginning of the self-assembly in solution (slices > 150) leading to the formation of the self-assembly peak in the solution.

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

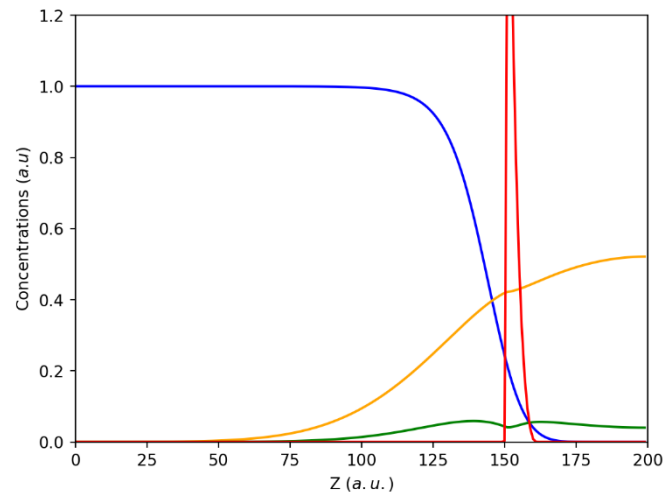


Figure 2e: Percentage of dephosphorylated peptides: 29% (green + red). Percentage of self-assembled peptides: 18.3% (red). The self-assembly continues to build up the peak in solution. The critical self-assembly concentration of PD has not yet been reached in the gel. Note the depletion of dephosphorylated peptides near the self-assembled peak (green).

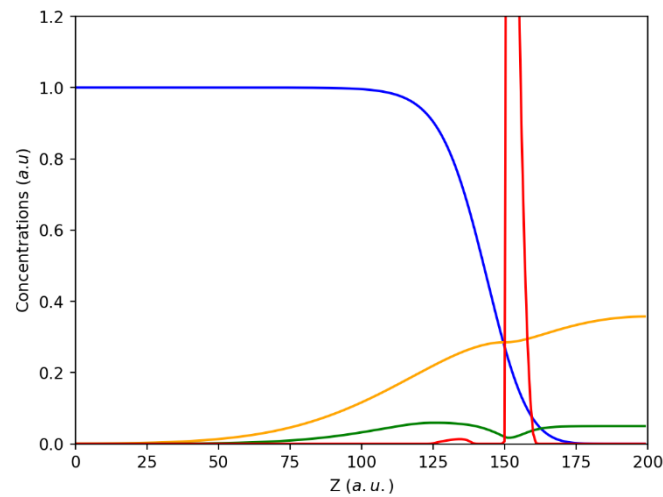


Figure 2f: Percentage of dephosphorylated peptides: 48% (green+red). Percentage of self-assembled peptides: 35.9% (red). The peak in the gel starts to form at about $z = 125$ with the presence of the depletion zone.

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

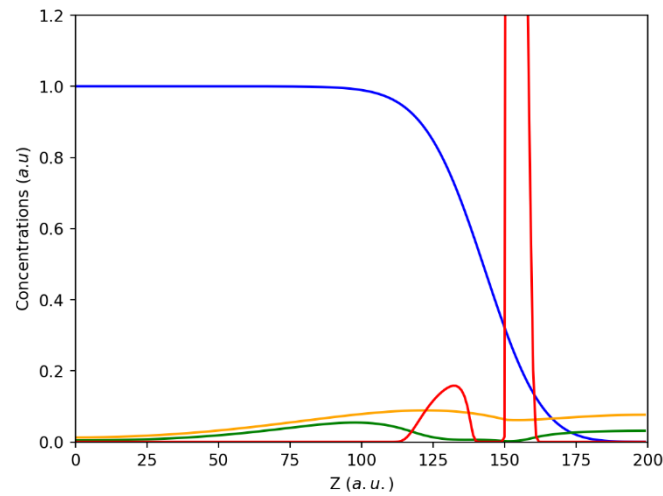


Figure 2g: Percentage of dephosphorylated peptides: 74.7% (green + red). Percentage of self-assembled peptides: 64.05% (red). The peak in the gel continues to grow. The one in solution continues to grow too but this is not visible due to the scale. Notice the asymmetric shape of the peak in the gel resembling to the experimental peak.

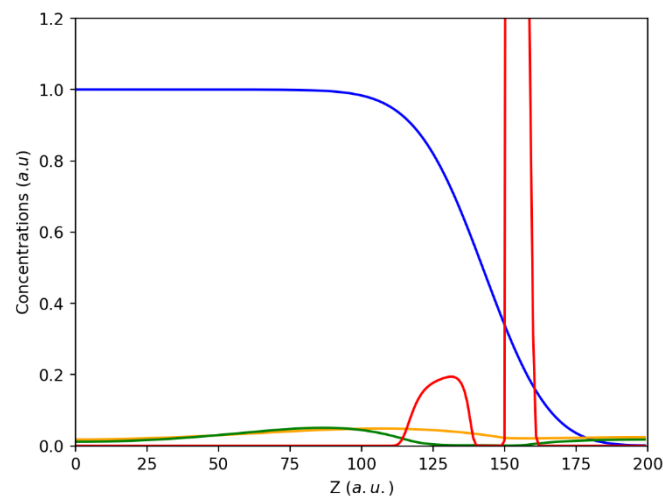


Figure 2h: Percentage of dephosphorylated peptides: 82.2% (green + red). Percentage of self-assembled peptides: 73.4% (red). One can observe that the peak in the gel becomes more dissymmetric. This comes from the shift of the maximum of free dephosphorylated peptides away from the interface and from the anchoring of free dephosphorylated peptides onto the self-assembly, leading to a depletion of PD (green) near the red peak (between 135 and 150).

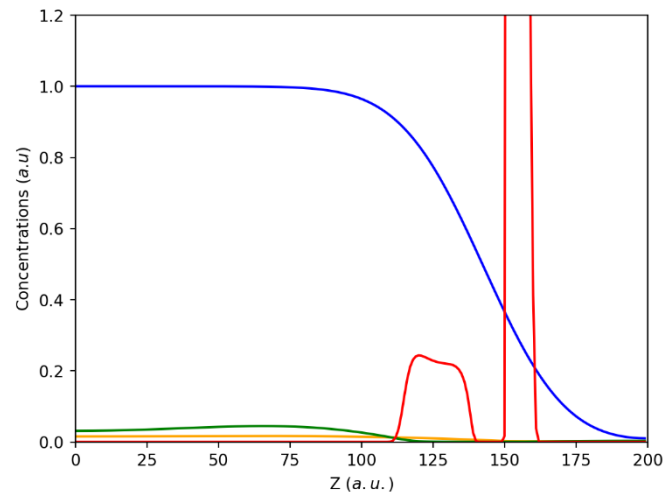


Figure 2j: *Percentage of dephosphorylated peptides: 95.6%% (green + red). Percentage of self-assembled peptides: 86.6% (red). This corresponds almost to the end of the buildup process. The local concentration of "free" dephosphorylated peptides (PD) is lower than the critical nucleation concentration. One then observes that the dissymmetry further builds-up and that the shape of the curve deviates from experimental observations. This is due to the limitations of the model which does not allow for the lateral extension of the self-assembly which certainly takes place. It is also due to the sharp concentration threshold of PD for the nucleation.*

Let us now analyze the effect of the peptide concentration on the depletion zone. To avoid the drawbacks of the model which show up at large percentages of self-assembled peptides we compare the results at percentages where the drawbacks just start to emerge (see Fig. 2j). In these simulations all the parameters remained the same except the peptide concentration which was increased from 1.0 up to 1.5. The enzyme concentration was kept equal to 1.0/7000.

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

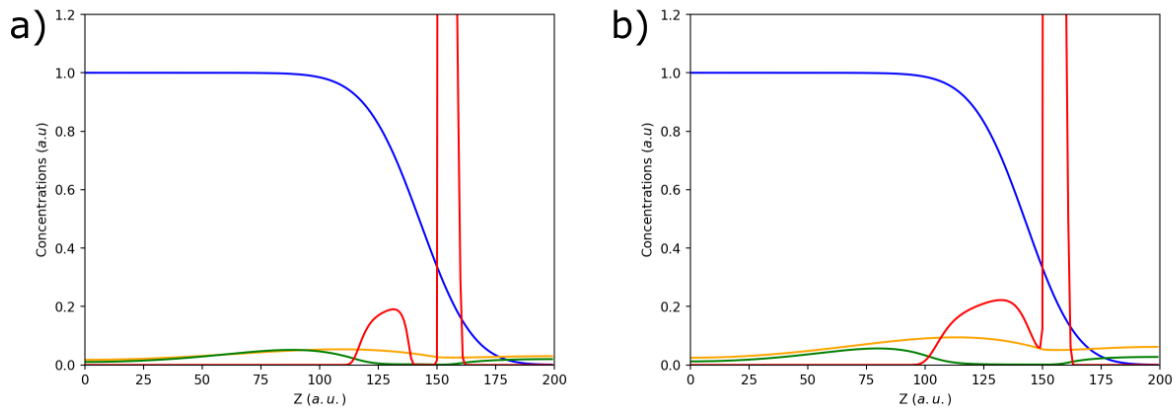


Figure 3: (a) Peptide concentration 1.0. (b) Peptide concentration 1.5.

For the largest peptide concentration, the depletion zone of PA (red) is less pronounced and the self-assembly zone extends over larger distances. These two features are observed experimentally (Figure 4).

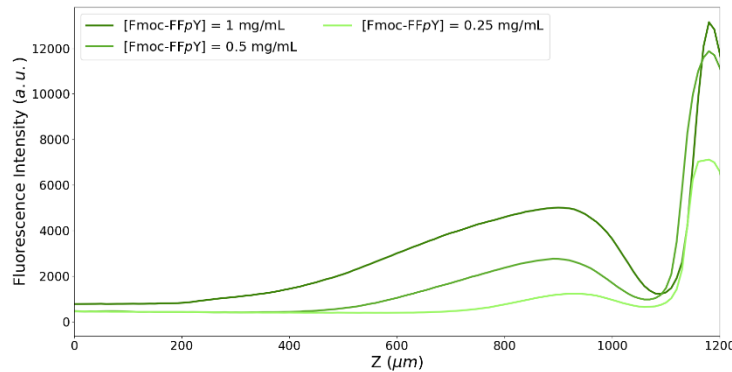


Figure 4: Experimental curves presenting the evolution of the green fluorescence with respect to position for 3 different peptide concentrations.

We also analyzed the influence of the enzyme concentration by keeping the peptide concentration equal to 1. All the simulation parameters remained otherwise the same.

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

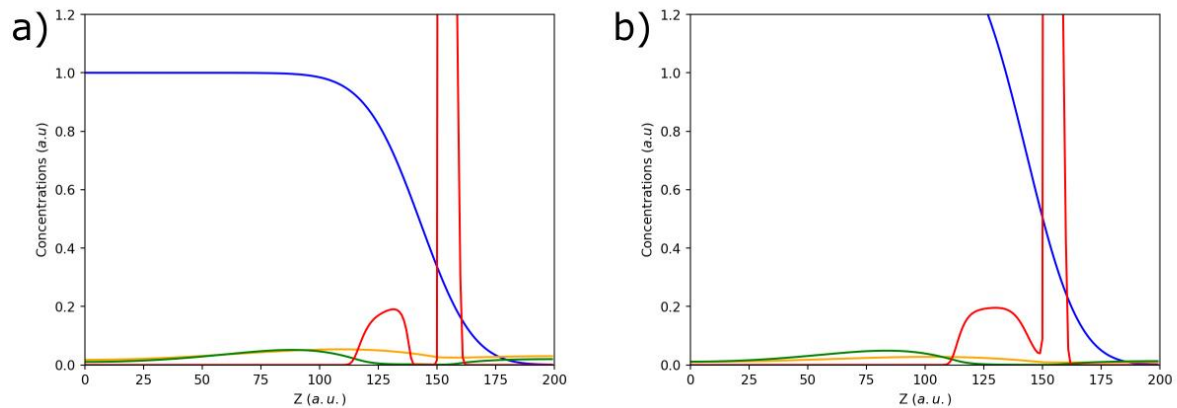


Figure 5: (a) Enzyme concentration 1. (b) Enzyme concentration 1.5.

One observes that the extension of the depletion zone of PA (red) decreases when the enzyme concentration increases and the maximum of self-assembly in the gel seems to shift towards the gel/solution interface as observed experimentally (Figure 6).

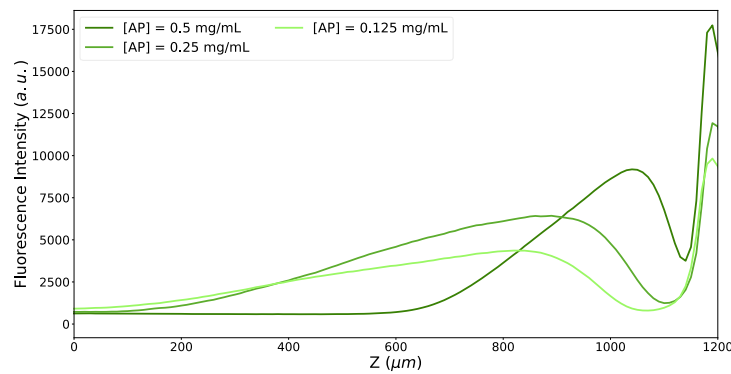


Figure 6: Experimental curves presenting the evolution of the green fluorescence with respect to position for 3 different enzyme concentrations.

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

This model also predicts that for certain parameters the process results in the appearance of multiple maxima in the gel by increasing the peptide concentration (Fig. 7a, b, c). The parameters are as follows:

- Initial concentration of phosphorylated peptides (PP) in the solution: variable, in the gel: 0,
- diffusion coefficient of PP in the gel: 0.3,
- diffusion of "free" dephosphorylated peptides (PD) in the gel: 0.09,
- initial concentration of enzymes far from the interface in the gel E_0 : 1.0/7000,
- diffusion coefficient of the enzymes in the gel: 0.01,
- ratio between the diffusion coefficient of both PP and PD in the solution versus gel: $x = 5.0$
- critical concentration of self-assembly P_0 : 0.04,
- coefficient P_1 : 0.0001,
- enzymatic constant in the gel k_1 : 0.5,
- ratio between the enzyme concentration in the solution and in the gel: 100,
- self-assembly constant during the nucleation process k_a : 0.3,
- association constant between PD and PA k_{as} : 0.4.

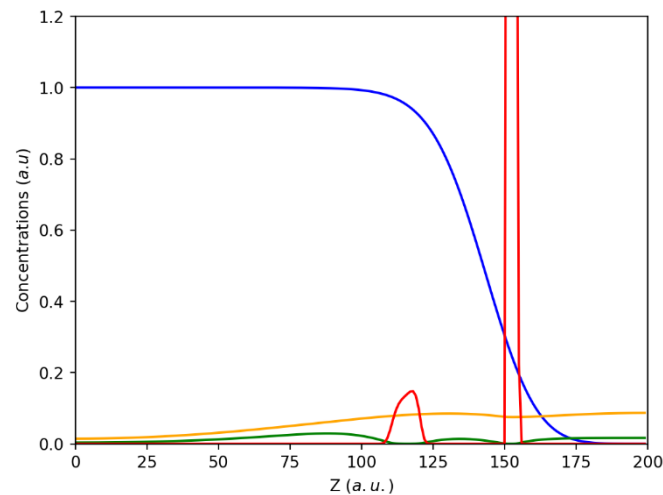


Figure 7a: Peptide concentration 0.7.

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

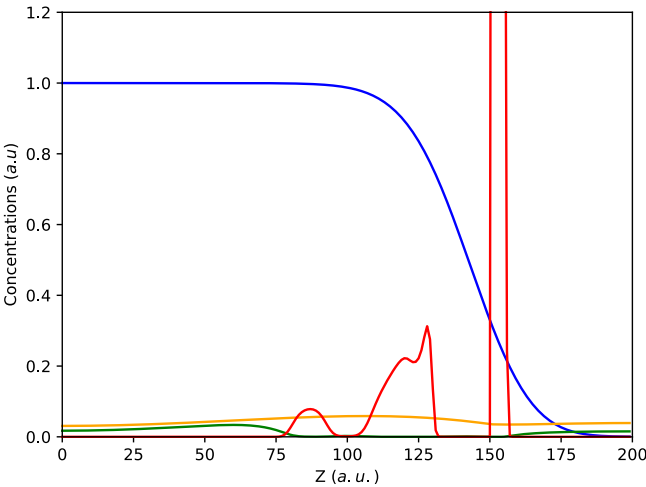


Figure 7b: Peptide concentration 1.

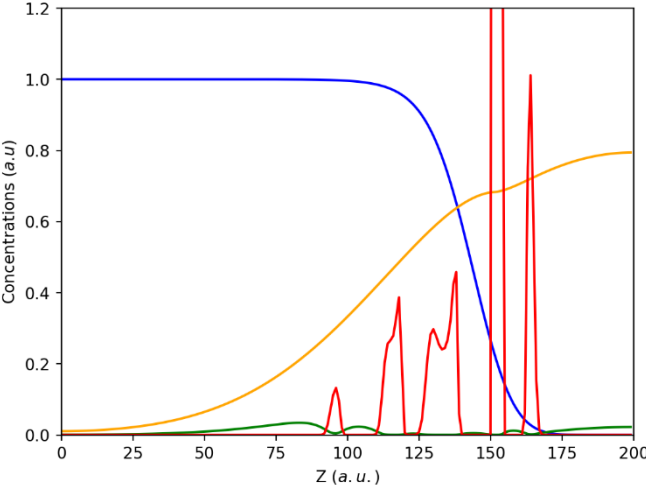


Figure 7c: Peptide concentration 2.5.

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

2 - Supplementary Figures

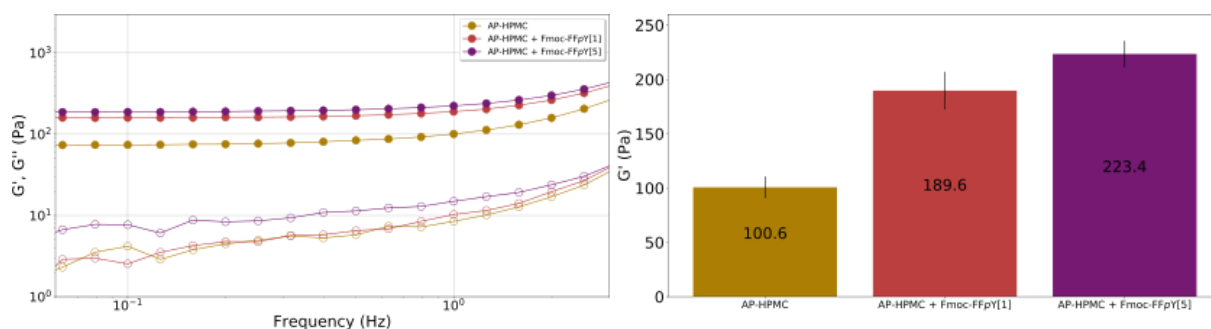


Figure S1: Storage modulus (G' - solid symbols) and loss modulus (G'' - hollow symbols) as a function of the frequency of AP-HPMC, AP-HPMC + FmocFFpY[1] and AP-HPMC + FmocFFpY[5] gels (Left). Storage modulus (G') at 1 Hz for the three samples studied, results are shown as mean \pm sd ($n = 3$) (Right). One can notice that an increase of peptide concentration results in an increase of the elastic modulus measured.

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

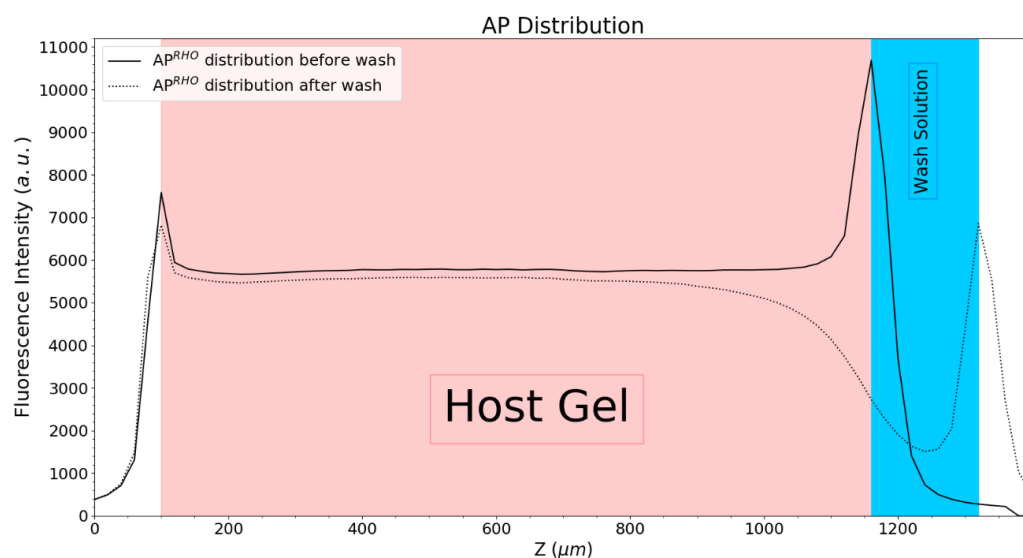


Figure S2: AP^{RHO} distribution within the host hydrogel HPMC and leading to AP-HPMC, before (continuous line) and after the rinsing step with buffer solution (dotted line). The excess of AP located at the gel/air interface in AP-HPMC is removed thanks to the rinsing step. A layer of AP is formed at the interface of rinsing solution and air. This experiment shows that AP is diffusing within AP-HPMC gel.

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

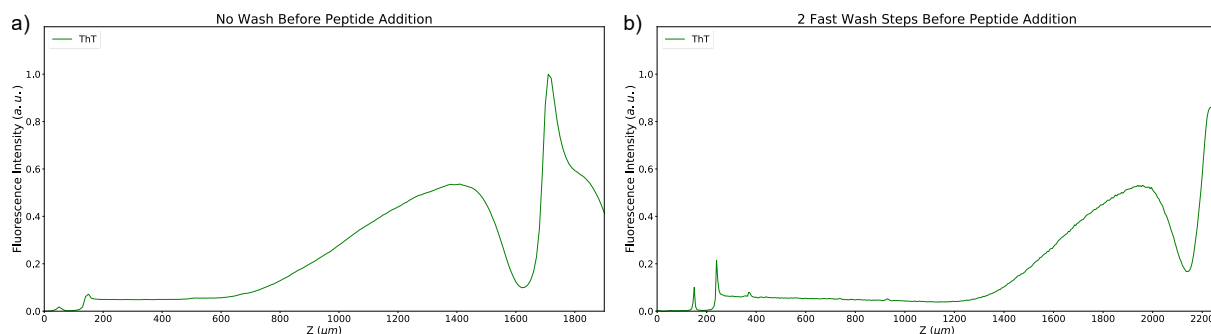


Figure S3: Fluorescence emission measurements realized by CLSM from ThT highlighting the self-assembly localization of Fmoc-FFY over the AP-HPMC hydrogel, without any rinsing with buffer (Borax buffer 25 mM, pH 9.5), on the top of the material (a) and after rinsing steps with buffer (b). The distribution profile of Fmoc-FFY self-assembly seems identical in both cases. ThT: $\lambda_{ex} = 450 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 482 \text{ nm}$.

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

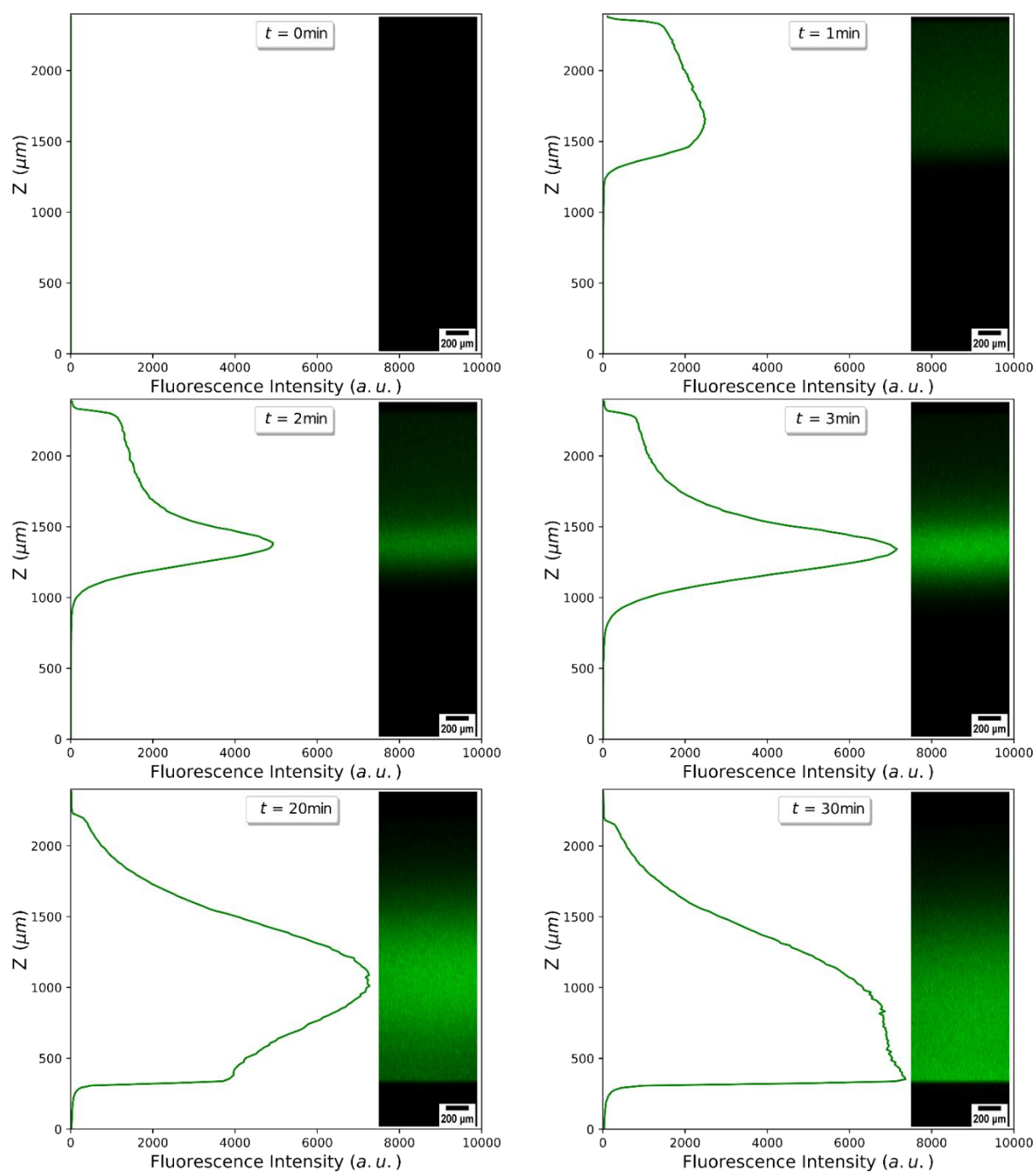


Figure S4: Diffusion of fluorescein diphosphate through AP-HPMC hydrogel and emission of the resulting fluorescein over time and depth, observed by CLSM ($\lambda_{ex}=490\text{ nm}$; $\lambda_{em}=540\text{ nm}$).

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

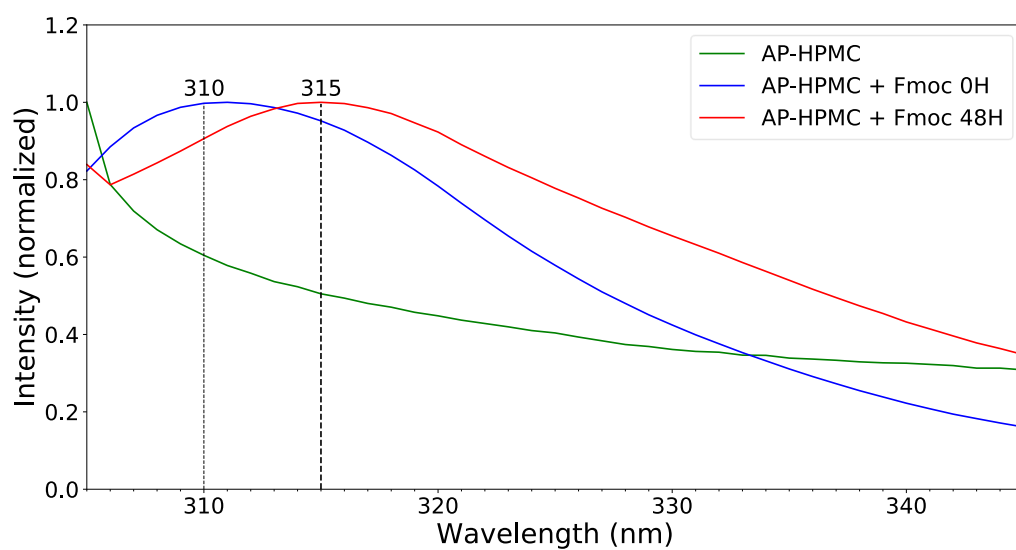


Figure S5: Fluorescence emission spectra obtained at an excitation wavelength of 290 nm of AP-HPMC (green line), AP-HPMC + Fmoc-FFpY (5 mg/mL of Fmoc-FFpY in borax buffer) taken right after deposition of the peptide solution (blue line) and AP-HPMC + Fmoc-FFpY (2 mg.mL⁻¹ of Fmoc-FFpY in borax buffer) taken 48 h after deposition of the peptide solution (red line).

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

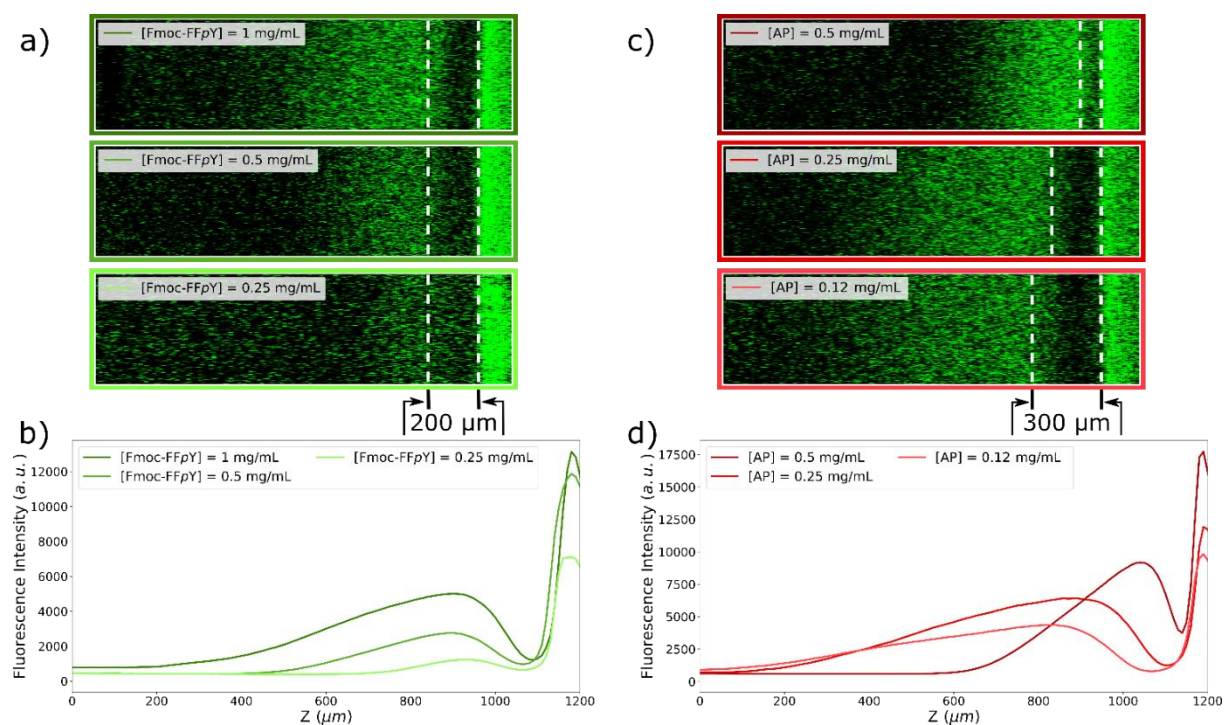


Figure S6: (a) *Fmoc-FFpY* self-assembly distribution through the ThT fluorescence emission within AP-HPMC hydrogel containing 0.25 mg/mL of AP, 12 h after the deposition of the *Fmoc-FFpY* solution at 1.00, 0.50 and 0.25 mg.mL⁻¹ (from top to bottom) and (b) its relative fluorescence intensity in *z* cross-section. (c) *Fmoc-FFpY* self-assembly through the ThT fluorescence emission at 0.50, 0.25 and 0.12 mg.mL⁻¹ concentration of AP (from top to bottom) and (d) its relative fluorescence intensity in *z* cross-section, 12 h after the *Fmoc-FFpY* solution (1 mg.mL⁻¹) deposition.

Profils non monotones d'auto-assemblages assistés par enzyme au sein de gels hôtes résultants de processus de réaction-diffusion.

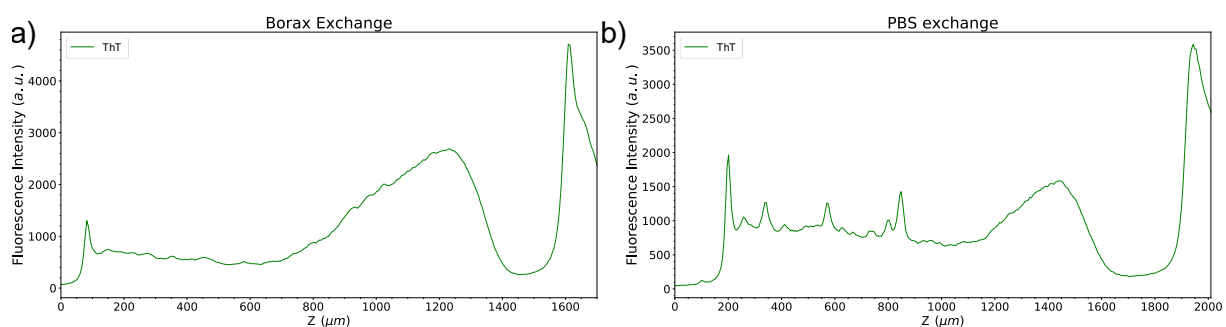


Figure S7: Diffusion of a Fmoc-FFpY solution (1 mg.mL^{-1} , 25 mM Borax buffer, $\text{pH } 9.5$) through an AP-HPMC hydrogel and monitoring by CLSM the fluorescence emission of ThT over time and depth within the host material ($\lambda_{ex} = 450 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 482 \text{ nm}$). The AP-HPMC host hydrogel was first brought in contact with a large amount of (a) Borax buffer ($\text{pH } 9.5$) or (b) Phosphate buffer (PBS, $\text{pH}=7.6$), before the diffusion of the Fmoc-FFpY solution.

Chapitre 4 : Transition d'une forme continue d'auto-assemblages assistés par enzyme à une forme microglobulaire par un mécanisme de type Liesegang

Ce chapitre est destiné à être publié sous la forme présentée ici.

Transition d'une forme continue d'auto-assemblages assistés par enzyme à une forme microglobulaire par un mécanisme de type Liesegang

I - Introduction au chapitre

Dans le chapitre précédent, j'ai pu montrer qu'un processus d'auto-assemblage assisté par enzyme prenant place dans un hydrogel hôte résulte en la formation d'un motif d'auto-assemblage à l'interface gel/solution lorsqu'une solution de peptide précurseur est mise au contact du gel hôte. Cette structuration spatiale de l'hydrogel hôte par des bandes d'auto-assemblage se retrouve perpendiculairement à l'interface. Elle se retrouve également le long de ladite interface dans le cas d'une goutte de solution de peptide précurseur déposée sur le gel hôte et ne recouvrant pas entièrement la surface du gel. Cette structuration de l'hydrogel hôte par des auto-assemblages s'accompagne également par un changement local des propriétés mécaniques de l'hydrogel parfaitement accordé au motif d'auto-assemblage observé (et ce dans le cas de la goutte déposée en surface du gel hôte).

Le propos principal du chapitre 3 de ce manuscrit était de montrer que ces structures résultent de mécanismes de réaction-diffusion de type Liesegang. Ceci a été réalisé expérimentalement en montrant l'influence essentielle de paramètres tels que la concentration en enzymes dans l'hydrogel hôte ou la concentration de la solution en peptides précurseurs mise au contact du gel hôte sur le profil de l'auto-assemblage. Un modèle basé sur les processus de réaction-diffusion et proche de la théorie de la sursaturation d'Ostwald permet de rendre compte qualitativement des résultats expérimentaux obtenus appuyant plus encore l'explication des mécanismes de réaction-diffusion de type Liesegang apportée pour rendre compte des motifs et structures observés expérimentalement.

En étudiant l'influence de concentrations extrêmement faibles en enzyme, nous avons observé une transition depuis un profil continu (chapitre 3) vers une distribution de microglobules individuelles de peptides auto-assemblés. Le chapitre 4 présente nos investigations visant à élucider l'origine de ces microglobules en s'appuyant sur les résultats du chapitre précédent basés sur des processus de réaction-diffusion de type Liesegang.

Ici encore la partie expérimentale s'appuie sur l'utilisation du microscope confocal à fluorescence pour suivre plus particulièrement la formation d'édifices auto-assemblés au cours du temps au sein des hydrogels hôtes. Sur la base de ces travaux, deux mécanismes pouvant

Transition d'une forme continue d'auto-assemblages assistés par enzyme à une forme microglobulaire par un mécanisme de type Liesegang

rendre compte de nos observations seront proposés. Il est à noter que les ouvertures apportées par ce chapitre permettront à l'avenir de raffiner le modèle proposé au chapitre 3.

II - Abstract

Enzyme-assisted self-assembly confined within host materials leads to Liesegang-like spatial structuration when precursor peptides are diffusing through an enzyme-functionalized hydrogel. Playing on peptide and enzyme concentrations results in a transition from continuous self-assembled peptides areas to individual microglobules. Their morphology, location, size and a buildup mechanism are described.

III - Introduction

Nature is full of examples of structures that result from complex reaction-diffusion processes.¹ Such structures can be observed over length scales ranging from a fraction of a micrometer to tens of meters in areas as different as the living world or geological structures.² Among the different patterns, Liesegang patterns are the first that have been thoroughly investigated. First noticed in 1855 by F.F. Runge, rediscovered and described by Liesegang in 1896, they are observed when a precipitation reaction is coupled with diffusion processes in the absence of convection.^{3, 4} Typically, when a soluble salt, **A**, diffuses into a gel containing another soluble salt, **B**, and when in addition **AB** forms a weakly soluble salt, one can observe, at high enough electrolyte concentrations the formation of regular structures such as rings or bands highly concentrated in **AB** precipitate.⁵ The characteristics of these structures (band or ring spacing, width of the bands...) depend upon numerous parameters such as the concentrations of the diffusing species or their diffusion coefficients.⁶ It is worth noting that **B** is generally in much lower concentration than **A**. The formation of the precipitate **AB** induces a zone in the gel, near the interface, that is depleted chiefly in **B**. Then, when **A** diffuses into the gel, the salt concentrations in this zone are below the critical supersaturation degree at which precipitation starts. The critical degree of supersaturation is again reached further from the interface where the depletion of **B** is less pronounced leading to a new zone of **AB** formation. This precipitate formation again generates a new zone depleted in **B**. Because **A** continues to diffuse into the gel, this process is likely to take place further in the gel and to produce additional bands.

Over the last decade, the enzyme-assisted self-assembly (EASA) of phosphorylated peptides has received great attention.⁷⁻¹¹ It results from the dephosphorylation of a phosphorylated precursor that is enzymatically transformed into a hydrogelator which then self-assembles in nanofibers, as shown by Bing Xu in a pioneer work.¹² The initial step of self-assembly closely resembles the nucleation process of crystals with the necessity of a critical hydrogelator concentration to induce self-assembly. Mainly studied in solution, self-assembly processes,¹³⁻¹⁵ and EASA in particular,^{16, 17} were much less explored when taking place in host gels where new features appear. In this context we have recently shown that Liesegang-like processes occur when a solution of the phosphorylated tripeptides Fmoc-FFpY (Fmoc:

Fluorenylmethyloxycarbonyl, F: phenyl alanine, *p*Y: phosphorylated tyrosine) is brought into contact with a hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) chemical host gel containing free alkaline phosphatase (AP) (Fig. 1a,b).¹⁸ Indeed, unexpectedly the precursor peptide diffusion results in the formation of a pattern of self-assembled Fmoc-FFY peptides. Figure 1c shows a typical self-assembly profile obtained when a 2 mg.mL⁻¹ Fmoc-FF*p*Y solution has diffused within a HPMC gel containing 0.5 mg.mL⁻¹ of AP. Thioflavine T (ThT) was used to reveal the Fmoc-FFY self-assembly by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM), since this dye becomes fluorescent when adsorbed on β -sheet structures of Fmoc-FFY assembly. The self-assembly profile appears continuous (at the scale of the image) along planes parallel to the interface and presents two self-assembly maxima in the direction perpendicular to the gel/solution interface. One maximum is located in the solution at the gel/solution interface. It is followed within the gel by a zone depleted in self-assembled structures followed by a second self-assembly maximum. In some cases, a third maximum can be also observed.¹⁸ This self-assembly profile was explained by a Liesegang-like process.

Herein, by playing with the enzyme concentration in the HPMC host hydrogel, the concentration of the diffusing solution of Fmoc-FF*p*Y and the enzymatic activity of AP, we report an unexpected transition going from the continuous self-assembly areas to a discrete distribution of micrometer-size globules of Fmoc-FFY self-assemblies. Through the analysis of these parameter's variation effects, the origin of this transition and the mechanism of the globular peptide assemblies are proposed.

First of all, it is important to remind the mechanism responsible of the continuous Liesegang-like pattern observed in the AP-assisted Fmoc-FFY self-assembly in HPMC hydrogel (called AP-HPMC).¹⁸ When a Fmoc-FF*p*Y solution (2 mg.mL⁻¹) is brought into contact with a HPMC gel (1.5% w/v)¹⁹ containing AP (1 mg.mL⁻¹), some of the enzymes diffuse out of the gel,

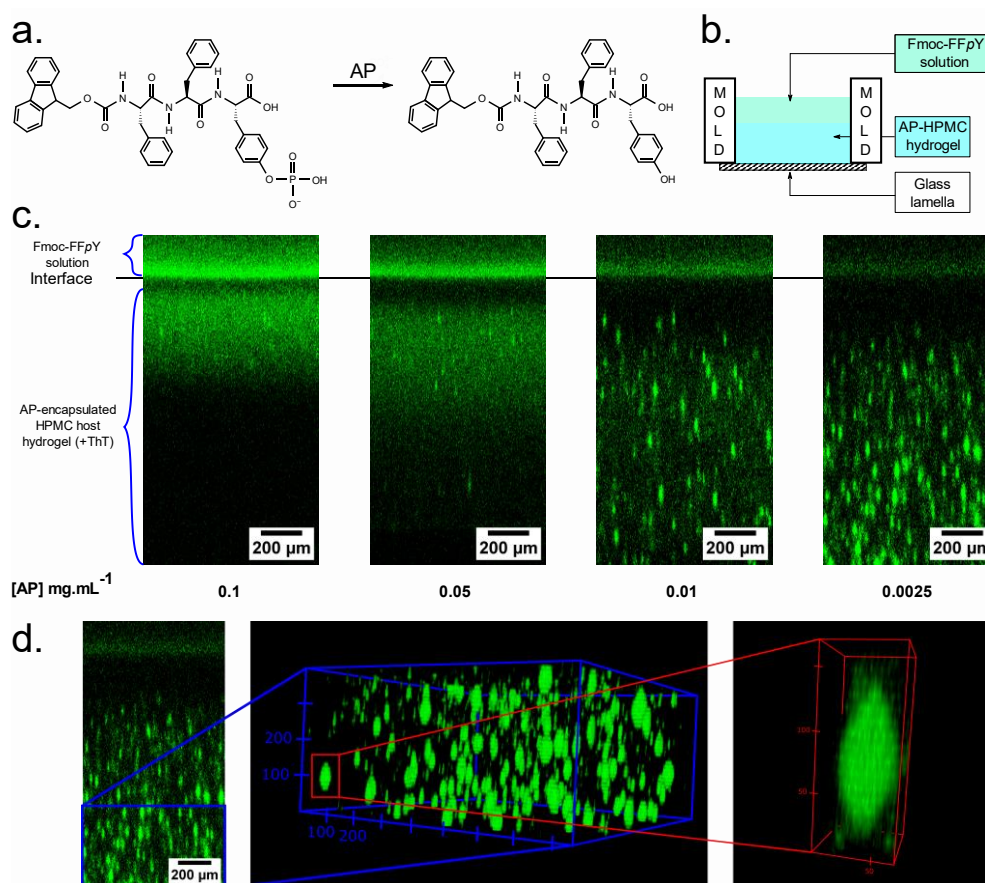


Figure 1: (a) Enzymatic transformation of Fmoc-FFpY in the self-assembling tripeptide Fmoc-FFY by AP. (b) Schematic of the diffusion experiments and (c) self-assembly patterns observed by CSLM using AP concentrations decreasing from 0.50 to 0.01 mg.mL⁻¹ in AP-HPMC, and 2 mg.mL⁻¹ of Fmoc-FFpY in each case. (d) 3D spatial distribution of the Fmoc-FFY self-assembled microglobules and magnifications when 0.01 mg.mL⁻¹ of AP is used in AP-HPMC hydrogel. The non spherical shape of the microglobules is due to the point spreading along the z-axis.

transform Fmoc-FFpY into Fmoc-FFY and a high enough concentration of Fmoc-FFY is almost instantaneously reached leading to the first self-assembly maximum at the gel/solution interface. Fmoc-FFpY also diffuses into the gel where it is transformed into Fmoc-FFY. As long as the concentration of Fmoc-FFY is not high enough in the gel no assembly occurs. However, these "free" Fmoc-FFY peptides may diffuse toward the first self-assembly maximum at the gel/solution interface and irreversibly anchor onto it, participating in the growth of this self-assembly. The self-assembly at the gel/solution interface thus acts as a sink for free Fmoc-FFY peptides. As time goes on, Fmoc-FFpY peptides diffuse further in the gel and are transformed into Fmoc-FFY whose local concentration thus increases. Competition

between the diffusion of Fmoc-FF p Y into the gel, their transformation into Fmoc-FFY and the diffusion of free Fmoc-FFY towards the first self-assembly structure leads to the appearance of a local maximum of the concentration of Fmoc-FFY in the gel. When it reaches a critical concentration, the Fmoc-FFY self-assembly starts there. Because it takes place in the host-gel AP-HPMC, the Fmoc-FFY self-assembled entities cannot diffuse and remain stuck in the gel. This self-assembly then grows locally, similarly to the first self-assembly maximum by capturing free Fmoc-FFY peptides diffusing in its close vicinity. This accentuates the depletion zone between this second self-assembled maximum and the first one at the gel/solution interface. This second self-assembled area then extends towards the bottom of the gel. The formation of other Fmoc-FFY self-assembled maxima is possible if enough precursor Fmoc-FF p Y continue to diffuse further within the host hydrogel.¹⁸ Despite the similarities with the famous Liesegang patterning mechanism of inorganic species, it must be reminded here that a striking difference is that the enzyme-assisted self-assembly process implies the chemical transformation of only one of the two partners in contrast to the original Liesegang process where the two partners are consumed (*i.e.* **A** and **B**).

IV - Results and discussion

When using a Fmoc-FFpY concentration of 2 mg.mL^{-1} and decreasing the AP concentration in the gel from 0.50 to 0.01 mg.mL^{-1} , the self-assembly zone increases in width, decreases in intensity and bright green self-assembled Fmoc-FFY globular "spots" appear (Fig. 1c). At a 0.50 mg.mL^{-1} AP concentration, a continuous area of Fmoc-FFY assembly is observed just below the depletion zone by $100 \mu\text{m}$ in depth, as previously described.¹⁸ Surprisingly, at the lower enzyme concentration (0.01 mg.mL^{-1}), the continuous zone of self-assembly in the gel is no longer visible and only large Fmoc-FFY self-assembled spherical microglobules are present. Their diameter is varying from 10 to $150 \mu\text{m}$ (Fig. 1d). Intermediate concentrations of AP, *i.e.* 0.10 and 0.05 mg.mL^{-1} , result in the concomitant presence of a continuous self-assembly pattern and discrete "spots" of self-assembled peptides. In addition to this evolution, we can also notice a shift of the spatial localization of the self-assembled Fmoc-FFY area from the first half of the HPMC hydrogel at high peptide concentrations (continuous distribution) to the second half, quasi at the bottom of the gel, for the low concentrations (microglobular shape assemblies). Starting from other Fmoc-FFpY concentrations such as 0.5 , 1.0 and 5.0 mg.mL^{-1} and varying the AP concentration in the same range (from 0.50 to 0.01 mg.mL^{-1}) leads to the same trends: whatever the peptide concentration, there is a transition from a continuous self-assembly pattern to a pattern constituted of discrete "spots" when the enzyme concentration diminishes (Fig. S1 in ESI). Heat-shock treatment can also be used to finely decrease the hydrolytic activity of AP.²⁰ Thus, we have prepared a batch of 98% less active AP (1 mg.mL^{-1}) to prepare AP-HPMC (Fig. S2). It thus corresponds to a $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ concentration of non-deactivated AP in HPMC. When Fmoc-FFpY (2 mg.mL^{-1}) is diffusing through this highly deactivated AP-encapsulated HPMC hydrogel, we observe the formation of distinct and big microglobules of self-assembled Fmoc-FFY having up to roughly $70 \mu\text{m}$ in diameter (Fig. S3). The very low *in situ* production of Fmoc-FFY within the AP-HPMC results in the appearance of the microglobules 40 hours after Fmoc-FFpY solution deposition on AP-HPMC. Thus, the enzymatic activity can be related with the microglobular-shaped pattern observed.

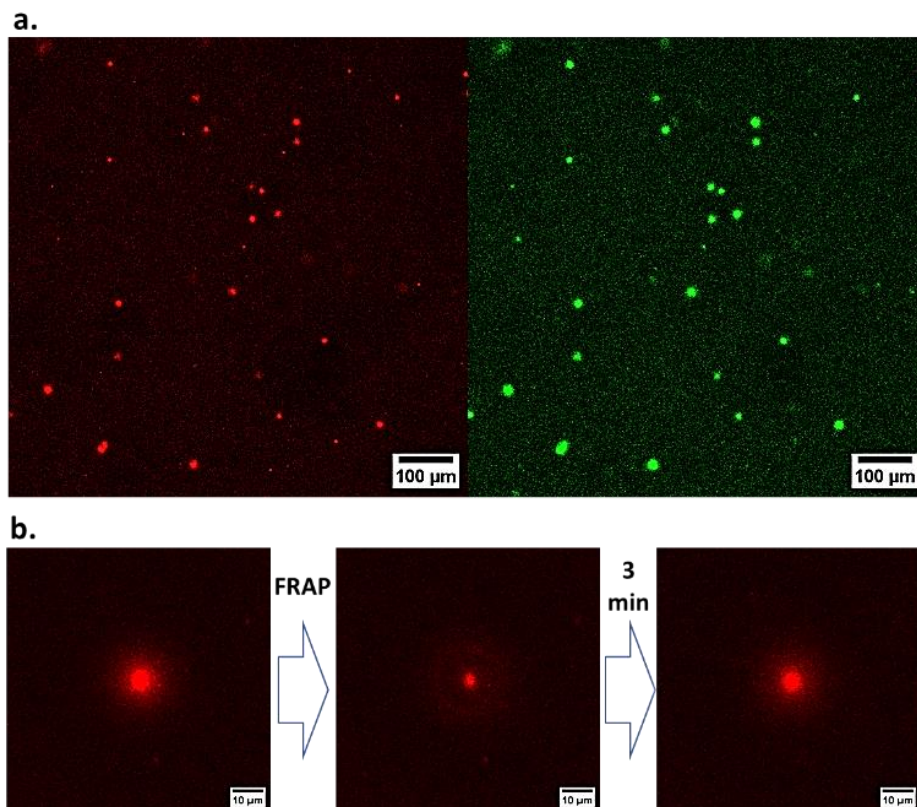


Figure 2: (a) CLSM images of *Fmoc-FFY* self-assembled microglobular shapes distribution revealed by *ThT* (green color). The AP^{RHO} localization is followed through its red colour emission. (b) Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments on AP^{RHO} localized within a microglobule.

By using rhodamine-labelled AP (AP^{RHO}) we could visualize simultaneously the localization of enzymes and the formation of the *Fmoc-FFY* self-assemblies over time by CLSM monitoring (Fig S4). When analysing temporally the morphological genesis and evolution of the self-assembled pattern in conditions under which a high spatial density of microglobules ultimately appears, one first observes that, at $t = 0$ (before the *Fmoc-FFpY* solution is deposited on AP-HPMC), apart from some very small red spots ($\approx 1-2 \mu\text{m}$ in diameter corresponding to aggregated proteins), AP^{RHO} appears uniformly distributed in the whole 3D space of the host gel. As time goes on, green “spots” appear randomly all over the 2D plane monitored within the AP-HPMC hydrogel. These structures gain in green intensity and end up in globular green spots (Fig. 2a). But the same trend occurs with AP^{RHO} : red “spots” appear when the *Fmoc-FFpY* is diffusing within AP^{RHO} -HPMC. We observed a strong colocalization of the *Fmoc-FFY* self-assembled microglobules and the AP^{RHO} enzymes: indeed, the centres of all the spots

Transition d'une forme continue d'auto-assemblages assistés par enzyme à une forme microglobulaire par un mécanisme de type Liesegang

becoming green also are red. When bleaching AP^{RHO} in part of a microglobule, over 60% of the initial red fluorescence emission is recovered after three minutes (Fig. 2b and S5); but it was not possible to determine unambiguously whether the AP performing the recovery originates from the non-bleached part of the microglobule or from its vicinity above and below the bleached plane.

What is the origin of these self-assembled peptide microglobules and is a Liesegang-like mechanism compatible with their presence? When the enzyme concentration becomes small, the enzymatic transformation of Fmoc-FFpY into Fmoc-FFY becomes slow, and likewise the increase of the Fmoc-FFY concentration in the gel. As the mean concentration approaches the critical aggregation concentration, though stays below it, this concentration may locally exceed it by a random, spontaneous Fmoc-FFY density fluctuation so that self-assembly starts there. Because this takes place in the host-gel the self-assembled structure remains in place and attracts free Fmoc-FFY peptides from its vicinity. If the enzyme and peptide concentrations lie in an intermediate concentration range, this process takes place simultaneously to the continuous self-assembly build-up. The Fmoc-FFY concentration increases very slowly, allowing large density fluctuations to appear. This leads to the formation of isolated microglobules that bind the free Fmoc-FFY peptides. This depletes the Fmoc-FFY peptide concentration around the microglobules so that the critical aggregation concentration is no longer reached as observed experimentally (Fig. S6). The spot formation process is thus in essence similar to the Liesegang process generating the continuous self-assembly profile discussed above. The attraction of AP by Fmoc-FFY self-assemblies even enhances the localized growth process for the generation of both the self-assembly pattern and the self-assembly spots.

In this description of a proposed mechanism, we have neglected possible local fluctuations in the peptide and/or enzyme concentrations always present in natural systems. We have also neglected the presence of small enzyme aggregates which act as local enzyme concentration fluctuations. Finally, we have neglected the fact that a nucleation process is stochastic in essence. These latter aspects act similarly to local peptide density fluctuations. When the enzyme and Fmoc-FFpY concentrations are high, the enzymatic reaction is fast, and one reaches the critical Fmoc-FFY self-assembly concentration almost simultaneously over a large area, so that the fluctuations are of minor effect, which is not the case when using low concentrations of AP in HPMC leading to peptide self-assembled microglobules. To answer if

these microglobules originate from enzyme aggregates initially present in AP-HPMC, we have carefully followed overtime the emergence of these globular structures. This is possible through CLSM since, as mentioned before, the Fmoc-FFY self-assemblies do not move (diffuse) within the host hydrogel. First, we observed that some globules are forming from AP aggregates and some others seemingly not (Fig. 3).

More strikingly, this investigation led us to observe another non-expected phenomenon: when two microglobules of different size are generated close together, we noticed that the small one disappears to the big microglobule profit, which becomes thus bigger (Fig. 3). Unambiguously, it does not correspond to any coalescence effect between the two microglobules. The ability of the small microglobule to disappear highlights the fact that the Fmoc-FFY self-assembled structures are always in a dynamic equilibrium over their formation within the host material. This observation looks like an Ostwald ripening mechanism.²¹ More investigations are required to elucidate this observation and are out of the scope of this communication.

The internal structuration of hydrogels through the self-assembly of organic molecules is an emerging research field which is a part of the hierarchical materials development. We have shown that EASA is a suitable tool to control the self-assembly pattern from continuous areas to discrete globular microstructures. Based on diffusion, enzymatic transformation and self-assembly, we have proposed a mechanism explaining this transition and the formation of these self-assembled entities. A model is currently developed in our groups to predict the structures growth and shape. One of the challenge in the near future is to find out the origin of the discrete globular microstructures : concentration fluctuations of peptides, enzymes or enzymes aggregates. A second challenge is to understand the molecular origin of our Ostwald ripening like process. Moreover, models based on a Ostwald ripening process have been proposed to explain Liesegang structures in inorganic systems. Could this process also be at the origin of the continuous self-assembly pattern observed in our system? The answer to this question could thus also have implications in the understanding of Liesegang patterns, the process of which are still in debate.

Transition d'une forme continue d'auto-assemblages assistés par enzyme à une forme microglobulaire par un mécanisme de type Liesegang

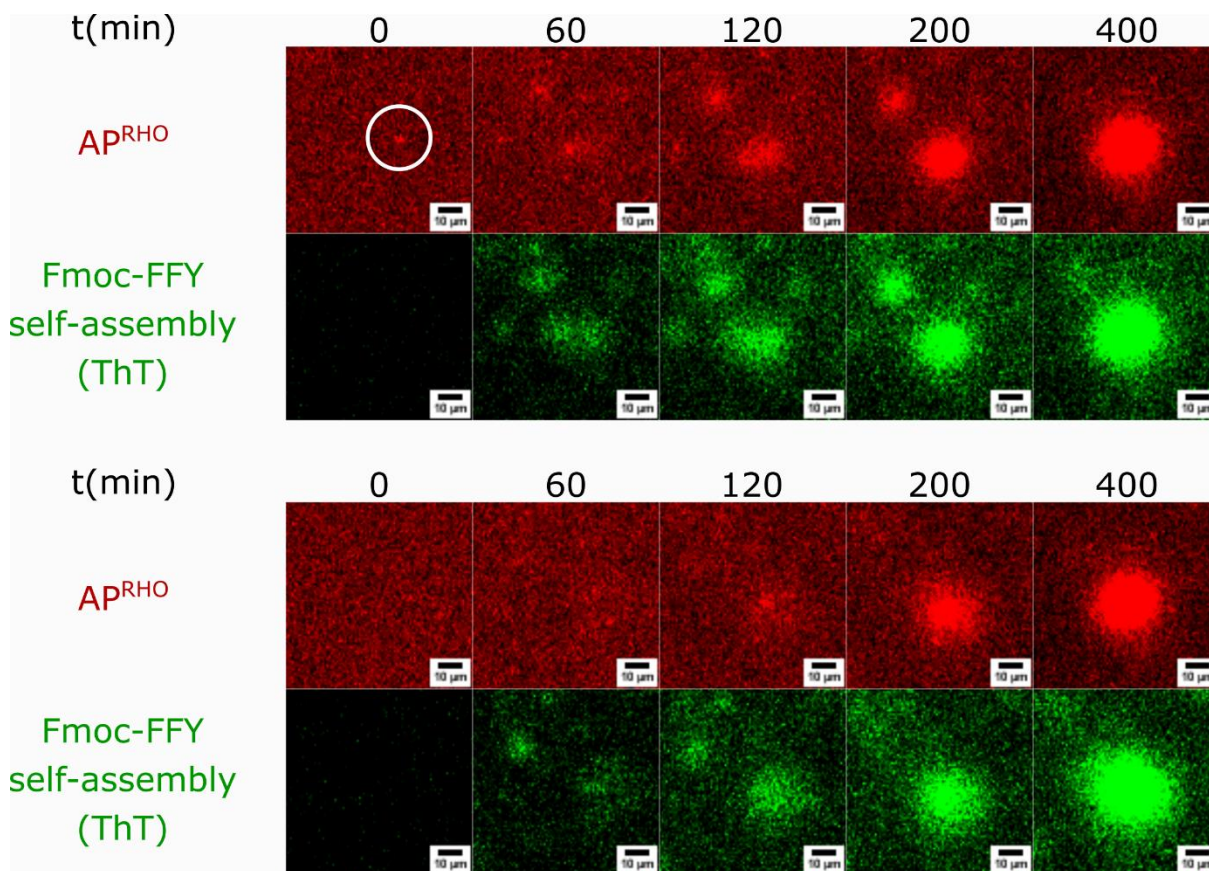


Figure 3: CLSM time lapse series of Fmoc-FFY self-assembled microglobules formation monitored overtime (from $t=0$ min, before the Fmoc-FFpY diffusion, to 60, 120, 200 and 400 min after the deposition of the Fmoc-FFpY solution on the AP^{RHO}-HPMC hydrogel. Fmoc-FFY self-assembly is revealed by ThT (green color) and the enzyme thanks to rhodamine-labelled AP, i.e. AP^{RHO} (red color). (Top) Monitoring of microglobules formation from aggregates of AP^{RHO}. The disappearance of smaller spots to bigger profit is here observed. (Bottom) Monitoring of microglobule formation in absence of enzymes aggregates.

References

1. Grzybowski, B. A. and Huck, W. T., *The nanotechnology of life-inspired systems*. Nat Nanotechnol, 2016. **11**(7): p. 585-92.
2. Whitesides, G. M. and Grzybowski, B., *Self-Assembly at All Scales*. Science, 2002. **295**(5564): p. 2418-2421.
3. Runge, F. F., *Der Bildungstrieb der Stoffe, veranschaulicht in selbstständig gewachsenen Bilder*. Self-Edited, 1855.
4. Liesegang, R. E., *Ueber einige Eigenschaften von Gallerten*. Naturwissenschaftliche Wochenschrift, 1896. **11**(30).
5. Sultan, R., Ortoleva, P., DePasquale, F., and Tartaglia, P., *Bifurcation of the Ostwald-Liesegang supersaturation-nucleation-depletion cycle*. Earth-Science Reviews, 1990. **29**(1): p. 163-173.
6. Nabika, H., Itatani, M., and Lagzi, I., *Pattern Formation in Precipitation Reactions: The Liesegang Phenomenon*. Langmuir, 2020. **36**(2): p. 481-497.
7. Hughes, M., Debnath, S., Knapp, C. W., and Ulijn, R. V., *Antimicrobial properties of enzymatically triggered self-assembling aromatic peptide amphiphiles*. Biomaterials Science, 2013. **1**(11): p. 1138-1142.
8. Vigier-Carriere, C., Garnier, T., Wagner, D., Lavallo, P., Rabineau, M., Hemmerle, J., Senger, B., Schaaf, P., Boulmedais, F., and Jierry, L., *Bioactive Seed Layer for Surface-Confining Self-Assembly of Peptides*. Angewandte Chemie-International Edition, 2015. **54**(35): p. 10198-10201.
9. Moreira, I. P., Sasselli, I. R., Cannon, D. A., Hughes, M., Lamprou, D. A., Tuttle, T., and Ulijn, R. V., *Enzymatically activated emulsions stabilised by interfacial nanofibre networks*. Soft Matter, 2016. **12**(9): p. 2623-2631.
10. Zhou, J., Du, X., Wang, J., Yamagata, N., and Xu, B., *Enzyme-Instructed Self-Assembly of Peptides Containing Phosphoserine to Form Supramolecular Hydrogels as Potential Soft Biomaterials*. Frontiers of chemical science and engineering, 2017. **11**(4): p. 509-515.
11. Wang, Z., Liang, C., Shang, Y., He, S., Wang, L., and Yang, Z., *Narrowing the diversification of supramolecular assemblies by preorganization*. Chemical Communications, 2018. **54**(22): p. 2751-2754.
12. Yang, Z., Gu, H., Fu, D., Gao, P., Lam, J. K., and Xu, B., *Enzymatic Formation of Supramolecular Hydrogels*. Advanced Materials, 2004. **16**(16): p. 1440-1444.
13. Lovrak, M., Hendriksen, W. E. J., Maity, C., Mytnyk, S., van Steijn, V., Eelkema, R., and van Esch, J. H., *Free-standing supramolecular hydrogel objects by reaction-diffusion*. Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 15317.
14. Schlichter, L., Piras, C. C., and Smith, D. K., *Spatial and temporal diffusion-control of dynamic multi-domain self-assembled gels*. Chemical Science, 2021. **12**(11): p. 4162-4172.
15. Cooke, H. S., Schlichter, L., Piras, C. C., and Smith, D. K., *Double diffusion for the programmable spatiotemporal patterning of multi-domain supramolecular gels*. Chemical Science, 2021. **12**(36): p. 12156-12164.
16. Criado-Gonzalez, M., Rodon Fores, J., Wagner, D., Schröder, A. P., Carvalho, A., Schmutz, M., Harth, E., Schaaf, P., Jierry, L., and Boulmedais, F., *Enzyme-assisted self-*

- assembly within a hydrogel induced by peptide diffusion*. Chemical Communications, 2019. **55**(8): p. 1156-1159.
17. Criado-Gonzalez, M., Loftin, B., Fores, J. R., Vautier, D., Kocgozlu, L., Jierry, L., Schaaf, P., Boulmedais, F., and Harth, E., *Enzyme assisted peptide self-assemblies trigger cell adhesion in high density oxime based host gels*. Journal of Materials Chemistry B, 2020. **8**(20): p. 4419-4427.
 18. Runser, J. Y., Criado-Gonzalez, M., Fneich, F., Rabineau, M., Senger, B., Weiss, P., Jierry, L., and Schaaf, P., *Non-monotonous enzyme-assisted self-assembly profiles resulting from reaction-diffusion processes in host gels*. J Colloid Interface Sci, 2022. **620**: p. 234-241.
 19. Trojani, C., Weiss, P., Michiels, J.-F., Vinatier, C., Guicheux, J., Daculsi, G., Gaudray, P., Carle, G. F., and Rochet, N., *Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel*. Biomaterials, 2005. **26**(27): p. 5509-5517.
 20. Ahnoff, M., Cazares, L. H., and Sköld, K., *Thermal inactivation of enzymes and pathogens in biosamples for MS analysis*. Bioanalysis, 2015. **7**(15): p. 1885-1899.
 21. Hubbard, A. T., *Encyclopedia of surface and colloid science*. Vol. 1. 2002: CRC press.

V - Supporting Information

Transition d'une forme continue d'auto-assemblages assistés par enzyme à une forme microglobulaire par un mécanisme de type Liesegang

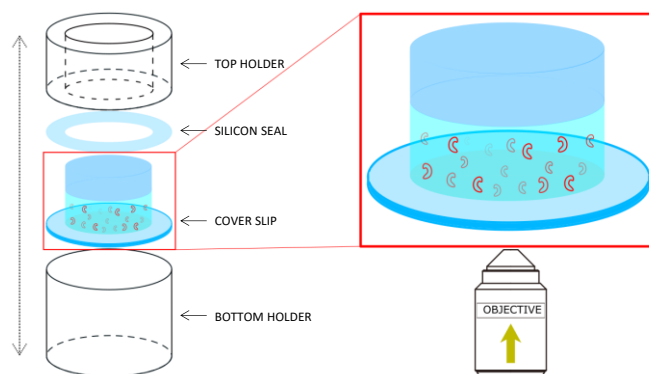
1 - Material and methods

a. Material

Alkaline phosphatase (AP) from bovine intestinal mucosa (AP) (10 DEA units mg⁻¹ protein) and para-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate System (PNP) were provided by Sigma Aldrich. Sodium tetraborate anhydrous (Borax) was supplied by Acros Organics. Fmoc-FFpY (99% purity, natural chirality) was purchased by PepMic and its characterization was identical to a previous reported work.¹ Thioflavine T was purchased from Aldrich. AP^{RHO} was prepared according to the literature.²

b. CLSM monitoring

Hydrogels were prepared in Teflon molds of 10 mm diameter by mixing 50 µL of Si-HPMC solution at 3%w/v in NaOH 0.1M and pH 12.9 with 50 µL of HEPES buffer at pH 3.6 in a vortex and let them gelate at room temperature for 48 hours. In the case of AP-HPMC with various AP (AP wild type, deactivated AP or AP^{RHO}) AP was dissolved in Hepes buffer at the desired concentration (in the case of kinetic experiments, this solution also contains Thioflavin T at 0.5mg.mL⁻¹). This solution was then mixed with the Si-HPMC solution (3%w/ pH 12.9) with a ratio of 100µL/100µL by mechanical stirring. After 48 h the gel was completely formed. Subsequently, 50 µL of Fmoc-FFpY (at the desired concentration) was put in contact with HPMC hydrogels for 24 h at room temperature (in the case of non kinetic experiment, ThT is added after those 24 h). Confocal laser scanning microscopy images were captured with a Zeiss LSM 710 microscope using a EC Plan-Neofluar 10x/0.3 and a Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 objectives (for Fluorescence recovery after photobleaching experiments). The fluorescence of Rhodamine B was measured with an excitation wavelength of 561 nm and emission between 566 and 703 nm. The self-assembly was visualized thanks to the Thioflavine T present in the host hydrogel (for kinetic experiments) or added after 24 h of diffusion of the peptide. The fluorescence of Thioflavine T was measured with excitation by an argon laser with a cut-off dichroic mirror at 488 nm and an emission band-pass filter between 493 and 548 nm. The setup for samples preparation and measurement is shown in the following scheme.



As mentioned above, CLSM is also used to perform fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments. The principle of such experiment is simple. A region of the sample is exposed to laser beam at its maximum intensity. Consequently, the fluorophores present in this region are bleached. Once this bleaching performed, one can continue image acquisition in time series in order to measure the recovery of fluorescence in this bleached area. The time taken to recover the fluorescence as well as the proportion of fluorescence recovered will for instance give information on the percentage of fluorophores that are mobile but also on their diffusion constant.

c. Preparation of 1.5%w/v AP-HPMC and diffusion of Fmoc-FFpY within this host hydrogel

Hydroxypropylmethylcellulose silanized, called Si-HPMC, has been prepared according to the reported procedure.³ HPMC hydrogels were prepared by mixing 100 μ L of Si-HPMC solution at 3%w/v in NaOH 0.1M and pH 12.9 with 100 μ L of HEPES buffer at pH 3.6 by mechanical stirring and let them gelate at room temperature. In the case of AP-HPMC preparation, AP, deactivated AP or AP^{RHO} was dissolved in Hepes (pH 3.6). This solution was then mixed with Si-HPMC solution (3%w/v, ph 12.9) with 100 μ L/100 μ L ratio by mechanical stirring. For the Fmoc-FFpY diffusion tests, after 48 hours gelation, 50 μ L of Fmoc-FFpY solution (at the desired concentration in borax buffer 25 mM, pH 9.5) was added on top. These 50 μ L diffuse into the host hydrogel in few minutes and then it is let 48 h at room temperature before further investigations.

d. Heat shock AP treatment and evaluation of the phosphatase activity

i) Heat shock treatment

The heat shocked enzymes were prepared as follows: dissolution of enzymes (AP) at the desired concentration in Hepes in a vial. The solution obtained is placed inside an oven preheated at the temperature of interest. After 10mn, the vial is taken out of the oven. 100 μ L of the solution are taken in order to prepare the host hydrogel and 150 μ L of the solution are taken in order to evaluate the enzyme activity after heating. The vial is replaced inside the oven for 10mn and the steps described above are repeated.

ii) Evaluation of the phosphatase activity by spectrophotometry

The enzymatic activity was measured in a microplate reader UV spectroscopy (FLX-Xenius®, SAFAS, Monaco) using a 96 well plate. The AP activity from NPs@AP embedded inside the HPMC hydrogels was measured by incubation of the substrate, *para*-nitrophenylphosphate (PNP) (200 μ L at 1 mM in borax buffer). Concentration and volume ensure a large excess of substrate for the enzymatic reaction. PNP is a colourless AP substrate that by sequential enzymatic hydrolysis of the phosphate substituent of PNP in presence of AP yields a yellow absorbance at $\lambda = 405$ nm due to *para*-nitrophenol formation.

References

1. Rodon Fores, J., Bigo-Simon, A., Wagner, D., Payrastre, M., Damestoy, C., Blandin, L., Boulmedais, F., Kelber, J., Schmutz, M., Rabineau, M., Criado-Gonzalez, M., Schaaf, P., and Jierry, L., *Localized Enzyme-Assisted Self-Assembly in the Presence of Hyaluronic Acid for Hybrid Supramolecular Hydrogel Coating*. *Polymers*, 2021. **13**(11): p. 1793.
2. Mertz, D., Vogt, C., Hemmerlé, J., Mutterer, J., Ball, V., Voegel, J.-C., Schaaf, P., and Lavalley, P., *Mechanotransductive surfaces for reversible biocatalysis activation*. *Nature Materials*, 2009. **8**(9): p. 731-735.
3. Trojani, C., Weiss, P., Michiels, J.-F., Vinatier, C., Guicheux, J., Daculsi, G., Gaudray, P., Carle, G. F., and Rochet, N., *Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel*. *Biomaterials*, 2005. **26**(27): p. 5509-5517.

2 - Supplementary Figures

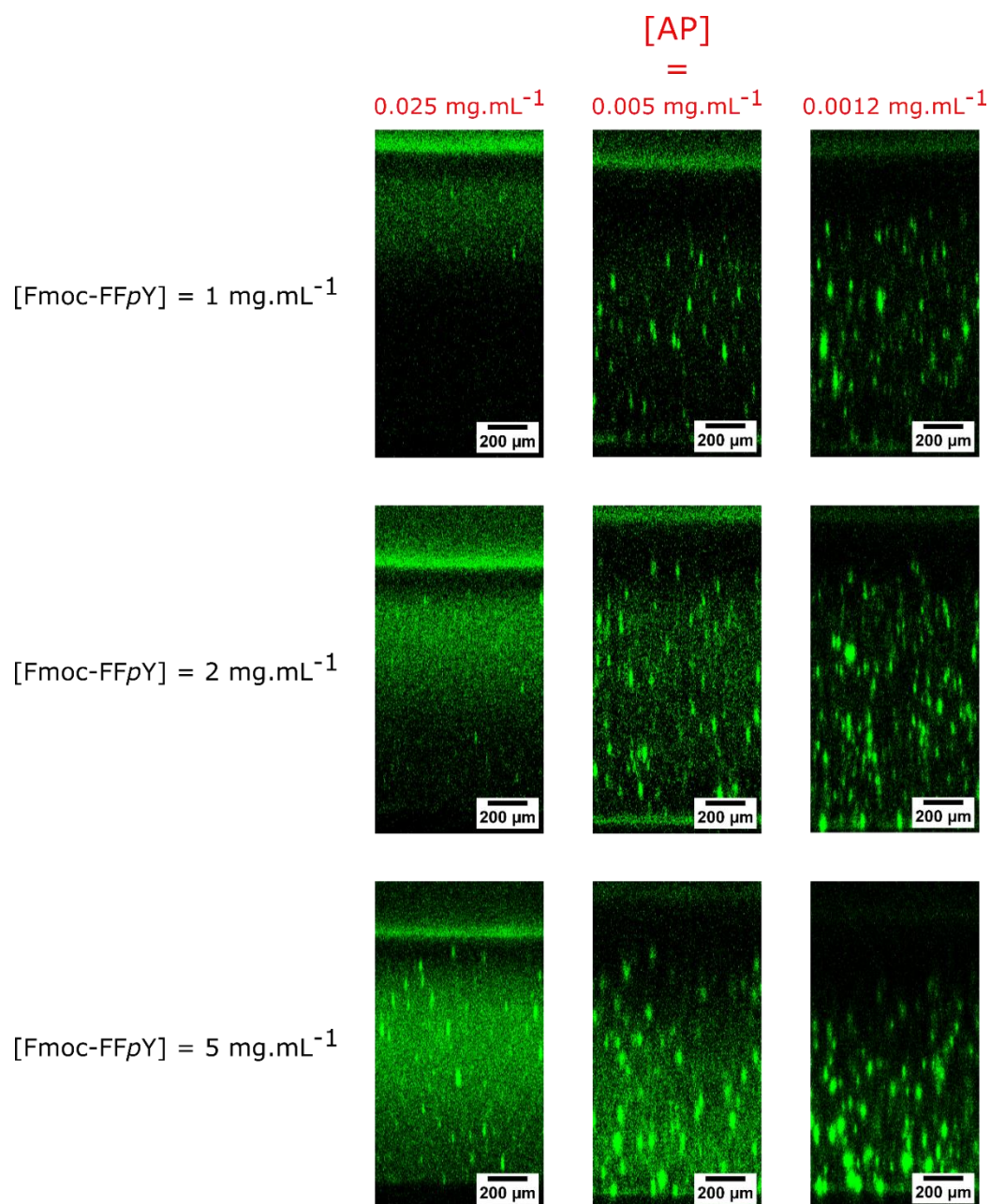


Figure S1: Self-assembly patterns observed by CSLM using two different AP concentrations (i.e. 0.05 and 0.01 mg.mL⁻¹) to prepare AP-HPMC, and various Fmoc-FFpY concentration diffusing through the host hydrogel (i.e. 0.5, 1, 2 and 5 mg.mL⁻¹).

Transition d'une forme continue d'auto-assemblages assistés par enzyme à une forme microglobulaire par un mécanisme de type Liesegang

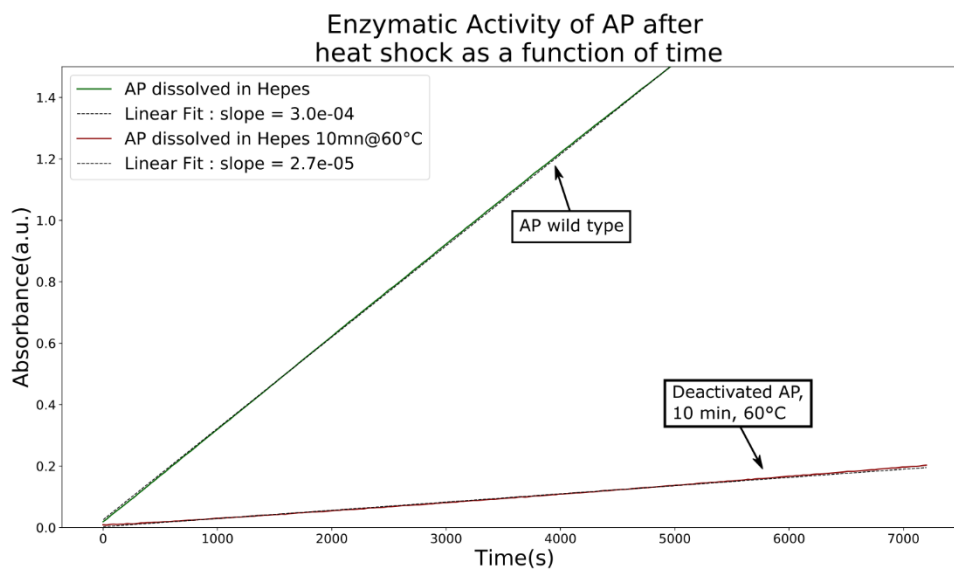


Figure S2: Spectrophotometric monitoring overtime of the absorbance of para-nitrophenol ($\lambda_{abs}=405$ nm) produced from para-nitrophenylphosphate hydrolysis (1 mM) in presence of deactivated AP (0.1 mg.mL⁻¹).

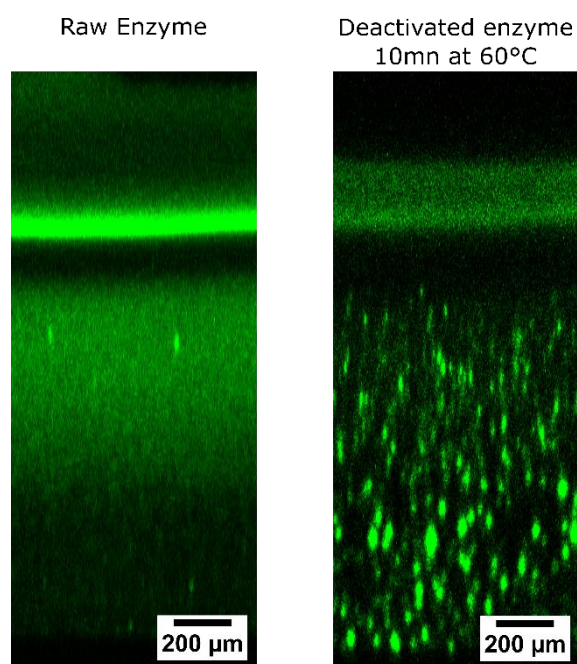


Figure S3: (right) Self-assembly profile resulting from enzyme deactivation (10 min at 60°C). (left) As point of comparison, self-assembly profile obtained using raw enzymes at the same concentration.

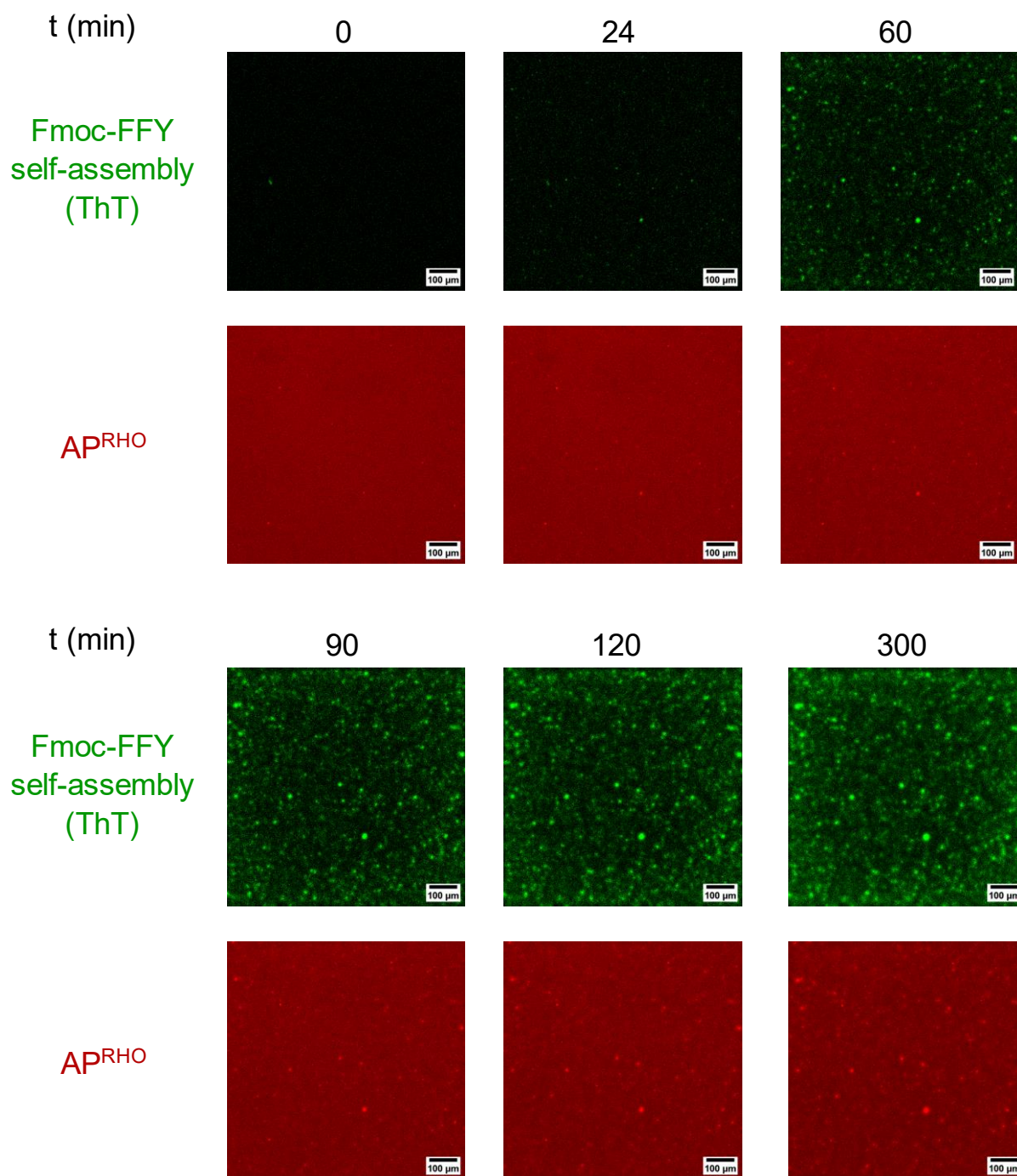


Figure S4: Apparition of microglobular self-assembly pattern over time. The AP^{RHO} concentration is 0.12 mg.mL⁻¹ while Fmoc-FFpY concentration is 2mg.mL⁻¹

Transition d'une forme continue d'auto-assemblages assistés par enzyme à une forme microglobulaire par un mécanisme de type Liesegang

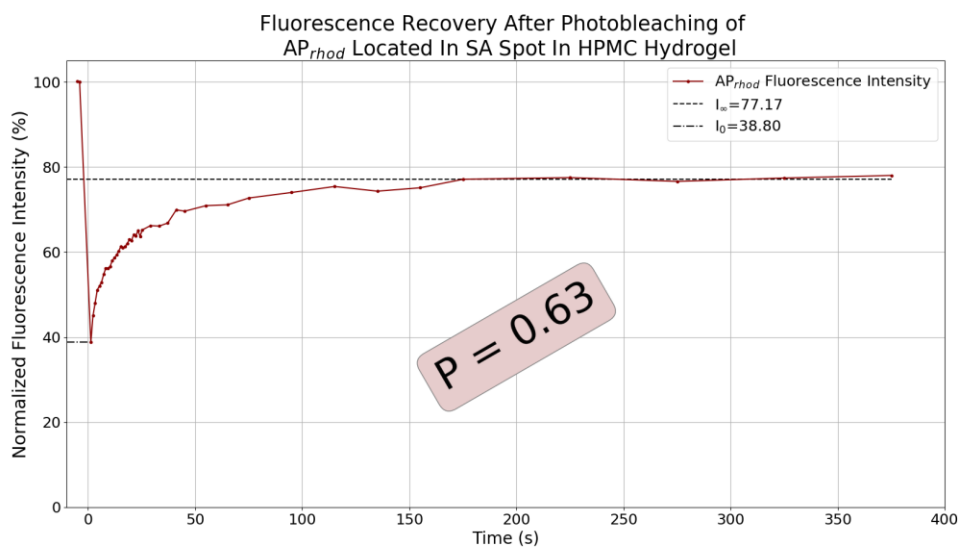


Figure S5: Graph resulting from FRAP experiment. By looking at the intensity of fluorescence recovered after photobleaching in comparison to the fluorescence intensity pre-bleach, one can deduce the proportion of particles mobile (diffusing freely) in the system. In this case, 63% of the enzymes are mobile.

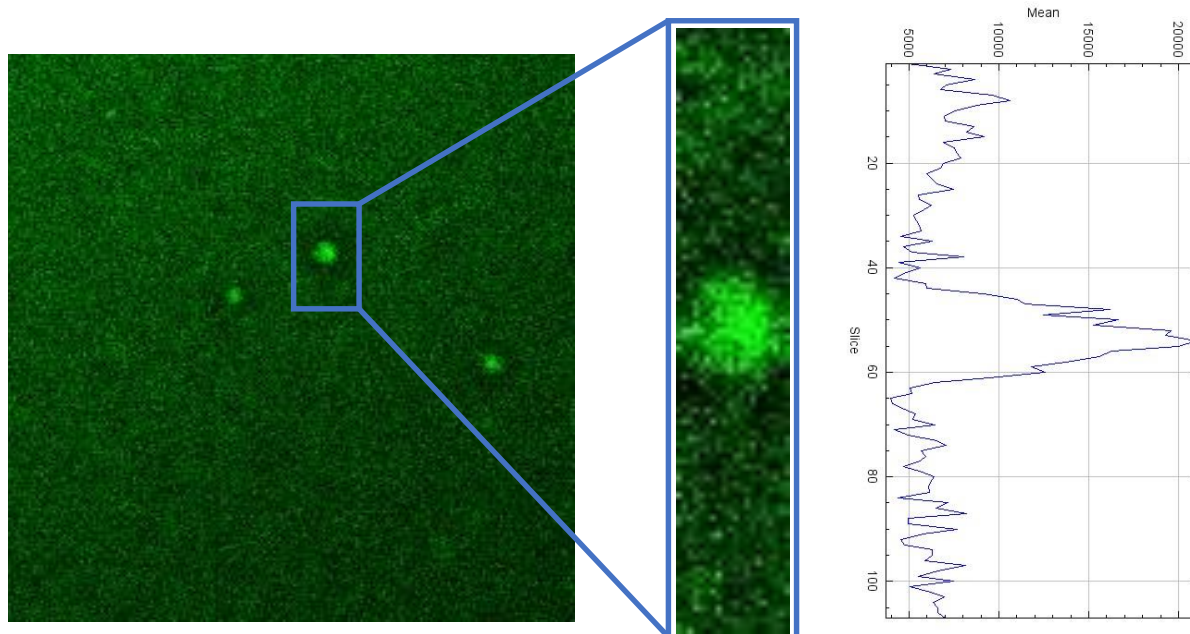


Figure S6: Zooming on a microglobule. One can observe here the depletion of Fmoc-FFY self-assembly around the microglobule.

Transition d'une forme continue d'auto-assemblages assistés par enzyme à une forme microglobulaire par un mécanisme de type Liesegang

Chapitre 5 : Nanoparticules fonctionnalisées par des enzymes pour diriger l'auto-assemblage de peptides dans un hydrogel avec un contrôle spatial 3D

Ce chapitre est destiné à être publié en l'état.

Miryam Criado-Gonzalez, Jean-Yves Runser, Fouzia Boulmedais, Pierre Weiss, Pierre Schaaf et Loïc Jierry

I - Introduction au chapitre

Dans les chapitres précédents, j'ai pu montrer qu'en faisant diffuser une solution peptidique capable d'auto-assemblage sous l'action d'une enzyme sur un hydrogel hôte contenant ladite enzyme, des phénomènes de réaction-diffusion prennent place résultant en une structuration *autonome* des hydrogels hôtes par des motifs d'auto-assemblages. Ceux-ci prennent la forme de bandes d'auto-assemblages (chapitre 3) ou de micro-globules (chapitre 4). Il apparaît important de souligner que ces bandes ne sont pas spatialement finement localisées. En effet, bien qu'un contrôle relatif sur le nombre de bandes (2 ou 3) et leur espacement (chapitre 3) ou encore le nombre de spots ou leur taille (chapitre 4) soit rendu possible par certaines variations des paramètres expérimentaux (tout particulièrement la concentration ou l'activité des enzymes présentes dans l'hydrogel hôte), ce contrôle n'est pas d'une grande finesse et ne permet pas à l'expérimentateur de "choisir" précisément la région de l'hydrogel hôte où la croissance du réseau d'auto-assemblage supramoléculaire se produira.

C'est la raison pour laquelle une solution alternative à la structuration d'hydrogels hôtes est proposée dans ce chapitre. Cette alternative part du constat que la diffusion des enzymes à l'intérieur du gel hôte doit être contrôlée afin de fixer et localiser ces enzymes dans le matériau hôte. L'approche adoptée et décrite dans le chapitre 5, pour prévenir la diffusion des enzymes, est de fonctionnaliser des nanoparticules de silice avec ces enzymes. Ces nanoparticules décorées d'enzymes, dont le diamètre est plus important que la maille du réseau de polymères formant l'hydrogel hôte, n'y diffusent donc pas.

Ce travail, qui a été réalisé sous la supervision du Dr. Miryam Criado-Gonzalez (postdoctorante dans l'équipe à l'époque où j'y commençais ma thèse) a été rendu possible par les avancées effectuées par mes prédécesseurs au laboratoire. En effet ceux-ci (Dr. Vigier-Carrière, Dr. Rodon-Fores, Dr. Lutzweiler notamment) ont pu montrer que des auto-assemblages peptidiques croissaient à partir de surfaces fonctionnalisées par des enzymes (mécanisme nommé LEASA pour Localized Enzyme-Assisted Self-Assembly) et ce dans différents systèmes.

Le chapitre 5 montre ainsi que l'insertion localisée de nanoparticules fonctionnalisées par des enzymes au sein d'hydrogels hôtes au moyen de microseringues permet d'induire la

Nanoparticules fonctionnalisées par des enzymes pour diriger l'auto-assemblage de peptides dans un hydrogel avec un contrôle spatial 3D

formation du réseau de peptides dans le voisinage proche de ces enzymes supportées par des nanoparticules.

Il est à noter que, même si cette approche ne sera pas développée dans ce chapitre 5, la structuration d'hydrogels par des réseaux d'auto-assemblages peptidiques supramoléculaires développée ici offre d'intéressantes perspectives dans son éventuel couplage à des techniques de bio-impression 3D pour une construction de motifs d'un intérêt biologique et pour la culture de cellules dans des matériaux structurés.

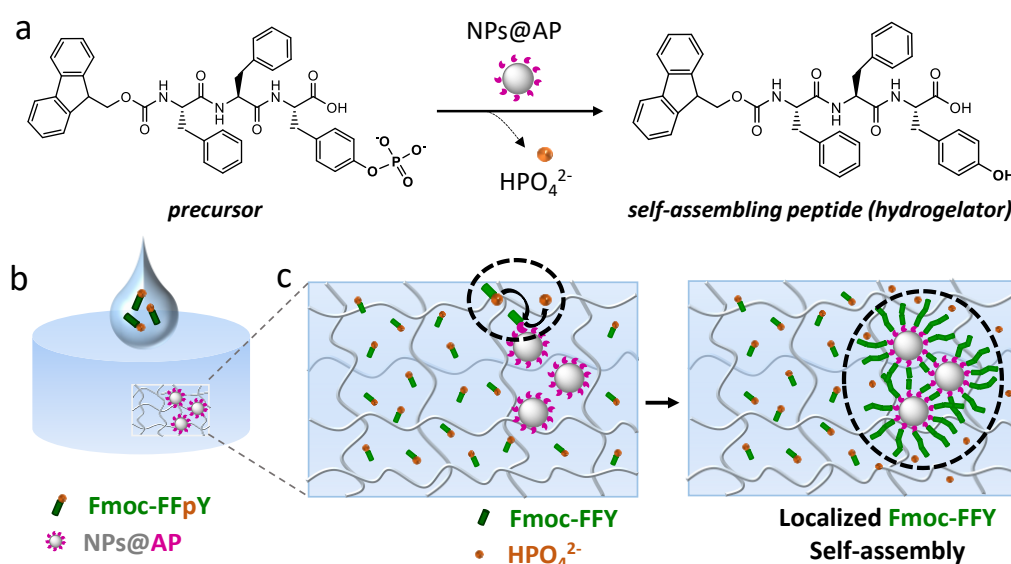
II - Abstract

Hydroxypropylmethylcellulose hydrogels are employed as 3D scaffolds to encapsulate phosphatase-modified silica nanoparticles. Such hybrid materials are catalytically active and strongly reduce the enzyme diffusion. This allows to spatially control the enzyme-assisted self-assembly of peptides within host materials as an alternative approach toward the design of hierarchically structured biomaterials.

III - Introduction

The concept of enzyme-assisted self-assembly (EASA) was introduced by Bing Xu in 2004 where enzymes transform low molecular weight precursors into hydrogelators which then self-assemble leading to a supramolecular hydrogel.¹ EASA allows the self-assembly localization where the enzyme is spatially located, as illustrated in 2009 by Ulijn through the covalent grafting of suitable enzymes on a glass substrate.² Thus, the self-assembly takes place in the spatial regions where both the precursors and the enzymes are present simultaneously.³ We and others have developed localized EASA (or LEASA) on surfaces with various types of enzyme-triggered processes and on various kinds of substrates whatever their shape and their size (planar surfaces, nanoparticles or porous structures).⁴⁻¹¹ Recently, it was reported that the self-assembly of precursors can be effective within a host material such as polymer hydrogels. This was highlighted by van Esch^{12, 13} and Smith^{14, 15} using protons as trigger of the precursor self-assembly within agarose or calcium alginate hydrogels. Indeed, the diffusion of precursor compounds at a specific area within a proton-loaded host gel directs the self-assembly process in the targeted area. Our group has shown that EASA can be an interesting tool to initiate molecular self-assembly within polymeric host hydrogels containing an embedded enzyme as a trigger of peptides self-assembly,¹⁶ and modulate thus the cell adhesion properties of the so-designed substrate.¹⁷ Very recently, the diffusion of precursor peptides within a host hydrogel has been shown to also induce the spontaneous micropatterning of self-assembled peptides zones, highlighting the potential of LEASA for autonomous 3D microstructuration of soft materials.¹⁸ This is one aspect of particular relevance for the current development of biomaterials.¹⁹ However, in spite of these promising developments of a new bottom-up approach to design structured functional materials, all works in this field suffers from the diffusion of the triggers, i.e., enzymes or protons, in the material so that their localization in a restricted area within the material is impossible. Compared to protons, enzymes can be covalently immobilized within the host hydrogel through a covalent grafting along the constitutive polymer chains of the material. This is usually performed by diffusion of chemically-modified enzymes within a hydrophilic host gel. But this strategy is not without disadvantages:²⁰⁻²² First, polymer hydrogels are prepared from few %w/v of polymer chains resulting in a low density of grafted enzymes. Second, it is highly difficult to remove from the

gel both the non-grafted enzymes and potential secondary compounds coming from the enzyme grafting reaction. Herein we present an alternative approach based on the use of encapsulated alkaline phosphatase-conjugated nanoparticles (NPs@AP) in a hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) host hydrogel. We have studied the impact of the NPs@AP within the HPMC gel and the resulting EASA of Fmoc-FFY from the phosphorylated precursors Fmoc-FFpY diffusion through the host material (Scheme 1). In addition, the 3D localization of peptides self-assembly in a defined spatial area of the HPMC hydrogel (LEASA) is illustrated through the syringe injection of NPs@AP within the precursor peptide contained-host material using confocal laser scanning microscopy (CLSM).



Scheme 1: (a) Phosphate group hydrolysis of the precursor Fmoc-FFpY leading to the self-assembling tripeptide Fmoc-FFY catalysed by NPs@AP. (b) Precursor solution of Fmoc-FFpY is brought in contact with the host hydrogel containing NPs@AP. (c) Fmoc-FFpY diffuses inside the material and is enzymatically transformed in Fmoc-FFY leading to (e) localized Fmoc-FFY self-assembly in close vicinity of NPs@AP.

IV - Results and discussion

HPMC hydrogel is an interesting biomaterial since it is fully biocompatible, and cells can live in a quiescent state during three weeks at least.²³ It is a chemical hydrogel based on siloxane bonds crosslinking between triethoxysilane-modified cellulose chains.²⁴ For our study, a 1.5% w/v HPMC hydrogel was investigated. As model system of EASA, we have used the following couple composed of the precursor peptide Fmoc-FFpY^{4, 25} and NPs@AP prepared according to a reported procedure²⁶ (Scheme 1a). The NPs@AP have an average diameter of 120 nm and all traces of unbounded AP have been removed (see Part 1 b, ESI). Recently, we have shown that NPs@AP can effectively trigger the Fmoc-FFY self-assembly in solution which exhibits antimicrobial properties.²⁷ The presence of 0.1% NPs@AP does not preclude the gelation of the HPMC host hydrogel as shown by the inverted tube test picture given in Fig. 1a and S1 in ESI. The hydrogel obtained is slightly light grey due to the presence of NPs@AP, compared to the translucent naked HPMC gel, i.e., without NPs@AP. The morphology of this hybrid hydrogel was analysed by cryo-SEM (Fig. 1b) observing the presence of clusters of micrometre-size nanoparticles within the fibrillar network of the HPMC gel network. The hydrogel formation was studied by oscillatory dynamic rheological measurements (Fig. S2). The elastic modulus of HPMC host hydrogels ($G' = 108 \pm 13$ Pa) is higher than the loss modulus ($G'' = 8 \pm 1$ Pa) over all frequency range, corroborating the gel formation after 24 hours (Fig. S2a) and its mechanical stability over the time. For HPMC host hydrogels with entrapped NPs@AP, even if G' (123 ± 27 Pa) is higher than G'' (10 ± 2 Pa) after 24 hours hydrogel formation (Fig. S2b), the elastic modulus increases up to $G' = 185 \pm 14$ Pa (respect to $G'' = 10 \pm 1$ Pa) after 48 hours to remain then stable (Fig. 1c).

Therefore, the incorporation of NPs@AP enhances the mechanical properties of the host hydrogels. In both cases, the hydrogels show a linear viscoelastic regime up to 60% strain (Fig. S2c-d).

We determined if AP is still active when NPs@AP are encapsulated inside the HPMC hydrogel. For that purpose, the hydrogel HPMC/NPs@AP was brought in contact with a solution of para-nitrophenyl phosphate (PNP) which is transformed in para-nitrophenol ($\lambda_{\max} = 405$ nm) by NPs@AP embedded in the gel (Fig. S3). The catalytic activity of NPs@AP inside the HPMC

hydrogels is equivalent to $\sim 0.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of AP concentration free in solution. This enzyme activity is stable over 48 hours at least. Next, HPMC/NPs@AP hydrogel was brought in contact with a solution of Fmoc-FFpY ($100 \mu\text{L}$ of $2.5 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in borax buffer 25mM) that diffuses

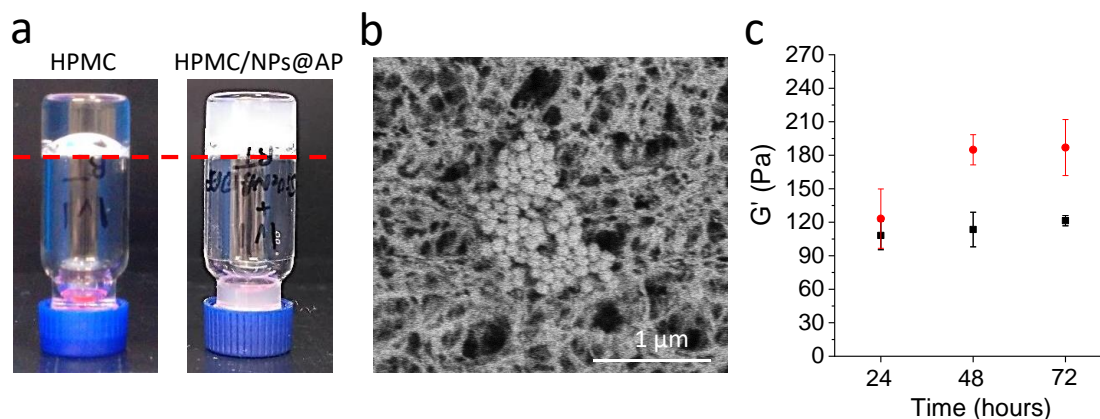


Figure 1: (a) Inverted tube tests of HPMC and HPMC/NPs@AP gels after 24h. (b) Typical cryo-SEM image of HPMC/NPs@AP. (c) Elastic modulus (G') of HPMC (black dots) and HPMC/NPs@AP (red dots) gels over the time.

throughout the host hydrogel and self-assembles by enzymatic dephosphorylation caused by NPs@AP located inside the HPMC hydrogel (Scheme 1b,c). The Fmoc-FFpY diffusion does not produce any increase of the elastic modulus of the HPMC/NPs@AP hydrogel ($G' = 185 \pm 19 \text{ Pa}$) (Fig. S4a,b). However, it has an impact on the shear-thinning behaviour of these hydrogels, decreasing the linear viscoelastic regime region. G' remains constant and higher than G'' up to a critical deformation, $\gamma_0 = 40 \%$, where G' starts to decrease until reaching the crossover point of G' and G'' , moment at which takes place the change from the gel-like state to the sol-like one (Fig. S4c). Interestingly, a different rheological behavior is observed when Fmoc-FFpY forms part of the hydrogel network. $G'' \sim 10 \text{ Pa}$ remains constant up to 2% strain and then starts to increase reaching a maximum of 90 Pa at 30% strain followed by a decrease. This fact is indicative of a weak-strain hardening behavior which is related to the energy dissipation of a complex structure breakage.²⁸

The Fmoc-FFY self-assembly within the HPMC gel was proven by Fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy in attenuated total reflection (ATR) mode. FTIR spectra of HPMC

gels containing either non functionalized nanoparticles (NPs), named as HPMC/NPs, NPs@AP, were recorded 48h after contact with the Fmoc-FFpY solution (Fig. 2a). In the case of HPMC/NPs (black curve), a broad amide I band is observed in the range of 1575 – 1725 cm^{-1} which is commonly assigned to disordered amide groups (Fig. S5).²⁹ For HPMC/NPs@AP the appearance of a band at 1640 cm^{-1} is the signature of aggregation via intermolecular hydrogen bonding attributed to the β -sheet structure (Fig. 2a, red line).^{4, 30, 31} The band at 1688 cm^{-1} is attributed to carbamates and is also consistent with a β -sheet structure and a possible anti-parallel arrangement.³² The band centered at 1605 cm^{-1} is assigned to the deprotonated form of the terminal carboxylic acid groups.^{26, 32} In addition to this, the excimer formation of Fmoc moieties from Fmoc-peptide self-assembly was monitored by fluorescence spectroscopy.^{16, 33} When HPMC/NPs are brought into contact with Fmoc-FFpY solution, a fluorescence emission band at 317 nm due to Fmoc moieties is observed (Fig. 2b). The same emission band is observed in the case of HPMC hydrogels in contact with Fmoc-FFpY and without NPs embedded (Fig. S6). However, when NPs@AP are embedded inside the HPMC hydrogels leading to HPMC/NPs@AP, the Fmoc-FFY self-assembly takes place and a red-shift of this maximum from 317 nm towards 327 nm is observed due to Fmoc excimers formation, which is characteristic of Fmoc-FFY self-assembly.²⁶

The supramolecular peptide self-assembly of free Fmoc-FFY within the HPMC/NPs@AP host hydrogel was also visualized by confocal laser scanning microscopy (CLSM) employing Thioflavine T (ThT), a non-fluorescent probe which becomes green fluorescent when in presence of β -sheets structures.³⁴ NPs@AP^{RHO} incorporating 10% of rhodamine-labelled AP (AP^{RHO}, AP labelled with rhodamine B) were used to localize the AP-modified NPs, i.e. NPs@AP^{RHO}, in the HPMC hydrogel. At the micrometer scale, the distribution of NPs@AP^{RHO} in the host material is not perfectly homogeneous (Fig. 2c) probably due to the propensity of these so-modified nanoparticles to aggregate as observed previously by cryo-SEM (Fig. 1b and S7). CLSM images show clusters (several hundred micrometre size) of NPs@AP explaining the turbidity of the resulting gel (Fig. 1b). We have first determined the mobility of the NPs@AP^{RHO} in the host gel by using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) measurements (Fig. S8). We found that only 11% of the particles are mobile in the gel. Because the pore size of HPMC gel (~70 nm) is smaller than the NPs@AP aggregates and since all AP are covalently bounded to the NPs, this mobility should be due to the low proportion of the smaller size NPs@AP. The diffusion of Fmoc-FFpY through the HPMC/NPs@AP^{RHO} hydrogel

gives rise to Fmoc-FFY self-assembly revealed by the presence of ThT (Fig. 2c). The green fluorescence emission of this dye highlights the presence of Fmoc-FFY self-assembly which corresponds perfectly to the localization of NPs@AP^{RHO}.

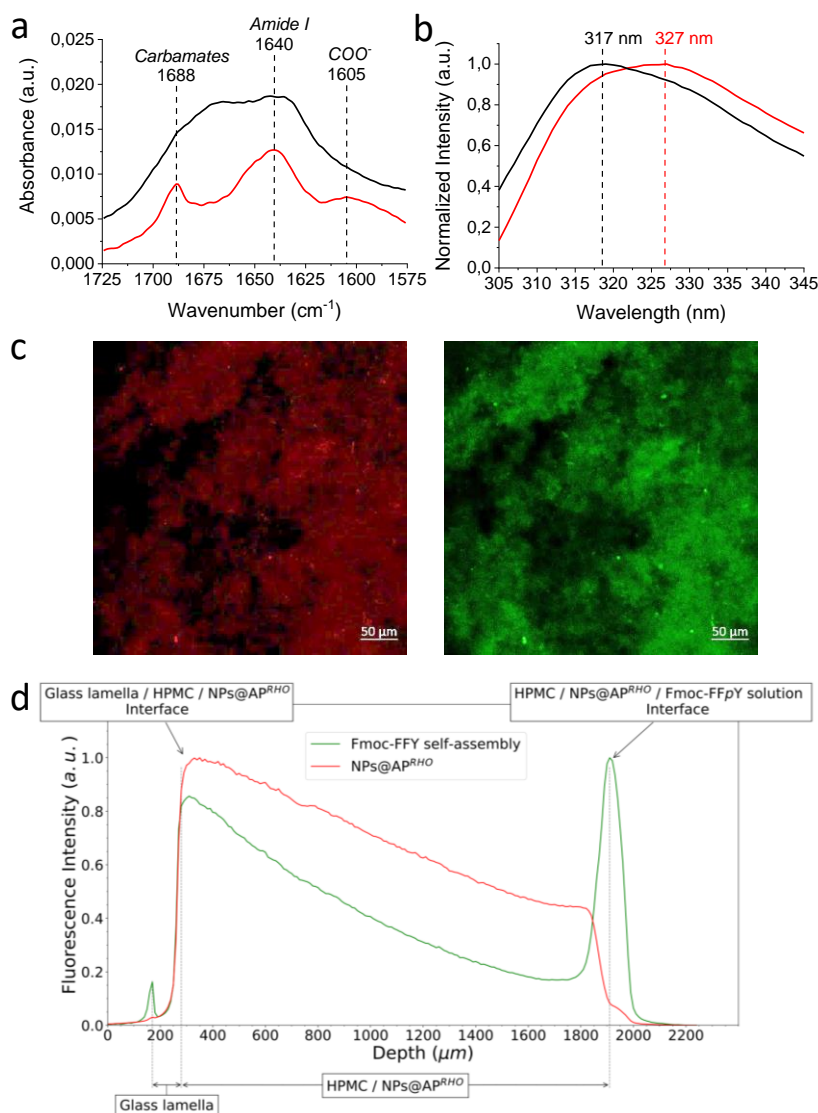


Figure 2: (a) ATR-FTIR and (b) fluorescence emission intensity ($\lambda_{ex}=290$ nm) spectra of HPMC hydrogels with naked NPs (black curve) and NPs@AP (red curve) after 48 h contact with Fmoc-FFpY (2.5 mg mL⁻¹). (c) Confocal images, red (left) and green (right) channels of HPMC hydrogels with NPs@AP embedded and distributed all around the host hydrogel. (d) Distribution profile of NPs@AP^{RHO} (red) and Fmoc-FFY self-assembly (green) observed by CLSM after the precursor peptide diffusion of Fmoc-FFpY solution within a 1.6 mm thick HPMC/NPs@AP^{RHO} material.

As a control experiment, HPMC/ThT hydrogels without any embedded nanoparticles were brought in contact with Fmoc-FFpY precursors and no fluorescence was detected (Fig. S9). It was also verified that almost no NPs@AP^{RHO} diffuse inside the HPMC hydrogel when

Nanoparticules fonctionnalisées par des enzymes pour diriger l'auto-assemblage de peptides dans un hydrogel avec un contrôle spatial 3D

deposited on top of it (Fig. S10). However, the presence of clusters of NPs@AP^{RHO} before the gelation of HPMC results in a gradient of NPs@AP^{RHO} distribution increasing from the bottom to the top of the host hydrogel (Fig. 2d). This is due to partial sedimentation of the NPs during the gelation. When gelation is over, the distribution of NPs@AP is fixed. Then, it is observed that when a solution of Fmoc-FFpY is diffusing through this HPMC/NPs@AP^{RHO}, the distribution profile of the Fmoc-FFY self-assembly (Fig. 2d) follows quite nicely the NPs@AP^{RHO} distribution. We noticed also a very slight diffusion of NPs@AP^{RHO} at the interface between HPMC hydrogel and Fmoc-FFpY solution, leading there to a maximum of Fmoc-FFY self-assembly. This might be due to diffusion of isolated and smaller NPs@AP^{RHO} that could constitute the 11% of diffusing NPs, as mentioned above.

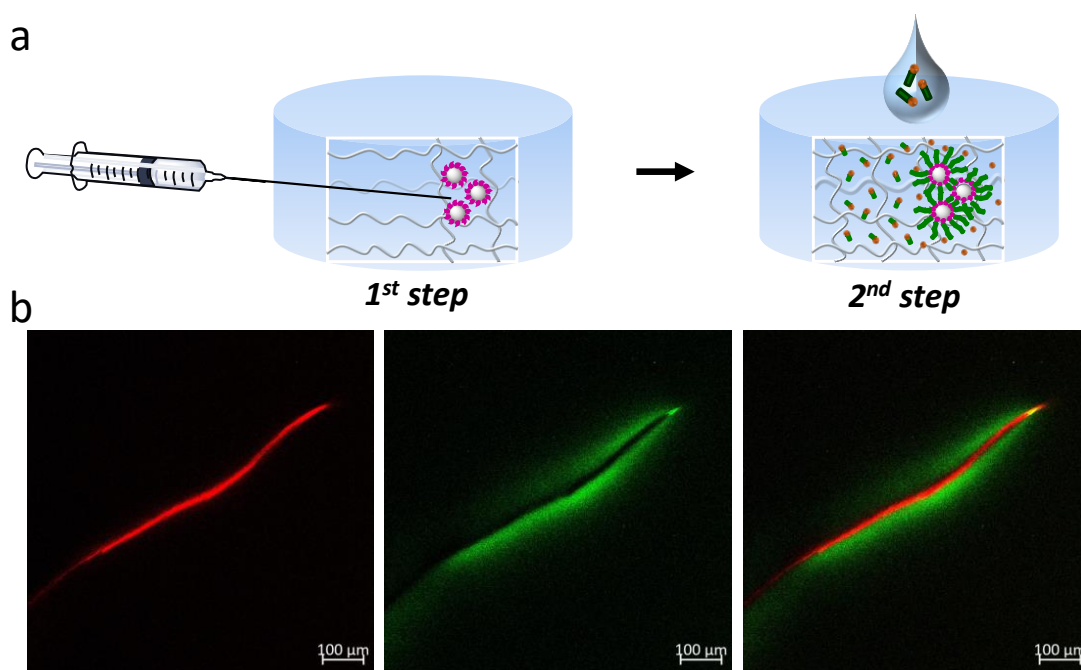


Figure 3: (a) Scheme of the injection of NPs@AP at a targeted spatial area within the HPMC host gel (1st step) and subsequent Fmoc-FFpY diffusion leading to localized peptide self-assembly (2nd step). (b) Confocal images, red (left), green (center) and merged (right) channels of HPMC hydrogels with NPs@AP^{RHO} localized in a specific area of the host hydrogel, after 48 h contact with Fmoc-FFpY (2.5 mg mL⁻¹) in presence of 1 mg mL⁻¹ ThT.

To induce the peptide self-assembly at a targeted spatial area in the host hydrogel, 1 μL of NPs@AP^{RHO} (0.6 μg mL⁻¹ in borax buffer 25 mM) was injected with an adequate microsyringe through the HPMC host hydrogel (Fig. 3a, 1st step) and monitored by CLSM. Subsequently, 50 μL of Fmoc-FFpY (2.5 mg mL⁻¹ in borax buffer 25 mM) was deposited on top of the

material and let diffuse throughout the whole HPMC hydrogel (Fig. 3a, 2nd step) for 24 hours: a localized green fluorescence is observed specifically in the hydrogel region in contact with the NPs@AP^{RHO} solution (Fig. 3b and S11). It thus reveals the specific spatial localization of Fmoc-FFY self-assembly due to the quasi non-diffusion of the NPs@AP^{RHO} within the HPMC hydrogel. Indeed, when 1 μ L of a solution of free AP^{RHO} (0.6 μ g mL⁻¹ in borax buffer 25 mM) was injected with a syringe in a middle point of the HPMC hydrogel, a homogeneous red fluorescence observed (Fig. S12a) proves that AP^{RHO} diffuses quickly throughout the HPMC hydrogel, giving rise to a homogenous green fluorescence (Fig. S12b) due to the Fmoc-FFY self-assembly.

V - Conclusion

These results prove that our strategy to localize EASA in host hydrogels through the physical encapsulation of enzyme modified nanoparticles is effective and could be employed to create 3D peptide patterning with a spatial control. This approach could be useful to develop 3D scaffolds with tuneable properties (mechanical and chemical) through functional patterns in a controllable manner.

References

1. Yang, Z., Gu, H., Fu, D., Gao, P., Lam, J. K., and Xu, B., *Enzymatic Formation of Supramolecular Hydrogels*. *Adv. Mater.*, 2004. **16**(16): p. 1440-1444.
2. Williams, R. J., Smith, A. M., Collins, R., Hodson, N., Das, A. K., and Ulijn, R. V., *Enzyme-assisted self-assembly under thermodynamic control*. *Nat. Nanotechnol.*, 2009. **4**(1): p. 19-24.
3. Muller, C., Ontani, A., Bigo-Simon, A., Schaaf, P., and Jierry, L., *Localized Enzyme-Assisted Self-Assembly of low molecular weight hydrogelators. Mechanism, applications and perspectives*. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2022. **304**: p. 102660.
4. Vigier-Carrière, C., Garnier, T., Wagner, D., Lavalle, P., Rabineau, M., Hemmerlé, J., Senger, B., Schaaf, P., Boulmedais, F., and Jierry, L., *Bioactive Seed Layer for Surface-Confining Self-Assembly of Peptides*. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015. **54**(35): p. 10198-10201.
5. Rodon Fores, J., Criado-Gonzalez, M., Chaumont, A., Carvalho, A., Blanck, C., Schmutz, M., Serra, C. A., Boulmedais, F., Schaaf, P., and Jierry, L., *Supported Catalytically Active Supramolecular Hydrogels for Continuous Flow Chemistry*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2019. **58**(52): p. 18817-18822.
6. Conte, M. P., Sahoo, J. K., Abul-Haija, Y. M., Lau, K. H. A., and Ulijn, R. V., *Biocatalytic Self-Assembly on Magnetic Nanoparticles*. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018. **10**(3): p. 3069-3075.
7. Williams, R. J., Hall, T. E., Glattauer, V., White, J., Pasic, P. J., Sorensen, A. B., Waddington, L., McLean, K. M., Currie, P. D., and Hartley, P. G., *The in vivo performance of an enzyme-assisted self-assembled peptide/protein hydrogel*. *Biomaterials*, 2011. **32**(22): p. 5304-5310.
8. Zhou, J., Du, X., Berciu, C., He, H., Shi, J., Nicastro, D., and Xu, B., *Enzyme-Instructed Self-Assembly for Spatiotemporal Profiling of the Activities of Alkaline Phosphatases on Live Cells*. *Chem*, 2016. **1**(2): p. 246-263.
9. Rodon Fores, J., Bigo-Simon, A., Wagner, D., Payraastre, M., Damestoy, C., Blandin, L., Boulmedais, F., Kelber, J., Schmutz, M., Rabineau, M., Criado-Gonzalez, M., Schaaf, P., and Jierry, L., *Localized Enzyme-Assisted Self-Assembly in the Presence of Hyaluronic Acid for Hybrid Supramolecular Hydrogel Coating*. *Polymers*, 2021. **13**(11).
10. Li, B., Criado-Gonzalez, M., Adam, A., Bizeau, J., Méllart, C., Carvalho, A., Bégin, S., Bégin, D., Jierry, L., and Mertz, D., *Peptide Hydrogels Assembled from Enzyme-Adsorbed Mesoporous Silica Nanostructures for Thermoresponsive Doxorubicin Release*. *ACS Applied Nano Materials*, 2022. **5**(1): p. 120-125.
11. Li, B., Adam, A., Criado-Gonzalez, M., Jierry, L., Bizeau, J., Chaumont, A., Harlepp, S., Méllart, C., Bégin-Colin, S., Bégin, D., and Mertz, D., *Near-infrared responsive nanocomposite hydrogels made from enzyme-coated carbon nanotubes@ large pore mesoporous silica for remotely triggered drug delivery*. *Materialia*, 2022. **22**: p. 101414.
12. Lovrak, M., Hendriksen, W. E. J., Maity, C., Mytnyk, S., van Steijn, V., Eelkema, R., and van Esch, J. H., *Free-standing supramolecular hydrogel objects by reaction-diffusion*. *Nature Communications*, 2017. **8**(1): p. 15317.

13. Lovrak, M., Hendriksen, W. E., Kreutzer, M. T., van Steijn, V., Eelkema, R., and van Esch, J. H., *Control over the formation of supramolecular material objects using reaction–diffusion*. *Soft Matter*, 2019. **15**(21): p. 4276-4283.
14. Schlichter, L., Piras, C. C., and Smith, D. K., *Spatial and temporal diffusion-control of dynamic multi-domain self-assembled gels*. *Chemical Science*, 2021. **12**(11): p. 4162-4172.
15. Cooke, H. S., Schlichter, L., Piras, C. C., and Smith, D. K., *Double diffusion for the programmable spatiotemporal patterning of multi-domain supramolecular gels*. *Chemical Science*, 2021. **12**(36): p. 12156-12164.
16. Criado-Gonzalez, M., Rodon Fores, J., Wagner, D., Schröder, A. P., Carvalho, A., Schmutz, M., Harth, E., Schaaf, P., Jierry, L., and Boulmedais, F., *Enzyme-assisted self-assembly within a hydrogel induced by peptide diffusion*. *Chem. Commun.*, 2019. **55**(8): p. 1156-1159.
17. Criado-Gonzalez, M., Loftin, B., Rodon Fores, J., Vautier, D., Kocgozlu, L., Jierry, L., Schaaf, P., Boulmedais, F., and Harth, E., *Enzyme assisted peptide self-assemblies trigger cell adhesion in high density oxime based host gels*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2020. **8**(20): p. 4419-4427.
18. Runser, J.-Y., Criado-Gonzalez, M., Fneich, F., Rabineau, M., Senger, B., Weiss, P., Jierry, L., and Schaaf, P., *Non-monotonous enzyme-assisted self-assembly profiles resulting from reaction-diffusion processes in host gels*. *J. Colloid Interface Sci.*, 2022. **620**: p. 234-241.
19. Xu, G., Ding, Z., Lu, Q., Zhang, X., Zhou, X., Xiao, L., Lu, G., and Kaplan, D. L., *Electric field-driven building blocks for introducing multiple gradients to hydrogels*. *Protein Cell*, 2020. **11**(4): p. 267-285.
20. Lyu, X., Gonzalez, R., Horton, A., and Li, T., *Immobilization of Enzymes by Polymeric Materials*. *Catalysts*, 2021. **11**(10).
21. Liu, Q., Hua, Y., Kong, X., Zhang, C., and Chen, Y., *Covalent immobilization of hydroperoxide lyase on chitosan hybrid hydrogels and production of C6 aldehydes by immobilized enzyme*. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2013. **95**: p. 89-98.
22. Meyer, J., Meyer, L.-E., and Kara, S., *Enzyme immobilization in hydrogels: A perfect liaison for efficient and sustainable biocatalysis*. *Eng. Life Sci.*, 2022. **22**(3-4): p. 165-177.
23. Trojani, C., Weiss, P., Michiels, J.-F., Vinatier, C., Guicheux, J., Daculsi, G., Gaudray, P., Carle, G. F., and Rochet, N., *Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel*. *Biomaterials*, 2005. **26**(27): p. 5509-5517.
24. Drury, J. L. and Mooney, D. J., *Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications*. *Biomaterials*, 2003. **24**(24): p. 4337-4351.
25. Wang, W., Qian, J., Tang, A., An, L., Zhong, K., and Liang, G., *Using Magnetic Resonance Imaging to Study Enzymatic Hydrogelation*. *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(12): p. 5955-5961.
26. Criado-Gonzalez, M., Fores, J. R., Carvalho, A., Blanck, C., Schmutz, M., Kocgozlu, L., Schaaf, P., Jierry, L., and Boulmedais, F., *Phase Separation in Supramolecular Hydrogels Based on Peptide Self-Assembly from Enzyme-Coated Nanoparticles*. *Langmuir*, 2019. **35**(33): p. 10838-10845.
27. Criado-Gonzalez, M., Iqbal, M. H., Carvalho, A., Schmutz, M., Jierry, L., Schaaf, P., and Boulmedais, F., *Surface Triggered Self-Assembly of Fmoc-Tripeptide as an Antibacterial Coating*. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020. **8**(938).

28. Lejardi, A., Hernández, R., Criado, M., Santos, J. I., Etxeberria, A., Sarasua, J. R., and Mijangos, C., *Novel hydrogels of chitosan and poly(vinyl alcohol)-g-glycolic acid copolymer with enhanced rheological properties*. Carbohydr. Polym., 2014. **103**: p. 267-273.
29. Mu, X. J., Eckes, K. M., Nguyen, M. M., Suggs, L. J., and Ren, P. Y., *Experimental and Computational Studies Reveal an Alternative Supramolecular Structure for Fmoc-Dipeptide Self-Assembly*. Biomacromolecules, 2012. **13**(11): p. 3562-3571.
30. Smith, A. M., Williams, R. J., Tang, C., Coppo, P., Collins, R. F., Turner, M. L., Saiani, A., and Ulijn, R. V., *Fmoc-Diphenylalanine Self Assembles to a Hydrogel via a Novel Architecture Based on π - π Interlocked β -Sheets*. Adv. Mater., 2007. **20**(1): p. 37-41.
31. Yamada, N., Ariga, K., Naito, M., Matsubara, K., and Koyama, E., *Regulation of β -Sheet Structures within Amyloid-Like β -Sheet Assemblage from Tripeptide Derivatives*. J. Am. Chem. Soc., 1998. **120**(47): p. 12192-12199.
32. Tang, C., Smith, A. M., Collins, R. F., Ulijn, R. V., and Saiani, A., *Fmoc-Diphenylalanine Self-Assembly Mechanism Induces Apparent pKa Shifts*. Langmuir, 2009. **25**(16): p. 9447-9453.
33. Tang, C., Ulijn, R. V., and Saiani, A., *Effect of Glycine Substitution on Fmoc-Diphenylalanine Self-Assembly and Gelation Properties*. Langmuir, 2011. **27**(23): p. 14438-14449.
34. Biancalana, M. and Koide, S., *Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils*. Bba-Proteins Proteom, 2010. **1804**(7): p. 1405-1412.

VI - Supporting Information

Nanoparticules fonctionnalisées par des enzymes pour diriger l'auto-assemblage de peptides dans un hydrogel avec un contrôle spatial 3D

Miryam Criado-Gonzalez, Jean-Yves Runser, Fouzia Boulmedais, Pierre Weiss, Pierre Schaaf and Loïc Jierry

1 - Material and methods

a. Material

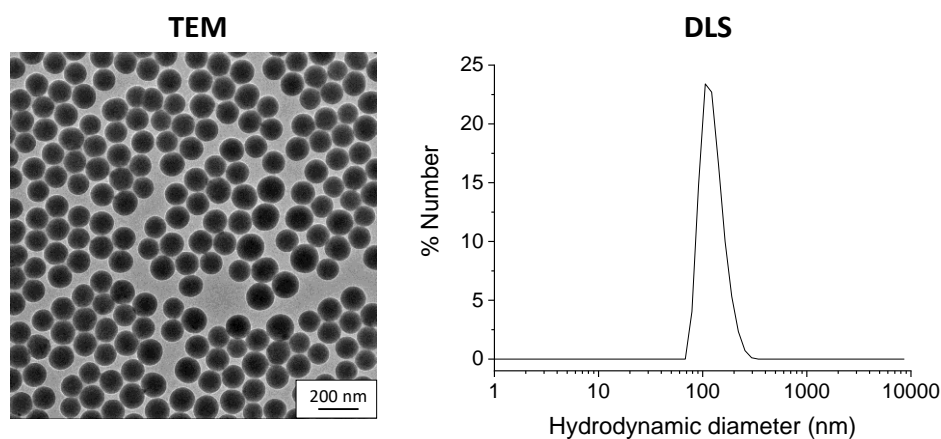
Tetraethyl orthosilicate (TEOS), (3-glycidyloxypropyl) trimethoxysilane (GPMS), phosphatase alkaline from bovine intestinal mucosa (AP) (10 DEA units mg^{-1} protein) and *para*-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate System (PNP) were provided by Sigma Aldrich. Sodium tetraborate anhydrous (borax) and dry toluene were supplied by Acros Organics. Fmoc-FFpY (99% purity, natural chirality) was purchased by PepMic and its characterization was identical to a previous reported work.¹ Ammonium hydroxide was purchased from Carlo Erba and ethanol from VWR.

b. Synthesis of silica nanoparticles, NPs, NPs@AP and NPs@AP^{RHO}

Silica nanoparticles (NPs) were synthesized following the procedure described previously.² Briefly, 80 mL of ethanol, 4.85 mL of Milli-Q water and 3.6 mL of NH_4OH were mixed in a two necks flask (250 mL) under mechanical stirring (400 rpm) and heated up to 55°C. When the temperature is reached, 8 mL of ethanol and 3.1 mL of TEOS, mixed in a separated vial, were added quickly to the previous solution and kept under stirring for 5 h. In a second step in order to obtain larger nanoparticles from the first synthesis (~ 80 nm), 10 mL of the NPs colloidal suspension were mixed with 70 mL ethanol, 13 mL Milli-Q water and 7.5 mL of NH_4OH in a two necks flask and heated again up to 55°C under mechanical stirring (400 rpm). When the temperature is reached, a mixture of 10 mL of ethanol and 1 mL of TEOS was added dropwise to the solution and kept under stirring for 5 h. Subsequently, the solution was centrifuged (6000 rpm, 20 min) and the precipitate of NPs was washed three times with ethanol by centrifugation (6000 rpm, 20 min). For the covalent immobilization of AP, 2.5 mL of NPs were dried at 100°C under argon atmosphere for 2 h in a 50 mL flask. Then, 10 mL of 5% v/v GPMS in dry toluene were added to dry NPs. The suspension was sonicated for 10 min to avoid aggregates and kept shaking at 720 rpm overnight at room temperature. The obtained epoxy-functionalized NPs were centrifuged and the precipitate was firstly washed three times with toluene to remove unbounded GPMS and subsequently, three times with ethanol to remove toluene. The final NPs were dispersed in 1 mL of ethanol and subsequently added dropwise to an aqueous solution of AP (1 mg mL^{-1} in borax buffer (25 mM, pH = 9.5)) and kept shaking for 24h at 4°C. Then, NPs were centrifuged and washed five times with borax buffer (25 mM, pH

Nanoparticules fonctionnalisées par des enzymes pour diriger l'auto-assemblage de peptides dans un hydrogel avec un contrôle spatial 3D

= 9.5) to remove the unbounded enzyme. NPs@AP showed an activity equivalent to 30 units mL⁻¹ with a solid content of 5% w/v. Finally, NPs@AP were redispersed in 1 mL borax buffer (25 mM, pH = 9.5) and stored at 4°C until needed. The same procedure was employed for the covalent grafting of AP^{RHO} (AP was previously labelled with rhodamine B according to a reported procedure)³ leading to NPs@AP^{RHO}. To check that unbounded enzyme is not present in the nanoparticles dispersion after the five washing steps, the AP activity of the washing solutions was measured by UV-vis, using *para*-nitrophenylphosphate (PNP) as substrate, and results corroborated that AP is not present in the last washing solution. The average size of the nanoparticles was determined by transmission electron microscopy (TEM), ~120 nm, and dynamic light scattering (DLS), ~135 nm, as shown in the following pictures.



c. Preparation of 1.5%w/v HPMC hydrogels and diffusion of Fmoc-FFpY within this host hydrogel

Triethoxypropyl-modified hydroxypropylmethylcellulose, called Si-HPMC, has been prepared according to the reported procedure.⁴ HPMC hydrogels were prepared by mixing 100 μ L of Si-HPMC solution at 3% w/v in NaOH 0.1M and pH 12.9 with 100 μ L of HEPES buffer at pH 3.6 in a vortex and let them gelate at room temperature. In the case of HPMC with nanoparticles embedded, *i.e.* HPMC/NPs@AP, 20 μ L of NPs or NPs@AP solutions were centrifuged at 13500 rpm for 10 min and redispersed in 100 μ L of Si-HPMC solution at 3%w/v in NaOH 0.1M and pH 12.9 by mechanical stirring. Then, 100 μ L of HEPES buffer at pH 3.6 was added, vortexed and let them gelate at room temperature. For the Fmoc-FFpY diffusion tests, after 48 hours gelation, 100 μ L of Fmoc-FFpY solution (2.5 mg mL⁻¹ in borax buffer 25 mM, pH 9.5)

was added on top. These 100 μL diffuse into the host hydrogel in few minutes and then it is let 48 h at room temperature before further investigations.

d. UV spectroscopy

The enzymatic activity was measured in a microplate reader UV spectroscopy (FLX-Xenius®, SAFAS, Monaco) using a 96 well plate. The AP activity from NPs@AP embedded inside the HPMC hydrogels was measured by incubation of the substrate, *para*-nitrophenylphosphate (PNP) (200 μL at 1 mM in borax buffer). Concentration and volume ensure a large excess of substrate for the enzymatic reaction. PNP is a colourless AP substrate that by sequential enzymatic hydrolysis of the phosphate substituent of PNP in presence of AP yields a yellow absorbance at $\lambda = 405$ nm due to *para*-nitrophenol formation.

e. Infrared spectroscopy

The Fourier Transform Infrared (FTIR) experiments were performed on a Vertex 70 spectrometer (Bruker, Germany) using DTGS detector. FTIR Spectra were recorded in the Attenuated Total Reflection (ATR) mode by collecting 128 interferograms between 800 and 4000 cm^{-1} at 2 cm^{-1} resolution, using Blackman-Harris three-term apodization and the standard Bruker OPUS/IR software (version 7.5).

f. Fluorescence spectroscopy

All fluorescence intensities were measured by using the microreader fluorescence spectroscopy (FLX-Xenius®, SAFAS, Monaco) at an excitation wavelength of 290 nm by recording the spectra between 305-345 nm. A special 96 well plate was used to prepare the samples and measure the fluorescence during the Fmoc-FFY self-assembly when HPMC hydrogels without and with NPs or NPs@AP embedded were put in contact with Fmoc-FFpY solutions at 2.5 mg mL^{-1} .

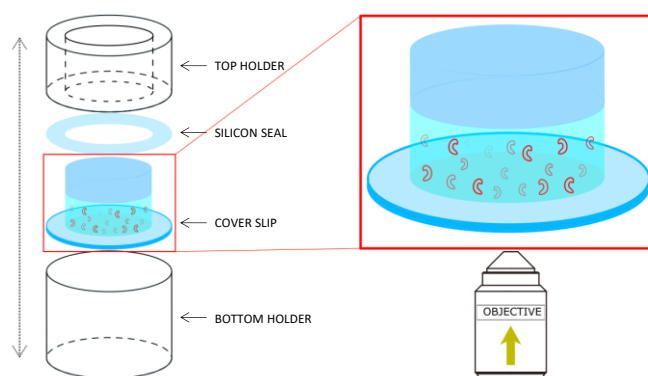
g. Rheology measurements

Hydrogels were prepared in Teflon molds of 10 mm diameter by mixing 100 μL of Si-HPMC solution at 3% w/v in NaOH 0.1M and pH 12.9 with 100 μL of HEPES buffer at pH 3.6 in a vortex and let them gelate at room temperature. In the case of HPMC with nanoparticles

embedded, 20 μL of NPs@AP solution were centrifuged at 13500 rpm for 10 min and redispersed in 100 μL of Si-HPMC solution at 3%w/v in NaOH 0.1M and pH 12.9 by mechanical stirring. Then, 100 μL of HEPES buffer at pH 3.6 was added, vortexed and let them gelate at room temperature. After different gelation times, viscoelastic properties were measured by dynamic oscillatory rheology in a Kinexus Malvern rheometer using a sandblasted plate geometry of 10 mm diameter and a gap of 2 mm. Strain measurements were carried out from 0.01% to 100% at 1 Hz and frequency sweeps were performed from 0.01 Hz to 10 Hz at 0.1% strain at 25°C.

h. Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

Hydrogels were prepared in Teflon molds of 10 mm diameter by mixing 50 μL of Si-HPMC solution at 3%w/v in NaOH 0.1M and pH 12.9 with 50 μL of HEPES buffer at pH 3.6 in a vortex and let them gelate at room temperature for 48 hours. In the case of HPMC with nanoparticles embedded, 10 μL of NPs@AP with a 10 % v/v NPs@AP^{RHO} (AP^{RHO}, AP labelled with rhodamine B was prepared according to a reported procedure)³ solution was centrifuged at 13500 rpm for 10 min and redispersed in 50 μL of Si-HPMC solution at 3%w/v in NaOH 0.1M and pH 12.9 by mechanical stirring. Then, 50 μL of HEPES buffer at pH 3.6 was added, vortexed and let them gelate at room temperature. After 48 h the gel was completely formed. Subsequently, 50 μL of Fmoc-FFpY (2.5 mg mL⁻¹) containing Thioflavin T (0.45 mg mL⁻¹) was put in contact with HPMC hydrogels for 48 h at room temperature. Confocal laser scanning microscopy images were captured with a Zeiss LSM 710 microscope using a EC Plan-Neofluar 10x/0.3 and a Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 objectives. The fluorescence of rhodamine was measured with an excitation wavelength of 561 nm and emission between 566 and 703 nm. The self-assembly was visualized by adding Thioflavine T (0.45 mg mL⁻¹) in the peptide solution. The fluorescence of Thioflavine T was measured with excitation by an argon laser with a cut-off dichroic mirror at 488 nm and an emission band-pass filter between 493 and 548 nm. The setup for samples preparation and measurement is shown in the following Figure.



i. Cryo-Scanning Electron Microscopy (Cryo-SEM)

A slight piece of HPMC or HPMC/NPs@AP gel was plunged quickly into liquid ethane and then fixed vertically into a cryo-holder which was previously placed inside a nitrogen bath. During the plunging, the sample is rapidly frozen by direct contact with the liquid ethane. The specific cryo-holder was designed and manufactured by the mechanical facility of the Charles Sadron Institute.⁵ The cryo-holder was then placed under vacuum into the cryo preparation chamber of the Quorum PT 3010 machine attached to the microscope. The sample was fractured with a razor blade and a slight etching at -90°C for 3 min was performed to render the fibers more visible. The sample was transferred in the FEG-cryoSEM (Hitachi SU8010) and observed at 1kV at -150°C .

2 - Supplementary Figures

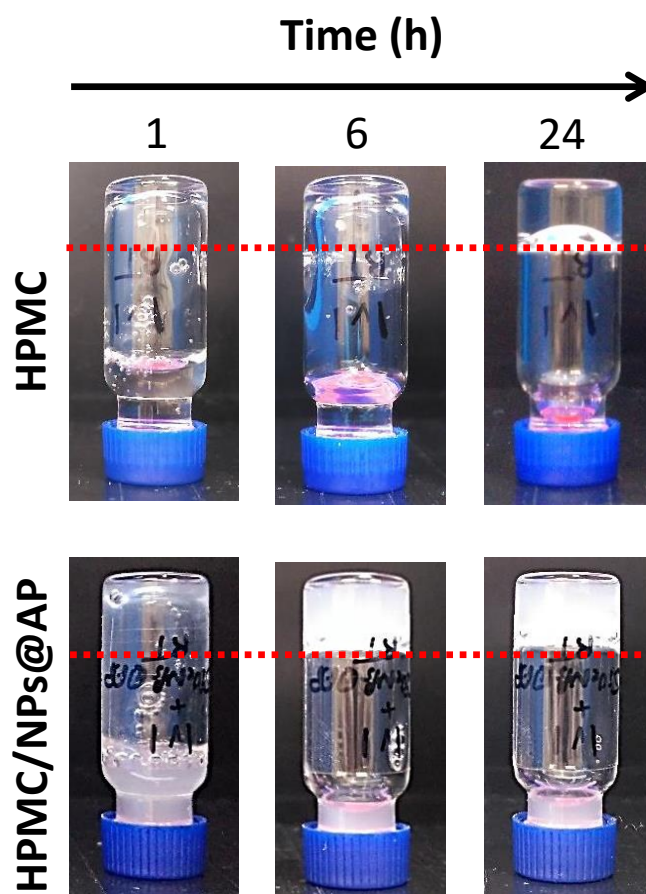


Figure S1: *Inverted tube tests of HPMC hydrogel formation without (top) and with NPs@AP embedded (bottom) as a function of the time.*

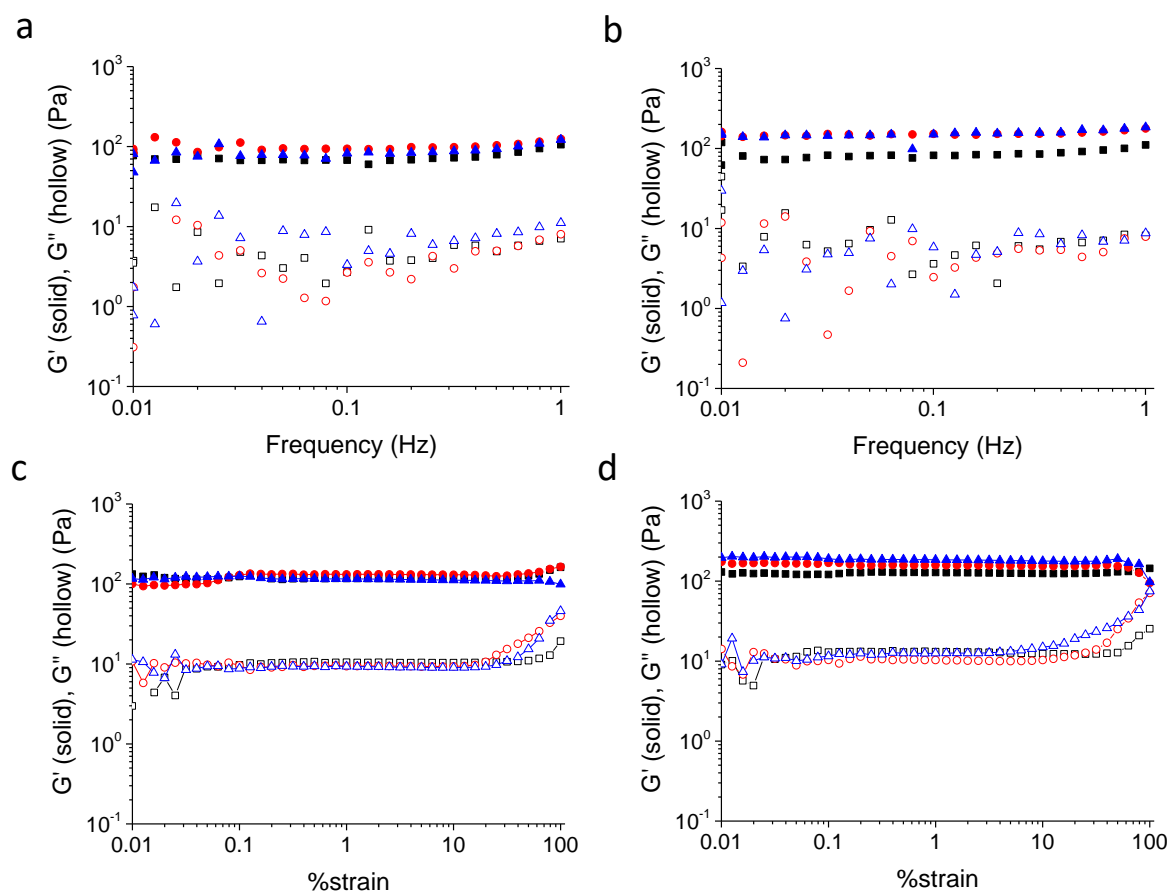


Figure S2: Storage modulus (G' – solid symbols) and loss modulus (G'' – hollow symbols) as a function of the frequency for (a) HPMC and (b) HPMC/NPs@AP host hydrogels after 24 h (■), 48 h (●), and 72 h (▲). G' and G'' as a function of the strain for (c) HPMC and (d) HPMC/NPs@AP host hydrogels after 24 h (■), 48 h (●), and 72 h (▲).

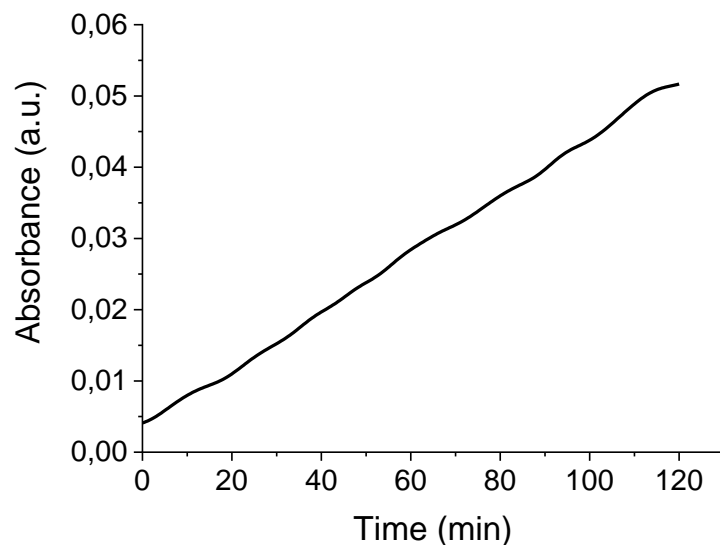


Figure S3: Evolution of the absorbance as a function of time of a para-nitrophenyl phosphate (PNP) solution brought in contact with HPMC/NPs@AP. The absorbance was measured at 405 nm. PNP is transformed into para-nitrophenol ($\lambda_{max} = 405$ nm) and phosphate ions by NPs@AP into the gel. The measurement was carried out in a microplate reader (see Material and Methods section, Part 1).

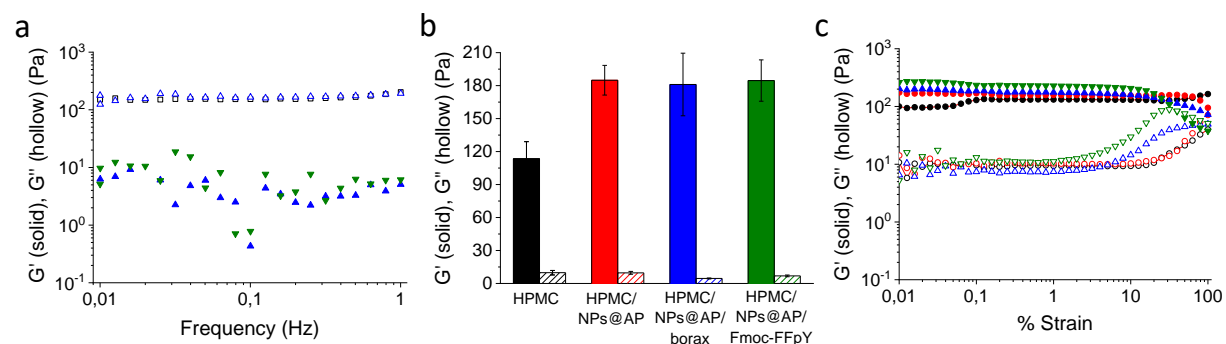


Figure S4: (a) Storage modulus (G' – solid symbols) and loss modulus (G'' – hollow symbols) of HPMC/NPs@AP hydrogels after 48 h contact with borax (blue curve) or Fmoc-FFpY (2.5 mg mL^{-1}) (green curve) as a function of the frequency at 25°C . (b) G' and G'' at 1 Hz frequency. (c) G' and G'' as a function of the strain for HPMC (black curve), HPMC/NPs@AP (red curve), HPMC/NPs@AP + borax buffer (blue curve), and HPMC/NPs@AP + Fmoc-FFpY (green curve).

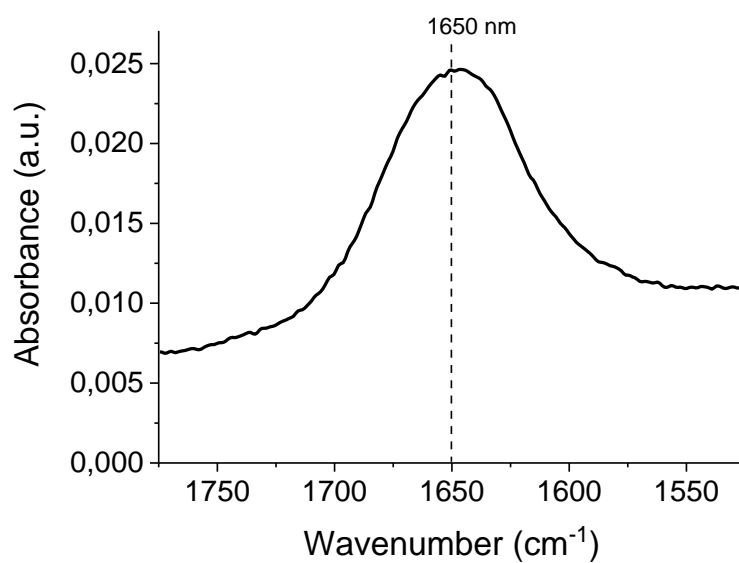


Figure S5: ATR-FTIR spectrum of HPMC gels after 48 h contact with Fmoc-FFpY (2.5 mg mL⁻¹ in borax buffer 25 mM).

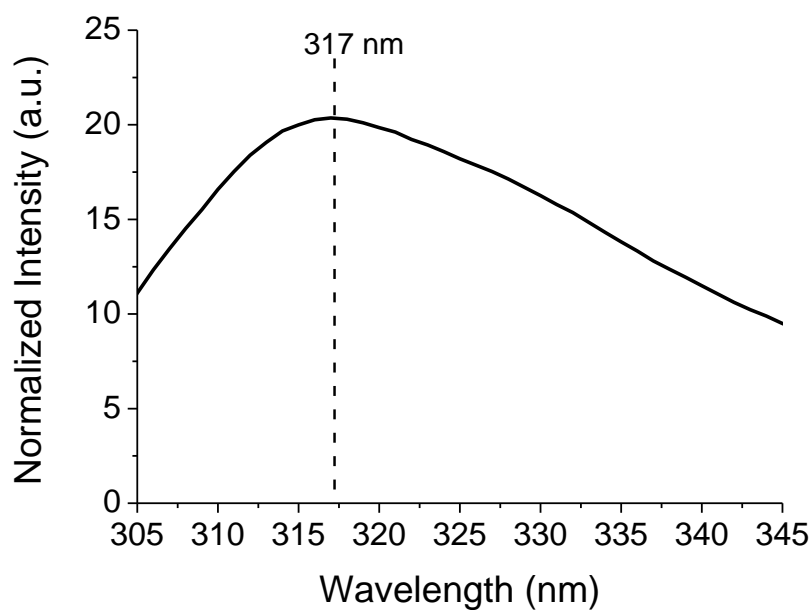


Figure S6: Fluorescence spectrum of HPMC gel after 48 h contact with Fmoc-FFpY (2.5 mg mL⁻¹ in borax buffer 25 mM) obtained at an excitation wavelength of 290 nm.

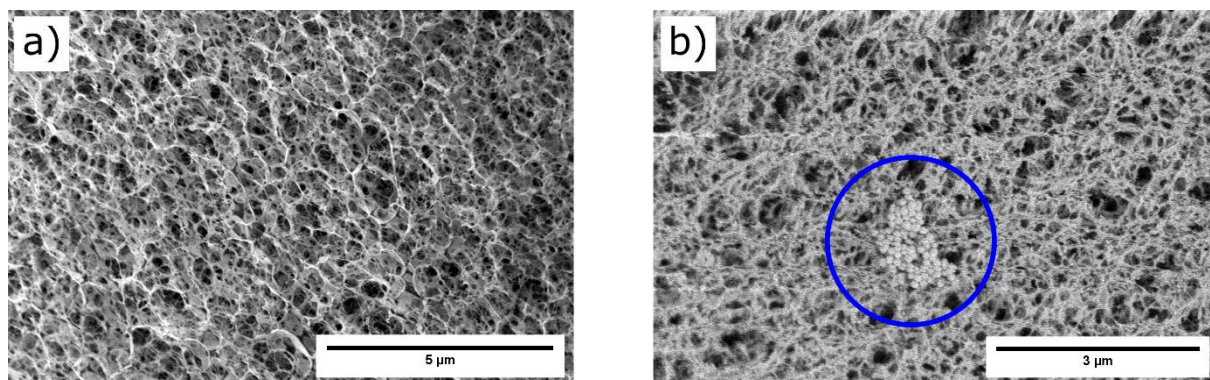


Figure S7: (a) Cryo-SEM images of HPMC hydrogel and (b) HPMC/NPs@AP. The blue circle shows a typical cluster of NPs@AP.

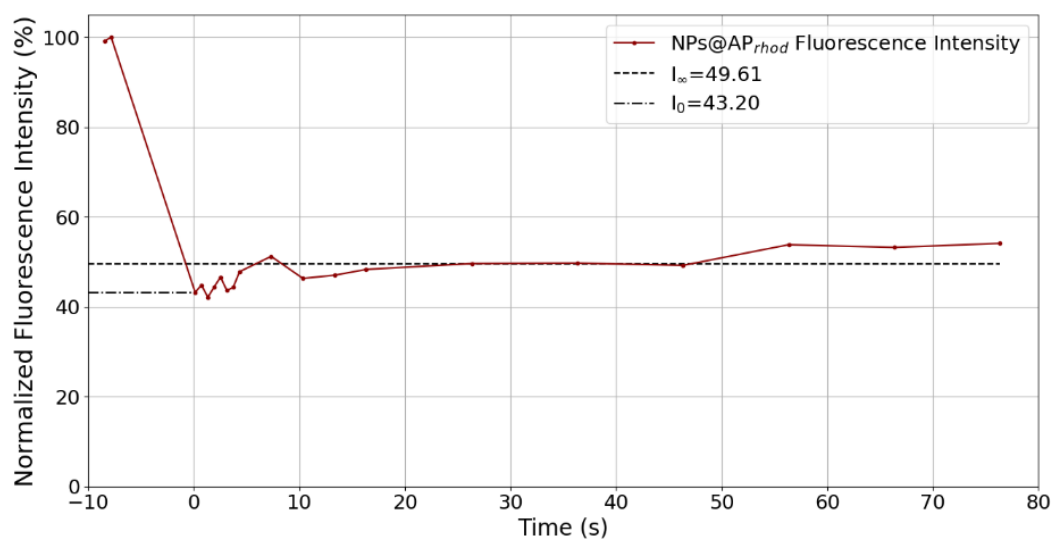


Figure S8: Photobleaching recovery test for the HPMC hydrogel with NPs@AP^{RHO} embedded.

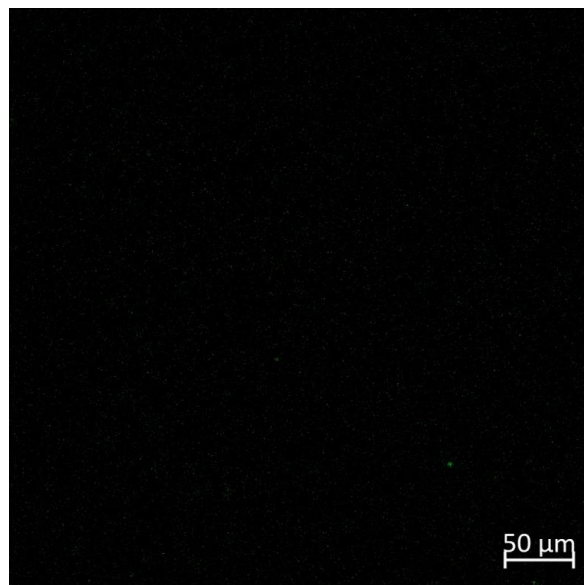


Figure S9: *Confocal image of HPMC host hydrogel containing ThT (without NPs@AP^{RHO}), 48 h after the diffusion of the Fmoc-FFpY solution (2.5 mg mL⁻¹ in borax buffer 25 mM).*

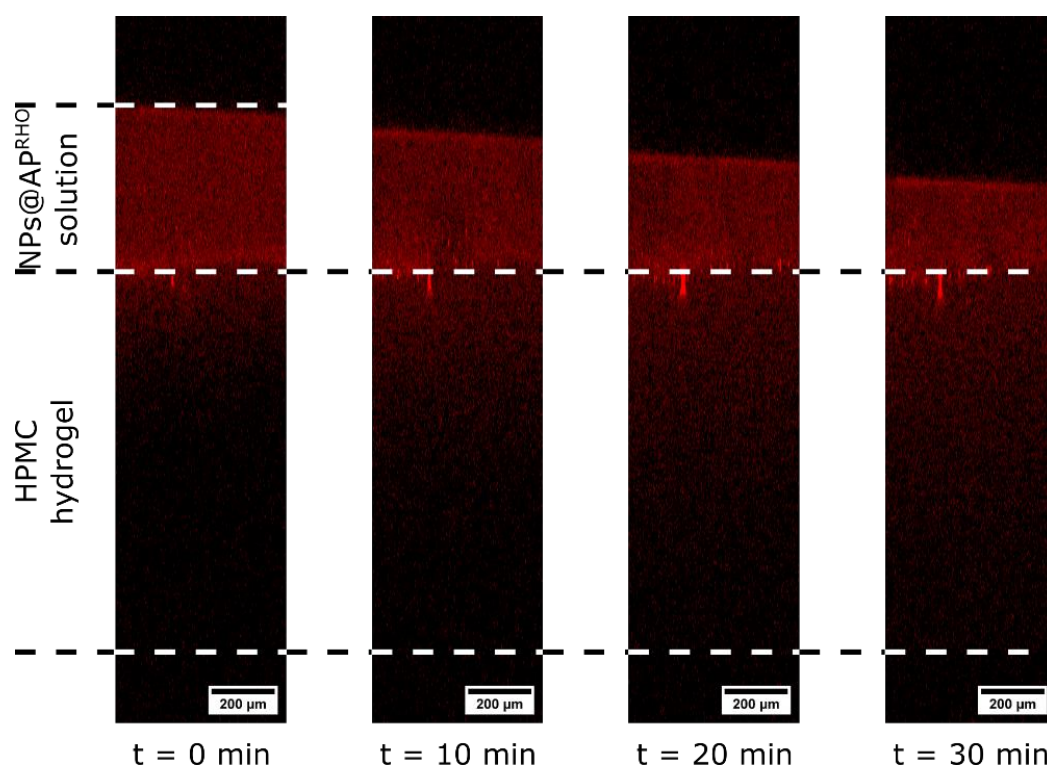


Figure S10: Confocal images of HPMC host hydrogel and NPs@AP^{RHO} solution ($0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ in borax buffer 25 mM) deposited in the top of the gel. The evolution overtime shows that very few enzymes are diffusing in the host gel. The decrease of the height of NPs@AP^{RHO} solution shows a quick evaporation accelerated by the laser beam of CLSM.

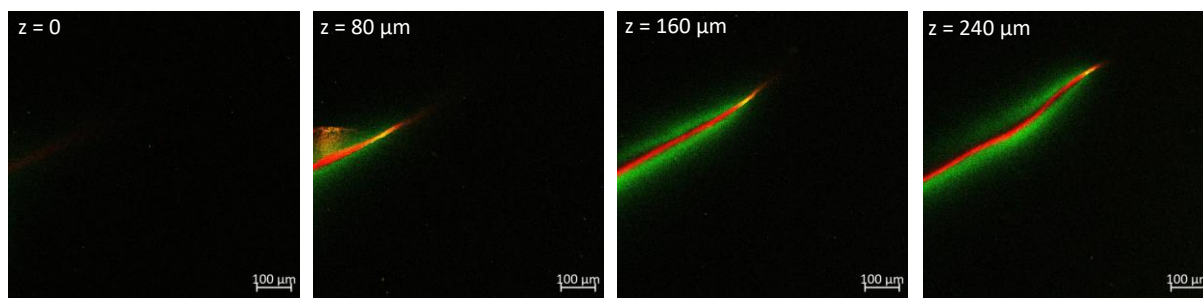


Figure S11: CLSM images taken along the z -axis penetrating inside the HPMC hydrogel after the diffusion of Fmoc-FFpY solution (2.5 mg mL^{-1} in borax buffer 25 mM): $z = 0 \text{ }\mu\text{m}$ (interface), $z = 80 \text{ }\mu\text{m}$, $z = 160 \text{ }\mu\text{m}$ and $z = 240 \text{ }\mu\text{m}$.

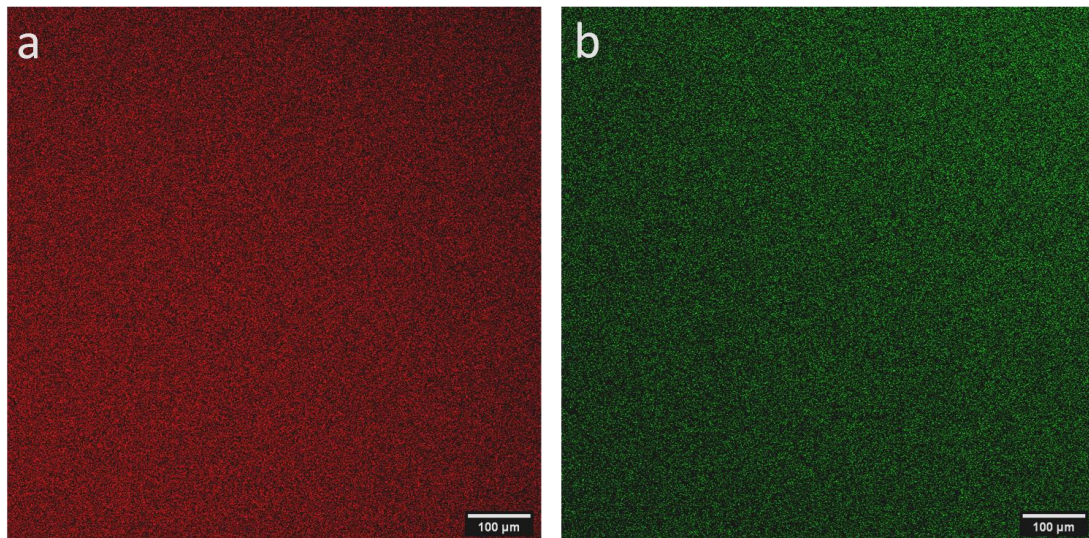
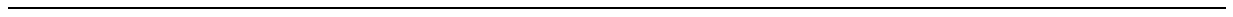


Figure S12: CLSM images of the HPMC host hydrogel containing AP^{RHO} (a) before and (b) after the diffusion of the Fmoc-FFpY solution (2.5 mg mL^{-1}) in presence of ThT (0.45 mg.mL^{-1}). Scale bars = $100 \mu\text{m}$.

References

1. Rodon Fores, J., Bigo-Simon, A., Wagner, D., Payrastra, M., Damestoy, C., Blandin, L., Boulmedais, F., Kelber, J., Schmutz, M., Rabineau, M., Criado-Gonzalez, M., Schaaf, P., and Jierry, L., *Localized Enzyme-Assisted Self-Assembly in the Presence of Hyaluronic Acid for Hybrid Supramolecular Hydrogel Coating*. *Polymers*, 2021. **13**(11): p. 1793.
2. Criado-Gonzalez, M., Fores, J. R., Carvalho, A., Blanck, C., Schmutz, M., Kocgozlu, L., Schaaf, P., Jierry, L., and Boulmedais, F., *Phase Separation in Supramolecular Hydrogels Based on Peptide Self-Assembly from Enzyme-Coated Nanoparticles*. *Langmuir*, 2019. **35**(33): p. 10838-10845.
3. Mertz, D., Vogt, C., Hemmerlé, J., Mutterer, J., Ball, V., Voegel, J.-C., Schaaf, P., and Lavalle, P., *Mechanotransductive surfaces for reversible biocatalysis activation*. *Nature Materials*, 2009. **8**(9): p. 731-735.
4. Trojani, C., Weiss, P., Michiels, J.-F., Vinatier, C., Guicheux, J., Daculsi, G., Gaudray, P., Carle, G. F., and Rochet, N., *Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel*. *Biomaterials*, 2005. **26**(27): p. 5509-5517.
5. Vigier-Carrière, C., Wagner, D., Chaumont, A., Durr, B., Lupattelli, P., Lambour, C., Schmutz, M., Hemmerlé, J., Senger, B., Schaaf, P., Boulmedais, F., and Jierry, L., *Control of Surface-Localized, Enzyme-Assisted Self-Assembly of Peptides through Catalyzed Oligomerization*. *Langmuir*, 2017. **33**(33): p. 8267-8276.

Conclusion générale



Conclusion

L'auto-assemblage induit par des enzymes représente un champ de recherche qui se développe de façon exponentiellement et ce depuis les travaux pionniers de Bing Xu en 2004.¹ D'abord observés dans le vivant, on les retrouve maintenant dans divers domaines de la recherche en biomédecine, montrant un large potentiel applicatif de cette technologie.^{2, 3} Mon travail de thèse, qui a débuté en 2019, se positionne dans ce contexte et a pleinement bénéficié de la grande expérience dans ce domaine acquise par les doctorants précédents de mon laboratoire. D'abord utilisé pour générer des films auto-assemblés au voisinage de surfaces et dans des milieux poreux, l'auto-assemblage de peptides induit par des enzymes a été étendu dans des gels avec comme objectif de les fonctionnaliser, voire de les structurer. Mon projet a ainsi consisté à étudier comment se déroule le phénomène d'auto-assemblage de peptides précurseurs dans des gels "hôtes" fonctionnalisés par des enzymes. Travailler dans un gel ralentit la diffusion des espèces présentes, ce qui a pour conséquence d'exacerber de nombreux phénomènes non observés en solution. Ainsi des relations de dépendance entre la diffusion et les transformations chimiques s'opèrent (diffusion des peptides, des enzymes, réaction enzymatique et processus d'auto-assemblage), et des phénomènes de surconcentration locales sont alors présents.

Nos études ont été réalisées en déposant, sur des gels fonctionnalisés avec des enzymes, des peptides précurseurs, que ce soit sous la forme de gouttes de solution de peptides ou en recouvrant totalement le gel avec la solution. Le résultat principal de ma thèse peut s'exprimer de la façon suivante : **les processus de réaction/diffusion conduisent à la formation d'un profil d'auto-assemblage qui n'est pas monotone mais qui présente un maximum d'auto-assemblage à l'interface gel/solution et un, voire deux, maxima relatifs dans le gel (chapitre 3). Nous avons également observé qu'en diminuant la concentration en enzymes dans le gel hôte des entités globulaires de peptides auto-assemblés, ayant une dimension de plusieurs dizaines de micromètres, apparaissent au sein du profil "continu" et finalement, en diminuant encore davantage la concentration en enzymes, le profil continu d'auto-assemblage disparaît et seuls subsistent ces microglobules de moins en moins nombreux mais de plus en plus étendus spatialement (chapitre 4).** La distribution des zones de peptides auto-assemblés au sein du gel hôte ainsi que l'apparition des microglobules peuvent être expliquées par un ensemble de processus qui s'apparentent à ceux conduisant à des structures de type Liesegang observées lors de la diffusion de sels inorganiques au travers des

gels hôtes. Les principales caractéristiques requises pour observer de tels profils d'auto-assemblage sont :

- l'existence d'une concentration critique d'hydrogélateur pour initier la formation des auto-assemblages,
- la diffusion des peptides précurseurs et des hydrogélateurs dans le gel et
- la croissance de structures auto-assemblées à partir de ces hydrogélateurs.

Ainsi, lorsque le gel hôte est mis au contact d'une solution de peptides précurseurs, il se produit d'abord un fort auto-assemblage à l'interface gel/solution. Malgré la formation de cet auto-assemblage, des peptides précurseurs diffusent dans le gel hôte et se transforment en peptides hydrogélateurs. En diffusant au sein de ce gel hôte, ces hydrogélateurs n'atteignent pas, dans un premier temps, la concentration critique qui permet d'initier leur assemblage spontané. Ils diffusent donc vers la zone d'auto-assemblage maximale localisée à l'interface gel/solution. Cette zone joue alors un rôle « attracteur » pour ces hydrogélateurs (car on considère l'édifice de peptides auto-assemblés comme irréversible) ce qui a pour conséquence de créer une zone déplétée en hydrogélateurs dans le gel au voisinage de ce maxima. Etant donné que la diffusion des précurseurs se poursuit dans le gel, la concentration des hydrogélateurs augmente lorsque l'on s'éloigne de l'interface et après un certain temps, le seuil critique d'auto-assemblage est atteint au sein du gel, au-delà de la zone de déplétion. Cette seconde zone de peptides auto-assemblés attire alors à son tour les hydrogélateurs se situant dans la zone de déplétion accentuant ainsi cette dernière. Lorsque la concentration en enzymes est très faible, le maximum d'auto-assemblage à l'interface gel/solution est toujours observé mais dans le gel la concentration en hydrogélateurs n'augmente que très lentement ce qui leur permet de diffuser plus profondément au sein du gel hôte, bien au-delà de l'interface gel/solution. On atteint alors que très lentement la concentration critique d'auto-assemblage dans le gel ce qui a pour effet de permettre à des agrégats d'enzymes, toujours présents, ou des fluctuations de concentration d'hydrogélateurs d'initier très localement l'auto-assemblage qui attire ensuite les hydrogélateurs avoisinants. Cela conduit alors à la formation des microglobules de peptides auto-assemblés. Un modèle basé sur des équations de réaction/diffusion a été développé permettant de rendre compte qualitativement des résultats observés, du moins en ce qui concerne la formation du profil continu d'auto-assemblage.

Perspectives

Les travaux réalisés au cours de mon projet doctoral démontrent combien il est important de comprendre les relations qui existent entre la diffusion d'entités et leur réactivités entre-elles pour prévoir la distribution spatiale d'édifices auto-assemblés au sein de gels hôtes. C'est à notre connaissance les premiers travaux dans ce domaine et de ce fait ils posent également de nombreuses interrogations.

Tout d'abord nous n'avons pas pu évaluer l'importance de la diffusion des enzymes dans le gel sur le profil de distribution final de l'auto-assemblage. Nous avons essayé de greffer les enzymes dans le gel mais nous n'y sommes pas parvenus jusqu'à présent. Aussi, nous avons greffé les enzymes sur des nanoparticules de silice que nous avons incorporées dans le gel hôte lors de sa formation (chapitre 5). Nous n'avons pas observé le profil d'auto-assemblage présentant différents maxima comme avec l'enzyme libre. L'auto-assemblage s'effectue aux endroits où se trouvent les nanoparticules modifiées par l'enzyme. Ainsi, l'injection de ces nanoparticules enzymatiques à l'aide d'une micro-seringue dans le gel à des endroits définis permet alors de localiser l'auto-assemblage précisément au voisinage de celles-ci. Il faudrait cependant revenir à l'immobilisation directe des enzymes dans le gel pour véritablement savoir si l'absence de zone de déplétion est due à l'immobilisation des enzymes où au fait qu'elles soient greffées sur des nanoparticules. Le modèle développé prévoit que même si les enzymes ne diffusent pas, il est toujours possible d'observer la formation d'un profil d'auto-assemblage avec plusieurs maxima. Pour vérifier cette prédiction il faudra peut-être utiliser d'autres types de gels que celui avec lequel nous avons travaillé, pour arriver au greffage total des enzymes.

Il semble également intéressant d'étudier l'influence de la nature du gel hôte sur la distribution des zones auto-assemblées. En effet, la littérature nous rapporte que les peptides peuvent interagir avec des gels à base de polysaccharides.⁴ Or l'HPMC, que nous utilisons pour préparer nos gels hôtes, est constitué de chaînes de cellulose qui est un polysaccharide. Aussi convient-il de vérifier si nos profils d'auto-assemblage ainsi que la présence de microglobules de peptides auto-assemblés se forment également au sein d'autres gels à base de polysaccharides comme l'acide hyaluronique par exemple, mais également avec des gels à base de polymères de synthèse comme des gels de polyéthylène glycol (PEG).

Nous n'avons pas pu suivre l'évolution du profil de concentration des précurseurs et des hydrogélateurs libres dans le gel hôte. Afin de valider davantage notre modèle cette information serait précieuse. Il faut donc rechercher des peptides fluorescents et dont la longueur d'onde

d'émission de fluorescence change suffisamment lors de l'auto-assemblage pour pouvoir être détectée par microscopie confocale. Cela permettrait de se passer de la thioflavine T.

Nous venons d'évoquer l'éventuelle influence de la nature du gel hôte sur les processus observés, mais il est peut-être encore plus important de vérifier si nos conclusions restent valables avec d'autres types de systèmes enzyme/peptide. Dans notre travail nous avons utilisé l'alkaline phosphatase et la déphosphorylation de peptides pour induire l'auto-assemblage. Ce système fait partie de la famille des auto-assemblages induits par clivage d'une liaison (ici la liaison entre le phosphate et le peptide). Mais il existe d'autres systèmes enzyme/peptide permettant d'induire l'auto-assemblage enzymatiquement. On pourra citer la α -chymotrypsine qui en présence de $KLOEt$ (K: lysine; L: leucine; OEt : ethyl ester) forme des oligopeptides $((KL)_nOEt$ qui s'auto-assemblent. C'est donc un système où l'auto-assemblage est induit par une réaction de formation de liaisons. Va-t-on observer le même type de profil d'auto-assemblage en faisant diffuser des peptides de $KLOEt$ dans un gel hôte contenant de l' α -chymotrypsine? La grande différence avec le système exploré dans cette thèse, mis à part le type de réaction conduisant à la formation des hydrogélateurs, est la cinétique de formation de ces hydrogélateurs qui devrait être plus lente. Est-ce que cela influera sur l'issue du processus d'auto-assemblage ?

Le modèle mathématique développé pour rendre compte des processus que nous pensons être mis en jeu constitue un résultat important. Nous avons développé ce modèle petit à petit en faisant évoluer les hypothèses au gré des résultats expérimentaux. Il s'avère, au final, que ce modèle est proche de ceux décrits dans la littérature pour prédire les structures inorganiques de Liesegang. Notre modèle, et tous ceux relatifs à ces structures, prédisent qualitativement et semi-quantitativement les profils des structures (dans notre cas d'auto-assemblage). Mais, à notre connaissance aucun modèle ne prédit la forme exacte (ou très approchée) de l'évolution des concentrations des précipités (dans notre cas de la structure auto-assemblée). C'est un défi que l'on peut éventuellement relever sur nos systèmes. Pour ce faire il faudra d'abord mesurer l'ensemble des paramètres entrant dans le modèle : les coefficients de diffusion, les réactivités enzymatiques, les seuils d'auto-assemblage. C'est un travail considérable et qui va nécessiter d'utiliser le système idoine pour y parvenir. Une autre difficulté sera de modéliser correctement la cinétique de nucléation de l'auto-assemblage. Pour l'instant la quasi-totalité des modèles utilisés pour prédire les structures de type Liesegang imposent une concentration seuil pour la formation des précipités de sels : en deçà de cette concentration il n'y a pas de précipitation, au-delà la précipitation se fait avec une certaine cinétique proportionnelle aux concentrations des espèces mises en jeu dans la réaction de précipitation.

Ce passage brutal de non-réaction à réaction induit des discontinuités dans les profils, discontinuités qui ne sont pas "physiques". Le verrou est donc d'arriver à modéliser correctement la cinétique de "nucléation" de l'auto-assemblage. Dans notre modèle nous avons utilisé une fonction exponentielle pour décrire ce passage. C'était un choix arbitraire qui ne relève d'aucune théorie physique mais qui a le mérite de rendre cette transition non-réaction/réaction continue. Il faudra étudier plus précisément comment s'effectue cette transition afin d'utiliser une expression mathématique plus exacte rendant compte de la cinétique de nucléation. Parvenir à prédire la forme plus ou moins exacte du profil d'auto-assemblage est donc un travail ambitieux mais dont les retombées seraient bien plus vastes que la description de nos systèmes. Cela permettrait aussi de mieux rendre compte de la formation des structures de type Liesegang en général et enfin prédire l'auto-assemblage dans des gels présentant des localisations d'enzymes.

Un autre enjeu, plus accessible peut être, est de développer un modèle permettant de décrire le passage du profil continu aux globules. Nous avons commencé à y travailler au cours des derniers mois de ma thèse. Cependant se pose la question de l'origine physique des globules. Cela a été évoqué au chapitre 4 où deux hypothèses s'affrontent : (i) des agrégats d'enzymes toujours présents dans une solution d'enzyme et qui joueraient le rôle de centres accélérant localement la réaction enzymatique et jouant même le rôle d'agent nucléant pour l'auto-assemblage ou (ii) les fluctuations locales de concentration d'hydrogélateurs induisant localement l'auto-assemblage par un processus stochastique. Certains faits expérimentaux militent en faveur de la première hypothèse, comme la présence d'une forte concentration locale d'enzymes au centre des globules. On ne peut cependant totalement exclure que l'affinité des enzymes pour les structures auto-assemblées de peptides ne soit à l'origine de ce résultat, ce qui pourrait également laisser le champ ouvert à la seconde hypothèse. La réponse à cette question constitue un des premiers défis à relever pour la suite de ce projet.

Pourquoi vouloir contrôler l'auto-assemblage de peptides dans des gels par voie enzymatique?

Nous avons déjà évoqué plus haut que cela pourrait servir à structurer les gels dans lesquels seraient enfouis des cellules, et ce dans le but de créer des tissus artificiels. Pour ce faire, il faut d'une part arriver à immobiliser les enzymes localement dans le gel et d'autre part à y insérer des auto-assemblages présentant des propriétés biologiques intéressantes (promotion de l'interaction cellulaire, modification locale des propriétés mécaniques qui jouent un rôle sur

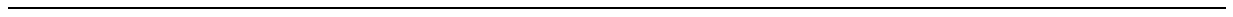
le devenir de cellules souches, insertion de facteurs de croissances...). Le premier point a été discuté plus haut. Le second point nécessite l'introduction de nouveaux peptides qui soient "biocompatibles". La structuration pourrait être réalisée par impression 3D du gel avec les enzymes, voire du gel avec les cellules. C'était l'objectif du projet « EASA » soutenu par l'ANR et dans lequel se situait mon sujet. Malheureusement l'approche par impression 3D n'a pour l'instant pas été couronnée de succès.

Pour conclure, cette thèse, je pense, a ouvert la voie à la fonctionnalisation de gels hôtes par l'auto-assemblage induit enzymatiquement. De nouveaux phénomènes sont apparus que nous avons essayé de comprendre et de modéliser. Qualitativement nous arrivons à rendre compte des observations expérimentales. Pour une prédiction quantitative, beaucoup reste encore à faire. Mais c'est là aussi le charme de la science: découvrir, expliquer, mais également poser de nouvelles questions.

Références

1. Yang, Z. M., Gu, H. W., Fu, D. G., Gao, P., Lam, J. K., and Xu, B., *Enzymatic formation of supramolecular hydrogels*. Adv. Mater., 2004. **16**(16): p. 1440-+.
2. Zhou, J., Du, X., Yamagata, N., and Xu, B., *Enzyme-Instructed Self-Assembly of Small D-Peptides as a Multiple-Step Process for Selectively Killing Cancer Cells*. J Am Chem Soc, 2016. **138**(11): p. 3813-23.
3. Feng, Z., Han, X., Wang, H., Tang, T., and Xu, B., *Enzyme-Instructed Peptide Assemblies Selectively Inhibit Bone Tumors*. Chem, 2019. **5**(9): p. 2442-2449.
4. Rodon Fores, J., Bigo-Simon, A., Wagner, D., Payrastre, M., Damestoy, C., Blandin, L., Boulmedais, F., Kelber, J., Schmutz, M., Rabineau, M., Criado-Gonzalez, M., Schaaf, P., and Jierry, L., *Localized Enzyme-Assisted Self-Assembly in the Presence of Hyaluronic Acid for Hybrid Supramolecular Hydrogel Coating*. Polymers, 2021. **13**(11).

Annexes



Annexe 1 : Codes Java et Python pour extraction des données et traitement des images.

Cinétiques

Les images acquises par cinétique présentent un format particulier. Il s'agit de coupes en z de l'hydrogel mais contrairement à l'acquisition des piles d'images présentées dans le chapitre 2, ce ne sont pas des images complètes qui sont empilées ici mais des lignes de pixels. Il est essentiel de procéder ainsi lors de ces expériences afin d'améliorer la résolution temporelle de l'appareil et obtenir ainsi des successions d'images en coupe de l'hydrogel qui soient de la meilleure qualité possible mais également temporellement très rapprochées afin de suivre au mieux l'évolution du système.

Les successions d'images ainsi obtenues nécessitent un traitement particulier pour l'extraction des valeurs d'intensité de fluorescence à chaque ligne de pixel (qui permettra par la suite de connaître la distribution des enzymes ou de suivre la croissance des auto-assemblages au sein des hydrogels).

L'extraction de ces données est réalisée au moyen d'un code écrit dans le langage de programmation Java interprétable par le logiciel de traitement d'images FIJI et permettant d'automatiser la séparation des canaux (rouge pour AP^{RHO} et vert pour ThT) et l'obtention des valeurs d'intensité de fluorescence pour chaque ligne de pixels et ce pour l'entière succession d'images dans le temps obtenues à la fin de l'expérience.

Le code complet est donné ici :

```
// split the channels and normalize the image names

title = getTitle();

run("Split Channels");
selectWindow("C1-" + title);
rename("green");
selectWindow("C2-" + title);
rename("red");

// get number of frames in the Channel for coming loop
selectWindow("green");
```

```

getDimensions(width, height, channels, slices, frames);
print(frames);

// Separate Images of the Stack
run("Stack to Images");

// Reslice and Measure Mean Int of each Slice
for (i = 1; i <= 9; i++) {

selectWindow("green-000"+i);

run("Reslice [/]...", "output=10.000 start=Top avoid");
run("Measure Stack...");
saveAs("Results_green_"+i, "D:/PhD/2021_04/Confocal/20210417 kinetic with addition
at 1h30/Traitement/Results_green_"+i+".txt");
run("Clear Results");

}

for (i = 10; i <= 95; i++) {

selectWindow("green-00"+i);
run("Reslice [/]...", "output=10.000 start=Top avoid");
run("Measure Stack...");
saveAs("Results_green_"+i, "D:/PhD/2021_04/Confocal/20210417 kinetic with addition
at 1h30/Traitement/Results_green_"+i+".txt");
run("Clear Results");

}

// get number of frames in the Channel for coming Loop
selectWindow("red");
getDimensions(width, height, channels, slices, frames);
print(frames);

// Separate Images of the Stack
run("Stack to Images");

for (i = 1; i <= 9; i++) {

selectWindow("red-000"+i);

run("Reslice [/]...", "output=10.000 start=Top avoid");
run("Measure Stack...");
saveAs("Results_red_"+i, "D:/PhD/2021_04/Confocal/20210417 kinetic with addition
at 1h30/Traitement/Results_red_"+i+".txt");
run("Clear Results");

}

for (i = 10; i <= 95; i++) {

selectWindow("red-00"+i);
run("Reslice [/]...", "output=10.000 start=Top avoid");

```

```

run("Measure Stack...");
saveAs("Results_red_"+i, "D:/PhD/2021_04/Confocal/20210417 kinetic with addition
at 1h30/Traitement/Results_red_"+i+".txt");
run("Clear Results");

}

```

```
run("Close All");
```

Le lecteur averti constatera que les données sont enregistrées pour chaque temps et chaque canal dans un fichier .txt séparé. Un script écrit en langage de programmation Python permet de tracer les graphs correspondants.

En voici le code :

```

from __future__ import division
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import pandas as pd

#####
##### ARRAY CREATION #####
#####

A = []

for i in range(1,95) :
    A.append(pd.read_csv('Results_green_{}.txt'.format(i), sep = '\t', skiprows =
0))

for i in range(0,94) :
    A[i]['Mean'] = A[i]['Mean'] / max(A[i]['Mean'])

B = []

for i in range(1,95) :
    B.append(pd.read_csv('Results_red_{}.txt'.format(i), sep = '\t', skiprows =
0))

for i in range(0,94) :
    B[i]['Mean'] = B[i]['Mean'] / max(B[i]['Mean'])

#####
##### FOR PLOT #####
#####

```

```
#####
```

```
fig, ax = plt.subplots()

for i in range(0,94) :
    ax.clear() # Clears the previous image
    plt.ylabel("Depth ( $\mu\text{m}$ )")
    plt.xlabel('Fluorescence Intensity (a.u.)')
    plt.title('Fluorescence intensity as a function of Depth')
    ax.plot(A[i]['Mean'], A[i]['microns'], '-', color='green', label = 'Time =
    %2.2f ( $\text{mn}$ )' % (i))
    ax.plot(B[i]['Mean'], B[i]['microns'], '-', color='red')
    plt.legend(shadow=True, loc=1, handlelength=0, fontsize=16)
    plt.savefig("file_gr_normalized_%d.png" % i)
```

Dans ce cas particulier, les données sont normalisées afin de pouvoir visualiser les courbes extraites des deux canaux rouge et vert sur un même tracé.

“Classiques”

Les piles d’images acquises de façon plus classique nécessitent des manipulations moins compliquées pour l’extraction des données.

L’extraction des intensités moyennes de fluorescence pour chaque image de la pile d’image se fait dans le logiciel de traitement d’images FIJI en suivant la procédure :

Image → Stacks → Measure Stack...

Ceci permet d’obtenir un fichier .txt contenant toutes les valeurs d’intérêt qui sera traité au moyen d’un script écrit dans le langage de programmation Python. Il paraît inutile de fournir ici ce script qui ne diffère que très peu de celui présenté ci-dessus.

Annexe 2 : Code Python pour la simulation du chapitre 3

Les équations de réactions diffusions décrites dans le supporting information du chapitre 3 ont été implémentées dans le langage de programmation Python.

En voici le code :

```
from cmath import *
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import pandas as pd

tfin1=100000000.0
tfin2=1000000000000.0

dt=0.01 # time increment

# declaration of tables
cbp=[] # phosphorylated peptide concentration in slit i
dcbp=[] # variation of the peptide concentration during a time dtcp=[] #
concentration des peptides déphosphorylés
cp=[] # concentration of dephosphorylated peptides
cpa=[] # concentration of self-assembled peptides
dcp=[] # variation of the concentration of dephosphorylated peptides during a time
dt
ce=[] # concentration of enzymes
cepl=[] #concentration of enzymes*7000 (for plotting reasons)
dce=[] # variation de la concentration des enzymes
xD=[] # coefficient multiplicatif du coeff de diffusion
xDe=[] # coeff de diffusion des enzymes
```

P0S=[] #concentration critique pour l'auto-assemblage

#paramètres

cprFD0=0.35 # coefficient valeur 1/2 de Fermi-Dirac

cprFD1=0.01 # largeur mi-hauteur Fermi-Dirac

cbp0=1.5 #initial concentration of phosphorylated peptides

Dbp=0.20 #diffusion coefficient of phosphorylated peptides

Dbd=0.07 #diffusion coefficient of dephosphorylated peptides

ce0=1.0/7000 #Initial concentration of enzymes

De0=0.01 # diffusion coefficient of enzymes

xDD=5.0 # ratio between the diffusion coefficients of the enzymes in solution/gel

P0=0.06 # critical concentration for self-assembly

P1=0.0001

ka=0.2 #self-ssembly constant during nucleation

kas=0.015 #association constant between free dephosphorylated peptides and self-assembly

k0=0.5 # enzymatic constant

xk=100.0 # ratio between the activity of enzymes in solution and gel

def fd(x):

 y=x-cprFD0

 return 0.2+(0.8/(1.0+np.exp(y/cprFD1)))

def fdr(x):

 return fd(x).real

```
it1=150 # number of slits in the gel
it2=it1-1 #it2 is the last slit in the gel
itd=50 #number of slits in the solution
itt=it2+itd #total number of slits
iy=[]
```

```
# concentrations in the gel
```

```
for i in range (0,it1+1):
    cbp.append(0.0)
    dcbp.append(0.0)
    cp.append(0.0)
    dcp.append(0.0)
    dce.append(0.0)
    iy.append(i)
    xD.append(1.0)
    xDe.append(De0)
    cpa.append(0.0)
    P0S.append(P0)
```

```
# calculation of the initial enzyme profile
```

```
for i in range (0,itt+1):
    if i<it1+1:
        xi=(i-it1)*1.0
```

```

        x=1.0-np.exp(xi/8.0)

        x=ce0*x

        xpl=x*7000.0

        ce.append(x)

        cepl.append(xpl)

    else:

        ce.append(0.0)

        cepl.append(0.0)

# concentrations in the solution

# part of the solution devoid of peptides and enzymes
for i in range (it1+1,it1+5):

    cbp.append(0.0)

    dcbp.append(0.0)

    cp.append(0.0)

    iy.append(i)

    dce.append(0.0)

    xD.append(xDD)

    xDe.append(De0)

    cpa.append(0.0)

    P0S.append(P0)

# part of the solution containing the peptides
for i in range (it1+5,itt+1):

```

```

cbp.append(cbp0)
dcbp.append(0.0)
cp.append(0.0)
iy.append(i)
dce.append(0.0)
xD.append(xDD)
xDe.append(De0)
cpa.append(0.0)
P0S.append(P0)

cbpi=0 # nombre initial de peptides
for i in range (0,itt+1):
    cbpi=cbpi+cbp[i]

t=0
j=0
while (t<tfin2):

    j=j+1

    for i in range(0,itt+1):
        xDe[i]=De0

# calcul pour la première tranche
u=(1.0/xD[0])+(1.0/xD[1])
ue=(1.0/xDe[0])+(1.0/xDe[1])
xe=(2.0/ue)*(ce[1]-ce[0])
x=Dbp*(2.0/u)*(cbp[1]-cbp[0])

```

```

xp=Dbd*(2.0/u)*(cp[1]-cp[0])

z=k0*cbp[0]*ce[0]
dcbp[0]=x*dt-z*dt

cp[0]=cp[0]+z*dt-kas*cpa[0]*cp[0]*dt+xp*dt

cpa[0]=cpa[0]+kas*cpa[0]*cp[0]*dt

u=np.exp((cp[0]-P0S[0])/P1)

cpa[0]=cpa[0]+ka*u*cp[0]*dt

cp[0]=cp[0]-ka*u*cp[0]*dt

dce[0]=xe*dt

```

```
# calcul pour les tranches 1 à itt-1
```

```

for i in range(1,itt):

    u=(1.0/xD[i-1])+(1.0/xD[i])
    v=(1.0/xD[i])+(1.0/xD[i+1])
    ue=(1.0/xDe[i-1])+(1.0/xDe[i])
    ve=(1.0/xDe[i])+(1.0/xDe[i+1])
    xe=(2.0/ue)*(ce[i-1]-ce[i])+(2.0/ve)*(ce[i+1]-ce[i])
    x=Dbp*(2.0/u)*(cbp[i-1]-cbp[i])+Dbp*(2.0/v)*(cbp[i+1]-cbp[i])
    xp=Dbd*(2.0/u)*(cp[i-1]-cp[i])+Dbd*(2.0/v)*(cp[i+1]-cp[i])

    if (i<it1+1):

        k1=k0

    else:

        k1=k0*xk

    z=k1*cbp[i]*ce[i]
    dcbp[i]=x*dt-z*dt

    cp[i]=cp[i]+z*dt-kas*cpa[i]*cp[i]*dt+xp*dt

    cpa[i]=cpa[i]+kas*cpa[i]*cp[i]*dt

    u=np.exp((cp[i]-P0S[i])/P1)

    cpa[i]=cpa[i]+ka*u*cp[i]*dt

```

```
cp[i]=cp[i]-ka*u*cp[i]*dt
```

```
dce[i]=xe*dt
```

```
#calcul pour la dernière tranche
```

```
u=(1.0/xD[itt-1])+(1.0/xD[itt])
```

```
ue=(1.0/xDe[itt-1])+(1.0/xDe[itt])
```

```
xe=(2.0/ue)*(ce[itt-1]-ce[itt])
```

```
x=Dbp*(2.0/u)*(cbp[itt-1]-cbp[itt])
```

```
xp=Dbd*(2.0/u)*(cp[itt-1]-cp[itt])
```

```
z=k0*xk*cbp[itt]*ce[itt]
```

```
dcbp[itt]=x*dt-z*dt
```

```
dce[itt]=xe*dt
```

```
cp[itt]=cp[itt]+z*dt-ka*cpa[itt]*cp[itt]*dt+xp*dt
```

```
cpa[itt]=cpa[itt]+ka*cpa[itt]*cp[itt]*dt
```

```
u=np.exp((cp[itt]-P0S[itt])/P1)
```

```
cpa[itt]=cpa[itt]+ka*u*cp[itt]*dt
```

```
cp[itt]=cp[itt]-ka*u*cp[itt]*dt
```

```
# calcul des nouvelles concentrations
```

```
for i in range(0,itt+1):
```

```
    cbp[i]=cbp[i]+dcbp[i]
```

```
    ce[i]=ce[i]+dce[i]
```

#tracé d'une courbe toutes les 1000 itérations

```
if (j==1000):

    cpd=0 # nombre de peptides déphosphorylés
    cpda=0 #pourcentage d'auto-assemblés
    for i in range(0,itt+1):
        cepl[i]=ce[i]*7000.0
        cpd=cpd+cp[i]+cpa[i]
        cpda=cpda+cpa[i]

    j=0
    df = pd.DataFrame({ 'Tranche':iy, '[Enzymes]':cepl,
'[Phospho_Pep]': cbp, '[Dephospho_Pep]': cp, '[SA_Pep]': cpa})
    example_string = df.to_csv(index=False)
    output_file = open('file_{}.txt'.format(int(((t+0.5)/10))-1), 'a')
    output_file.write(example_string)
    output_file.close()
    #print (df)
    print('t=',t)
    print('% déphosphorylés = ',cpd*100/cbpi)
    print('% auto-assemblés = ',cpda*100/cbpi)
    print('  ')

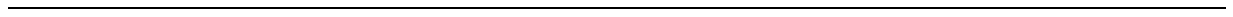
t=t+dt
```

```
for i in range(0,itt+1):
```

```
    cepl[i]=ce[i]*7000.0
```

```
plt.ylim(0,2.0)
plt.xlim(0,itt)
plt.plot(iy,cepl)
plt.plot(iy,cbp)
plt.plot(iy,cp)
plt.plot(iy,cpa)
```

```
plt.show()
```



Annexe 3 : Expériences complémentaires au chapitre 3

Dans notre effort de compréhension des phénomènes en jeu et avant de parvenir à identifier les processus de type Liesegang comme étant à l'origine des structures en bandes que nous avons observé, nous avons d'abord pensé que les processus de réaction-diffusion à l'œuvre dans notre système étaient plutôt de type activateur/inhibiteur où les structures et motifs observables sont dûs à l'inhibition d'une espèce en présence comme expliqué dans le chapitre 1 de ce manuscrit. Cette idée nous est venue lorsque nous nous sommes rendu compte dans les expériences en cinétique que directement après l'ajout de la solution de peptide sur le gel, l'intensité moyenne de fluorescence de l'AP^{RHO} encapsulée dans le gel hôte augmente de façon immédiate (voir Figure A.1) avant de se restabiliser autour de la valeur moyenne de départ (avant ajout de la solution de peptide)

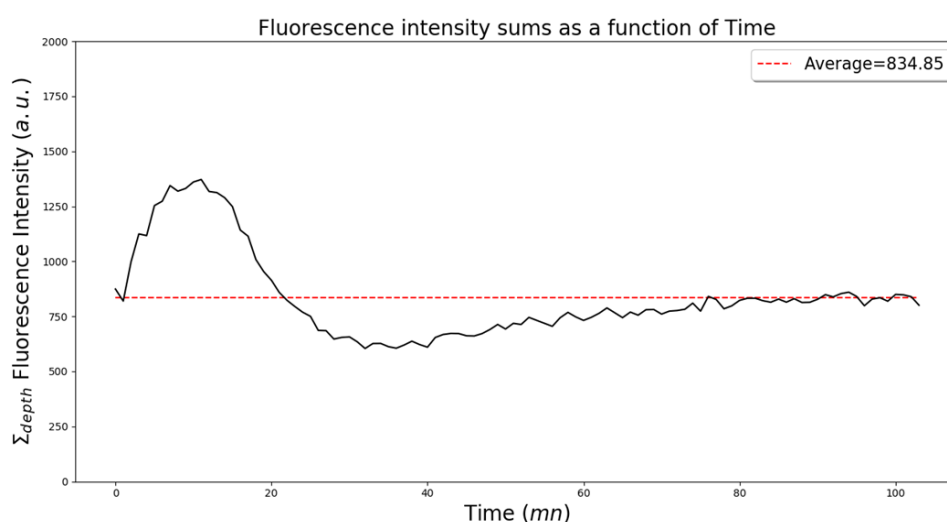


Figure A.1 : Graph représentant l'augmentation immédiate de l'intensité moyenne de fluorescence de AP^{RHO} dans le gel hôte après ajout de la solution de peptide.

J'ai constaté dans la littérature que la fluorescence de la Rhodamine B est fortement affectée par le pH l'environnant et certaines techniques ont même été développées afin de l'utiliser comme sonde de pH¹.

J'ai donc réalisé des expériences de spectroscopie de fluorescence afin de vérifier quelle est la gamme de pH à laquelle l'AP^{RHO} est sensible. J'ai pu observer qu'en présence d'un pH inférieur à 3, l'intensité de fluorescence de la rhodamine B augmente drastiquement et est légèrement red shiftée (voir Figure A.2).

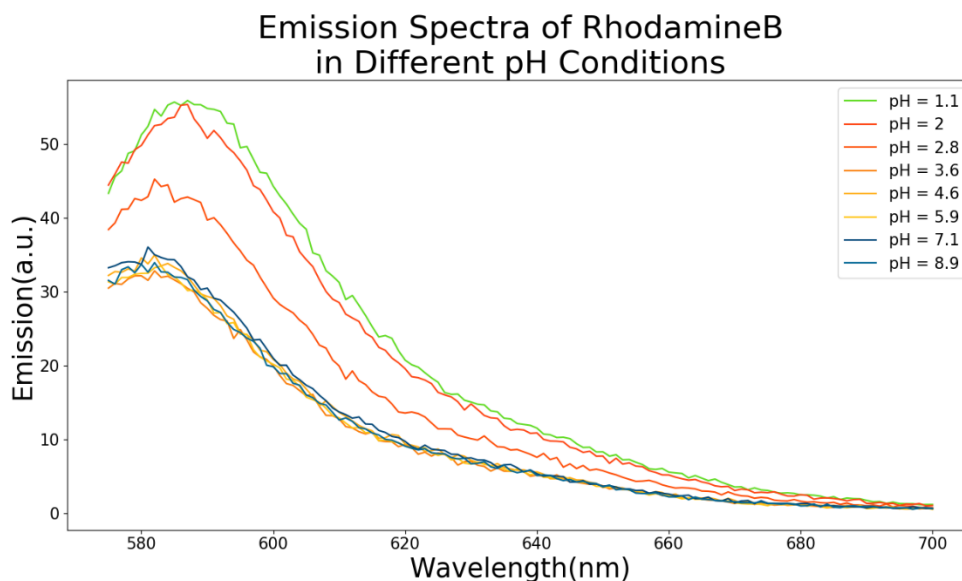


Figure A.2 : *Ce graphique obtenu en spectroscopie de fluorescence ($\lambda_{ex} = 561$) permet de se rendre compte que en-dessous de pH 3, la fluorescence de la Rhodamine B greffée sur les enzymes AP augmente fortement.*

On peut supposer que lors de l'ajout du peptide sur le gel hôte les pH évoluent très rapidement dans le gel jusqu'à atteindre un tel pH.

Il est aisé d'expliquer cela. En effet, l'action enzymatique de déphosphorylation sur le peptide précurseur pour le transformer en hydrogélisateur est une réaction d'hydrolyse qui va produire des ions H^+ changeant drastiquement le pH du milieu. Le retour progressif de l'intensité de fluorescence moyenne vers sa valeur initiale observé dans la figure A.1 est sans doute dû à la présence du tampon Borax (25mM, pH 9,5) qui est employé pour la dissolution du peptide.

Une inhibition de l'enzyme peut donc facilement s'expliquer ici tant celle-ci est sensible au pH et à la présence de phosphates en solution. Ces deux éléments sont connus comme étant des inhibiteurs de l'activité enzymatique de l'AP.^{2, 3}

Afin de savoir si le relargage d'ions H^+ et de phosphates lors de la déphosphorylation du peptide étaient responsables du profil d'auto-assemblage observé, l'expérience suivante a été réalisée : 2 gels ont été préparés dans les mêmes conditions.

- Un des gels a été mis au contact d'une solution de borax + AP de façon répétée afin de le transformer en gel tampon, qui permettra de préserver les enzymes qu'il contient de la chute de pH.
- L'autre gel a été mis au contact d'une solution de PBS +AP de façon répétée afin que les enzymes soient inhibées par les phosphates en solution

Les résultats obtenus sont présentés Figure A.3 et permettent de constater que la chute de pH ne semble guère affecter le profil particulier d'auto-assemblage habituellement observé. La présence de PBS semble avoir un effet plus important mais ne permet néanmoins pas de s'affranchir du profil d'auto-assemblage habituel.

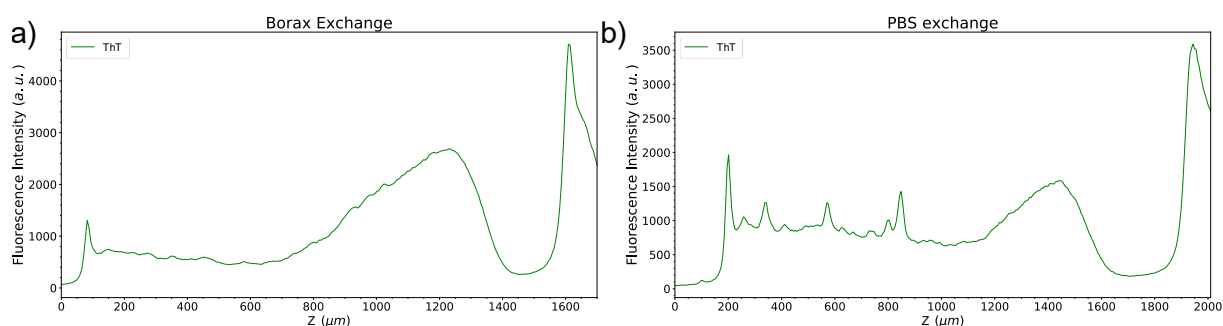


Figure A.3 : (a) Profil de l'auto-assemblage obtenu dans un gel tamponné par sa mise en contact avec une solution de Borax + AP. (b) Profil de l'auto-assemblage obtenu dans un gel où l'activité enzymatique des AP a été inhibée par la présence d'ions phosphates en raison de sa mise en contact avec une solution de Borax + AP.

Références

1. Zhang, W., Shi, K., Shi, J., and He, X., *Use of the fluorescence of rhodamine B for the pH sensing of a glycine solution*. International Symposium on Optoelectronic Technology and Application 2016. Vol. 10155. 2016: SPIE.
2. Fernley, H. N. and Walker, P. G., *Studies on alkaline phosphatase. Inhibition by phosphate derivatives and the substrate specificity*. The Biochemical journal, 1967. **104**(3): p. 1011-8.
3. Ross, M. H., Ely, J. O., and Archer, J. G., *Alkaline Phosphatase Activity And pH Optima*. Journal of Biological Chemistry, 1951. **192**(2): p. 561-568.

AUTO-ASSEMBLAGE DE PEPTIDES ASSISTÉ PAR ENZYME AU SEIN D'HYDROGELS

Résumé

Mon projet doctoral concerne à la fois l'auto-assemblage de peptides induit par des enzymes et la structuration de matériaux par des processus de réaction-diffusion. Nous avons montré qu'en utilisant la phosphatase alcaline au sein d'un gel hôte et en y laissant diffuser un peptide précurseur phosphorylé, celui-ci est transformé en peptide hydrogélateur qui s'auto-assemble. Comme les enzymes dans le gel diffusent également hors du gel, on observe un profil de concentration d'auto-assemblage à l'interface gel/solution suivi d'une zone de déplétion dans le gel, elle-même suivie d'un second maximum d'auto-assemblage. Ce profil résulte de processus semblables à ceux permettant l'obtention de structures de Liesegang. Lorsque la concentration en enzyme dans le gel diminue, on observe une transition entre un profil continu et des micro-globules isolés d'auto-assemblage. Nous avons développé un modèle rendant compte de l'ensemble de ces observations. A notre connaissance, ces travaux décrivent pour la première fois la formation *in situ* et autonome de motifs organiques microstructurés au sein de matériaux, à partir d'enzymes. Ils représentent ainsi une nouvelle approche pour la conception de biomatériaux hiérarchisés et fonctionnels.

Abstract

My thesis work concerns both the enzyme-assisted self-assembly of peptides and the structuring of materials by reaction-diffusion processes. We have shown that by using alkaline phosphatase within a host gel and allowing a phosphorylated precursor peptide to diffuse into it, it is transformed into a hydrogelator peptide that self-assembles. As the enzymes in the gel also diffuse out of the gel, there is a concentration profile of self-assembly at the gel/solution interface followed by a depletion zone in the gel followed by a second maximum of self-assembly. This profile is the result of processes similar to those used to obtain Liesegang structures. As the enzyme concentration in the gel decreases, a transition is observed between a continuous profile and isolated self-assembling micro-globules. We have developed a model to account for all these observations. To our knowledge, this work describes for the first time the *in situ* and autonomous formation of organic microstructured motifs within materials, based on enzymes. It thus represents a new approach for the design of hierarchical and functional biomaterials.