



Titre: Production de peptides synthétiques et mise au point
Title: d'échafaudages moléculaires pour le génie tissulaire

Auteur: Nesrine Riahi
Author:

Date: 2017

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Riahi, N. (2017). Production de peptides synthétiques et mise au point
Citation: d'échafaudages moléculaires pour le génie tissulaire [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/2462/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/2462/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Gregory De Crescenzo, & Olivier Henry
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

PRODUCTION DE PEPTIDES SYNTHÉTIQUES ET MISE AU POINT
D'ÉCHAFAUDAGES MOLÉCULAIRES POUR LE GÉNIE TISSULAIRE

NESRINE RIAHI

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

JANVIER 2017

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

PRODUCTION DE PEPTIDES SYNTHÉTIQUES ET MISE AU POINT
D'ÉCHAFAUDAGES MOLÉCULAIRES POUR LE GÉNIE TISSULAIRE

présentée par : RIAHI Nesrine

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. JOLICOEUR Mario, Ph. D., président

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. HENRY Olivier, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. VIRGILIO Nick, Ph. D., membre

M. GROLEAU Denis Michel, Doctorat, membre

DÉDICACE

À mes parents !

REMERCIEMENTS

"La fin de la thèse peut être en soi une fin d'un long cursus scolaire, mais en vrai ce n'est que le point de départ d'une carrière à construire "

Alors je ne peux passer à autre chose dans la vie sans exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui étaient là pour moi :

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Mr. Gregory De Crescenzo, professeur au département génie chimique à l'école polytechnique de Montréal, de m'avoir permis de faire partie de son groupe de recherche. Sa disponibilité, ses précieux conseils et ses encouragements au cours de certains moments difficiles m'ont été de grande importance et d'un immense réconfort pour avancer dans le projet ; Merci infiniment Monsieur !

J'aimerais également remercier mon co-directeur, Mr. Olivier Henry, lui aussi professeur au département génie chimique à l'école polytechnique de Montréal de m'avoir orienté vers les bonnes décisions même si les rencontres n'étaient pas nombreuses.

Mes remerciements les plus profonds vont à Mr. James Omichinski, professeur au département de biochimie à l'université de Montréal, qui m'a accueilli dans son groupe de recherche pendant une période de deux ans durant laquelle j'ai beaucoup appris. Je tiens à remercier Laurent qui m'a appris l'art de la biologie moléculaire, Mathieu, Thomas, Geneviève, Haytham, Philippe et Normand pour leur gentillesse, leur sympathie et leurs conseils qui m'ont été de grande aide pendant les moments difficiles du projet.

Qu'il me soit permis d'exprimer mes sentiments de respect, d'amitié, de profonde reconnaissance et de gratitude à tous les membres de mon groupe de recherche : je commence par Julie, avec qui j'ai développé une grande amitié. Je la remercie pour l'écoute, la patience et les encouragements qu'elle m'accordait quand j'en avais besoin. Je remercie également Benoit, ma référence en chimie, de m'avoir beaucoup aidé pour l'avancement du projet, surtout dans la partie qui concerne les hydrogels. Un grand MERCI va à toute "la gang" du 2074 et 2086, avec qui j'ai partagé ces 6 années de ma vie, ceux qui sont encore là: Fred, Eric, Kahina, Mayssa, Cécile et Florian; ainsi ceux qui sont déjà parti : Sam, Charles, Cyril, Pauline, Ines, Julien, Atafeh, Zahra et Cédric.

Et pour finir, un remerciement spécial pour ma famille/belle-famille, et particulièrement à mes parents, qui ont cru en moi et qui ont su trouver les mots pour me soutenir et atteindre mes objectifs dans la vie malgré qu'ils soient de l'autre côté de l'atlantique. Je remercie également mon cher Mari qui n'a pas cessé de me soutenir et de m'encourager et que sans lui cette thèse n'aurait jamais été achevée. Son écoute m'était très précieuse malgré qu'il ne comprenait pas trop ce que je lui racontais mais il me proposait des solutions quand même !!!!

Et mon dernier MERCI est adressé à ma petite fille chérie, Salma, pour être là dans ma vie et de me donner la force pour arriver au terme de ce projet.

RÉSUMÉ

Le développement de structures biomimétiques, notamment les hydrogels, a révolutionné le domaine des biomatériaux durant les dernières décennies. Les hydrogels ont été utilisés dans diverses applications comme la livraison de biomolécules thérapeutiques et de cellules mais aussi pour jouer le rôle de support de soutien pour la régénération d'un tissu endommagé. Plusieurs études ont démontré que l'utilisation des peptides synthétiques, tels que les peptides présentant le motif "coiled-coil", pour la réticulation des chaînes polymériques, présente plusieurs avantages et plus particulièrement l'anticipation de la structure à partir de leur séquence primaire. En voulant se pencher sur la conception et le développement de structures tridimensionnelles à base des peptides Kcoil et Ecoil, peptides synthétiques fortement utilisés dans notre groupe de recherche, nous devons en premier lieu trouver une alternative à la synthèse chimique pour la production de ces peptides à moindre coût.

Une première étude portant sur le développement d'un procédé adéquat pour la production biologique de Kcoil a été réalisée en utilisant *Escherichia coli*. La fusion à plusieurs protéines (p.e. MBP, TRX, NusA, GST, KSI) a été testée et le meilleur niveau d'expression avait été enregistré avec la thiorédoxine (TRX). Le procédé de production et de purification développé a permis de récupérer 1.5 mg par litre de Kcoil pur. L'identité de la séquence peptidique et son affinité à son partenaire Ecoil ont été vérifiées par spectroscopie de masse et par un test basé sur la résonance plasmonique de surface (SPR), respectivement. Ces travaux de recherche ont été présentés lors de la conférence internationale "*Protein Engineering Summit : PEGS Boston*" en mai 2014 et ont été publiés dans le journal "**Amino Acids**" sous le titre "*Soluble expression, purification and functional characterization of a coil peptide composed of a positively charged and hydrophobic motif*".

La deuxième étude présentée dans ce manuscrit porte sur la conception et le développement d'hydrogels à base de dextrane. À cause de plusieurs problèmes d'ordre technique, l'utilisation de l'hétérodimère Kcoil/Ecoil a été remplacée par le trisodium trimétaphosphate (STMP) pour la réticulation du dextrane en un réseau tridimensionnel. Un ratio de $W_{\text{dextrane}} : W_{\text{STMP}}$ de 3:1 a permis d'avoir un hydrogel transparent, stable, présentant une surface lisse et facilement manipulable. Étant donné que le dextrane a des propriétés anti-adhésives, le greffage du motif peptidique RGD

était nécessaire pour la culture des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC). Une quantité minimale de RGD sur les chaînes du dextrane (c.-à-d. 0.1% du total en polymère) a abouti à la formation d'un tissu cellulaire confluent après 3h d'inoculation. L'ajout du chlorure de sodium ($W_{\text{Polymère}} : W_{\text{NaCl}} = 1 : 0.25$) au mélange original et à la surface du gel a généré une structure poreuse favorisant l'échange métabolique et la migration cellulaire. L'analyse par microscopie de la culture des cellules "HUVEC" sur les gels poreux avait montré que ces dernières adhèrent rapidement, prolifèrent et migrent à l'intérieur de la matrice après une culture de 7 jours. Les résultats relatifs à ces travaux de recherche ont été résumés dans un article scientifique intitulé *"Development of RGD functionalized dextran based hydrogels for cell delivery"* et qui a été soumis pour publication dans le journal **"Carbohydrate Polymers"**.

Une dernière étude a été réalisée sur l'identification de la méthode optimale pour la co-immobilisation d'un facteur de croissance et des résidus RGD sur les chaînes de dextrane. La protéine doublement étiquetée en N-terminal Cys-Ecoil-EGF a été conçue au départ pour participer à la fois à la réticulation des chaînes de dextrane et à l'immobilisation du facteur de croissance épidermique (EGF) dans le gel obtenu. La protéine était aussi active en solution que son contrôle (Ecoil-EGF). Cependant, le recrutement du récepteur de EGF était fortement influencé par la méthode de greffage (c.-à-d. via interaction Kcoil/Ecoil ou par couplage de thiols) de la protéine Cys-Ecoil-EGF sur la surface de la puce de SPR. Un essai cellulaire in vitro a été réalisé pour vérifier les résultats obtenus par SPR. Les cellules vasculaires musculaires lisses (VSMC) de rat ont été cultivées en présence de Cys-Ecoil-EGF immobilisé par couplage de thiols ou par interactions "coiled-coil" sur un revêtement de chondroïtine sulfate. L'analyse de la densité de protéines immobilisées dans les deux cas de figure en utilisant une méthode d'analyse immuno-enzymatique (ELISA) a confirmé que l'immobilisation des protéines par interaction Kcoil/Ecoil est plus efficace pour préserver l'activité biologique de la protéine, ce qui est en accord avec le test de survie des VSMC. Les travaux présentés ici ont été résumés dans un manuscrit dont le titre est *"Bioavailability of immobilized Epidermal Growth Factor : Covalent versus Non-Covalent Grafting"* et qui a été soumis pour publication dans le journal **"Biointerphases"**.

ABSTRACT

The development of biomimetic structures, especially hydrogels, has revolutionized the field of biomaterials in the recent decades. Hydrogels have been used in various applications such as delivery of therapeutic biomolecules and cells but also as a support for damaged tissue regeneration. Several studies have demonstrated that the use of *de novo* designed peptides, such as those presenting "coiled-coil" motif, for the crosslinking of polymers presents several advantages and more particularly the structure anticipation from their primary sequence. In order to study the design and development of three-dimensional structures based on the peptides Kcoil and Ecoil, synthetic peptides highly used in our research group, we first had to find an alternative to chemical synthesis for the lower cost production of these peptides.

A first study on the development of a suitable process for Kcoil biological production was carried out using *Escherichia coli*. Several fusion proteins (e.g. MBP, TRX, NusA, GST, KSI) were tested and the best expression level was noted with thioredoxin (TRX). The process of production and purification developed made it possible to recover 1.5 mg of pure Kcoil per liter of bacterial culture. The identity of the peptide sequence and its affinity to its Ecoil partner were verified by mass spectroscopy and surface plasmon resonance (SPR) based assay, respectively. This research was presented at the international conference "*Protein Engineering Summit: PEGS Boston*" in May 2014 and published in the journal "**Amino Acids**" in a scientific paper entitled "*Soluble expression, purification and functional characterization of a coil peptide composed of a positively charged and hydrophobic motif*".

The second study presented in this manuscript concerns the design and development of dextran-based hydrogel. Due to several technical problems, the use of the Kcoil/Ecoil heterodimer has been replaced by trisodium trimetaphosphate (STMP) for the cross-linking of dextran in a three-dimensional network. A ratio $W_{\text{dextran}}:W_{\text{STMP}}$ of 3:1 allow us to get a transparent and stable hydrogel, presenting a smooth surface and was easily to handle. Adhesive peptide motif (RGD) grafting, was required for the culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) because of the anti-adhesive dextran properties. A minimal amount of RGD on the dextran chains (ie, 0.1% of the total of polymer) resulted in the formation of a confluent cellular tissue after 3 h

of inoculation. The addition of sodium chloride ($W_{\text{Polymer}}: W_{\text{NaCl}} = 1: 0.25$) to the original mixture and to the surface of the gel, generated a macroporous structure which promotes metabolic exchange and cell migration. Microscopic analysis showed that HUVEC cells adhere rapidly, proliferate and migrate within the matrix after a 7-day culture. The results of this research were summarized in a scientific article entitled "*Development of RGD functionalized dextran based hydrogels for cell delivery*" which was submitted for publication in the journal "**Carbohydrate Polymers**".

A final study was carried out on the identification of the optimal method for the co-immobilization of a growth factor with RGD residues on dextran chains. The double tagged Cys-Ecoil-EGF protein was originally designed to participate in both the crosslinking of dextran chains and the immobilization of epidermal growth factor (EGF) in the resulting hydrogel. The protein was active in solution as much as its control (Ecoil-EGF), however recruitment of the EGF receptor was strongly influenced by the grafting method (i.e. via Kcoil/Ecoil interaction or by thiol coupling strategy) of Cys-Ecoil-EGF protein on the surface of SPR chip. An in vitro cell assay was performed to verify the results obtained by SPR. Smooth muscle vascular cells (VSMC) of rat culture was performed in the presence of immobilized Cys-Ecoil-EGF protein by thiol coupling or by coiled-coil interactions on a chondroitin sulfate coating. Analysis of the density of immobilized proteins in both cases using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method confirmed that protein immobilization by Kcoil/Ecoil interaction is more efficient in preserving protein biological activity, which agrees with the survival test of VSMC. The work presented here was summarized in a manuscript entitled "*Bioavailability of immobilized Epidermal Growth Factor: Covalent versus Non-Covalent Grafting*" which was submitted for publication in the journal "**Biointerphases**".

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT	VIII
TABLE DES MATIÈRES	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XVI
LISTE DES FIGURES.....	XVII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Contexte du projet	1
1.2 Problématique du projet	4
1.3 Objectifs	5
1.3.1 Objectif I	5
1.3.2 Objectif II	6
1.3.3 Objectif III.....	6
CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE	7
2.1 Les peptides synthétiques.....	7
2.1.1 Définition et origine	7
2.1.2 La famille des "coils"	8
2.2 L'hétérodimère Ecoil/Kcoil.....	13
2.2.1 Propriétés.....	13
2.2.2 Applications	15
2.3 Méthodes de production	15

2.3.1	Synthèse chimique en solution (SPS).....	15
2.3.2	La synthèse de peptide en phase solide (SPPS)	16
2.3.3	Ligation chimique native (NCL)	18
2.3.4	Biocatalyse enzymatique.....	19
2.3.5	La biologie synthétique	20
2.3.5.1	Système d'expression.....	21
2.3.5.2	Vecteurs de clonage	25
2.4	Hydrogels	31
2.4.1	Description	31
2.4.2	Types d'hydrogels	32
2.4.3	Principales applications biomédicales.....	35
2.4.3.1	Livraison de cellules.....	36
2.4.3.2	Livraison de biomolécules actives	39
2.4.3.3	Matériau de remplissage provisoire ou permanent	42
2.5	Biofonctionalisation des biomatériaux.....	44
2.5.1	Définition	44
2.5.2	Stratégies d'immobilisation des biomolécules	48
2.5.3	Intermédiaire/espaceur de liaison.....	50
CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT		53
CHAPITRE 4 ARTICLE 1: SOLUBLE EXPRESSION, PURIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF A COIL PEPTIDE COMPOSED OF A POSITIVELY CHARGED AND HYDROPHOBIC MOTIF		56
4.1	Présentation de l'article.....	56

4.2	Entête de l'article	56
4.3	Abstract	57
4.4	Introduction	57
4.5	Materials and Methods	59
4.5.1	Chemical and reagents	59
4.5.2	Generation of the expression vectors	60
4.5.3	Cloning Kcoil coding sequence.....	60
4.5.4	Screening of expression levels	61
4.5.5	Optimization of TRX-tagged Kcoil peptide purification	62
4.5.6	SDS-PAGE analysis.....	63
4.5.7	Kcoil peptide characterization.....	63
4.5.7.1	Kcoil peptide quantification.....	63
4.5.7.2	Mass spectrometry molecular weight verification	63
4.5.7.3	Surface Plasmon Resonance (SPR) biosensor assay	63
4.6	Results and Discussion.....	64
4.6.1	Expression of chimeras corresponding to Kcoil peptide fused to three different protein carriers.....	64
4.6.2	Optimisation of Kcoil peptide purification	66
4.6.3	Bioactivity assay on the BIACORE	72
4.7	Acknowledgments	73
4.8	References	74
CHAPITRE 5 ARTICLE 2: IMPACT OF RGD AMOUNT IN DEXTRAN-BASED HYDROGELS FOR CELL DELIVERY		80
5.1	Présentation de l'article.....	80

5.2	Entête de l'article	80
5.3	Abstract	80
5.4	Introduction	81
5.5	Materials and Methods	83
5.5.1	Materials.....	83
5.5.2	VS-modified dextran (Dex-VS) production and characterization.....	83
5.5.3	Peptide-modified Dex-VS production and characterization	84
5.5.4	Hydrogel preparation.....	84
5.5.5	Hydrogel porosity modification	84
5.5.6	HUVEC adhesion, proliferation and migration assays	85
5.5.7	Cell imaging	85
5.5.8	Morphology characterization using Scanning Electron Microscopy	86
5.5.9	Hydrogel swelling studies	86
5.5.10	Statistical analysis	86
5.6	Results	86
5.6.1	Peptide grafting on dextran chain.....	86
5.6.2	Preparation of scaffolds.....	88
5.6.3	Cellular assay	89
5.6.3.1	HUVEC adhesion assay	89
5.6.4	Hydrogel characterization	90
5.6.4.1	Morphology observations.....	90
5.6.4.2	Swelling assay	91
5.6.5	Cellular proliferation and migration into porous scaffold.....	93
5.7	Discussion	95

5.8	Conclusion.....	97
5.9	Acknowledgments.....	97
5.10	References	98
CHAPITRE 6 ARTICLE 3: BIOAVAILABILITY OF IMMOBILIZED EPIDERMAL GROWTH FACTOR: COVALENT VERSUS NON-COVALENT GRAFTING.....		
		104
6.1	Présentation de l'article:	104
6.2	Entête de l'article	104
6.3	Abstract	104
6.4	Introduction	105
6.5	Experimental	108
6.5.1	Chemicals and Reagents.....	108
6.5.2	Cell Culture	109
6.5.3	Recombinant Protein Production	109
6.5.4	Surface Plasmon Resonance (SPR)-based Assay.....	110
6.5.5	In Vitro Cell Assay to Evaluate Soluble Cys-Ecoil-EGF Bioactivity.....	111
6.5.6	Cys-Ecoil-EGF Grafting on Chondroitin Sulfate-coated Surfaces	111
6.5.7	VSMC Survival in Serum-free Medium	112
6.6	Results and discussions	112
6.6.1	Cys-Ecoil-EGF production and purification	112
6.6.2	Diffusible Cys-Ecoil-EGF bioactivity assay	114
6.6.3	Immobilized Cys-Ecoil-EGF bioactivity assays	115
6.7	SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	122
6.8	ACKNOWLEDGMENTS.....	122
6.9	References	122

CHAPITRE 7	DISCUSSION GÉNÉRALE	127
7.1	Production biologique du peptide synthétique Kcoil	128
7.2	Conception, préparation et fonctionnalisation d'un hydrogel pour des applications en génie tissulaire.....	131
7.2.1	Hydrogel à base de dextrane	131
7.2.2	Étude de l'impact de l'intermédiaire/espaceur sur la bioactivité de Cys-Ecoil-EGF	133
CHAPITRE 8	CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	135
8.1	Production biologique du peptide Kcoil.....	136
8.1.1	Co-expression des peptides Kcoil et Ecoil	136
8.1.2	Production biologique des mutants et analogues des peptides Ecoil et Kcoil	136
8.2	Conception et développement d'hydrogels	137
8.2.1	Peut-être un gel injectable ?	137
8.2.2	Conception de gel à base de peptides "coils"	137
BIBLIOGRAPHIE		139

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Propriétés de quelques protéines de fusion et probabilité de solubilité/insolubilité de la protéine d'intérêt (Gregory D. Davis, Claude Elisee, Denton M. Newham, & Roger G. Harrison, 1999).....	28
Tableau 2.2 : Groupements fonctionnels fréquemment disponibles dans la structure d'une protéine et les fonctionnalités appropriées sur la surface permettant de générer une liaison covalente. Inspiré de (Rusmini, F. et al., 2007).....	49
Table 4.1: Primer sequences used for PCR amplification.....	61
Table 4.2: Yields of fusion protein and final purified Kcoil peptide. Yields are reported by mg of protein produced per liter of bacterial culture	70
Table 6.1: Kinetic and thermodynamic constants calculated for the EGFRED-Fc binding to the different surfaces displaying EGF moieties	117

LISTE DES FIGURES

- Figure 2.1: Représentation schématique d'un dimère ayant une structure "coiled-coil" parallèle (A et B) et une représentation de la structure déterminée par rayons X du domaine leucine Zipper du GCN4 (C et D) générée par le logiciel moslsript. Les boules et les bâtons représentent les chaînes latérales. Les panneaux B et D présentent une vue de côté. Les couleurs représentent les résidus a et g d'une hélice et a' et g' de l'autre hélice complémentaire. Les interactions hydrophobes dans la séquence répétitive sont également représentées comme suit : g et g' en bleu et rouge respectivement ; e et e' en cyan et orange respectivement). Le cœur hydrophobe est également représenté (a/a' et d/d') (Mason & Arndt, 2004).....9
- Figure 2.2 : Illustration des structures tridimensionnelles de plusieurs protéines naturelles présentant le domaine "coiled-coil" (Apostolovic et al., 2010).11
- Figure 2.3 : Représentation schématique du dimère E/K coil. Inspirée de (Heman Chao, Daisy L. Bautista, Jennifer Litowski, Randall T. Irvin, & Robert S. Hodges, 1998b)15
- Figure 2.4 : Schéma simplifié présentant les différentes étapes de la synthèse chimique de peptide en phase solide (SPPS).....17
- Figure 2.5 : Principe de la ligation chimique native (rectangle bleu : fragment peptidique 1 et rectangle rouge : fragment peptidique 2). Inspirée de (Raibaut et al., 2012).....19
- Figure 2.6 : Pourcentage de protéines recombinantes produites chez E.coli ou P. pastoris. Le pourcentage correspond au nombre total de citations retrouvées en recherchant le terme "recombinant protein" seul ou combiné au nom de l'un des deux organismes sur une période de 15 ans dans la banque de données "PubMed" et de 5 ans pour le journal "Microbial Cell Factories" (Sorensen, 2010).23
- Figure 2.7 : Représentation schématique des stratégies d'expression stable et transitoire des gènes dans le cas de cellules mammifères cultivées en suspension. Inspirée de (Hacker & Balasubramanian, 2016).....25
- Figure 2.8 : Schéma représentatif de la structure chimique de la molécule de dextrane35
- Figure 2.9 : Représentation schématique de la stratégie d'encapsulation des cellules dans un gel biodégradable. Les cellules isolées sont ajoutées au mélange de précurseurs polymériques.

Une fois que la réaction de gélification a eu lieu, les cellules se retrouvent encapsulées à l'intérieur de la structure, migrent, prolifèrent et commencent à synthétiser le nouveau tissu. Inspiré de (Nicodemus & Bryant, 2008).38

Figure 2.10 : Représentation simplifiée de l'interaction cellule-ECM durant une réparation/régénération d'un tissu. Inspirée de (Petreaca & Martins-Green, 2011)46

Figure 2.11 : Schéma explicatif de la stratégie d'immobilisation d'une molécule bioactive par liaison covalente et en utilisant un intermédiaire. Inspirée de (Goddard & Hotchkiss, 2007)51

Figure 4.1: A. Helical-wheel representation of the heterodimeric E/K coiled-coil peptide system. The interchain electrostatic interactions between the charged residues are indicated by the arrows. B. Schematic representation of Kcoil-fusion protein sequence design. Arrows indicate the restriction enzyme sites required to insert the cDNA corresponding to the fusion protein and the Kcoil sequence within the different plasmids. A three amino-acid sequence (CGG) was added upstream the Kcoil peptide cDNA in order to allow any thiol coupling procedure for Kcoil peptide grafting. A TEV site was also added for fusion protein removal and pure Kcoil peptide recovery65

Figure 4.2 : Schematic diagram summarizing the optimized strategy developed for Kcoil peptide biological production and purification68

Figure 4.3 : SDS-PAGE analysis of heat-treated samples taken at each stage of the Kcoil-Thioredoxin fusion protein production and purification process. Two molecular weight marker ladder were used. FT flow through, Ultra ultracentrifugation69

Figure 4.4 : A. Kcoil peptide and Thioredoxin fusion protein separation by cation exchange chromatography. After enzymatic digestion, the mixture was injected on a SP-Sepharose FF column using phosphate buffer (pH 7.4) as loading buffer and a 0–100 % linear gradient of NaCl (corresponding to 125-to-500 mM, dashed line) for elution. The nomenclature (IEX-peak1 and IEX-peak2) is the same as in Fig. 4.3. B. Reverse-phase HPLC analysis of SP-Sepharose eluted fractions. Kcoil peptide was eluted from the C4 column using a 20–35 % linear gradient (15 min) of buffer B (intermittent line) (acetonitrile with 0.05 % of TFA). Reduced Kcoil peptide was detected by absorbance at 214 nm (continuous line) at

approximately 180 mL of eluted volume; the small oxidized fraction of Kcoil correspond to the shoulder (arrow) at the base of the Kcoil peak.....71

Figure 4.5: A. Control-corrected sensorgrams corresponding to the injection of 100 nM of E5-EGF over the same amount of either chemically-synthesized (gray) or bacteria-produced (black) Kcoil that had been immobilized at the biosensor surface. B. Kinetic analysis of E/Kcoil interaction using a simple binding model. Various concentrations of Ecoil peptide, ranging from 0.5 to 5 nM, were injected over less than 60 RU of immobilized bacteria-produced Kcoil. Both experimental data and global fit corresponding to a simple Langmuirian model are shown73

Figure 5.1: Schematic representation of the hydrogel formation process.....88

Figure 5.2: HUVEC adhesion on dextran-based hydrogels. Cell adhesion on hydrogel surface was assessed by metabolic assay (Alamar Blue) 3h post-seeding. Different hydrogel formulation were tested, i.e. hydrogels containing A. 90% dextran and 10% modified dextran (Dex-VS, Dex-VS-RGE and Dex-VS-RGD). B. increasing Dex-VS-RGD content (from 0.1 to 10% $W_{\text{Dex-VS-RGD}}/W_{\text{Dex}}$). As a reference, results on hydrogels made of pristine dextran are shown. The data were expressed as mean values ($n = 3$ different scaffolds for each condition). Statistical differences are noticed * and *** for $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively and "n.s." means not statistically different. C. Optical microscopy images of paraformaldehyde-fixed HUVEC cells on three hydrogel surfaces of B. Scale bar = 50 μm 89

Figure 5.3: A. Scanning electron microscopy photographs illustrating the three-dimensional structure and pore size of the hydrogels resulting from the crosslinking of (1) pristine dextran (Dex) and (2, 3) modified dextrans (Dex-VS and Dex-VS-RGD, respectively). (4) Pore interconnection was observed when sodium chloride ($W_{\text{Dex}}:W_{\text{NaCl}} = 1:0.25$) was added to the original hydrogel formulation (scale bar correspond to 100 μm). B. Swelling ratio in PBS of hydrogel corresponding to various sodium chloride quantities added to 0.1% Dex-VS-RGD. Data correspond to average values ($n = 3$) and statistical differences were denoted by * if $p < 0.05$ **, if $p < 0.01$ and by *** if $p < 0.001$ 92

Figure 5.4: Surface morphology of the hydrogel by SEM. The hydrogel surface was covered by a thin layer of NaCl crystals at different time points (5 (A) and 10 (B) minutes) after the

beginning of the crosslinking reaction. For the negative control (C), salt was not added neither to the hydrogel preparation mix, nor to the surface of the scaffold93

Figure 5.5: HUVEC adhesion and proliferation for 7 days on dextran-based hydrogels at different RGD ratio. A. Macroscopic images of the hydrogels showing a white ring (indicated by the arrows), which was observed by fluorescent microscopy (C). The gels were cut as indicated in (B) and each section analyzed by fluorescent microscopy (494 nm for excitation and 517 nm for emission). Cell organisation on the surface (C) and inside (D) the different hydrogels was assessed by Calcein AM-based coloration.....95

Figure 6.1: Strategies for the oriented grafting of Epidermal Growth Factor on chondroitin sulfate (CS). Non-covalent capture of (Left) Ecoil-EGF and (Middle) Cys-Ecoil-EGF via Ecoil/Kcoil coiled-coil interactions. (Right) Covalent grafting of Cys-Ecoil-EGF via direct thiol coupling108

Figure 6.2: Cys-Ecoil-EGF production and purification. a. pTT5 expression plasmid for the production of the Cysteine-Ecoil-tagged hEGF. b. SDS-PAGE analysis of Cys-Ecoil-EGF production and purification in reducing conditions after Coomassie Blue staining. Purified Ecoil-EGF was used as control113

Figure 6.3: Cys-Ecoil-EGF bioactivity in solution. Western Blot analysis of EGF receptor phosphorylation in A431-cells, using an anti-phosphotyrosine antibody, after a 5-min incubation with different concentrations of recombinant a. Cys-Ecoil-EGF, or b. Ecoil-EGF as positive control. Negative control with no growth factor is indicated by: nc.....114

Figure 6.4 : Control-corrected sensorgrams corresponding to EGFRED-Fc injections over grafted (Cys-)Ecoil-EGF. EGFRED-Fc solutions of 2, 5, 10, 20 and 50 nM were injected over 70 RUs of a. Ecoil-EGF or b. Cys-Ecoil-EGF both captured at the biosensor surface by coiled-coil interactions, and c. 425 RUs of Cys-Ecoil-EGF that had been covalently immobilized vi thiol-based chemistry.116

Figure 6.5 : Characterization of EGF grafting on chondroitin sulfate coating and its impact VSMC survival in pro-apoptotic conditions. a. Amounts of bioavailable grafted EGF was determined by direct ELISA for various concentrations of EGF chimera used during the grafting step (tethering or covalent coupling). b. VSMC survival plotted as a function of bioavailable EGF

(as shown in panel a.) for Ecoil-EGF (closed squares) and Cys-Ecoil EGF (open squares) that was tethered via coiled-coil interactions or Cys-Ecoil EGF covalently coupled via thiol-based chemistry (open circles).119

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ARN _t	Acide ribonucléique de transfert
bFGF	"Basic fibroblast growth factor"
Cys	Cystéine
D ₂ O	Oxyde de deutérium
DTT	Dithiothréitol
ECM	Matrice extracellulaire
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EGF	Facteur de croissance épidermique
ELISA	"Enzyme-linked immunosorbent assay"
GCN4	Facteur de transcription
GST	Glutathione-S-transférase
¹ H-RMN	Resonance magnétique nucléaire
HUVEC	"Human umbilical vein endothelial cells"
IEX	"Ions-exchange chromatography"
IgG	Immunoglobuline G
IMAC	"Immobilized metal ion affinity chromatography"
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

KSI	Kétostéroïde isomérase
MBP	"Maltose binding protein"
NCL	Ligation chimique native
NusA	"N-utilization substance protein A"
PEG	Polyéthylène glycol
pI	Point isoélectrique
RGD	Arg-Gly-Asp
RGE	Arg-Gly-Glu
SEM	Microscopie électronique à balayage
SPPS	Synthèse chimique sur support solide
SPR	Résonance plasmonique de surface
STMP	Trisodium trimétaphosphate
TEV	"Tobacco Etch Virus"
TFA	Acide trifluoroacétique
TGE	"Transcient gene expression"
ToF-SIMS	"Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry"
TRX	Thiorédoxine
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VS/DVS	Vinyl sulfone/divinyl sulfone

VSMC "Vascular smooth muscle cells"

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Contexte du projet

Le domaine de l'ingénierie tissulaire s'est développé ces dernières décennies pour répondre aux besoins de milliers de personnes souffrant de la perte ou d'un dysfonctionnement d'un organe ou de tissus et qui ont besoin de transplantation. D'une manière générale, le génie tissulaire cherche à reproduire des organes vivants pouvant remplacer ceux qui sont endommagés dans les conditions actuelles de pénurie de donneurs (Drury & Mooney, 2003; Jonker, Löwik, & van Hest, 2012). Ce besoin est illustré par le déséquilibre, qui continue à croître, entre l'offre et la demande d'organes et de tissus disponibles pour une transplantation. Pour illustrer cette triste réalité, mentionnons que 23 407 personnes ont subi des transplantations de juillet 2000 à juillet 2001, alors que 79 902 personnes en avaient besoin selon les statistiques réalisées aux États Unis par le réseau uni pour la répartition d'organes "UNOS" (United Network for Organ Sharing) (Drury & Mooney, 2003).

La thérapie cellulaire consisterait à administrer au patient ses propres cellules, des cellules souches dans la plus part des cas, au site d'intérêt, ce qui permettrait de former un nouveau tissu voire même un organe (Hastings et al., 2015). Plusieurs stratégies ont été testées pour la livraison des cellules/tissus, mais les hydrogels ont prouvé qu'ils étaient les véhicules les plus appropriés. En effet, ils garantissent une bonne survie et un meilleur transfert des cellules, constituant un bon point de départ comme matrice où les cellules proliféreront, migreront et se différencieront jusqu'à la formation d'un nouveau tissu (Jonker et al., 2012). De plus, les hydrogels peuvent aussi bien véhiculer des cellules que d'autres molécules thérapeutiques, telles que les facteurs de croissance, augmentant ainsi la chance que les cellules soient en présence de tous les stimuli chimiques dont elles auront besoin pour une meilleure régénération tissulaire. En outre, les hydrogels ont une forte teneur en eau et sont caractérisés par une viscoélasticité contrôlable, ce qui permet d'obtenir des structures similaires à celle de la matrice extracellulaire (ECM). Toutes ces propriétés expliquent non seulement l'engouement récent pour ce genre de véhicule mais aussi les résultats très prometteurs obtenus en ingénierie tissulaire. Les hydrogels peuvent être conçus pour être biodégradables, biocompatibles et biofonctionnels, de telle manière à interagir favorablement avec le type de cellules qu'ils doivent livrer ou accueillir (Aillon, Xie, El-Gendy, Berkland, & Forrest, 2009; Ko, Shinde, Yeon, & Jeong, 2013).

La matrice cellulaire est le support biologique naturel qui entoure les cellules dans les tissus vivants. Elle est notamment responsable du soutien mécanique et fournit un environnement adéquat pour la formation de nouveaux tissus. Elle se compose principalement de filaments de protéoglycanes, de fibres de collagène et d'élastine. Les fibres de collagène procurent une résistance à la traction et une bonne durabilité pour le tissu environnant, tandis que l'élastine permet l'étirement du réseau pour permettre l'élargissement du tissu. Les filaments de protéoglycanes sont quant à eux constitués de protéines et d'acide hyaluronique, où les facteurs de croissance sont piégés. Donc, imiter la structure de la ECM est un objectif important dans la conception d'un hydrogel pour des applications en génie tissulaire et médecine régénérative.

La biodégradabilité est l'une des raisons qui ont attiré l'attention des chercheurs vers l'utilisation de polysaccharides pour la conception des hydrogels à des fins biomédicales, et plus précisément le dextrane. Le dextrane est un polymère bien connu sur le marché des produits biopharmaceutiques, car il est notamment utilisé depuis 5 décennies comme agent anti-thrombotique et pour l'expansion volumétrique du plasma (Mehvar, 2000). Il peut être éliminé par clairance rénale ou dégradé par la dextranase dans certains organes humains (p.e. la rate, le foie, les reins et une partie du tractus intestinal) tout dépendant de son poids moléculaire (Mehvar, 2000; Van Tomme & Hennink, 2007). Les hydrogels à base de dextrane sont particulièrement intéressants à cause de la résistance de ce polymère, aussi bien à l'adsorption des protéines qu'à l'adhésion cellulaire, ce qui permet de concevoir des matrices avec des sites de reconnaissance cellulaire spécifiques dans un contexte neutre (Lévesque, Lim, & Shoichet, 2005). Avec une telle surface de biomatériau résistante à l'adsorption de cellules/protéines comme point de départ, un contrôle précis des interactions cellulaires voulues peut être réalisé par greffage chimique du type de ligand d'adhésion souhaité, à la densité appropriée (Massia, Stark, & Letbetter, 2000). Il a été rapporté qu'un certain nombre d'hydrogels à base de dextrane vont sans doute se rendre aux études cliniques pour la livraison de protéines thérapeutiques dans les prochaines 5 années et les chances de résultats positifs sont assez élevées (Van Tomme & Hennink, 2007).

Les peptides et les protéines sont souvent utilisés dans le développement de nouveaux hydrogels, car ils présentent certaines caractéristiques avantageuses. L'incorporation de peptides dans des biomatériaux peut être effectuée en utilisant plusieurs réactions chimiques assez spécifiques, y compris par la chimie "Click", par l'addition de Michael de résidus cystéine à un résidu vinyl-

sulfones ou maléimide, par une réticulation initiée par les rayons ultraviolet ou encore par ligation chimique native. Les peptides peuvent être incorporés dans les biomatériaux pour leur conférer un certain nombre de fonctions telles qu'induire (i) une adhésion des cellules sur la surface du matériau, (ii) la liaison d'un facteur de croissance, ou encore (iii) une susceptibilité protéolytique. Pour l'adhésion cellulaire, le peptide le plus fréquemment utilisé est le domaine RGD (Arg-Gly-Asp). L'incorporation de ce motif d'adhésion cellulaire dans les biomatériaux a déjà fait l'objet d'études approfondies dans la littérature qui ont démontré son efficacité avec plusieurs types cellulaires et des substrats polymériques neutres tels que le dextrane ou le polyéthylène glycol (PEG) (Jonker et al., 2012).

Une autre classe de peptides qui a suscité un intérêt de recherche croissant ces dernières années correspond aux peptides qui sont capables de s'auto-assembler pour former des structures secondaires d'hélice α ou de feuillet β . Le couple de peptides Kcoil/Ecoil, très utilisé dans les projets de recherche de notre laboratoire et dont les caractéristiques et les applications seront détaillées dans le prochain chapitre, en fait partie. Ces peptides sont capables de constituer des blocs moléculaires polyvalents et de s'organiser avec une grande précision en une structure bien définie, présentant un niveau très élevé de régularité qui peut être manipulé en fonction de l'application visée au moment de la conception de ces derniers (Koopmans & Aggeli, 2010; Kumar et al., 2011). Des supra-structures à base de peptides s'auto-assemblant dans des conditions physiologiques pour former des gels ont été développées. Ces gels ont suscité beaucoup d'intérêt pour des applications biomédicales et plus particulièrement en génie tissulaire, et ce, pour plusieurs raisons: (i) la polyvalence, puisque l'obtention de structure spécifique peut être facilement prédite pendant la conception et le choix de séquence du peptide, (ii) la capacité de contrôler les propriétés mécaniques du gel en jouant sur le type d'interactions non covalentes (p.e. interactions hydrophobes, liens ioniques), (iii) la possibilité de former des gels *in situ* qui sont peu invasifs pour le patient, (iv) les matériaux peptidiques sont intrinsèquement biodégradables, ce qui permet au matériau de disparaître avec l'apparition du nouveau tissu, enfin, (vi) les gels obtenus sont transparents, une propriété très importante pour leur caractérisation par microscopie optique (Koopmans & Aggeli, 2010; Kumar et al., 2011). D'un point de vue industriel, les brevets concernant des structures obtenues par auto-assemblage de peptides sont peu nombreux puisque la plupart sont encore en instance et le petit nombre qui a été attribué date de moins de 10 ans. De

plus, à l'exception du PuraMatrix™, matrice tridimensionnelle à base de peptides commercialisée par la compagnie "3D Matrix Medical Technology", aucun système de gel auto-assemblé n'est présentement disponible sur le marché biopharmaceutique (Kumar et al., 2011).

Jusqu'à présent, les peptides du couple Kcoil/Ecoil qui s'auto-assemblent pour former une super hélice α , sont produits par synthèse chimique en utilisant la technique de synthèse de peptides en phase solide (SPPS). Or, depuis la découverte de l'ADN recombinant, la production de la majorité des entités biologiques protéiques est rendue possible à moindre coût.

1.2 Problématique du projet

Les peptides Kcoil et Ecoil conçus par le groupe de recherche du Pr. Robert S. Hodges et qui sont très utilisés au sein de notre laboratoire pour des applications biomédicales, présentent une séquence composée de 35 acides aminés. L'étude cinétique des interactions entre ces peptides a montré que la formation du complexe Ecoil/Kcoil est très rapide, alors que sa dissociation est lente. Cette propriété fait de ce dimère un système de capture très efficace pour la préparation de surfaces de biocapteurs et la décoration de nanoparticules pour des applications en thérapie génique (Boucher, C., Liberelle, B., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G, 2009; De Crescenzo, G., Pham, P. L., Durocher, Y., & O'Connor-McCourt, M. D, 2003; Fortier, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y., 2013). Dans ces diverses applications, le peptide Ecoil a été produit sous forme de fusion avec le facteur de croissance épidermique (EGF), tandis que son partenaire Kcoil a jusqu'ici été généré par synthèse peptidique en phase solide (SPPS). Malgré sa maturité, cette technique présente plusieurs inconvénients : un coût prohibitif lorsque la taille du peptide dépasse les 30 acides aminés, des impacts environnementaux non-négligeables et une mise à l'échelle difficile à réaliser. Pour toutes ces raisons, la production biologique dans *E. coli* serait une alternative prometteuse pour la production à grande échelle de ce type de peptides, ce qui permettrait d'envisager de nouveaux champs d'applications pour l'utilisation de l'hétérodimère Kcoil/Ecoil, plus particulièrement la génération de structures tridimensionnelles (p.e. des hydrogels). Le développement d'un hydrogel par auto-assemblage de polymères est prometteur, car il donnerait lieu à une structure tridimensionnelle hautement organisée, stable et présentant des propriétés mécaniques et une porosité facilement modifiables. Cependant, la production biologique du peptide Kcoil est difficile en raison de sa taille et de ses résidus chargés positivement. Son noyau

hydrophobe peut affecter sa solubilité après qu'il soit produit dans le système bactérien, ce qui complique sa purification. De plus, en raison de l'absence de résidus aromatiques, le processus de purification est difficile à caractériser. Enfin, pour ajouter à la complexité de la tâche, pendant la conception de la séquence du peptide Kcoil, un résidu cystéine a été ajouté en N-terminal nécessaire pour le greffage du peptide aux polymères ; ce résidu cystéine s'oxyde rapidement, ce qui limite fortement le rendement de la réaction de greffage.

L'utilisation du dextrane comme polymère hydrophile pour la préparation d'hydrogels est basée surtout sur ses propriétés répulsives vis-à-vis des cellules et des protéines du système circulatoire. L'idée est ici d'avoir une structure de base neutre, véritable point de départ sur lequel il est possible de greffer des peptides choisis pour une conception rationnelle et sélective. Ces derniers peuvent inclure des peptides Kcoil pour le recrutement de protéines étiquetées avec le peptide coil complémentaire ou encore des peptides d'adhésion afin de favoriser le recrutement et l'adhésion cellulaire. L'obtention d'une structure poreuse est nécessaire afin de permettre aux cellules de migrer à l'intérieur de la structure et de proliférer. Dans ce contexte, l'interconnexion des pores est indispensable aussi bien pour l'avancement du tissu cellulaire dans le gel, mais aussi pour faciliter les échanges de métabolites et d'oxygène.

Sachant que le peptide Ecoil a été précédemment produit en fusion avec plusieurs facteurs de croissance, notamment la protéine EGF, l'intégration de ce type de protéines de fusion dans la structure du gel permettrait d'utiliser le peptide Ecoil aussi bien pour la réticulation du gel que pour le greffage d'une biomolécule d'intérêt comme un facteur de croissance.

1.3 Objectifs

1.3.1 Objectif I

Le premier objectif de ce projet de recherche est de développer une nouvelle méthode pour produire le peptide Kcoil à faible coût et permettant d'améliorer les qualités (homogénéité et pureté) du produit fini.

Hypothèse A: Il est possible de biosynthétiser le peptide Kcoil à l'aide d'un système d'expression procaryote et plus particulièrement *Escherichia coli*.

Hypothèse B: La mise en place d'une stratégie d'expression par couplage à une protéine de fusion permet l'amélioration de l'expression du peptide synthétique (Kcoil) sous forme soluble.

1.3.2 Objectif II

Le second objectif de ces travaux de recherche porte sur la conception d'échafaudages moléculaires à base de polymères de dextrane permettant d'obtenir une matrice sur laquelle les cellules peuvent adhérer, migrer et proliférer.

Hypothèse : Le greffage de peptides d'adhésion sur le dextrane ainsi que l'interconnexion des pores de l'hydrogel sont nécessaires à la bonne adhésion puis à la migration des cellules à l'intérieur de la matrice.

1.3.3 Objectif III

Le dernier objectif de ce projet de recherche vise à utiliser le facteur de croissance EGF étiqueté avec un peptide Ecoil au niveau de l'extrémité N-terminale. Cette protéine de fusion pourra ainsi participer à la formation d'un hydrogel dont l'assemblage sera contrôlé par des interactions entre les peptides Ecoil et Kcoil tout en permettant l'incorporation du facteur de croissance épidermique (EGF) dans la structure obtenue.

Hypothèse : La présence d'une double étiquette au niveau de l'extrémités N-terminale de EGF n'affecte pas ou peu son activité biologique.

CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 Les peptides synthétiques

2.1.1 Définition et origine

Les peptides sont des hétéropolymères composés d'acides aminés reliés entre eux par des liens désignés sous le nom de liens peptidiques. Ces liens s'effectuent entre le groupement carboxylique de l'un et le groupement amine de l'autre selon une réaction de condensation. La définition du terme peptide en fonction de la longueur de la chaîne est un peu vague, la longueur communément admise variant de 2 à quelques dizaines de résidus. Les molécules ayant une masse moléculaire qui ne dépasse pas les 6000 Da sont considérées comme des peptides, au-delà de cette taille on parle plutôt de protéines (Guzmán, Barberis, & Illanes, 2007). Les peptides et les protéines jouent tous les deux des rôles essentiels dans de nombreux processus biologiques et physiologiques chez les organismes vivants (Kimmerlin & Seebach, 2005). Ils peuvent être impliqués comme des hormones (l'exemple le plus connu est l'insuline : 51 résidus, 5773 Da) (Guzmán et al., 2007), comme neurotransmetteurs nécessaires à la communication intercellulaire, ils peuvent aussi agir comme des anticorps dans le système immunitaire afin de protéger l'organisme contre les corps étrangers, ils sont aussi requis pour le transport de plusieurs substances à travers les membranes biologiques et ils peuvent jouer un rôle structural (Kent, 2009).

Les expériences d'Anfinson ont décrit pour la première fois le repliement réversible des chaînes peptidiques en étudiant la structure de la Ribonucléase A, ce qui lui a permis de conclure que la structure tridimensionnelle d'une protéine est codée par sa séquence primaire. Toutefois, la conception de protéines artificielles qui s'inspirent de structures naturelles est une tâche ardue; le design de protéines et/ou de peptides « *de novo* » est un domaine de recherche scientifique relativement nouveau (Wayne D. Kohn & Robert S. Hodges, 1998) qui vise à améliorer notre capacité à comprendre, imiter et reconstruire des systèmes naturels. Nos connaissances du vivant peuvent ainsi être améliorées à travers (i) un cycle d'observations et de déduction des règles par lesquelles les complexes protéiques naturels sont formés, suivi (ii) d'essais de création d'analogues synthétiques et enfin (iii) d'une étape de comparaison des résultats au modèle original (E. H.

Bromley & K. J. Channon, 2011). Ainsi, la création de nouveaux peptides et protéines s'inspirant de la nature pourrait permettre de contrôler certains phénomènes biologiques (Wayne D. Kohn & Robert S. Hodges, 1998).

2.1.2 La famille des "coils"

Le motif structural protéique "coiled-coil" est constitué d'au moins deux hélices α qui sont enroulées l'une autour de l'autre pour former la superhélice (Apostolovic, Danial, & Klok, 2010; Heman Chao et al., 1996; Wayne D. Kohn & Robert S. Hodges, 1998; Andrei Lupas, 1996; Y. B. Yu, 2002). Dans la nature, ce motif est ubiquitaire, il a été observé chez presque 10% des protéines eucaryotes (Gevorg Grigoryan & Amy E. Keating, 2008). La largeur de l'hélice ainsi que la longueur de la chaîne des acides aminés font en sorte que sa séquence primaire est caractérisée par un modèle répétitif en heptade **(abcdefg)_n** où **n** représente le nombre des répétitions. L'hélice- α comporte 3,6 acides aminés par tour, ce qui fait en sorte que l'acide aminé en position $(i+7)$ est toujours au-dessus de l'acide aminé en position (i) . Cette propriété est très importante puisqu'elle assure le bon arrangement de la séquence répétitive dans l'espace, d'où le caractère amphiphatique de la structure (hydrophobe d'un côté et hydrophile de l'autre) (E. H. C. Bromley & K. J. Channon, 2011; Wayne D. Kohn & Robert S. Hodges, 1998; Mason & Arndt, 2004; Y. B. Yu, 2002); en effet, les positions **a** et **d** sont généralement occupées par les acides aminés hydrophobes et forment ainsi le cœur hydrophobe de la structure "coiled-coil", qui est aussi appelé "l'interface de l'hélice" alors que les 5 autres résidus sont généralement hydrophiles. De plus, les positions **e** et **g** sont souvent occupées par des résidus de charges opposées, qui peuvent interagir entre eux et qui sont responsables du maintien de la structure de l'hélice grâce à des interactions électrostatiques (Figure 2.1) (Apostolovic et al., 2010; E. H. C. Bromley & K. J. Channon, 2011; Peter Burkhard, Jörg Stetefeld, & Sergei V. Strelkov, 2001; Gevorg Grigoryan & Amy E. Keating, 2008; Wayne D. Kohn & Robert S. Hodges, 1998; Andrei Lupas, 1996; Mason & Arndt, 2004; Y. B. Yu, 2002). Mais il a été aussi démontré que la stabilité de la structure "coiled-coil" est principalement maintenue par l'arrangement des résidus apolaires dans le cœur hydrophobe formant ce qu'on appelle un motif "knobs-into-holes". En effet, le résidu hydrophobe **a** d'une hélice est piégé dans une cavité formée par les résidus **a'**, **d'**, **e'** et **a'** de l'autre hélice (Apostolovic et al., 2010; E. H. C. Bromley & K. J. Channon, 2011; Heman Chao et al., 1996; Gevorg Grigoryan & Amy E. Keating,

2008; Andrei Lupas, 1996; Y. B. Yu, 2002). Cette structure a été décrite en premier par Crick en 1953 en se basant sur une étude aux rayons X de l' α -kératine (Apostolovic et al., 2010; Heman Chao et al., 1996; Andrei Lupas, 1996; Mason & Arndt, 2004; Y. B. Yu, 2002). Cependant des liaisons hydrogènes entre l'acide aminé en position (i) et celui en position ($i+4$) peuvent être à l'origine d'une hélice- α stable (E. H. C. Bromley & K. J. Channon, 2011).

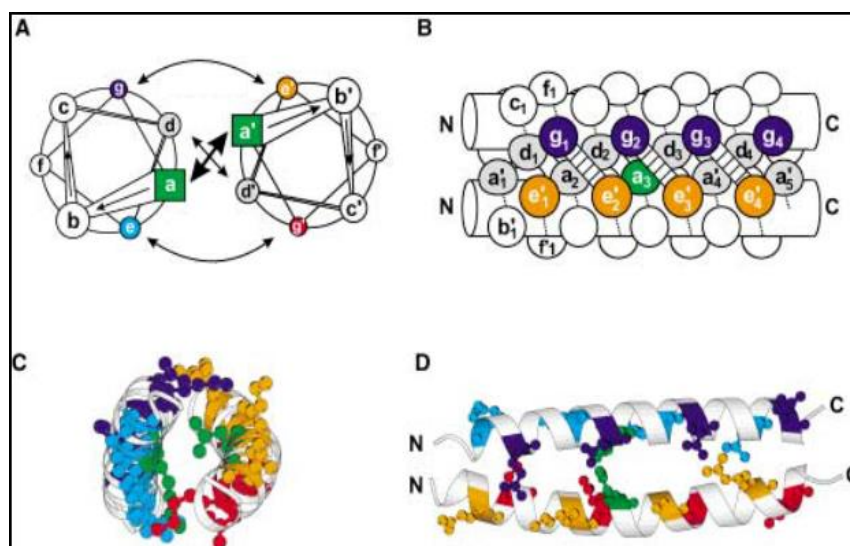


Figure 2.1: Représentation schématique d'un dimère ayant une structure "coiled-coil" parallèle (A et B) et une représentation de la structure déterminée par rayons X du domaine leucine Zipper du GCN4 (C et D) générée par le logiciel moslscrip. Les boules et les bâtons représentent les chaînes latérales. Les panneaux B et D présentent une vue de côté. Les couleurs représentent les résidus a et g d'une hélice et a' et g' de l'autre hélice complémentaire. Les interactions hydrophobes dans la séquence répétitive sont également représentées comme suit : **g** et **g'** en bleu et rouge respectivement ; **e** et **e'** en cyan et orange respectivement). Le cœur hydrophobe est également représenté (**a/a'** et **d/d'**) (Mason & Arndt, 2004)

Malgré sa simplicité, il s'agit d'un motif de repliement polyvalent qui assure une variété de fonctions: il participe à la formation de structures larges et rigides telles que les cheveux, les écailles et les plumes (kératine), ainsi que le caillot sanguin (fibrine) (Andrei Lupas, 1996). Il a été identifié chez les protéines du cytosquelette, telles que la vimentine humaine, les protéines motrices comme la myosine, la kinésine et la dynéine. Il est aussi impliqué dans les systèmes de reconnaissance

moléculaire et les processus de repliement des protéines et peut même former des canaux ioniques (E. H. C. Bromley & K. J. Channon, 2011; Peter Burkhard et al., 2001). Les motifs "coiled-coil" sont également impliqués dans la transduction de signal et ils participent à la stabilité mécanique des cellules. Les études structurales ayant recours à la cristallographie et à la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire ont montré que le domaine "coiled-coil" se trouve sous plusieurs formes d'oligomérisation dans la nature (Figure 2.2). Il peut exister sous forme (i) dimérique chez les facteurs de transcription (comme la boîte MADS qui est un motif commun à tous les facteurs de transcription); (ii) trimérique, tel qu'observé dans les glycoprotéines de la périphérie des virus (HIV, influenza, SARS...); (iii) tétramérique chez les protéines impliquées dans la transcription de l'ADN; et enfin (iv) pentamérique chez les protéines membranaires permettant le transport des ions métalliques divalents (Mg^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} ...) et les petites molécules organiques comme les vitamines, tant chez les eucaryotes que les procaryotes (Apostolovic et al., 2010; E. H. C. Bromley & K. J. Channon, 2011; Gevorg Grigoryan & Amy E. Keating, 2008; Y. B. Yu, 2002). Plus le degré d'oligomérisation augmente, plus le nombre de protéines étudiées ayant la structure "coiled-coil" sous cette forme diminue ; leurs fonctions deviennent aussi plus diverses. Ainsi, la seule protéine naturelle connue contenant le motif "coiled-coil" sous forme hexamérique est l'enzyme cobalamine adénosyl-transférase chez *Lactobacillus reuteri*. Son domaine "coiled-coil" contient 3 dimères antiparallèles. Chacun d'eux est attaché à un domaine enzymatique qui catalyse la dernière étape de la synthèse de l'adénosylcobalamine à partir de la vitamine B₁₂ (Apostolovic et al., 2010). Selon la variété des fonctions assurées par ce type de structure dans la nature, il est clair que le motif "coiled-coil" pourrait fournir un outil polyvalent pour le domaine biotechnologique; ses applications potentielles pourraient notamment inclure le développement de matériaux protéiques ayant des propriétés et des fonctions intéressantes. La relative simplicité du motif pourrait entre autres permettre la mise au point rapide de nouveaux systèmes peptidiques dont la structure et les propriétés peuvent être contrôlés par manipulation de leur structure primaire (Apostolovic et al., 2010; E. H. C. Bromley & K. J. Channon, 2011).

Donc, le design *de novo* des structures "coiled-coil" signifie la construction de nouveaux peptides synthétiques ayant des structures et des propriétés définies. Il est souhaitable que la séquence soit la plus simple possible afin de faciliter les études séquence/structure/fonction. En effet, les structures naturelles "coiled-coil" contiennent souvent des discontinuités dans leurs séquences

primaires (p.e. un saut de résidu, des régions non-hélicoidales, etc.) ce qui les rend moins appropriés pour des études - et des applications - plus avancées (Apostolovic et al., 2010; Peter Burkhard et al., 2001). De plus, certaines structures naturelles "coiled-coil" peuvent former des dimères avec plusieurs partenaires biologiques; cette spécificité réduite pourrait limiter les champs d'application de ce système en biotechnologie ou encore dans le domaine biomédical (Heman Chao, Daisy L. Bautista, Jennifer Litowski, Randall T. Irvin, & Robert S. Hodges, 1998a).

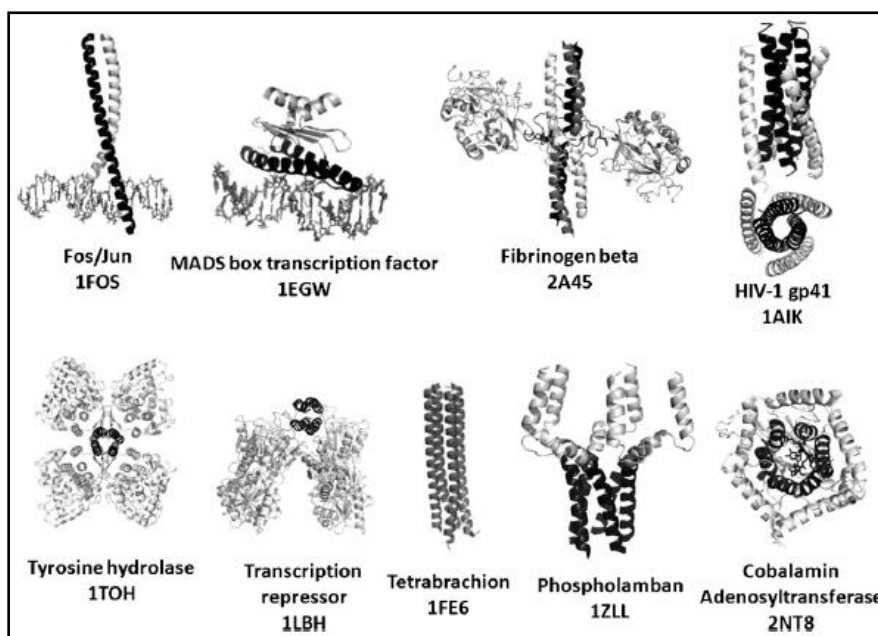


Figure 2.2 : Illustration des structures tridimensionnelles de plusieurs protéines naturelles présentant le domaine "coiled-coil" (Apostolovic et al., 2010).

Les principes de base sur lesquels s'appuie le design *de novo* d'une structure "coiled-coil" affectent la stabilité, le degré et la nature de l'oligomérisation, ainsi que l'orientation des hélices (Apostolovic et al., 2010; Wayne D. Kohn & Robert S. Hodges, 1998; Mason & Arndt, 2004). En effet, la stabilité de la structure est un facteur très important et son contrôle peut se faire en (i) augmentant le nombre des répétitions *n*, (ii) en modifiant la composition du cœur hydrophobe, plus précisément par l'utilisation de résidus plus ou moins hydrophobes aux positions **a** et **d** et enfin (iii) en utilisant des interactions spécifiques entre les acides aminés dans les positions **e** et **g** comme les ponts disulfures, les liaisons lactamates ou des liaisons ioniques (Apostolovic et al., 2010; Heman Chao et al., 1996). Toutefois le nombre d'hélices dans une structure "coiled-coil" est déterminé par l'assemblage des résidus hydrophobes. Il dépend de la nature ainsi que de la

géométrie de la chaîne latérale des acides aminés en positions **a** et **d** (Apostolovic et al., 2010; Andrei Lupas, 1996; Mason & Arndt, 2004). Selon une étude menée par Harbury, le remplacement de la leucine par l'isoleucine a permis de passer d'un dimère à un trimère dans la structure du peptide GCN-p1 (Apostolovic et al., 2010; Andrei Lupas, 1996). Le passage d'une homo- à une hétéro-oligomérisation dépend essentiellement des interactions ioniques entre les acides aminés en positions **e** et **g** et des interactions entre les résidus en **a** et **d** du noyau hydrophobe du peptide (Apostolovic et al., 2010; Andrei Lupas, 1996; Mason & Arndt, 2004). Les acides aminés en positions **e** et **g** doivent être de charge opposée dans un hétérodimère parallèle afin de consolider la structure du peptide, notamment en promouvant les interactions électrostatiques (ioniques) entre le résidu à la position **e** d'un brin du peptide et celui en position **g** du brin complémentaire (e:g'). Dans certains cas, la présence de résidus de charges identiques au niveau de ces positions peut aussi empêcher l'homo-oligomérisation. Enfin, en ce qui concerne l'orientation de l'hélice dans une structure "coiled-coil", elle est principalement dépendante des interactions ioniques entre les acides aminés en position **e** et **g'** qui sont les mêmes interactions électrostatiques responsables de la stabilité de la structure. L'arrangement des hélices se fait comme suit: (i) les interactions de type (e:g') et (g:e') soutiennent la formation d'un hétérodimère parallèle tandis que (ii) les interactions (e:e') et (g:g') permettent la formation d'un hétérodimère antiparallèle (Apostolovic et al., 2010). En plus des interactions électrostatiques entre les 2 brins, les effets hydrophobes peuvent aussi influencer l'orientation hélicoïdale (Apostolovic et al., 2010; E. H. C. Bromley & K. J. Channon, 2011; Heman Chao et al., 1996; Gevorg Grigoryan & Amy E. Keating, 2008). Acharya *et al.* ont réalisé une étude qui consistait à substituer les résidus des positions a-a' au niveau de l'hétérodimère formant le domaine bZIP (domaine se trouvant dans plusieurs facteurs de transcription). Les résultats montrent qu'une homodimérisation est favorisée dans le cas de résidus hydrophobes alors qu'une hétérodimérisation est préférée dans le cas des résidus polaires et chargés (Acharya, Rishi, & Vinson, 2006). Une autre étude réalisée par Oakley et Kim, a montré que la position des résidus polaires peut déterminer l'orientation des deux brins peptidiques (Oakley & Kim, 1998). Ainsi, en se basant sur ces principes, plusieurs constructions de peptide ont été réalisées et une grande variété de peptides synthétiques présentant le motif "coiled-coil" a été rapportée dans la littérature. Le défi à relever lors du design *de novo* des peptides synthétiques présentant le motif "coiled-coil" est la stabilité dans les conditions physiologiques (c.-à-d. température, pH...) : ainsi, le développement

d'une nouvelle génération de matériaux transportant des biomolécules d'intérêt thérapeutique (Apostolovic et al., 2010) nécessite de pouvoir moduler cette stabilité, ce qui était particulièrement d'intérêt dans le cadre de ce projet de recherche.

2.2 L'hétérodimère Ecoil/Kcoil

2.2.1 Propriétés

Comme mentionné précédemment, plusieurs paramètres peuvent influencer la stabilité des structures "coiled-coil". De ce fait, comprendre la formation d'un dimère "coiled-coil" d'un point de vue cinétique s'avère nécessaire. Nous porterons notre attention sur le design d'un hétérodimère "coiled-coil" particulier (composé des peptides coils E et K, chacun composé de 35 acides aminés – Figure 2.3) qui a été réalisé par le groupe de recherche du Pr. Hodges à l'Université d'Alberta. Les deux peptides ont été synthétisés par synthèse chimique en phase solide (SPPS) en utilisant une résine d'hydrochloride de benzhydrylamine et un synthétiseur automatique. Le produit a été purifié par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) (Heman Chao et al., 1996). Plusieurs paramètres ont été pris en considération pour le design de ces deux peptides: (i) la sélection d'acides aminés qui ne perturbent pas la structure d'une hélice, (ii) le placement de résidus apolaires et complémentaires capables de former un cœur hydrophobe stable au niveau des positions **a** et **d**, (iii) le choix de résidus chargés appropriés pour les positions **e** et **g** afin de favoriser une hétérodimérisation plutôt qu'une homodimérisation, (iv) l'introduction d'acides aminés chargés à la position **f** pour améliorer la solubilité, (v) l'équilibrage de la charge nette de chaque hélice- α (peptide E et K seuls) en plaçant des acides aminés de charge opposée à la position **f** par rapport aux positions **e** et **g**, (vi) la sélection d'une séquence peptidique optimale pour une synthèse chimique et, finalement, (vii) le maintien de la stabilité du cœur hydrophobe (Heman Chao et al., 1998a). Les peptides E et K ont été conçus pour former un hétérodimère plutôt qu'un homodimère à pH neutre et en présence de faibles concentrations des 2 peptides. Le cœur hydrophobe est composé de résidus valine (position **a**) et leucine (position **d**), une combinaison très répandue dans les structures "coiled-coil" naturelles. Ce choix a été posé bien qu'il soit connu que ce type de cœur hydrophobe est moins stable qu'un cœur totalement formé de leucine ou d'isoleucine en **a** et leucine en **d**. La combinaison valine et leucine permet d'avoir une plus grande probabilité de

formation de l'hétérodimère en présence de répulsions électrostatiques et elle prévient la formation d'agrégats indésirables en solution. Les résidus glutamate et lysine étaient les meilleurs candidats pour les positions **e** et **g**. Les groupements méthyl de la chaîne latérale de ces acides aminés chargés pourraient contribuer à leur tour à l'hydrophobicité du cœur de la structure. Les répulsions électrostatiques entre ces derniers sont en faveur de la formation d'hétérodimères (E/K) et non pas d'homodimères ((E/E) ou (K/K) - Figure 2.3). Le peptide Ecoil dispose de cinq heptades répétées (g-a-b-c-d-e-f) de la séquence E-V-S-A-L-E-K tandis que la séquence de l'heptade du peptide K est K-V-S-A-L-K-E. Une étude par dichroïsme circulaire des peptides E et K a permis de montrer que la superhélice formée entre ces deux derniers est très stable, surtout en présence de faibles concentrations des peptides (Heman Chao et al., 1998a; Heman Chao et al., 1996). Une étude de stabilité en présence de plusieurs agents dénaturants avait montré que ce complexe résiste à des températures aussi élevées que 85°C (Heman Chao et al., 1998a) et à 6 M d'urée (Heman Chao et al., 1998a; Heman Chao et al., 1996). Même une combinaison d'un chauffage à 85°C et d'une solution de 5 M d'urée est incapable de déstabiliser le complexe E/K coil. L'hydrochlorure de guanidine est le seul agent testé qui était capable de dénaturer le complexe E/K coil. Une autre étude portant sur la stabilité du complexe dans des conditions physiologiques avait montré que chaque peptide est stable, individuellement et en complexe, pour une période de 50 heures sans apparition de signes de dégradation dans du sérum humain à 37°C (Heman Chao et al., 1998a).

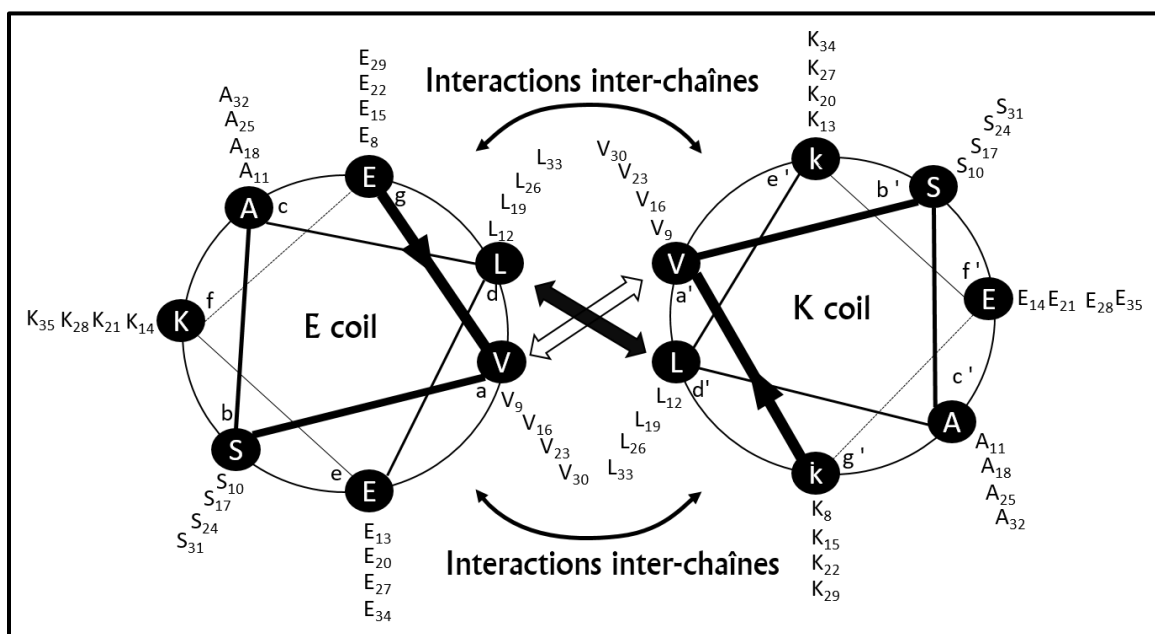


Figure 2.3 : Représentation schématique du dimère E/K coil. Inspirée de (Heman Chao, Daisy L. Bautista, Jennifer Litowski, Randall T. Irvin, & Robert S. Hodges, 1998b)

2.2.2 Applications

La stabilité en solution et la forte affinité entre les deux partenaires E/K coil (K_D de l'ordre du pM) ont fait du complexe E/K coil un outil d'intérêt pour diverses applications dans le domaine de la biotechnologie. L'utilisation du couple de peptides a débuté par le développement d'une méthode de purification des protéines portant une étiquettes Ecoil ou Kcoil (p.e. des anticorps) par chromatographie d'affinité (Heman Chao et al., 1998). L'étude cinétique avait révélé que la formation du complexe s'effectuait rapidement alors que sa dissociation était très lente avec un k_d faible ; ce qui fait du complexe E/K coil un domaine de capture stable et efficace pour la préparation des surfaces des puces des biocapteurs (Heman Chao et al., 1998; De Crescenzo, Pham, et al., 2003; P. U. Le et al., 2009). L'hétérodimère E/K coil a été aussi utilisé avec succès pour l'immobilisation orientée de biomolécules thérapeutiques (p.e. des facteurs de croissance comme l'EGF et le VEGF) (Pauline Lequoy, Frederic Murschel, Benoit Liberelle, Sophie Lerouge, & Gregory De Crescenzo, 2016; Frederic Murschel et al., 2013) et le développement de nanoparticules décorées destinées à la thérapie génique (Charles Fortier et al., 2013).

2.3 Méthodes de production

2.3.1 Synthèse chimique en solution (SPS)

La recherche pour la synthèse des enzymes et d'autres protéines a été l'un des grands défis qu'a connu la chimie organique au XXe siècle. Au début de ce siècle, le chimiste allemand Emil Fischer a essayé de synthétiser des produits naturels, connus sous le nom d'enzymes à ce moment-là, par synthèse chimique totale. Cette méthode se base sur l'utilisation d'un maximum d'approches de protection pour que tous les groupements fonctionnels des acides aminés à greffer soient réversiblement protégés, à l'exception de celui participant à la réaction de greffage. Toutes les réactions sont effectuées dans un solvant organique. Cependant, toutes les approches de synthèse chimique en solution de polypeptides avec une longue chaîne présentent certains inconvénients :

(i) un manque d'intégrité chirale dans la formation des liaisons peptidiques; en effet, l'activation du groupement α -COOH de la chaîne peptidique protégée donne lieu au phénomène de racémisation dans des conditions basiques ; (ii) l'incapacité de purifier et de caractériser le peptide protégé si jamais un contrôle entre les étapes est nécessaire et finalement (iii) une faible solubilité des produits, surtout dans les solvants organiques forts, alors que toute la réaction s'effectue dans ce type de solvants. Donc, la réaction de couplage est très lente et incomplète, et par conséquent beaucoup de sous-produits indésirables sont générés. Cette approche est donc très peu efficace pour la synthèse de peptides de haut poids moléculaire. Pour toutes ces raisons, la technique a été abandonnée rapidement pour être remplacée par la synthèse chimique en phase solide (Kent, 2009).

2.3.2 La synthèse de peptide en phase solide (SPPS)

Le développement de cette technologie remonte au début des années 60 (Kent, 2009; Nilsson, Soellner, & Raines, 2005b; Raibaut, Ollivier, & Melnyk, 2012a), à une époque où la chromatographie échangeuse d'ions sur des billes de polystyrène fonctionnalisées était la principale méthode de purification et d'analyse des petites molécules chargées. C'est R. B. Merrifield qui en est le concepteur alors qu'il travaillait dans le laboratoire de D. W. Woolley à l'Institut Rockefeller à New York. Dans l'approche proposée par Merrifield (Figure 2.4), le premier acide aminé est lié à un support insoluble par une forte liaison (c.-à-d., résistant à tous types de composés chimiques) ; ceci assure que le peptide reste greffé sur le support solide pendant les différentes étapes d'assemblage. A chaque cycle de greffage, l'acide aminé en bout de chaîne est sélectivement déprotégé à chaque fois qu'un résidu supplémentaire est introduit. Chaque réaction est suivie d'une étape de filtration qui permet d'éliminer l'excès de réactifs et les produits secondaires dissous dans le solvant. Une dernière étape de « déprotection » détache le peptide du support. L'approche de Merrifield possède plusieurs avantages, notamment : (i) le rendement de synthèse est élevé, (ii) la technique requiert moins de manipulations et par conséquent la durée du processus est écourtée, (iii) et une réduction significative des pertes de réactifs est observée par rapport à la synthèse en solution. Le développement de cette méthode a valu à Merrifield d'obtenir le prix Nobel de chimie en 1984 (Benoiton, 2016). Six ans plus tard, cette technique a été utilisée pour la production de l'enzyme ribonucléase A (dont la séquence comprend 124 acides aminés) sous une forme biologiquement active (Nilsson, Soellner, & Raines, 2005a; Raibaut, Ollivier, & Melnyk, 2012b).

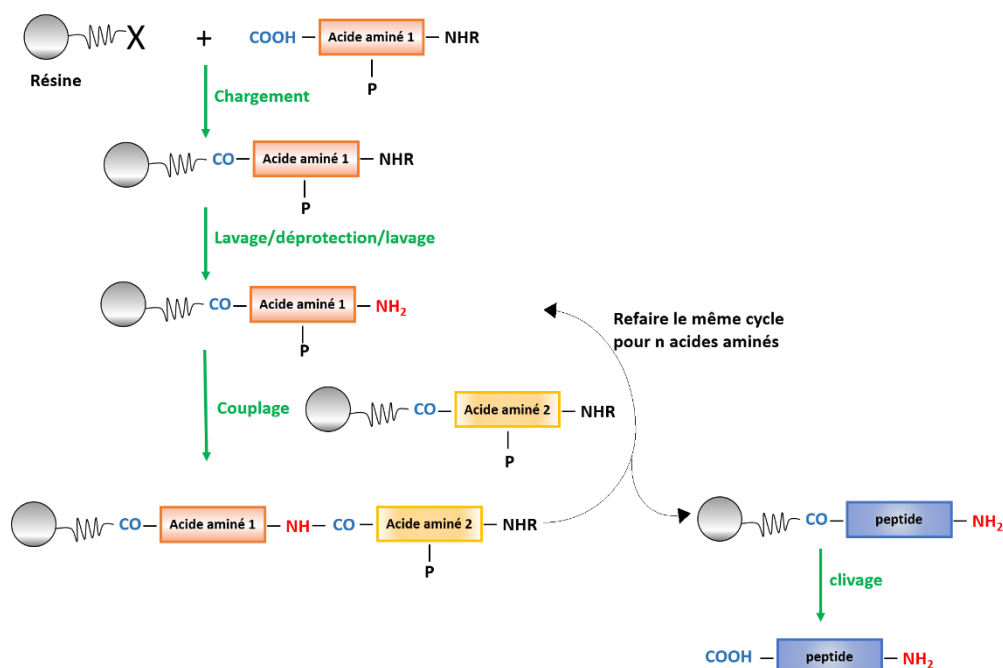


Figure 2.4 : Schéma simplifié présentant les différentes étapes de la synthèse chimique de peptide en phase solide (SPPS)

Au cours des dernières années, la technique n'a pas cessé de s'affiner grâce à la mise au point de plus de 250 groupements pour la protection de la chaîne latérale des acides aminés lors de la synthèse d'un peptide - seul un petit nombre d'entre eux est actuellement utilisé (Guzmán et al., 2007). Les groupements les plus utilisés sont le mélange t-Boc/Bzl où le tert-butoxycarbonyle est utilisé pour la protection de l' α -amine et le benzyle pour la chaîne latérale ou la combinaison Fmoc/tBu où le 9-Chlorure de fluorénylméthoxycarbonyle est utilisé pour la protection de l' α -amine et le tert-butyle pour la chaîne latérale. Ces groupements peuvent être facilement et rapidement éliminés (Guzmán et al., 2007; Nilsson et al., 2005a). Malgré tous les progrès accomplis dans le développement de la technologie de synthèse de peptide en phase solide, elle présente encore quelques limitations dont la principale est la taille du peptide (Kent, 2009; Nilsson et al., 2005a; Raibaut et al., 2012b). En effet, il est difficile d'obtenir un produit homogène avec un bon rendement quand il s'agit de peptide dont la taille dépasse les 50 acides aminés (Choe, Sun, Tan, & Kamei, 2012; Kent, 2009; Wayne D. Kohn & Robert S. Hodges, 1998; Raibaut et al., 2012). Plusieurs spécialistes fixent même cette limite à 40 acides aminés (Altunbas & Pochan, 2012; Nilsson et al., 2005a). Ces dernières années, beaucoup d'efforts ont été fournis afin de résoudre ce

problème de limite de taille. Parmi les solutions proposées, la ligation chimique, en solution ou sur support insoluble, de segments de peptide synthétisés par SPPS est l'une des plus utilisées. Cette méthode permet de produire des peptides de plus grande taille (> 50 acides aminés), par contre elle s'accompagne de beaucoup de pertes puisque chaque segment de peptide est synthétisé et purifié de manière individuelle avant ligation (Raibaut et al., 2012). Malgré tous les efforts fournis pour l'amélioration du rendement de la méthode, la récupération d'un produit fini (c.-à-d. le peptide pur) nécessite encore 4 jours de synthèse et 4 jours de purification, même en utilisant les systèmes automatisés (Benoiton, 2016).

2.3.3 Ligation chimique native (NCL)

Actuellement, la NCL est la méthode la plus courante pour assembler des peptides. La stratégie chimique de la NCL se base sur les réactions observées dans la nature où la formation du lien peptidique se produit par un transfert séquentiel du groupement acyl C-terminal d'une chaîne peptidique en cours de synthèse de l'ARN_t (Nilsson et al., 2005a). En 1953, Wieland *et al.* ont mis en évidence la possibilité d'utiliser cette réaction chimique pour assembler des chaînes peptidiques. La réaction implique la formation d'un intermédiaire thioester contenant le soufre de la cystéine (Nilsson et al., 2005). La réaction d'assemblage natif commence par une étape de capture chimiosélective qui rapproche l'extrémité C-terminale d'un fragment de l'extrémité N-terminale de l'autre fragment à assembler. Cette technique est basée sur une réaction de transthioestérification entre le thioester du côté C-terminal d'un fragment de peptide et la Cystéine du côté N-terminal de l'autre fragment (Figure 2.5) (Raibaut et al., 2012). Elle permet la synthèse de protéines de grandes tailles en ayant recours à un assemblage séquentiel d'au moins trois segments peptidiques déprotégés, mais dont l'un d'eux est attaché à la résine (Raibaut et al., 2012). Le fait de travailler avec des peptides non-protégés permet de réduire le temps de réaction (Nilsson et al., 2005).

La voie de synthèse chimique est souvent la meilleure option technologique pour la synthèse de peptides petits, voire moyens, ce qui est le cas de la majorité des molécules/protéines d'intérêt thérapeutique. Elle est aussi très utile dans les études fondamentales du rapport structure/fonction des protéines, dans la découverte de nouveaux agents de diagnostics ou des agents thérapeutiques et même dans la synthèse de vaccins (Guzmán et al., 2007).

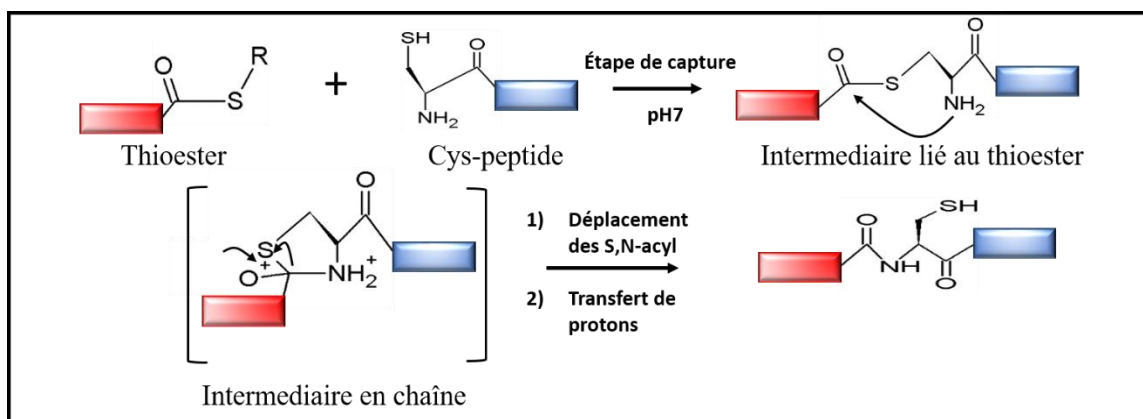


Figure 2.5 : Principe de la ligation chimique native (rectangle bleu : fragment peptidique 1 et rectangle rouge : fragment peptidique 2). Inspirée de (Raibaut et al., 2012)

Parmi les technologies disponibles pour la synthèse de peptides à grande échelle, la synthèse chimique en phase solide (SPPS) est la plus utilisée étant donné qu'elle est la plus développée et la plus mature. Malgré les inconvénients associés à cette approche quand la séquence du peptide dépasse les 10 acides aminés, plusieurs peptides de 30 à 50 résidus maintenant sur le marché sont synthétisés par SPPS. Le rendement de production est fortement dépendant de la taille du peptide, puisque le nombre d'étape est proportionnel au nombre d'acides aminés formant le peptide en lui-même. De plus, la synthèse chimique de peptides fait intervenir des agents de couplage et d'activation, de protection et de déprotection qui sont toxiques, leurs utilisation en grande quantité a donc un effet néfaste sur l'environnement (Guzmán et al., 2007). Tous ces inconvénients ont limité les applications industrielles de plusieurs peptides et ont amené les chercheurs à trouver une alternative à la SPPS pour les produire.

2.3.4 Biocatalyse enzymatique

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui interviennent dans le métabolisme cellulaire. Pour pouvoir utiliser une enzyme dans un processus de biocatalyse, il faut qu'elle soit assez robuste pour pouvoir résister aux conditions ardues d'un procédé industriel. Ceci implique généralement des modifications de l'enzyme afin de produire un biocatalyseur stable. Les enzymes protéolytiques comprennent un groupe d'hydrolases qui est le plus pertinent d'un point de vue technologique pour la synthèse de peptides. Ce groupe représente environ la moitié du marché mondial d'enzymes, avec des ventes annuelles d'environ 3 milliards de \$US. En effet, les protéases

ne sont pas seulement capables de catalyser le clivage des liens peptidiques, mais aussi leur formation. La subtilisine, la chymotrypsine, la trypsine, et la papaïne sont des protéases qui ont été largement utilisées pour la synthèse de peptides. Elles ont été sélectionnées en se basant sur leur spécificité par rapport aux acides aminés, ce qui inclut toutes les exo- et endo-protéases commerciales disponibles (Guzmán et al., 2007). Elles peuvent être d'origines animale, végétale ou microbienne. Les protéases présentent certaines propriétés qui ont fait d'elles de bonnes candidates pour être utilisées comme biocatalyseurs : elles sont assez robustes et stables, ne nécessitent pas de cofacteur et elles sont hautement stéréo- et régiosélectives. L'utilisation des protéases dans un milieu non-aqueux permet une synthèse des liens peptidiques et non pas leur hydrolyse. Malgré les bonnes propriétés catalytiques des protéases, celles-ci ne font pas d'elles la meilleure stratégie de synthèse de peptide. Leur spécificité ainsi que leur sélectivité peuvent limiter leur potentiel, particulièrement dans le cas des peptides de grande taille. Toutefois, la synthèse enzymatique des peptides est une technologie en cours de développement : il n'y a pas à ce jour de protocole standard qui puisse être utilisé ou encore moins mis à l'échelle. Donc, jusqu'à présent, la productivité de la synthèse enzymatique des peptides est largement inférieure à celle de la synthèse chimique et très désavantageuse si l'on considère les coûts élevés des biocatalyseurs sur le marché (Guzmán et al., 2007).

2.3.5 La biologie synthétique

D'une manière générale, la biologie synthétique englobe le design et la synthèse de structures inspirées de la nature (c.-à-d. un nouveau design permettant d'obtenir une structure particulière ou reproduire une structure naturelle en apportant des modifications). L'objectif principal de cette discipline hybride est le même que la chimie synthétique, mais les moyens adoptés par chacune sont différents. La synthèse chimique se base sur la chimie organique pour produire des molécules artificielles, tandis que la biologie synthétique repose sur la biologie moléculaire pour reproduire ou imiter les structures naturelles. Ce domaine de recherche est relativement nouveau, et tend vers un développement concerté et intégratif de diverses disciplines telles que la chimie, la physique, la biologie et l'ingénierie pour un développement de procédés industriels et pour leur intégration (Malinova, Nallani, Meier, & Sinner, 2012).

2.3.5.1 Système d'expression

Le domaine de recherche de la biologie synthétique a été proposé par Waclaw Szybalski en 1974 comme la suite logique de la biologie moléculaire. Le développement des technologies de l'ADN recombinant à ce moment a rendu envisageable la création de génomes et d'organismes synthétiques. Ce nouveau domaine de recherche se base essentiellement sur le génie génétique afin de permettre (i) le design et la production de composés ou systèmes biologiques qui n'existent pas dans la nature ou (ii) de reconstruire des systèmes naturels avec ou sans modifications. La principale stratégie adoptée pour atteindre ces objectifs est le génie biomoléculaire pour introduire de nouvelles fonctions à une cellule hôte afin de produire des molécules d'intérêt (E. H. C. Bromley & K. J. Channon, 2011). Le gène codant pour la molécule d'intérêt peut être intégré dans un plasmide, qui est ensuite utilisé pour transformer une cellule hôte, comme par exemple les cellules d'*Escherichia coli* (E. H. C. Bromley & K. J. Channon, 2011; Choe et al., 2012). Tout le matériel biologique utilisé pour la production de la protéine recombinante, comme les vecteurs et les cellules hôtes, devrait être génétiquement stable pendant toute la période de culture. La cellule hôte devrait être capable de croître dans un milieu de culture simple afin de réduire les coûts de production et devrait être assez robuste pour résister aux conditions d'un procédé industriel. Des organismes bien caractérisés, capables de croître en présence d'une source de carbone très simple et peu coûteuse, sont toujours favorisés d'un point de vue industriel. Toutefois, la majorité des cellules hôtes utilisées vont spontanément et rapidement se débarrasser du gène étranger codant pour la protéine d'intérêt, afin de minimiser la charge métabolique liée à l'ADN étranger. Pour remédier à ce problème, le groupe de recherche de Blattner a réussi à développer une souche d'*Escherichia coli* capable de maintenir un ADN étranger stable à l'intérieur des cellules tout au long du processus de production de la protéine recombinante (Pósfai et al., 2006). En fait, ils ont enlevé la partie codant les éléments relatifs à la mobilité ainsi que les gènes de virulence du chromosome bactérien. La souche cellulaire développée présentait un taux de croissance similaire à celui de la souche sauvage, alors que sa productivité était excellente (Keasling, 2008). La dernière décennie a connu un grand progrès dans le développement de systèmes de production de protéines recombinantes, ce qui sous-entend la découverte d'un grand nombre de systèmes d'expression, d'organismes hôtes et de stratégies de transformations (Pines & Inouye, 1999). En effet, *Escherichia. coli* était le premier organisme hôte qui a été utilisé pour l'expression d'un gène recombinant il y a presque 40

ans (Sorensen, 2010). *E. coli* demeure jusqu'à présent un très bon organisme pour la production de protéines recombinantes à la fois à l'échelle de laboratoire qu'en industrie, parce que ce système d'expression présente plusieurs avantages tels que (i) un taux de croissance élevé, (ii) des besoins nutritionnels simples, et (iii) une bonne stabilité génétique. En plus de la simplicité de sa manipulation génétique, ce microorganisme a la capacité d'accumuler une grande quantité de protéines (au moins 20% du total de ses protéines cellulaires). Cela rend *E. coli* une cellule hôte attractive pour la production à grande échelle de protéines recombinantes (Pines & Inouye, 1999). Cependant, dans le cas d'un gène d'origine eucaryote, le taux d'expression peut être assez faible avec formation de corps d'inclusion dont la manipulation, nécessaire pour récupérer le produit d'intérêt, est difficile et rend les processus de production et de purifications plus complexes. Dans ce cas, il est préférable de ne pas utiliser *E. coli* comme système d'expression, notamment si des modifications post-traductionnelles comme la glycosylation sont requises (Sorensen, 2010). Pendant les dernières 15 années, *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) a aussi été grandement utilisée pour résoudre les problèmes de modifications post-traductionnelles dans le cas de protéines eucaryotes (p.e. dans le cas de l'insuline, de l'interferon- α et de l'antigène de l'hépatite B) (Shen et al., 2016). En se fiant à la base de données du serveur "PubMed", l'utilisation de *P. pastoris* comme système d'expression est passée de 4% à 17% du total des gènes recombinant rapportés entre 1995 et 2009 (Figure 2.6). Cependant, durant cette période, l'utilisation d'*E. coli* comme système d'expression n'a pas évoluée ($\approx$ 60% des gènes recombinant rapportés dans tous les journaux indexés dans PubMed). L'utilisation des levures pour la production de protéines recombinantes a connu un tel progrès car (i) le génome de *P. pastoris* a été entièrement séquencé, (ii) les conditions de culture sont simples et les niveaux d'expression de protéines intra- ou extracellulaires peuvent atteindre des taux assez élevés, (iii) ces cellules permettent un repliement efficace de la plupart des protéines eucaryotes puisqu'elles sont capables d'effectuer certaines modifications post-traductionnelles comme la glycosylation. Toutefois, *P. pastoris* est une levure méthylotrophe qui utilise du méthanol comme source de carbone. Dans la plupart des cas, l'expression des protéines recombinantes chez *P. pastoris* est contrôlée par un promoteur du gène de l'alcool oxydase I (AOX1) qui est activé par le méthanol et réprimé par toute autre source de carbone (c.-à-d. glucose, glycérol et éthanol). L'induction de l'expression des protéines recombinantes par le méthanol freine l'utilisation de ce système d'expression car le méthanol est toxique et inflammable, ce qui

complique sa manipulation (Macauley-Patrick, Fazenda, McNeil, & Harvey, 2005; Shen et al., 2016; Sorensen, 2010).

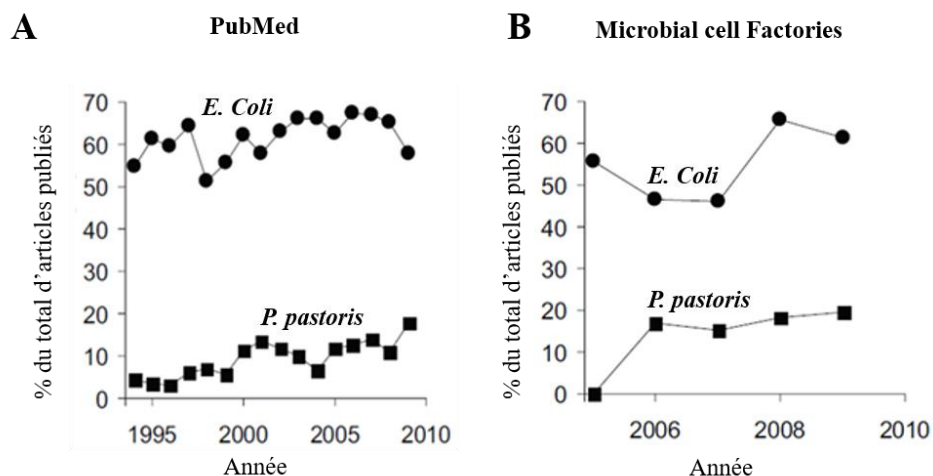


Figure 2.6 : Pourcentage de protéines recombinantes produites chez *E.coli* ou *P. pastoris*. Le pourcentage correspond au nombre total de citations retrouvées en recherchant le terme "recombinant protein" seul ou combiné au nom de l'un des deux organismes sur une période de 15 ans dans la banque de données "PubMed" et de 5 ans pour le journal "Microbial Cell Factories" (Sorensen, 2010).

Les systèmes d'expression alternatifs à *E.coli* et *P. pastoris* ont été originellement développés afin de permettre un meilleur repliement des protéines qui nécessitent l'incorporation des modifications post-traductionnelles, tout en s'efforçant de maintenir un bon rendement de production. Afin de répondre à cette demande, un grand nombre d'études ont porté sur les cellules d'insectes et les cellules mammifères (Sorensen, 2010).

Les cellules de mammifères sont un choix tout indiqué lorsqu'il s'agit de produire des protéines humaines parce qu'elles ont, contrairement aux procaryotes ou aux eucaryotes inférieurs, la capacité de réaliser efficacement le repliement ainsi que les modifications post-traductionnelles (Demain & Vaishnav, 2009; Pham, Kamen, & Durocher, 2006; F. M. Wurm, 2004). Récemment, la productivité des cellules mammifères cultivées dans des bioréacteurs a atteint les grammes par litre dans certains cas, une amélioration des rendements d'un facteur 100 par rapport à des processus similaires dans le milieu des années 1980. Cette augmentation de la productivité volumétrique est principalement le fruit de l'amélioration de la composition des milieux de culture,

du contrôle des procédés (F. M. Wurm, 2004) et du développement de nouvelles stratégies d'expression de l'ADN recombinant (Pham et al., 2006). Un procédé classique de production de protéines recombinantes dans des cellules mammifères commence par une étape de transfection, suivi de l'isolement du clone stable qui exprime la protéine d'intérêt. Pour ce qui est de l'expression stable, les cellules sont transfectées avec un ou plusieurs vecteurs d'expression, suivi d'une phase de sélection (1-2 semaines) en utilisant généralement des antibiotiques. Les cellules recombinantes sélectionnées peuvent être ainsi maintenues en culture pour la production de protéines par une population mixte de cellules comme elles peuvent être utilisées pour la génération de lignées cellulaires stables en utilisant la méthode d'isolement clonal ("Single cell clone") (Hacker & Balasubramanian, 2016). Cependant, cette dernière étape peut prendre des mois avant d'établir une lignée cellulaire productive du gène d'intérêt. Cette lenteur inhérente du procédé a conduit à l'optimisation des méthodes de transfection transitoire (appelée aussi TGE "Transient gene expression") plus adaptées à la production rapide de protéines recombinantes (Wintgens, Lorthioir, Dubot, Sébille, & Amiel, 2015). Cette approche permet de nos jours de réduire le temps nécessaire à la production à environ 10 jours (Figure 2.7). Avec la TGE, plusieurs types de vecteurs ont été utilisés, viraux et non viraux (Baldi, Hacker, Adam, & Wurm, 2007; F. Wurm & Bernard, 1999). Pour développer un processus de TGE optimal à grande échelle permettant l'expression efficace des protéines recombinantes, cinq aspects clés doivent être pris en considération, à savoir (i) la lignée cellulaire, (ii) le vecteur d'expression, (iii) la qualité du plasmide d'ADN nécessaire, (iv) le vecteur de transfection, et (v) le milieu de culture. Un processus de TGE peut être évalué à grande échelle en termes d'efficacité de transfection et de rendement d'expression de la protéine recombinante. L'utilisation des plasmides exprimant les protéines modèles "rapporteur" (p.e. la "secreted alkaline phosphatase" (SEAP) et la "green fluorescent protein" (GFP)) pour la sélection des meilleurs paramètres opératoires est fortement conseillée (Pham et al., 2006; F. M. Wurm, 2004). Parmi les lignées cellulaires les plus utilisées pour la production de protéines recombinantes à grande échelle, on peut citer les "Human embryonic kidney cells" (HEK-293) et les "Chinese hamster ovary" (CHO).

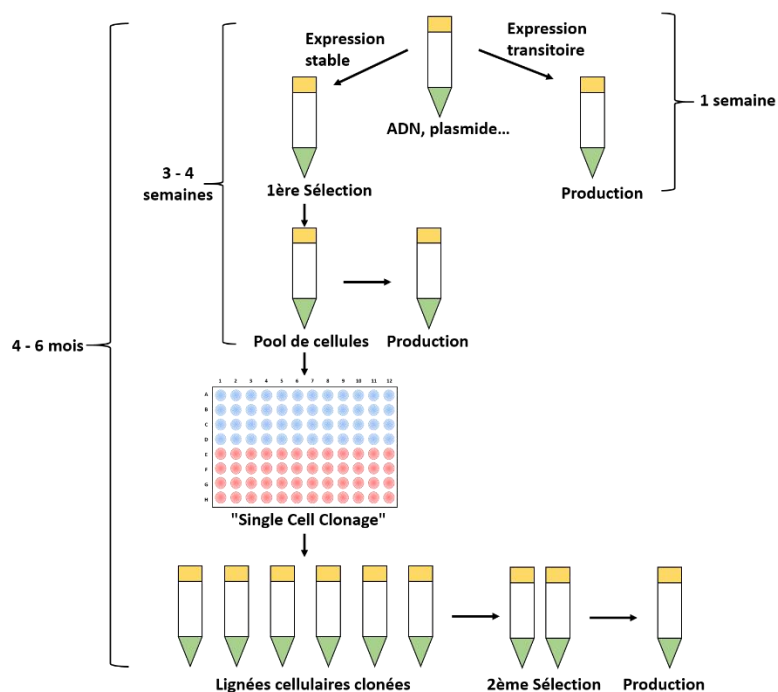


Figure 2.7 : Représentation schématique des stratégies d'expression stable et transitoire des gènes dans le cas de cellules mammifères cultivées en suspension. Inspirée de (Hacker & Balasubramanian, 2016).

Pour conclure, les différents systèmes d'expression décrits dans cette section présentent tous des avantages et des inconvénients et l'expression d'une protéine d'intérêt est toujours influencée par l'aspect fonctionnel de la cellule hôte, raison pour laquelle les chercheurs ont eu recours aux systèmes de transcription/traduction *in vitro*, qui se sont avérés très efficaces dans le cas de produits cytotoxiques, instables et insolubles. Ils permettent également l'incorporation d'acides aminés non-naturels dans la protéine d'intérêt. Des rendements très élevés peuvent-être atteints avec cette approche, car elle ne fait intervenir que la machinerie de traduction isolée. Elle permet d'éviter toute la procédure de clonage et de culture cellulaire et ne nécessite qu'une seule étape de purification (K.-H. Lee, Kwon, Yoo, & Kim, 2010; Martin et al., 2001).

2.3.5.2 Vecteurs de clonage

D'autres éléments sont aussi à considérer en plus du système d'expression dans le développement d'un procédé de production de protéine recombinante, comme le vecteur qui joue le rôle de véhicule de la séquence génétique codant pour la protéine d'intérêt jusqu'à la cellule hôte (Davis,

2012). La stabilité ségrégationnelle du vecteur est très importante pour une manipulation en biologie moléculaire. Il doit à la fois avoir un nombre de copies suffisamment petit pour ne pas entraîner de surcharge à la cellule hôte et en même temps garantir que toutes les cellules hôtes en culture en possèdent une copie et seront par conséquent capables de synthétiser le produit d'intérêt (Keasling, 2008). En plus de la séquence codant pour la protéine ou le peptide d'intérêt, un vecteur de clonage peut contenir une petite étiquette qui servira par après pour la purification de la protéine d'intérêt. Les petites étiquettes les plus utilisées à l'échelle industrielle sont : poly-Arg, FLAG (c.-à-d. DYKDDDDK), poly-His, c-myc (c.-à-d. EQKLISEEDL), S15, Strept II. Ces petites étiquettes facilitent la purification et ont très peu d'effet sur la structure tertiaire et l'activité biologique de la protéine (Baldi et al., 2007; Terpe, 2003). Cependant, dans certains cas, l'utilisation de grandes séquences de peptide ou de protéine en fusion avec le produit d'intérêt (Tableau 2.1) est nécessaire afin d'améliorer la solubilité de ce dernier et/ou son niveau d'expression ; ces protéines de fusion vont essentiellement protéger la cellule hôte de la toxicité du peptide/protéine, mais aussi protéger le produit lui-même de la protéolyse cellulaire. Les plus populaires sont la thiorédoxine, la "Glutathione-S-transférase" (GST), la "Maltose Binding Protein" (MBP) et la "N-utilization substance A" (NusA) (Dominic Esposito & Deb K. Chatterjee, 2006; Vincentelli et al., 2011). Dans le cas où la toxicité de la protéine limite son expression, la fusion de cette dernière à une protéine (p.e. à l'isomérase kétéroïde, KSI) qui va diriger l'expression dans les corps d'inclusion serait une solution de choix (Britton, Hanle, & Robinson, 2012; B. Hartmann, W. Kaar, R. Falconer, B. Zeng, & A. Middelberg, 2008; Yifeng Li, 2011; Majerle, Kidrič, & Jerala, 2000; J. M. Riley, A. Aggeli, R. J. Koopmans, & M. J. McPherson, 2009; Sudhir Sahdev, SunilK Khattar, & KulvinderSingh Saini, 2008; Sharpe, Yau, & Tycko, 2005). D'une manière générale, le choix de la protéine de fusion dépend des propriétés intrinsèques de la protéine ou du peptide d'intérêt (c.-à-d. de sa stabilité, son hydrophobicité, sa charge, sa taille...), du système d'expression et de l'application ultérieure du produit (Baldi et al., 2007; Terpe, 2003). D'après une étude réalisée par Li *et al.* (Yifeng Li, 2012), la thiorédoxine est la protéine de fusion la plus utilisée (c.-à-d. 22%) si l'on considère l'ensemble des peptides antimicrobiens produits dans un système biologique.

La thiorédoxine est une protéine de faible poids moléculaire (~ 12 kDa), très soluble, qui possède une structure assez compacte et très stable lors de changements de température. La thiorédoxine possède aussi un rôle de chaperonne. Elle est recommandée pour la production de peptides

recombinants à cause de sa petite taille. Toutes ces propriétés ont fait de la thioredoxine une protéine de fusion largement utilisée dans le but d'éviter l'agrégation et la formation de corps d'inclusion, et ainsi améliorer l'expression de protéines/peptides recombinants dans le cytoplasme d'*E. coli* (Bals, Schambach, Meyer, Scheper, & Rinas, 2011; Edward R. LaVallie et al., 1993; Edward R. LaVallie, Zhijian Lu, Elizabeth A. Diblasio-Smith, Lisa A. Collins-Racie, & John M. McCoy, 2000; Yifeng Li, 2011).

Li et collègues concluent également que la GST est aussi très répandue (plus de 12% des protéines de fusion utilisées) pour la production des peptides antimicrobiens (Yifeng Li, 2009). La purification d'un polypeptide fusionné à la GST a été décrite pour la première fois en 1988 (Terpe, 2003). La GST est une protéine naturelle de 26 KDa présente dans les cellules eucaryotes. Le gène, isolé à partir du parasite *Schistosoma japonicum*, a été utilisé pour le développement de vecteurs d'expression tels que les vecteurs pGEX (Frangioni & Neel, 1993; Harper & Speicher, 2001, 2011; Smith & Johnson, 1988; Terpe, 2003). Les avantages principaux de ce système contenant la séquence codant pour la GST sont : (i) un taux d'expression élevé de la protéine de fusion (parfois ≥ 50 mg/l de culture d'*E.coli* dépendamment de la taille de la protéine d'intérêt mais qui varie généralement entre 10 et 50 mg/l de culture) et (ii) une simplicité du procédé de purification (Harper & Speicher, 2001). La protéine de fusion peut être purifiée directement à partir du lysat cellulaire par chromatographie d'affinité en utilisant de la glutathione immobilisée sur une matrice de Sépharose. La liaison de la GST à la glutathione est réversible et la protéine de fusion peut être éluee dans des conditions douces et non dénaturantes. Cette étiquette permet de protéger le peptide ou la protéine d'intérêt des dégradations par les protéases intracellulaires et de stabiliser les produits de faibles poids moléculaires (Harper & Speicher, 2001, 2011; Terpe, 2003). De plus, Li Song *et al.* ont démontré qu'il est possible de produire un peptide de 24 acides aminés dans le vecteur pGEX-6p-1 en utilisant la GST comme étiquette. Ces chercheurs ont atteint des taux de 1 mg/l (L. Song, Zhu, Dong, Li, & Liu, 2012). Dans certains cas, le problème d'insolubilité n'est pas résolu avec l'étiquette GST. Ceci dépend vraiment du produit, plus précisément de sa séquence, de sa taille (> 100 KDa), et de la présence de résidus hydrophobes ou chargés (Harper & Speicher, 2001, 2011; Terpe, 2003). L'étiquette GST peut être placée en C- ou N- terminal de la séquence d'intérêt et elle peut être utilisée dans un système bactérien, de levures, de cellules mammifères et même avec les cellules d'insectes (Terpe, 2003).

Tableau 2.1 : Propriétés de quelques protéines de fusion et probabilité de solubilité/insolubilité de la protéine d'intérêt (Gregory D. Davis, Claude Elisee, Denton M. Newham, & Roger G. Harrison, 1999).

Protéine	MW (KDa)	Nombre d'acides aminés	Probabilité de solubilité/insolubilité
NusA (<i>N-utilization substance A</i>)	55	495	95 % soluble
BFR (<i>bacterioferritin</i>)	18.5	158	95% soluble
GrpE (<i>Group E protein</i>)	21.7	197	92% soluble
Thioredoxine	11.7	109	73% soluble
DsbA (<i>Disulfide bond A</i>)	21.1	189	59% soluble
MBP (<i>Maltose binding protein</i>)	38.5	370	55% insoluble
GST (<i>Gluthaione-S-transférase</i>)	26	218	56% soluble
hIL-3 (<i>human interleukin-3</i>)	15.1	133	73% insoluble
bGH (<i>Bovine growth hormone</i>)	21.6	189	85% insoluble
hIFN-α (<i>Human interferon-α</i>)	17.1	146	96% insoluble

Les vecteurs utilisés pour le clonage comportent aussi dans la grande majorité des cas un site spécifique à une protéase (p.e. à la thrombine, la TEV ou au facteur X_a) qui permettra de cliver l'étiquette de la protéine d'intérêt. Le choix de la méthode de clivage se fait lors du design du vecteur d'expression et dépend de plusieurs facteurs. Dans certaines situations, il est nécessaire d'enlever les étiquettes de grande taille afin de ne pas affecter l'activité du produit fini. Ceci peut être réalisé grâce à des enzymes, comme mentionné plus haut, ou en utilisant des réactifs

chimiques. Dans le cas de protéines de fusion insolubles, les réactifs chimiques le plus couramment utilisés sont : (i) le bromure de cyanogène, (ii) l'acide formique et (iii) l'hydroxylamine. Ces réactifs chimiques sont dangereux, en particulier le bromure de cyanogène. En outre, le clivage chimique n'est pas très spécifique ; le bromure de cyanogène clive la chaîne peptidique au niveau de chaque méthionine. Ceci n'est pas le cas de l'acide formique et de l'hydroxylamine, qui clivent tous les deux entre deux acides aminés spécifiques (Asp-Pro et Asp-Gly, respectivement). Cependant, la réaction est très sensible aux variations de température et de pH, et est très affectée par les propriétés de la protéine à cliver (Yifeng Li, 2011; Sudhir Sahdev, SunilK Khattar, et al., 2008). Autrement, les protéines de fusion solubles sont clivées préférentiellement en utilisant des enzymes, certaines d'entre elles peuvent être moins efficaces que les réactifs chimiques – c'est le cas de la thrombine, du facteur Xa et des entérokinases (coûteuses et très sensibles). Mais, la "small ubiquitin-like modifier" (SUMO)-protease et la "Tobacco Etch Virus" TEV-protease sont des enzymes très efficaces, spécifiques et assez robustes (c.-à-d. toujours actives en présence de certaines concentrations d'urée). La SUMO-protease ne peut être utilisée qu'avec son partenaire (c.-à-d. protéine SUMO) car elle reconnaît sa structure tertiaire. SUMO est une protéine de fusion très répandue, qui permet d'améliorer la solubilité de beaucoup de peptides ayant des propriétés structurales bien particulières (A. Prakash, S. Parsons, S. Kyle, & M. McPherson, 2012; Satakarni & Curtis, 2011). En ce qui concerne la TEV-protease, elle reconnaît spécifiquement la séquence ENLYFQ\S et clive rigoureusement entre les résidus Q et S. Elle est très stable et peut être facilement produite aussi bien à l'échelle du laboratoire qu'à l'échelle industrielle (Dominic Esposito & Deb K. Chatterjee, 2006; Yifeng Li, 2011; Sudhir Sahdev, SunilK Khattar, et al., 2008; Terpe, 2003).

Il nous faut aussi mentionner qu'il existe des protéines de fusion qui s'autoclivent dans des conditions particulières (c.-à-d. en présence de réactifs particuliers ou suite à une variation de température ou de pH) à partir du précurseur de la protéine en cours d'être traduite. Malgré la simplicité du processus, l'utilisation de ce type de protéines de fusion présente beaucoup plus d'inconvénients que d'avantages (p.e. autoclivage non contrôlé, requiert dans certains cas une longue période pour qu'il soit complet, rendement faible) (Esipov, Makarov, Stepanenko, & Miroshnikov, 2016; Li, Zheng, Li, & Wang, 2012).

Les promoteurs inductibles, que l'on retrouve aussi sur le vecteur de clonage, constituent une manière très simple et efficace de démarrer l'expression du gène d'intérêt - raison pour laquelle un grand nombre de vecteurs inductibles sont maintenant disponibles pour utilisation aussi bien avec les procaryotes que les eucaryotes. L'agent inducteur le plus utilisé est l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) qui active l'expression des gènes sur un opéron lactose. La seule contrainte avec ces systèmes est l'uniformité de l'induction entre cellules en plus du taux d'induction qui dépend de la concentration de l'inducteur en question (Keasling, 2008; Yarranton, 1992) et de son milieu environnant. Ces contraintes ont conduit au développement de nouveaux milieux de culture auto-inductibles dans lesquels les cellules poussent jusqu'à atteindre une très forte densité avant le début de l'expression de la protéine recombinante. Ainsi, l'auto-induction réduit les risques de toxicité cellulaire et améliore en même temps les rendements de production en comparaison avec ceux obtenus par induction classique à l'IPTG (Kyle, James, & McPherson, 2012; Studier, 2005).

Les vecteurs peuvent également comporter une séquence codant pour un signal de redirection qui, après transcription/traduction, va diriger le produit vers le cytoplasme, le périplasme ou même vers l'extérieur de la cellule. Par exemple, la "outer-membrane-protein-A" (*OmpA*) est une séquence codant pour un peptide qui va diriger la translocation de la protéine recombinante à travers le cytoplasme. Elle est très utilisée pour l'expression de protéine secrétées (Pines & Inouye, 1999).

Lors de la mise à l'échelle industrielle d'un procédé production (kilogrammes ou tonnes, selon le produit), beaucoup de critères qui n'étaient pas pris en considération à l'échelle laboratoire le seront. Les préoccupations majeures seront les coûts de production, la pureté du produit et l'impact environnemental du procédé. Sachant que la majorité des réactifs chimiques coûtent chers, leur utilisation en excès, pratique très courante en chimie afin d'être sûr que la réaction sera complète, n'est plus possible à grande échelle. Mis à part les coûts, la charge environnementale est également un facteur très important à prendre en considération car le surplus d'effluent produit par la synthèse chimique est associé à un coût de plus en plus élevé. L'objectif final d'un procédé de synthèse de peptide à grande échelle est d'obtenir à la fois une viabilité technologique et économique du procédé et de satisfaire les exigences réglementaires en termes de qualité standardisée du produit et de validation du procédé. Un système de bonnes pratiques de fabrication doit être mis en place pour surveiller la reproductibilité du processus, ainsi que la qualité du produit fini. La validation

d'un processus doit tenir compte des rendements des produits secondaires, du produit fini et des déchets, ce qui est très difficile dans le cas de la synthèse chimique si l'on tient compte de la complexité et du grand nombre d'étapes impliquées dans ce type de processus (Guzmán et al., 2007). Toutefois, la taille de la molécule à produire est un facteur d'une grande importance quant au choix du type de technologie pour sa synthèse. La technologie d'ADN recombinant est la plus appropriée pour produire les gros peptides voire les protéines (Guzmán et al., 2007; Wayne D. Kohn & Robert S. Hodges, 1998). Une fois qu'un protocole d'expression et de purification a été établi, la génération d'un grand nombre d'analogues peut être rapidement atteinte. Cependant, le développement du procédé initial, de l'expression et jusqu'à l'obtention d'un produit final pur est, souvent difficile (Wayne D. Kohn & Robert S. Hodges, 1998). En considérant les avantages et inconvénients de chaque technique présentée ci-dessus, il est aisé de conclure que l'adéquation des diverses technologies dépend fortement de la biomolécules d'intérêt (Guzmán et al., 2007).

2.4 Hydrogels

2.4.1 Description

Un hydrogel est un réseau tridimensionnel fortement hydraté, obtenu en réticulant des polymères hydrophiles (Altunbas & Pochan, 2012; Gasperini, Mano, & Reis, 2014; Kopeček, 2007; Peppas, Huang, Torres-Lugo, Ward, & Zhang, 2000; Peppas, Slaughter, & Kancelberger, 2012; Xu & Kopeček, 2008). Cette structure absorbe l'eau (c.-à-d. jusqu'à l'équivalent de 1000 fois son poids sec), ou toute autre solution aqueuse, mais demeure insoluble (Jonker et al., 2012; Kopeček & Yang, 2012; Peppas et al., 2000; Peppas et al., 2012; Xu & Kopeček, 2008). L'aspect mou et la porosité de la structure sont à l'origine de la diversification de leurs applications biomédicales (Coviello, Matricardi, Marianecci, & Alhaique, 2007). Le premier hydrogel reporté remonte à 1960, quand Wichterle *et al.* ont obtenu un gel transparent à base de 2-hydroxyethyl methacrylate (Hoffman, 2012; Ko et al., 2013). Ce gel présentait une structure très prometteuse pour la préparation de lentilles de contact. Depuis cette découverte, les publications rapportant de nouvelles structures d'hydrogel sont de plus en plus nombreuses. Ils peuvent correspondre à des homopolymères ou copolymères, mais aussi être obtenus par auto-assemblage de petites molécules en une structure de haut poids moléculaire (Jonker et al., 2012).

2.4.2 Types d'hydrogels

Selon la littérature, les hydrogels peuvent être classifiés de nombreuses façons (Jonker et al., 2012); ils peuvent par exemple être différenciés par le type de liaison reliant les chaînes polymériques entre elles et donnant lieu à la formation du réseau. Ces liaisons peuvent être de type chimique (p.e. liaisons covalentes, photopolymérisation) ou physique (c.-à-d. des enchevêtrements moléculaires, liaisons hydrogènes, liaisons de Van der Waals, interactions hydrophobes, ioniques et électrostatiques). Une combinaison des deux peut aussi avoir lieu (Altunbas & Pochan, 2012; Coviello et al., 2007; Jonker et al., 2012; Nguyen, Huynh, Park, & Lee, 2015; Peppas et al., 2012). Les hydrogels basés sur des interactions de type physique sont fortement sensibles aux perturbations environnementales et plus précisément à des variations de la force ionique, de la température, et du pH (Altunbas & Pochan, 2012; Banta, Wheeldon, & Blenner, 2010); ce qui fait d'eux des gels réversibles, une propriété qui peut être attrayante pour des applications bien particulières. Dans le cas d'hydrogels basés sur des liaisons de type chimique, la structure, les propriétés de la chaîne primaire et la densité de la réticulation contribuent toutes aux propriétés globales de la structure obtenue du gel (Banta et al., 2010; Gasperini et al., 2014; Kopeček & Yang, 2009). Toutefois, les hydrogels peuvent être classés selon le caractère ionique de la macromolécule formant le réseau en hydrogel cationique, anionique ou encore amphotère. Cette propriété est très importante puisqu'elle contrôle le comportement de la structure à l'état d'équilibre pendant le processus de gonflement. Les hydrogels peuvent aussi être classés selon la nature de la macromolécule précurseur, qui peut être naturelle ou synthétique. Plusieurs hydrogels ont été synthétisés à partir de molécules naturelles telles que le collagène, la fibrine, l'acide hyaluronique, la gélatine, l'agarose, l'alginate pour ne citer qu'elles (Peppas et al., 2012). Ces hydrogels naturels présentent une structure tridimensionnelle similaire à celle de la matrice extracellulaire, qui fait d'eux des matériaux prometteurs pour des applications biomédicales, en plus de leur biocompatibilité (Jonker et al., 2012; Kopeček, 2007; Gemma Leone & Barbucci, 2009; Peppas et al., 2012). Cependant, les hydrogels synthétiques, obtenus par exemple à partir du PVA (alcool de polyvinyle), du HPMA (*N*-(2-Hydroxypropyl)méthacrylamide), du PEG (polyéthylène glycol) ou du PEA (oxyde de polyéthylène) (Altunbas & Pochan, 2012) sont plus faciles à contrôler pour obtenir des propriétés bien déterminées et plus de reproductibilité d'un lot à un autre, et sont plus faciles à manipuler pour une montée en échelle si une application industrielle est envisagée.

(Altunbas & Pochan, 2012; Peppas et al., 2012). Parmi les polymères naturels utilisés pour la préparation des hydrogels, les polysaccharides jouent un rôle prépondérant, ce qui est dû principalement à trois facteurs. Tout d'abord, la large documentation disponible démontrant le rôle critique des sucres dans la signalisation cellulaire, deuxièmement, le développement de nouvelles techniques de synthèse automatisée d'oligosaccharides et enfin, troisièmement, l'explosion de la recherche en génie tissulaire et le besoin de nouveaux matériaux ayant une activité biologique contrôlable, spécifique et surtout étant biodégradables (Gemma Leone & Barbucci, 2009). Les polysaccharides tels que l'acide hyaluronique, l'alginate, la cellulose carboxyméthylée et le dextrane sont largement utilisés pour la préparation d'hydrogels pour des applications biomédicales (p.e. l'encapsulation et la livraison de cellules vivantes, la livraison contrôlée de protéines) (Coviello et al., 2007; Gemma Leone & Barbucci, 2009); ils sont plus avantageux que les polymères synthétiques parce qu'ils (i) sont déjà utilisés dans le domaine pharmaceutique, donc reconnu par la FDA ("Food and drug administration"), (ii) sont abondants, (iii) sont naturels, (iv) présentent une large variété de compositions et (v) sont faciles à produire, ce qui réduit leurs coûts de production en comparaison avec les polymères synthétiques (Coviello et al., 2007; Pasqui, De Cagna, & Barbucci, 2012).

Nous allons dans les prochaines sections nous intéresser au dextrane dans cette revue de littérature, puisque c'est le polymère qui a été utilisé dans les travaux de recherche menés durant ce projet de doctorat. En effet, le terme "dextrane" a été inventé par Scheibler en 1874 lorsqu'il a découvert cette molécule. Il a déterminé que c'était un polysaccharide, présentant une rotation optique positive et ayant comme formule empirique $(C_6H_{10}O_6)_n$ (Coviello et al., 2007). Le dextrane peut être défini comme un homopolysaccharide bactérien exocellulaire constitué essentiellement d'unités linéaires de glucopyranose reliées entre elles majoritairement par des liaisons de type α -1,6 avec un faible pourcentage de liaisons α -1,2, α -1,3 et α -1,4 (Figure 2.8) (Coviello et al., 2007; Maia, Evangelista, Gil, & Ferreira, 2014; Van Tomme & Hennink, 2007). Ce polymère hautement hydrosoluble est produit dans un environnement riche en saccharose par les bactéries *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* (Maia et al., 2014; Purnama et al., 2015; Silva, Juenet, Meddahi-Pellé, & Letourneur, 2015; Van Tomme & Hennink, 2007). Il est commercialisé sous différents poids moléculaires obtenus par hydrolyse partielle ou par fractionnement de la forme native ayant un haut poids moléculaire et présentant un degré de polydispersité élevé. Le degré de

ramification et le poids moléculaire affectent les propriétés physicochimiques du polymère. Le dextrane de poids moléculaire moyen (c.-à-d. environ $2 \cdot 10^6$ g/mol) est commercialisé à des fins de recherche, cependant celui de faible poids moléculaire (40 000 et 70 000 g/mol), est utilisé depuis plus que 50 ans pour des applications cliniques telles que l'expansion du volume plasmatique, la prophylaxie de la thrombose, l'amélioration du débit sanguin périphérique et l'amélioration rhéologique des larmes artificielles. Dans le cas d'une administration parentérale, le dextrane de faible poids moléculaire (40 000 g/mol ou moins) a une demi-vie de 8 h et est éliminé par clairance rénale. En outre, les dextrans ayant un poids moléculaire plus élevé ont des demi-vies plus longues et sont ensuite dégradés par le système réticulo-endothélial. Le dextrane peut aussi être dégradé par différentes dextranases (α -1-glucosidases) dans divers organes du corps humain, y compris le foie, la rate et le côlon (Maia et al., 2014; Purnama et al., 2015; Van Tomme & Hennink, 2007). Par ailleurs, la molécule de dextrane est riche en groupements hydroxyl, ce qui permet sa dérivatisation et/ou une réticulation subséquente permettant d'obtenir une structure bien particulière. Durant la dernière décennie, les recherches se sont focalisées sur le développement de biomatériaux à base de dextrane - comme les hydrogels - à cause de toutes les propriétés intéressantes que présente ce polymère (Maia et al., 2014; Purnama et al., 2015; Silva et al., 2015; Van Tomme & Hennink, 2007). Un revêtement polymérique à base de dextrane permet en effet d'améliorer les performances des implants, et ceci par un contrôle précis des interactions cellulaires à l'interface tissu/biomatériau. En faisant la conception d'une matrice ou d'un biomatériau, le but est de fournir un substrat provisoire qui favorise une adhésion maximale d'un type cellulaire particulier et, en même temps, qui évite le déclenchement d'une réaction inflammatoire provoquant la formation d'une capsule fibrotique autour de l'implant, qui va l'isoler et empêcher un contact direct avec les tissus environnants. Ayant des propriétés répulsives par rapport aux cellules ainsi qu'aux protéines, le dextrane constitue une matrice neutre avec un signal d'adhésion très faible, et permet ainsi de contrôler les interactions cellulaires avec précision, et ce, par greffage chimique de ligands d'adhésion cellulaire ou de facteurs de croissance voulus (Massia et al., 2000).

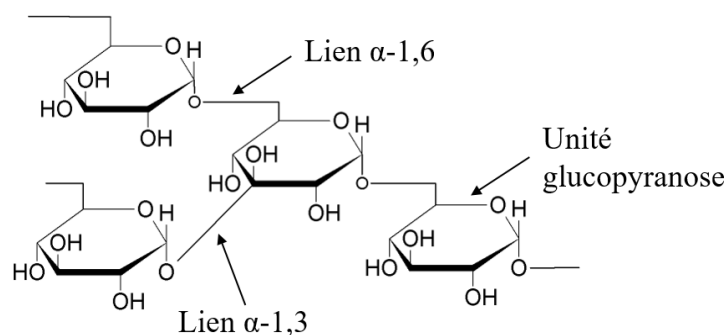


Figure 2.8 : Schéma représentatif de la structure chimique de la molécule de dextrane

Toutefois, les peptides et les protéines peuvent également faire partie de la structure intégrale d'un gel, obtenu par auto-assemblage ou agrégation comme ils peuvent aussi être couplés à des polymères et ainsi donner lieu à des structures hybrides (Altunbas & Pochan, 2012; Jonker et al., 2012; Kopeček & Yang, 2012; Peppas et al., 2012).

2.4.3 Principales applications biomédicales

La capacité à retenir une grande quantité d'eau est un facteur commun aux hydrogels et aux tissus vivants naturels, ce qui rend l'utilisation des gels très avantageuse pour diverses applications biomédicales (Coviello et al., 2007). La conception d'une matrice ou hydrogel ainsi que la sélection des matériaux adéquats pour une application spécifique dépendent de plusieurs variables, y compris les propriétés physiques (p.e., les propriétés mécaniques, de dégradation et de gélification), les propriétés de transfert de masse et les propriétés biologiques (p.e., l'adhésion et la signalisation cellulaire). Trois catégories d'applications biomédicales des hydrogels ont été identifiées : matériau de remplissage d'espace, livraison et distribution de molécules bioactives et transport de cellules/tissus (Drury & Mooney, 2003; Nguyen et al., 2015). Les hydrogels formés *in situ* ont toujours eu un intérêt particulier pour la livraison de biomolécules ou des cellules à un site donné. Les cellules ou les molécules pharmaceutiques peuvent être ajoutées au mélange qui est encore sous forme aqueuse, puis injectées au site cible pour former enfin l'hydrogel. Les gels injectables simplifient la méthode d'implantation, rendant le recours à une intervention chirurgicale optionnel. Pour fabriquer un hydrogel *in situ*, il faut que la réaction de gélification se fasse rapidement, permettant la formation de fortes réticulations entre les chaînes polymériques. De plus, la

gélification doit avoir lieu dans des conditions douces (c.-à-d. pH neutre, 37°C) puisqu'il s'agit d'applications biomédicales (Cabral et al., 2014; Hiemstra, van der Aa, Zhong, Dijkstra, & Feijen, 2007a; Ko et al., 2013; Lin et al., 2010; Pasqui et al., 2012).

2.4.3.1 Livraison de cellules

Dans la plupart des essais cliniques des thérapies à base de cellules, généralement les cellules souches (p.e., les cellules souches mésenchymateuses MSCs, neuronales NSCs et pluripotentes) sont resuspendues dans une solution saline puis sont directement injectées au site d'intérêt en utilisant une seringue ou un cathéter (Burdick, Mauck, & Gerecht, 2016; Hastings et al., 2015; Kabu, Gao, Kwon, & Labhasetwar, 2015). Les résultats de ce type de procédés sont très limités en raison des pertes de cellules pendant l'injection et d'une viabilité réduite (c.-à-d. presque 95% des cellules meurent) causée par des dommages subis pendant le processus d'injection. Les solutions salines n'ont pas la capacité de retenir les cellules sur le site cible, ou encore de répondre aux besoins des cellules vivantes, ce qui va influencer leur comportement, leur aspect et leur viabilité. Une mauvaise rétention des cellules est souvent présentée comme étant le facteur limitant majeur des thérapies à base de cellules. Puisque la régénération du tissu endommagé dépend du nombre de cellules retenues sur le site après injection, l'amélioration de la méthode de greffage des cellules est indispensable pour poursuivre le développement de ce type de thérapie. Une approche qui a beaucoup aidé à améliorer la rétention des cellules au site d'intérêt après injection, est l'utilisation des hydrogels. Les hydrogels présentent une structure interne similaire à celle de la matrice extracellulaire des tissus humains, ce qui a aidé à retenir les cellules injectées au site d'intérêt en fournissant un microenvironnement familier qui soutient la fonction et qui permet de préserver une bonne viabilité cellulaire (Burdick et al., 2016; Hastings et al., 2015).

Un hydrogel peut être conçu comme un simple support structurel fournissant une niche aux cellules ou comme une structure complexe incorporant des facteurs biologiques qui vont guider la croissance cellulaire et tissulaire. Deux principales stratégies sont utilisées : (i) les cellules sontensemencées sur les gels poreux préfabriqués puis elles vont diffuser à l'intérieur ou (ii) les cellules sont encapsulées pendant le processus de gélification (Figure 2.9). Dans la première stratégie, on peut utiliser une large gamme de précurseurs hydrophiles et/ou hydrophobes, et le procédé de fabrication peut impliquer des solvants et/ou des réactifs agressifs, pour autant que le produit final

soit cytocompatible. Toutefois, la structure doit-être assez poreuse pour permettre aux cellules de diffuser à l'intérieur et d'y être piégées. La macro/micro-porosité de certains hydrogels permet non seulement de favoriser l'adhésion cellulaire, mais aussi la réorganisation et la régénération d'un nouveau tissu (Autissier, Le Visage, Pouzet, Chaubet, & Letourneur, 2010; Ferreira et al., 2007; Guerrero et al., 2013). La porosité est très importante pour le développement d'un système de livraison permettant une libération adéquate des cellules. Une étude réalisée par le groupe de Letourneur a rapporté la formation d'agrégats de cellules endothéliales avec une importante mortalité une fois que ces dernières migrent à l'intérieur des échafaudages présentant de larges pores ($\sim 200 \mu\text{m}$), tandis que ceux avec des pores plus petits ($20\text{-}40 \mu\text{m}$) ont permis une meilleure viabilité cellulaire. Dans la même étude, l'interconnexion des pores a été créée en rajoutant un agent porogène (p.e., du chlorure de sodium, du bicarbonate de sodium ou du carbonate de sodium) au mélange réactionnel du gel ou par lyophilisation directement après gélification (Lavergne et al., 2012; V. C. Le & Letourneur, 2009b; Purnama et al., 2015).

En ce qui concerne l'encapsulation (Figure 2.9), la gélification doit se faire dans des conditions douces, ce qui limite significativement le nombre de matériaux et de formulations appropriées. Cette stratégie est souvent utilisable comme système injectable dans lequel les cellules en suspension dans une solution de précurseurs liquide sont livrées *in vivo* au site d'intérêt. En outre, par durcissement de l'hydrogel directement au niveau du site d'intérêt, la solution de précurseurs peut diffuser dans le tissu adjacent, conduisant à une meilleure adhérence de l'échafaudage sur le tissu (Ferreira et al., 2007; Nicodemus & Bryant, 2008). La première encapsulation des cellules a été rapportée par Lim et Sun en 1980 (Lim, F., & Sun, A, 1980). Depuis cette percée, les recherches sont orientées vers l'optimisation des matériaux destinés à cette fin. De nombreux travaux ont été proposés permettant l'encapsulation des cellules aussi bien dans le cas d'une xénotransplantation que dans le cas de la régénération d'un tissu. Une grande partie des structures tridimensionnelles destinées à ce genre d'applications est préparée à partir de polymères naturels en raison de leur ressemblance inhérente à la matrice extracellulaire de plusieurs tissus humains (Gasperini et al., 2014). Les hydrogels sont attrayants pour la livraison de cellules et le développement d'un tissu <a cause de leurs structures polymériques hautement hydratées, qui ressemblent beaucoup à la matrice extracellulaire. Ainsi ils peuvent fournir un support dans lequel les cellules peuvent adhérer, proliférer et se différencier (Drury & Mooney, 2003; Peters, Christoforou, Leong, Truskey, &

West, 2016). Ces structures peuvent également fournir des signaux chimiques aux cellules par l'incorporation de facteurs de croissance et de signaux mécaniques, ce qu'on appelle la "biofonctionnalisation" des matériaux (S. T. Lee et al., 2010). Actuellement, les hydrogels sont testés comme véhicule de livraison de cellules pour une large gamme de tissus, y compris le cartilage, les os, les muscles, la graisse, le foie et les neurones (Drury & Mooney, 2003; Mao et al., 2016). Par exemple, l'alginate a été largement utilisé afin d'évaluer le potentiel des hydrogels pour la réparation du cartilage *in vivo*. Les chondrocytes ont été incorporés dans des gels d'alginate et le tout a été injecté au site d'intérêt. Les résultats d'études animales avaient montré que les chondrocytes étaient viables et produisaient des protéines de la matrice extracellulaire du cartilage à partir de quatre semaines post-implantation (Drury & Mooney, 2003).

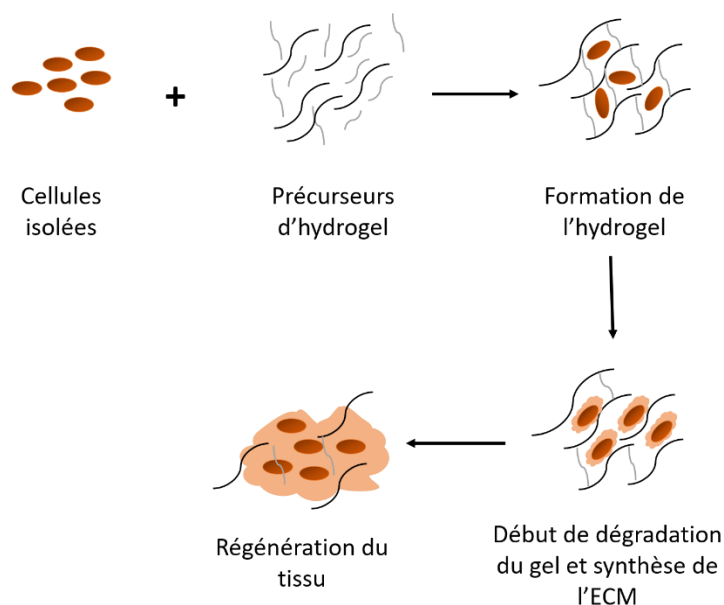


Figure 2.9 : Représentation schématique de la stratégie d'encapsulation des cellules dans un gel biodégradable. Les cellules isolées sont ajoutées au mélange de précurseurs polymériques. Une fois que la réaction de gélification a eu lieu, les cellules se retrouvent encapsulées à l'intérieur de la structure, migrent, prolifèrent et commencent à synthétiser le nouveau tissu. Inspiré de (Nicodemus & Bryant, 2008).

Une fois formé, l'hydrogel présente différentes propriétés de transport en fonction de sa structure, de sa composition chimique et de son degré de réticulation. Cet aspect est fondamental pour permettre aux nutriments d'atteindre les cellules encapsulées, et pour permettre l'élimination des

déchets - influençant directement la survie ou la mort cellulaire à l'intérieur de l'échafaudage. En effet, la matrice d'hydrogel peut agir comme une barrière mécanique et/ou chimique pour les molécules entrantes et sortantes ; l'oxygène, les molécules de signalisation, les nutriments cellulaires et les métabolites devraient être capables de diffuser à travers la matrice sans être bloqués. Donc, la survie cellulaire à l'intérieur de la matrice dépend également de la porosité de la structure permettant l'apport nécessaire en nutriments et l'élimination efficace des déchets métaboliques. De plus, les cellules étant au centre de la matrice d'hydrogel peuvent recevoir une quantité inférieure de nutriments dans un temps donné. Cela signifie qu'un faible taux de transfert massique de nutriments peut être la cause de la mort cellulaire observée. Ceci met l'accent sur l'importance de l'homogénéité de la structure, de sa porosité et de l'interconnexion de ses pores entre eux pour une telle application (Autissier et al., 2010; Gasperini et al., 2014; R. Zhang, Bowyer, Eisenthal, & Hubble, 2007).

2.4.3.2 Livraison de biomolécules actives

Depuis le prix Nobel de Paul Berg en 1972 pour la découverte de l'ADN recombinant, un nouveau monde de produits biopharmaceutiques a vu le jour. En effet, en ayant recours à la biotechnologie moderne, il est possible de produire toute protéine qui pourrait être d'usage thérapeutique (c.-à-d. traiter le cancer, les insuffisances immunitaires ou les maladies infectieuses). Le nombre de protéines recombinantes qui ont été ou sont en phase d'études cliniques au cours des dernières 30 années, est énorme. Toutefois, les protéines/peptides sont des molécules très fragiles et sensibles à la fois à la dégradation physique (c.-à-d. à la température) et chimique (c.-à-d. pH, oxydation, dégradation enzymatique), ce qui peut non seulement engendrer une perte de leur bioactivité, mais aussi le déclenchement d'une réaction immunitaire (Van Tomme & Hennink, 2007).

Alors, la livraison par voie orale, voie non-invasive préférée pour l'administration de médicaments, de ces protéines/peptides thérapeutiques ne serait pas la meilleure façon de procéder à cause du faible pH de l'estomac, de la présence de protéases et des difficultés à passer au travers de l'épithélium intestinal (ce qui conduit à leur évacuation du corps par clairance rénale) (Basan, Gümüşderelioğlu, & Tevfik Orbey, 2007; Drury & Mooney, 2003; Van Tomme & Hennink, 2007). Dans le but de stabiliser (c.-à-d. augmenter le temps de demi-vie) ces protéines thérapeutiques dans le plasma ou à un site bien spécifique ainsi que maintenir leur efficacité, des modifications

spécifiques ont été testées telles que la PEGylation (c.-à-d. conjugaison de la molécule d'intérêt au PEG). Il a été démontré que la PEGylation peut prolonger le temps de circulation des molécules bioactives, ce qui augmente la chance que ces dernières atteignent leur site d'action. Cette stratégie a été utilisée pour la préparation des liposomes contenant la doxorubicine, premier nanomédicament thérapeutiques approuvé par la FDA en 1995. Cependant, il s'est avéré rapidement que ce complexe se dégrade plus rapidement après plusieurs injections répétées, et ce en raison de la production d'IgM. Cette limite démontre le grand besoin de systèmes sophistiqués permettant la livraison locale et le ciblage d'un tissu en particulier pour le traitement de plusieurs maladies et plus particulièrement le cancer (Nicolas, Mura, Brambilla, Mackiewicz, & Couvreur, 2013). À cause de leur forte teneur en eau, leur souplesse et leur structure interne en éponge, les hydrogels sont de bons candidats pour la livraison de protéines/peptides pharmaceutiques (p.e. agents antimicrobiens ou facteurs de croissance) (Basan et al., 2007; Drury & Mooney, 2003; Van Tomme & Hennink, 2007). La livraison systémique (c.-à-d. par voie orale ou intraveineuse) des molécules bioactives est non seulement très coûteuse (car de fortes doses sont recommandées), mais peut aussi causer de sérieux effets secondaires. L'administration systémique de grandes quantités du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) est un bon exemple pour illustrer ce point. Ce facteur de croissance favorise localement l'angiogenèse, mais quand il est administré par voie circulatoire, il peut conduire à des effets secondaires graves, tels que la néovascularisation de tissus non ciblés, l'expansion des plaques athérogènes et la croissance de tumeurs. En outre, de nombreux facteurs, qui sont nécessaires ou bénéfiques pour un tissu, peuvent être toxiques pour d'autres. Ainsi, un véhicule ou un échafaudage permettant une livraison locale et spécifique à un site de tissu cible, est hautement souhaitable dans de nombreuses situations. Pour contourner les contraintes rencontrées avec la livraison systémique du VEGF, ce dernier a été incorporé dans plusieurs types de gels (à base de collagène ou d'alginate) et l'étude de son relargage contrôlé a démontré son efficacité aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Une autre protéine favorisant l'angiogenèse, le facteur de croissance des fibroblastes bFGF, a aussi été libérée sur une longue période de temps par un gel à base d'alginate et d'héparine (Drury & Mooney, 2003).

Le dextrane et ses dérivés sont parmi les principaux polymères prometteurs pour la préparation d'hydrogels biodégradables capables de garantir une libération prolongée de protéines. En fait, ces dernières années, une grande variété de protéines bioactives et de peptides a été produite (en ayant

recours aux outils du génie biotechnologique) et, puisqu'ils présentent une faible biodisponibilité après administration orale, ils ont été généralement administrés par voie parentérale.

Une étude portant sur la livraison de certaines protéines modèles telles que l'immunoglobuline G, l'albumine du sérum bovin, la lysozyme ainsi que le facteur de croissance des fibroblastes basique en utilisant un hydrogel biodégradable à base de dextrane a démontré une libération très lente, entre 12 et 25 jours pour l'IgG, 14 jours pour la lysozyme et 28 jours pour le bFGF (Hiemstra, Zhong, van Steenberg, Hennink, & Feijen, 2007). Différents polymères naturels ou synthétiques, lipides, tensioactifs et dendrimères ont été utilisés pour la préparation de systèmes de livraison efficaces de médicaments ; parmi eux, les polysaccharides, tels que le chitosane et l'alginate (Ribeiro, Morgado, Miguel, Coutinho, & Correia, 2013). Dans certains cas, l'effet thérapeutique nécessite des administrations répétées en raison de l'élimination rapide du système circulatoire malgré l'encapsulation dans un substrat (Coviello et al., 2007). C'est pour ce genre d'applications que l'utilisation des hydrogels pour la livraison locale de biomolécule est limitée. Malgré leurs propriétés physiques attrayantes, la quantité de médicament chargé dans les hydrogels est limitée et la forte teneur en eau de la plupart de ces structures tridimensionnelles implique souvent des profils de libération relativement rapides. De plus, il risque d'y avoir des effets secondaires nocifs pour le patient à cause de fortes concentrations du médicament restantes dans la structure (Ribeiro et al., 2013). Les limites des hydrogels utilisés dans l'administration des médicaments peuvent être franchies par (i) la fonctionnalisation du polymère (p.e. introduction de doubles liaisons comme le glycidyl acrylate dans le cas du dextrane, immobilisation de la biomolécule) ou (ii) incorporation de différents nano- ou micro-dispositifs à l'intérieur de la structure des hydrogels. Ces systèmes auront pour but de protéger toutes les biomolécules actives de la dégradation lorsqu'ils sont en contact avec les liquides physiologiques et permettent ainsi une libération prolongée et ciblée de ces dernières. Ceci est fondamental pour diminuer le nombre de doses thérapeutiques administrées et augmenter l'efficacité du système proposé, comme la libération du facteur de croissance transformant (TGF- β 1) d'un hydrogel à base de dextrane fonctionnalisé (Maire, Logeart-Avramoglou, Degat, & Chaubet, 2005; Ribeiro et al., 2013).

2.4.3.3 Matériau de remplissage provisoire ou permanent

Les agents de remplissage d'un espace tissulaire comprennent toute structure qui fournit une base de fabrication d'un nouveau tissu ainsi que celle qui va favoriser l'adhésion cellulaire et la régénération du tissu. Les exigences fondamentales pour une telle application est la capacité à maintenir un certain volume ainsi que l'intégrité structurale du tissu endommagé pendant un intervalle de temps requis. Ce type d'implants est utilisé pour traiter les incontinences urinaires et le reflux vésico-urétéro-rénal et est très utile tant pour la chirurgie plastique que reconstructive. Les hydrogels ont été largement utilisés pour ce genre d'application. Leur structure similaire à celle de la matrice extracellulaire leur permet de jouer le rôle de support jusqu'à ce que le tissu endommagé se régénère. Il est préférable dans ce cas d'utiliser un matériau à base de polymères ayant des propriétés antiadhésives par rapport aux cellules ainsi qu'aux protéines. Par contre, les hydrogels peuvent aussi être utilisés comme des adhésifs biologiques dans les interventions chirurgicales pour sceller les petites plaies afin d'améliorer l'efficacité des pansements, ce qu'on appelle aussi la "colle biologique". La colle à base de fibrine a été couramment utilisée ainsi, mais maintenant des hydrogels à base de chitosane et de dérivés de chitine sont proposés pour sceller des trous dans l'intestin grêle, l'aorte et la trachée d'après une étude clinique réalisée chez la souris (Drury & Mooney, 2003).

La guérison des plaies est un processus biologique extrêmement dynamique et interactif. Il implique des interactions complexes de molécules de la matrice extracellulaire, des médiateurs solubles, diverses cellules résidentes (fibroblastes et kératinocytes) et des sous-types de leucocytes qui, tous ensemble, agissent pour rétablir l'intégrité du tissu endommagé et le remplacer. Habituellement, le processus de cicatrisation est compliqué, lent et rarement accompagné d'une restauration structurelle et fonctionnelle complète du tissu en question. La peau doit généralement être couverte par un pansement juste après qu'elle a été endommagée afin d'améliorer les chances de sa régénération et de minimiser la perte de ses fonctions. Le substitut cutané, tel que le pansement, sera destiné à l'inhibition du saignement, à la prévention des pertes de liquide et de protéines, au contrôle des perturbations électrolytiques et à l'amélioration de l'aspect esthétique du site de la plaie. Un pansement idéal doit (i) être biocompatible et biodégradable, (ii) prévenir la déshydratation et (iii) avoir de bonnes propriétés mécaniques pour permettre la croissance cellulaire. En outre, il devrait également être poreux pour permettre la diffusion des déchets et des

nutriments. Étant un matériau qui répond à toutes les exigences indiquées plus haut, les hydrogels font partie de ces pansements modernes qui sont en train de se développer sur le marché des biomatériaux. Ils couvrent le site de la lésion et la protègent d'une infection secondaire indésirable. Les hydrogels sont souples et malléables à cause de leur forte teneur en eau, ce qui favorise le processus de guérison, en fournissant un bon environnement hydraté. Ces matériaux contribuent aussi au refroidissement de surface de la plaie, conduisant à une réduction marquée de la douleur chez le patient (Ribeiro et al., 2013). Donc, la conception d'un hydrogel avec des propriétés biomimétiques est critique pour des applications de réparation d'une lésion tissulaire. En plus de la non-toxicité, biodégradabilité, biocompatibilité, certaines propriétés physiques sont indispensables pour la réparation ou la régénération d'un tissu, telles que la porosité, la taille des pores, la structure interne, les interconnexions et la forme. Il a été démontré qu'une structure présentant des pores interconnectés permet non seulement le transport des nutriments et des déchets métaboliques, mais aussi la migration des cellules vers l'intérieur de l'hydrogel ; les cellules vont remplacer le tissu endommagé en même temps que le gel se dégrade après avoir assuré son rôle de support pour les cellules. L'hydrogel doit présenter un minimum de force mécanique qui permet de fournir un bon support structurel aux cellules, promouvoir leur croissance ainsi que leur différenciation, permettant ainsi la régénération tissulaire. Dans ce type d'application, l'hydrogel devrait soutenir la présence de plusieurs types de cellules vasculaires (les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes) et des types de cellules spécifiques d'organes (p.e. des hépatocytes et des cardiomyocytes). Une fois implanté au niveau du site de la lésion, l'hydrogel biodégradable s'intégrera au tissu via des structures microvasculaires et se dégradera rapidement tandis que les nouveaux tissus vont apparaître au fur et à mesure (Sun & Mao, 2012).

Pour conclure, un hydrogel efficace et fonctionnel peut jouer un rôle critique à la fois dans la libération contrôlée et dans l'ingénierie tissulaire. La libération contrôlée peut être un domaine de recherche indépendant, comme il peut faire partie de l'ingénierie tissulaire, puisqu'il intervient dans la distribution des facteurs de croissance et autres molécules normalement présentes dans la matrice extracellulaire. Une structure bien conçue fournit aux cellules des signaux physiques et biochimiques permettant l'adhésion cellulaire, la migration ainsi que la formation de la structure tissulaire envisagée. L'échafaudage finira par se dégrader et sera remplacé par les tissus hôtes. Plusieurs études ont montré que, avec une modification et une formulation appropriée, le dextrane

peut être utilisé pour former des nano/micro-structures pour diverses applications biomédicales, aussi bien l'administration de médicaments que l'ingénierie tissulaire (Sun & Mao, 2012).

2.5 Biofonctionnalisation des biomatériaux

2.5.1 Définition

Pendant le dernier siècle, les biomatériaux comprenaient essentiellement des polymères synthétiques conçus pour être inertes *in vivo* dans le but d'assurer leur fonction sans interagir avec l'organisme. Ces matériaux sont caractérisés par une faible adsorption des protéines, de faibles interactions avec le sang ainsi qu'avec les tissus vivants. Toutefois, au cours des dernières décennies, de nombreux polymères synthétiques ou d'origine biologique ont été étudiés et utilisés afin d'améliorer leur intégration (Vladkova, 2010). Aujourd'hui, les scientifiques essayent de concevoir des matériaux biocompatibles, capables d'induire une bonne croissance cellulaire, l'homéostasie, et une réparation voire une régénération des tissus (Figure 2.10). Plusieurs approches ont été adoptées dans ce but en se basant sur les interactions au niveau de l'interface de contact entre cellule/tissu/sang et surface du substrat. Ceci a été réalisé en ayant recours à des méthodes physicochimiques (p.e., le traitement de la surface par des radiations ionisantes, ou oxydation, ou par photo-lithographie, par traitement plasma ...) et d'autres biologiques (c.-à-d. greffage de molécules bioactives comme les protéines de la matrice extracellulaire ou des petits fragments peptidiques) (Collier, J. H., & Segura, T, 2011; Shim, Shi Kam, Chen, Li, & Dai, 2002; Vladkova, 2010). Pour développer une stratégie efficace afin d'améliorer la biocompatibilité des matériaux, les chercheurs ont eu recours à des méthodes qui font intervenir la chimie, la conception et l'assemblage des peptides ainsi que la science des matériaux sans oublier la biologie fonctionnelle, car ces matériaux doivent également profiter des nouvelles découvertes et de la compréhension de la biologie de la matrice extracellulaire (Collier, J. H., & Segura, T, 2011). Deux approches peuvent-être considérées pour la fonctionnalisation biologique d'un matériau synthétique ou naturel : (i) immobilisation d'une séquence peptidique, telle que le peptide de liaison à l'intégrine, RGD ou (ii) immobilisation d'un domaine protéique ou d'une protéine entière comme les facteurs de croissance (p.e. le facteur de croissance épidermique EGF, ou le VEGF) ou les protéines de la matrice extracellulaire (Boucher et al., 2008; Collier, J. H., & Segura, T, 2011; Frederic Murschel

et al., 2013; Noel et al., 2016). En effet, il semble que l'utilisation des peptides est plus avantageuse par rapport aux protéines à cause de leur stabilité et de leur faible coût. Ils permettent plus de contrôle de leur orientation ainsi que de la densité de greffage. Cependant, ils peuvent, dans certains cas, manquer de spécificité, ce qui affecte fortement leurs fonctions. En effet, les peptides conjugués aux biomatériaux peuvent posséder diverses fonctions en plus de favoriser l'adhésion cellulaire ; ils peuvent induire la susceptibilité protéolytique, la liaison à la surface, la liaison à la matrice, l'auto-assemblage, et la liaison aux facteurs de croissance. Le domaine RGD est le tripeptide le plus utilisé pour des applications biomédicales (Bondalapati, Ruvinov, Kryukov, Cohen, & Brik, 2014; Guillaume Delaittre, Pauloehrl, Bastmeyer, & Barner-Kowollik, 2012; Drumheller & Hubbell, 1994; Ferreira et al., 2007; Joseph R. Klim, Lingyin Li, Paul J. Wrighton, Marian S. Piekarczyk, & Laura L. Kiessling, 2010; Vladkova, 2010). Il a été à l'origine développé comme un produit facile à synthétiser et comme une petite molécule capable de fonctionner de façon analogue à un domaine de la fibronectine. Mais depuis sa découverte et son étude exhaustive, il a été observé dans de nombreuses molécules de la ECM à part la fibronectine telles que la laminine, la thrombine, la vitronectine et le collagène (Collier, J. H., & Segura, T, 2011; Petreaca & Martins-Green, 2011). Le tripeptide RGD se lie au récepteur de type intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Figure 2.10). Il est surexprimé à la surface des cellules malignes et des cellules endothéliales néovasculaires prolifératives de la tumeur alors qu'il est minimalement exprimé chez les cellules endothéliales quiescentes normales. Un peptide RGD cyclique a été développé par Kessler et collègues et sa liaison spécifique aux intégrines $\alpha_v\beta_3$ est 170 fois plus forte que la forme linéaire (Haubner, R., Gratias, R., Diefenbach, B., Goodman, S. L., Jonczyk, A., & Kessler, H, 1996). Ce peptide cyclique a été conjugué à la surface de nanoparticules pour cibler le récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFR). Une fois les nanoparticules fonctionnalisées, elles sont internalisées par les cellules endothéliales. Le peptide a permis l'inhibition de la voie de signalisation de VEGFR et, par conséquent, la propagation de la tumeur (Nicolas et al., 2013).

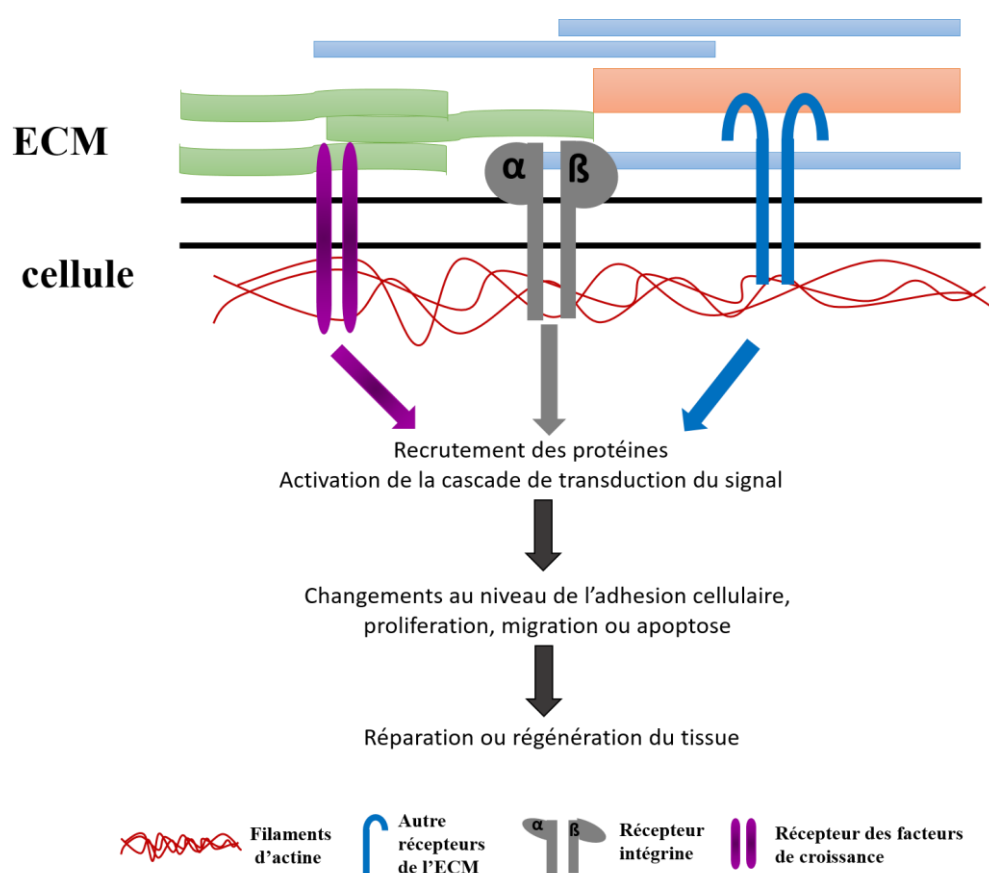


Figure 2.10 : Représentation simplifiée de l'interaction cellule-ECM durant une réparation/régénération d'un tissu. Inspirée de (Petreaca & Martins-Green, 2011)

Les peptides peuvent jouer un rôle structural au sein d'un biomatériau comme, par exemple, l'utilisation de séquences peptidiques susceptibles à une dégradation protéolytique; ces matrices peuvent être conçues pour une dégradation contrôlable par les métalloprotéases ou la plasmine (Collier, J. H., & Segura, T., 2011; James J. Moon et al., 2010; Peters et al., 2016). Les peptides peuvent également être conçus pour s'auto-assembler et jouer un rôle structural dans la formation d'un biomatériau ou comme système de greffage. Plusieurs classes de peptides ont été conçues et exploitées dans la fabrication des biomatériaux en raison de leur propriété d'auto-assemblage. Ceux-ci ont inclus des peptides en feuillet β , des peptides amphiphiles, des peptides formant des structures d'hélices super-enroulées ("coiled-coil") et d'autres. Dans chaque cas, des règles de conception ont été élaborées et suivies afin d'obtenir un assemblage prévisible en fibres, en réseaux ou en gels, ou des stratégies pour décorer des matériaux avec des séquences peptidiques fonctionnelles. La conjugaison des peptides à des matériaux synthétiques peut-être accomplie avec

plus de précision que celle des protéines. Dans certains cas, il peut être difficile d'orienter la biomolécule de telle sorte qu'elle soit positionnée correctement et uniformément sur une surface donnée. En outre, les modifications chimiques nécessaires à la conjugaison de la protéine peuvent également influencer son activité biologique de manière imprévisible. En revanche, les peptides peuvent être incorporés dans des biomatériaux par des méthodes spécifiques, en utilisant une large gamme d'options disponibles sur le marché telles que la réaction d'addition de Michael de peptides contenant des cystéines aux groupements vinylsulfones, la conjugaison par groupement acrylate ou maléimide, la réticulation initiée par les rayons ultraviolet, le couplage acide aminé/acide carboxylique ainsi que des méthodes chimiosélectives telles que la chimie "click" et la ligation chimique native. Toutes ces méthodes sont hautement spécifiques, tandis que l'incorporation covalente de protéines dans des biomatériaux est typiquement obtenue par couplage non spécifique amine/acide carboxylique de la chaîne latérale. Ces types de stratégies d'immobilisation peuvent entraîner une modification aléatoire de la protéine, ainsi, la population de protéines attachées à la surface du substrat sera hétérogène du point de vue de sa conformation, ce qui implique fréquemment une réduction de l'activité de ces dernières (Collier, J. H., & Segura, T., 2011).

Il faut aussi noter les avantages de l'immobilisation des protéines/biomolécules par rapport à la diffusion sous forme soluble. Les stratégies d'immobilisation peuvent prolonger la disponibilité de la biomolécule d'intérêt, permettre un contrôle spatial et réduire les doses requises du facteur de croissance, ce qui peut réduire potentiellement le coût et accroître l'efficacité de divers matériaux bioactifs (Masters, K. S., 2011).

La biofonctionnalisation d'un matériau par immobilisation de biomolécules peut se faire principalement de trois manières : (i) sur une surface plane en deux dimensions avec une couche uniforme de groupements fonctionnels (p.e. des aldehydes, des carboxyls, des hydroxyls ou des esters), (ii) une structure tridimensionnelle comme un gel ou (iii) sur une structure supramoléculaire qui consiste en un revêtement macromoléculaire au-dessus d'une surface 2D (Ajikumar et al., 2007). En outre, la conjugaison peut se faire avant la préparation du substrat (c.-à-d. nanoparticules, hydrogel, nanofibre) ou après, ceci dépendant des propriétés physicochimiques de la protéine/peptide d'intérêt. Le greffage des protéines est de préférence effectué après préparation du substrat parce que la structure secondaire des protéines peut rapidement être affectée en présence de solvants organiques, d'un faible pH ou d'autres conditions expérimentales. Toutefois, en

utilisant cette stratégie, le choix de la méthode de purification du produit de conjugaison doit se faire avec précaution; de plus, la caractérisation nécessite l'utilisation de méthodes avancées comme la XPS ou la ToF-SIMS alors que les méthodes routinières telles que la RMN sont suffisantes pour vérifier la conjugaison dans le cas où elle est réalisée en amont de la préparation de la structure. La seule limite de cette stratégie est la nécessité de revoir le processus de préparation du substrat, que ce soit un gel ou une nanoparticule, en raison des effets du couplage de la protéine/peptide sur les propriétés physicochimiques du précurseur polymérique (Nicolas et al., 2013).

2.5.2 Stratégies d'immobilisation des biomolécules

Pour conserver leur activité biologique, les protéines doivent être immobilisées de telle manière à ne pas affecter leur conformation spatiale ainsi que leur fonction. Généralement, le choix d'une stratégie d'immobilisation appropriée est déterminé aussi bien par les propriétés physico-chimiques de la surface que celles de la protéine en question. Par conséquent, la transposition des stratégies d'immobilisation d'un système à un autre pour différentes classes de protéines est difficile (Federica Rusmini, Zhiyuan Zhong, & Jan Feijen, 2007). De nombreuses techniques d'immobilisation ont été développées ces dernières années qui reposent principalement sur les trois approches suivantes : (i) par liaison non-covalente (p.e. adsorption physique), (ii) par liaison covalente de la biomolécule sur la surface et (iii) par affinité (p.e. une interaction biotine-streptavidine) (Mary Rose Burnham, James N. Turner, Donald Szarowski, & David L. Martin, 2006; Joddar & Ito, 2011; Ju, Xueji, & Wang, 2011; Shim et al., 2002). L'approche non-covalente peut inclure des interactions électrostatiques, des liaisons de type π - π ou encore les forces de Van der Waals. En outre, la conjugaison covalente des biomolécules se fait suivant 3 stratégies principales : (i) réaction chimique directe, (ii) moyennant un espaceur ou encore (iii) en utilisant la chimie "click". L'attachement covalent est généralement préférable à l'adsorption physique non spécifique pour ce qui est de la stabilité et de la reproductibilité de l'étape de fonctionnalisation dans un processus de fabrication d'un biomatériau (Ju et al., 2011).

Dans le cas de l'immobilisation non covalente, les protéines peuvent s'adsorber sur les surfaces par des forces intermoléculaires, principalement des liaisons ioniques, ou hydrophobes et polaires. La population de protéines adsorbées est généralement hétérogène et orientée aléatoirement, puisque

chaque molécule peut avoir plusieurs points de contact avec la surface dans différentes orientations. Le faible attachement et l'orientation aléatoire et non contrôlée de la protéine constituent les deux principaux inconvénients de cette approche d'immobilisation. De plus, les protéines sont souvent attachées de manière covalente en reliant les groupements fonctionnels exposés de leur chaîne latérale au support préalablement modifié à cette fin (Tableau 2.2). Les groupements fonctionnels présents sur la surface sont générés par traitement chimique. Toutefois, la liaison chimique via les acides aminés de la chaîne latérale de la protéine est souvent aléatoire, car elle est basée sur des résidus présents sur la partie extérieure de la protéine. Par conséquent, l'attachement peut se produire simultanément à travers de nombreux résidus, augmentant alors l'hétérogénéité de la population de protéines immobilisées à l'exception du cas où la protéine présente dans sa structure un seul acide aminé actif. L'immobilisation orientée à un site spécifique nécessite l'ajout d'un groupement fonctionnel particulier à la molécule ou à la surface, ou aux deux (Rusmini, F. et al., 2007). La stratégie d'immobilisation appropriée peut dépendre de la chimie du substrat, de la disponibilité des groupes réactifs dans la structure de la biomolécule, de l'emplacement des groupes actifs par rapport à la zone de liaison à son partenaire biologique, de la dimensionnalité du substrat ainsi que de l'intention de créer des modifications en bloc ou en motifs (c.-à-d. la densité de greffage désirée) (Masters, K. S., 2011).

Tableau 2.2 : Groupements fonctionnels fréquemment disponibles dans la structure d'une protéine et les fonctionnalités appropriées sur la surface permettant de générer une liaison covalente. Inspiré de (Rusmini, F. et al., 2007)

Groupement présent à la chaîne latérale	Résidu	Groupements fonctionnels à la surface
-NH ₂	Lysine	Acide acroxylique
	Hydroxyl-lysine	Ester activé (NHS)
		Aldéhyde
		Époxy
-SH	Cystéine	Maléimide
		Disulfide pyridil
		Vinyl sulfone
-COOH	Acide aspartique	Amine
	Acide glutamique	
-OH	Serine	Époxy
	Threonine	

2.5.3 Intermédiaire/espaceur de liaison

Un espaceur/intermédiaire de liaison est un segment placé entre la surface et le motif de liaison aux cellules. Il consiste généralement en une molécule homo/hétérobifonctionnelle qui contient deux groupements réactifs qui peuvent-être utilisés pour un couplage à une protéine ou toute autre macromolécule (Figure 2.11). Le recours à une telle molécule est à l'origine de l'incompatibilité des groupements actifs sur la surface et la molécule biologique à greffer, raison pour laquelle il va jouer le rôle d'intermédiaire entre les deux (Delaittre, G. et al., 2012). Par exemple, une partie du bras espaceur peut contenir un groupement amine réactif alors qu'une autre partie comporte un groupement réactif sulfhydryl. Le but est alors est de jouer le rôle d'intermédiaire entre une surface et une molécule dont la composition chimique est incompatible (Hermanson, 1996). Il peut aussi

être utile quand le composé bioactif perd de son activité lorsqu'il est directement lié à la surface d'un polymère hydrophobe, il jouera alors le rôle d'espaceur (Goddard & Hotchkiss, 2007).

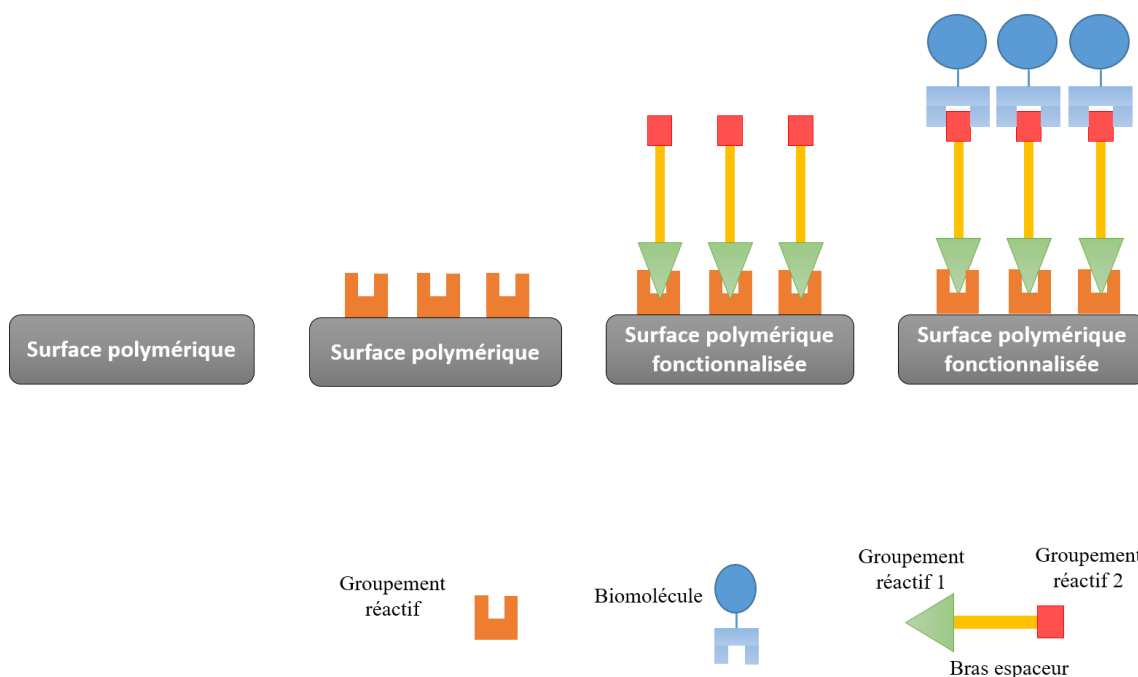


Figure 2.11 : Schéma explicatif de la stratégie d'immobilisation d'une molécule bioactive par liaison covalente et en utilisant un intermédiaire. Inspirée de (Goddard & Hotchkiss, 2007)

Une variété de revêtements polymériques a été utilisée afin de prévenir l'attachement non spécifique des protéines sur les surfaces aussi bien dans le développement de biocapteurs que dans le domaine biomédical. Le polyéthylène glycol (PEG) est l'un de ces polymères. Il a été démontré qu'une surface couverte d'un revêtement polymérique à base de PEG est fortement résistante à l'attachement non spécifique des protéines. L'utilisation d'un espaceur polymérique comme le PEG a permis de réduire les faux positifs dans une étude portant sur la fonctionnalisation de nanotubes de carbone (Shim et al., 2002). Dans une autre étude portant sur l'immobilisation des immunoglobulines G de souris sur une surface de nanoparticules polymériques à base de poly(lactic-co-glycolic acid), l'utilisation du PEG comme intermédiaire a permis de former une sorte de couche de protection qui entoure la nanoparticule et qui la protégerait d'une dégradation rapide par le système réticulo-endothélial. Donc, la conjugaison directe par liaison covalente d'un agent thérapeutique, par exemple un IgG, au PEG a permis l'augmentation de la stabilité de la formulation en augmentant le temps de circulation une fois le système implanté *in vivo* (Betancourt

et al., 2009). L'utilisation d'un intermédiaire hydrophile comme le PEG permet de protéger la biomolécule d'intérêt de la dénaturation après immobilisation, ce qui induit une amélioration de son activité biologique (Goddard & Hotchkiss, 2007).

Une autre approche qui a été adoptée pour développer des surfaces bioactives est l'insertion d'une matrice, comme un hydrogel, qui jouera le rôle d'interface entre la protéine à immobiliser et la surface. Par exemple, un gel de polyacrylamide a été utilisé pour la préparation de micropuces à protéines et à ADN pour des biocapteurs (Burnham, M. R. et al., 2006). Les structures tridimensionnelles ont été efficacement utilisées pour tenter de simuler l'environnement naturel des protéines thérapeutiques pour un meilleur comportement; comme par exemple des membranes poreuses avec une épaisseur limitée (ne dépassant pas les 10 à 100 μm) (Delaittre, G. et al., 2012).

CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT

L'objectif global de la thèse consistait à concevoir et développer un échafaudage supramoléculaire à base de polysaccharide, plus spécifiquement de dextrane, permettant de véhiculer des cellules à un site déterminé. De plus, différentes études réalisées au sein de notre laboratoire de recherche avaient démontré l'efficacité de l'utilisation de l'hétérodimère Kcoil/Ecoil pour l'immobilisation stable et orientée de facteurs de croissance sur divers substrats en deux dimensions. Ce couple de peptides synthétiques s'avérait également être prometteur pour la conception de structures tridimensionnelles telles que les hydrogels. Les hydrogels obtenus par auto-assemblage de précurseurs polymère-peptide présentent plusieurs avantages, et plus particulièrement, le contrôle précis de la structure interne de la matrice (c.-à-d. sa densité de réticulation, la taille de ses pores, sa dégradation...). Mais la seule contrainte avec ce type d'hydrogel est le besoin de quantités assez importantes de matériel peptidique, ce qui est extrême puisque le couple de peptides est présentement produit par synthèse chimique (SPPS). C'est ainsi qu'est apparu le besoin de trouver une alternative à la SPPS permettant la conception d'hydrogels à base de dextrane-peptide "coils" à moindre coût.

Le premier objectif de cette thèse de doctorat était donc de produire le peptide Kcoil dans un système biologique et plus particulièrement chez *E. coli*. Les résultats relatifs à cette partie du projet ont été publiés sous le titre "**Soluble expression, purification and functional characterization of a coil peptide composed of a positively charged and hydrophobic motif**", dans le journal "Amino Acids" en octobre 2015 et présenté dans le chapitre 4 dans ce manuscrit.

De ce fait, ayant réussi à développer un procédé de production et de purification du peptide Kcoil, la conception d'hydrogels à base de peptides "coils" peut alors être possible, ce qui constituait le deuxième objectif de ces travaux. Ce dernier portait sur la conception d'échafaudages moléculaires à base de dextrane-(K/Ecoil) auto-assemblés et permettant d'obtenir une matrice sur laquelle les cellules adhèrent, migrent et prolifèrent. Le greffage du peptide Kcoil sur les chaînes polymériques du dextrane s'est avéré être un autre défi de taille puisque le greffage était difficile à vérifier en

utilisant une des méthodes routinières utilisées pour cette fin, la résonance magnétique nucléaire (RMN). En effet, le greffage a été testé par couplage de thiols entre les vinyl sulfone et la cystéine rajoutée à la séquence peptidique de l'heptade. Cependant le greffage est limité par une réaction parasite d'oxydation qui aboutit à la formation d'homodimères du peptide Kcoil. Des conditions non favorables à la formation de l'homodimère (c.-à-d. absence d'oxygène, de lumière) n'ont pas permis d'améliorer le rendement de greffage du peptide Kcoil sur les chaînes du dextrane. Alors le couple Kcoil/Ecoil a été remplacé par le trisodium trimétaphosphate (STMP) pour la réticulation du dextrane en un réseau tridimensionnel. Ce changement de stratégie a permis d'acquérir au sein de notre laboratoire de recherche une nouvelle expertise dans le domaine des biomatériaux. Les travaux de recherche relatifs à cette partie du projet ont été présentés dans le chapitre 5, sous forme d'article scientifique intitulé " **Impact of RGD amount in dextran-based hydrogels for cell delivery**" et qui a été accepté pour publication au journal "Carbohydrate Polymers" en janvier 2017. L'hydrogel à base de dextrane biofonctionnalisé obtenu a été testé avec des cellules humaines primaires (c.-à-d. "Human Umbilical Vein Endothelial Cells", HUVEC) et après 7 jours de culture, les observations microscopiques ont montré que ces dernières prolifèrent et migrent à l'intérieur de la structure macroporeuse.

Donc l'hydrogel développé peut être utilisé comme une niche dans le but de véhiculer des cellules à un site bien particulier. Il est vrai que l'organisation interne de l'hydrogel est très proche de celle de la matrice extracellulaire et que les macropores créés ont permis l'échange de métabolites nécessaire pour entretenir la croissance cellulaire. Mais la co-immobilisation de facteurs de croissance (comme le facteur de croissance épidermique, EGF) et RGD permettrait d'obtenir une structure biomimétique, ce qui était le troisième objectif de ce projet de doctorat. C'est dans ce contexte que la protéine Cys-Ecoil-EGF a été conçue. Cette protéine doublement étiquetée en N-terminal, participera à la fois à la réticulation des chaînes polymériques de dextrane et à l'immobilisation d'EGF par interaction "coiled-coil". L'étude de la bioactivité de la protéine Cys-Ecoil-EGF immobilisée, en utilisant un test basé sur la résonance plasmonique de surface, a montré qu'elle est fortement influencée par la méthode de greffage sur la surface (c.-à-d. interaction Kcoil/Ecoil ou par couplage thiol). Ce résultat a de nouveau redirigé nos travaux de recherche vers l'identification de la meilleure méthode de greffage de la protéine Cys-Ecoil-EGF sur une surface polymérique tout en préservant son activité biologique. Les résultats obtenus ont été présentés dans

le chapitre 6 du manuscrit, sous forme d'un rapport scientifique intitulé "**Bioavailability of immobilized Epidermal Growth Factor: Covalent versus Non-Covalent Grafting**" et qui a été soumis pour publication dans le journal "Biointerphases" en décembre 2016.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1: SOLUBLE EXPRESSION, PURIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF A COIL PEPTIDE COMPOSED OF A POSITIVELY CHARGED AND HYDROPHOBIC MOTIF

4.1 Présentation de l'article

Le travail présenté dans ce chapitre concerne le premier objectif du projet ; où il était question de développer un procédé de production et purification d'un peptide synthétique (Kcoil) ayant les mêmes propriétés que celui produit par synthèse chimique. Le travail a fait l'objet d'un article scientifique qui a été publié dans le journal "Amino Acids" en février 2016, Volume 48, Issue 2, pp 567–577.

4.2 Entête de l'article

**"Soluble expression, purification and functional characterization of a coil peptide
composed of a positively charged and hydrophobic motif"**

Nesrine Riahi¹, Laurent Cappadocia², Olivier Henry¹, James Omichinski² and Gregory De Crescenzo¹

(1) Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB), Bio-P2 Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montreal, QC, Canada H3C 3A7.

(2) Department of Biochemistry, Université de Montréal, PO Box 6128, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

4.3 Abstract

A *de novo* heterodimeric coiled-coil system formed by the association of two synthetic peptides, the Ecoil and Kcoil, has been previously designed and proven to be an excellent and versatile tool for various biotechnology applications. However, based on the challenges encountered during its chemical synthesis, the Kcoil peptide has been designated as a "difficult peptide". In this study, we explore the expression of the Kcoil peptide by a bacterial system as well as its subsequent purification. The maximum expression level was observed when the peptide was fused to thioredoxin and the optimized purification process consisted of three chromatographic steps: immobilized-metal affinity chromatography (IMAC) followed by cation-exchange chromatography and, finally, reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). This entire process led to a final volumetric production yield of 1.5 mg of pure Kcoil peptide per liter of bacterial culture, which represents a significant step towards the cost-effective production and application of coiled-coil motifs. Our results thus demonstrate for the first time that bacterial production is a viable alternative to chemical synthesis of *de novo* designed coil peptides.

Keywords: *Bacterial production; coil peptide; soluble expression, Thioredoxin*

4.4 Introduction

Coiled-coils are structural protein domains composed of three to five amphipathic alpha helices found in a great variety of proteins (P. Burkhard, J. Stetefeld, & S. V. Strelkov, 2001; Cohen & Parry, 1986; A. Lupas, 1996). Based on naturally occurring structures, a *de novo* heterodimeric coiled-coil system has been previously designed and characterized. It is formed by the association of two synthetic peptides, the Ecoil and Kcoil, each composed of a distinct seven residue repeat (denoted [abcdefg]_n) where n represents repetition number, "a" and "d" positions are occupied by hydrophobic residues, while the "e" and "g" positions are occupied by charged residues. The designed hydrophobic core and electrostatic interactions make this coiled-coil structure very stable (Figure 4.1.A) (H. Chao et al., 1996; G. De Crescenzo, J. R. Litowski, R. S. Hodges, & M. D. O'Connor-McCourt, 2003; G. Grigoryan & A. E. Keating, 2008) whereas each coil component remains monomeric on its own in solution. The creation of such new bio-inspired molecules with enhanced features could find widespread use in a number of biomedical and therapeutic

applications (E. H. Bromley & K. J. Channon, 2011). More specifically, the E/K coiled-coil system has proven to be an excellent and versatile tool for (i) the detection of coil-tagged proteins by Western blot (C. Boucher, St-Laurent, Jolicoeur, Crescenzo, & Durocher, 2010) or ELISA (B. Liberelle, L. Bartholin, et al., 2010), (ii) coiled-coil-mediated protein dimerization (De Crescenzo, Pham, Durocher, Chao, & O'Connor-McCourt, 2004), as well as (iii) stable and oriented capture of coil-tagged proteins onto various surfaces harboring the partner coil peptide for applications in biosensing (H. Chao, D. L. Bautista, J. Litowski, R. T. Irvin, & R. S. Hodges, 1998; G. De Crescenzo, P. L. Pham, Y. Durocher, & M. D. O'Connor-McCourt, 2003) and regenerative medicine (C. Fortier, G. De Crescenzo, & Y. Durocher, 2013; B. Liberelle, C. Boucher, et al., 2010; F. Murschel et al., 2013; Frederic Murschel, Aldo Zaimi, Samantha Noel, Mario Jolicoeur, & Gregory De Crescenzo, 2015). To date, the Ecoil peptide ((EVSALEK)₅ sequence) has been expressed as part of larger fusion proteins produced in mammalian cells (B. Liberelle, C. Boucher, et al., 2010; F. Murschel et al., 2013) or bacteria (V. C. Le & Letourneur, 2009a), whereas the partner Kcoil peptide ((KVSALKE)₅ sequence), has been generated by solid phase peptide synthesis (SPPS) with an N-terminal cysteine residue that is included for immobilization purposes. The SPPS technique has the advantage of allowing the incorporation of unnatural amino acids as well as for rapid production of milligram quantities of the peptide (W. D. Kohn & R. S. Hodges, 1998). However, it presents several drawbacks including expensive processing costs and difficulties associated with mass production. SPPS is indeed a multi-stage process that requires chemical protection/deprotection steps for every introduced residue. The number of steps thus increases chances to produce mismatched peptides, which negatively impacts on the final production yield. This is especially the case for the Kcoil peptide, for which challenges associated with its chemical synthesis have been recently highlighted (Winkler & Tian, 2015). In the laboratory, this may translate into large amounts of final product (>50%) containing errors in the sequence, which in turn imposes costly high-resolution chromatography steps to get the pure Kcoil peptide. Moreover, chemical synthesis of peptides involves significant volumes of coupling and/or activating reagents, which can be aggressive or even toxic to the environment (Guzman, Barberis, & Illanes, 2007). For these reasons, there is an unmet and critical need for the production of long coil peptides using a bacterial expression system in order to further expand the use of these peptides in emerging and promising applications requiring large quantities such as the development of

coiled-coil-based scaffolds (Gerling-Driessen et al., 2015) for tissue engineering (Aronsson et al., 2015; Woolfson & Mahmoud, 2010) and gene delivery (Assal, Mizuguchi, Mie, & Kobatake, 2015).

However, the biological production of the Kcoil peptide poses significant challenges; first of all, because of its size (the 5 heptad repeats and cysteine-containing linker correspond to a 38 amino-acid-long peptide) which makes it very susceptible to intracellular proteolysis and, second, due to the presence of a high density of positively charged residues (2 lysine residues per heptad) that makes it very toxic to the bacteria and, consequently, leads to poor expression. Moreover, the development of a suitable purification scheme is hampered since the hydrophobic core of the coil peptide may affect its solubility and the lack of an aromatic residue in the original sequence precludes its quantification by absorbance measurements at 280 nm. In the present work, we report on the successful recombinant production of a cysteine-labelled Kcoil peptide as an alternative to SPPS. Kcoil expression levels were first compared when fused to three common soluble carrier proteins: thioredoxin (TRX), maltose-binding protein (MBP) and N-utilization substance A protein (NusA), then a culture protocol amenable to large scale was developed and, finally, an efficient purification strategy involving three chromatographic steps was set up.

4.5 Materials and Methods

4.5.1 Chemical and reagents

Orange II sodium salt (92% purity), ethidium bromide (95% purity), cysteine (99% purity), bromophenol blue, imidazole and Coomassie Brilliant Blue (100% purity) were purchased from Sigma-Aldrich Canada, Ltd. (Oakville, ON). Cysteine-tagged Kcoil peptides were chemically synthesized by the peptide facility at University of Colorado (Denver, CO) to be used as control. CM5 sensor chips, HEPES buffered saline (HBS-P), amine-coupling kit (including 2-(2-pyridinyldithio) ethaneamine, PDEA) were obtained from GE Healthcare (Baie d'Urfe, QC). Milli-Q quality water (18.2 M Ω .cm; total organic compounds (TOC) = 4 ppb) was generated with a Millipore Gradient A 10 purification system. Cysteine (99+% purity), acetic acid glacial (99.7% purity), hydrochloric acid (HCl, 37.7% v/v), yeast extract and peptone were obtained from VWR International, Ltd. (Mont-Royal, QC). Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and

Dithiothreitol (DTT) were purchased from INALCO (San Luis Obispo, CA). Ampicillin, sodium chloride (NaCl) and sodium dodecyl sulfate (SDS) were obtained from Fisher scientific (Ottawa, ON). BL21(DE3) competent cells (Novagen) and Tobacco Etch Virus (TEV) protease were generated in house.

4.5.2 Generation of the expression vectors

The EcoRI site of the pET15b vector (Novagen) was first deleted by site directed mutagenesis using the following primers: CAAGAATTATCATGTTTGACAGCTTATC and ATGATAATTCTTGAAGACGAAAGGGC; the deletion was verified by sequencing. Then, two oligonucleotides of sequence CATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGTACCGAAAACCTTGTATTTCCAGGGATCCCCGGGAATTCATCGTGACTGAA and GATCTTCAGTCACGATGAATTCCCGGGGATCCCTGGAAATACAAGTTTTTCGGTACCGCTGCTGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGCC were phosphorylated with the T4 Polynucleotide Kinase (Fermentas, CA), annealed, and ligated in between the NcoI and BamHI sites of the modified pET vector to generate a pET-TEV vector, thereby destroying the original BamHI site and adding a new multiple cloning site. This strategy allows for the production of proteins being His-tagged at their N-terminus where the His tag can be removed by treatment with the Tobacco Etch Virus (TEV) protease. Furthermore, genes can be cloned in between the His tag and the TEV site corresponding DNA sequences by taking advantage of the KpnI site. The genes coding for the thioredoxin (TRX), the N-utilization substance A protein (NusA) and the maltose binding protein (MBP) were amplified using the primers summarized in Table 4.1. PCR amplified products were then digested with KpnI and inserted into the KpnI site of pET-TEV to generate pET-TEV-TRX, pET-TEV-NusA and pET-TEV-MBP vectors. Positive clones were verified by sequencing.

4.5.3 Cloning Kcoil coding sequence

Kcoil DNA coding sequence was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from pIDTBlue:Kcoil plasmid (integrated DNA technology, US) using the primers reported in Table 4.1. Subsequently, the PCR products as well as the different expression vectors already containing

the gene of the protein to be fused to the Kcoil peptide (pET-TEV-TRX, pET-TEV-NusA and pET-TEV-MBP) that had been generated as described above, were double-digested by BamHI and EcoRI restriction enzymes. Kcoil DNA sequence was cloned using a 4:1 ligation ratio (insert/vector) and then transformed in *E. coli* DH5 α competent cells. Positive clones were verified by sequencing.

Table 4.1: Primer sequences used for PCR amplification

Genes	Primers
Thioredoxin	F: CAGC <u>GGTACC</u> CAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGAC
	R: CAGC <u>GGTACC</u> GGCCAGGTTAGCGTCGAGG
Maltose-Binding Protein	F: CAGC <u>GGTACCA</u> AAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGG
	R: CAGC <u>GGTACCT</u> GGGATATCGTAATCAGTCTGCGCG
N-utilisation substance A protein	F: CAGC <u>GGTACCA</u> ACAAAGAAATTTTGGCTGTAGTTGAAGCCG
	R: CAGC <u>GGTACCC</u> GCTTCGTCACCGAACCAGCAAATATTACG
Kcoil	F: CGGGATCCTCGGTGGTAAGGTATCCGCTTTAAAGGAGAAAGTT TCTGC
	R: GCGAATTCTCACTCTTTAAGTGCTGAAACCTTTTCCTTCAAGG

KpnI, BamHI and EcoRI restriction sites are underlined; **F** forward primer, **R** reverse primer.

4.5.4 Screening of expression levels

Plasmids (pET-TEV-TRX, pET-TEV-NusA and pET-TEV-MBP) encoding Kcoil peptide were used to transform BL21(DE3) *E. coli* cells. Single positive transformed colonies were used to inoculate 5 mL of standard LB medium containing ampicillin (100 μ g/mL) and were grown overnight at 37°C in a shaker at 200 rpm. Bacteria pre-cultures were then diluted in 50 mL of LB medium and fusion protein expression was induced by adding 0.7 mM of isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at an optical density (OD) of approximately 0.6 (600 nm). Following an induction period of 5h, cells were harvested by centrifugation (10 min at 3000 rpm) and cellular pellets were re-suspended in 10 mL of lysis buffer (20 mM NaPO₄ pH7.4, 500 mM NaCl, 1 mM

DTT and 0.5 M EDTA) and then sonicated (Branson Sonifier, US) on ice for 30 s. Soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation at 13 000 rpm (30 min) using a microcentrifuge (Thermo Fisher Scientific Inc., US) and each fraction sample was analysed by SDS-PAGE.

4.5.5 Optimization of TRX-tagged Kcoil peptide purification

To prepare the culture, 1 L of overnight pre-culture of BL21(DE3) cells expressing the TRX-Kcoil fusion protein was diluted in 8 L of fresh LB medium containing 100 µg/mL ampicillin. IPTG was then added at a final concentration of 0.7 mM at an OD_{600nm} of approximately 0.6 and the culture was incubated at 37°C for 5 h. The cellular pellet was collected by centrifugation (10 min at 8000 rpm and 4°C) and kept frozen at -20°C until use. Cell disruption was carried out by re-suspension of the cellular pellet in lysis buffer (20 mM PO₄ pH 7.4, 500 mM NaCl and 25 mM imidazole), followed by several cycles through the French press. After an ultra-centrifugation step at 105 000 x g for 1 h at 4°C, the His-tagged TRX-Kcoil fusion protein was purified by ion metal affinity chromatography (IMAC): the supernatant containing soluble proteins was loaded on a Ni²⁺-charged 5-mL His-trap HP column (GE Healthcare, Sweden) using an ÄKTA-purifier UPC 10 system (GE Healthcare, Sweden) and the His-tagged fusion protein was eluted by applying a 25-to-500 mM imidazole gradient (10 min, flow rate of 5 mL/min). Collected fractions were overnight dialyzed against TEV cleavage buffer (25 mM NaPO₄ pH7.4, 125 mM NaCl and 10 mM DTT) at 4°C. The thioredoxin fusion protein was subsequently treated with TEV at an enzyme/substrate ratio of 1:80 (c/c) for 2 h at room temperature and the cleavage mixture was directly injected onto a HiLoad™ 16/10 SP Sepharose® Fast Flow column (GE Healthcare, Sweden) that had been pre-equilibrated with 10 column volumes of phosphate buffer (25 mM NaPO₄ pH7.4, 125 mM NaCl) at 90 cm/h. The column was then eluted using a 125-to-500 mM NaCl gradient (20 column volumes of elution buffer at the same flow rate). Fractions corresponding to the same peak were pooled, concentrated and then subjected to buffer exchange against MilliQ water containing 5% acetic acid at 4°C. Finally, a reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) step was carried out using a C₄ column (Grace Vydac, USA) connected to a Bio-Rad system (Biologic autoflow, US). A linear gradient from 20% to 35% over 15 min of acetonitrile containing 0.05%

trifluoroacetic acid was applied at 8 mL/min to elute the Kcoil peptide. Collected fractions were concentrated and finally lyophilized for storage until needed.

4.5.6 SDS-PAGE analysis

Samples were analysed by SDS-PAGE (non-reducing conditions) on 15% gels and stained by Coomassie Brilliant Blue G-250 after a heat treatment of 10 min at 100°C. 5 µL of Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (Bio-Rad, CA) was used as a pre-stained molecular weight marker for Kcoil peptide detection while PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo-scientific, CA) was used for protein expression monitoring during the production and purification process.

4.5.7 Kcoil peptide characterization

4.5.7.1 Kcoil peptide quantification

The total amount of purified biologically produced Kcoil peptide was estimated by adapting the protocol described by Drogoz et al. for primary amine detection in solution (Drogoz, David, Rochas, Domard, & Delair, 2007). A volume of 900 µL of previously diluted sample were mixed with 100 µL of Orange II solution (0.8 mM) and incubated for 15 min at room temperature. Supernatant absorbance was measured at 484 nm after 30 min of centrifugation at 20 000xg. Absorbance measurements were performed using a UV-2100 Spectrophotometers (Unico, Spain).

4.5.7.2 Mass spectrometry molecular weight verification

Accurate mass measurements were performed on a LC/MSD-TOF instrument (Agilent Technologies) in positive electrospray mode. Protonated molecular ions (M^+H)⁺ and/or sodium adducts (M^+Na)⁺ were used for empirical formula confirmation.

4.5.7.3 Surface Plasmon Resonance (SPR) biosensor assay

The interaction between biologically produced Kcoil and its partner Ecoil peptide was recorded in real-time using a SPR biosensor assay. Chemically synthesised Kcoil was used as positive control. The assay was performed at 25°C as described by Murschel and colleagues (F. Murschel et al., 2013), using a Biacore T100 biosensor instrument with HBS-P as a running buffer. Cysteine-tagged Kcoils (chemically- and biologically-produced) were first immobilized onto distinct CM5 sensor

chip surfaces using standard ligand thiol coupling procedure (F. Murschel et al., 2013). The Ecoil-EGF protein corresponding to an Ecoil peptide/epidermal growth factor (EGF) fusion protein (C. Boucher et al., 2008) was injected on both Kcoil surfaces as well as on a mock surface (activated / deactivated surface) at 100 nM for 15 s at 100 μ L/min. In between Ecoil-EGF injections, surfaces were regenerated by two injections of guanidine hydrochloride (6 M, 15 s each). For a more accurate functional characterization of the biologically produced Kcoil, kinetic experiments were performed by SPR on similar Kcoil peptide surfaces. Several Ecoil solutions at concentrations ranging from 0.5 to 5 nM, were injected over 60 RU of immobilized Kcoil. Control-corrected sensorgrams were analyzed, assuming a simple 1:1 Langmuir binding interaction between Kcoil and Ecoil (Gregory De Crescenzo, Jennifer R. Litowski, Robert S. Hodges, & Maureen D. O'Connor-McCourt, 2003).

4.6 Results and Discussion

4.6.1 Expression of chimeras corresponding to Kcoil peptide fused to three different protein carriers

Since the main objective of the biological production of the Kcoil peptide is to further expand its biomedical applications, the cDNA encoding the Kcoil peptide was designed as depicted in Figure 4.1.B. The cDNA sequence corresponding to the three Cys-Gly-Gly residues that had been included to perform any thiol coupling procedure for Kcoil peptide grafting, were added upstream of the cDNA sequence encoding the Kcoil peptide. The bacterial production of the Kcoil peptide presents a significant challenge because of (i) the peptide size, (ii) its sequence comprising a hydrophobic core combined to positively charged residues. An additional difficulty for process development also came from the impossibility to detect the peptide by absorbance at 280 nm (addition of a tyrosine residue to the original coil sequence to facilitate concentration determination of the purified product, resulted in the generation of an insoluble peptide in water, data not shown). For all these reasons, we tried to express the Kcoil peptide in inclusions bodies since we believed that its expression would be more efficient as the inclusion bodies might reduce its cytotoxicity while protecting the peptide from proteolysis (Yifeng Li, 2011). For this purpose, the Kcoil peptide cDNA was fused to the ketosteroid isomerase protein (KSI). After solubilisation and His trap

capture, the theoretical yield we calculated was about 5 mg/L of bacterial culture. As an alternative to the expression in inclusion bodies, the soluble expression of the Kcoil peptide as fusion protein was then tried (Yifeng Li, 2009; Terpe, 2003).

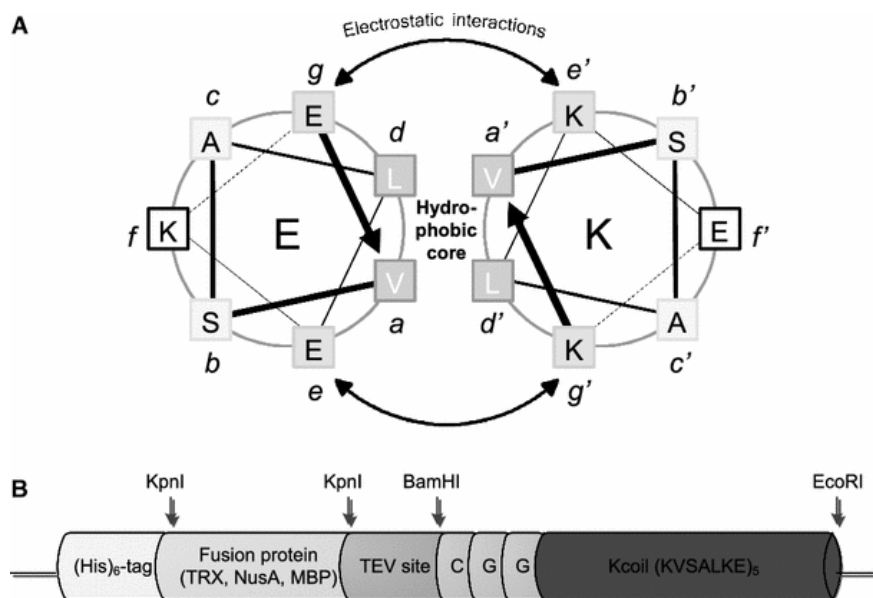


Figure 4.1: A. Helical-wheel representation of the heterodimeric E/K coiled-coil peptide system. The interchain electrostatic interactions between the charged residues are indicated by the arrows. **B.** Schematic representation of Kcoil-fusion protein sequence design. Arrows indicate the restriction enzyme sites required to insert the cDNA corresponding to the fusion protein and the Kcoil sequence within the different plasmids. A three amino-acid sequence (CGG) was added upstream the Kcoil peptide cDNA in order to allow any thiol coupling procedure for Kcoil peptide grafting. A TEV site was also added for fusion protein removal and pure Kcoil peptide recovery

First of all, the expression level with pGEX vectors encoding Kcoil peptide fused to Glutathione-S-Transferase (GST) was very low (0.375 mg per liter of bacterial culture) and the peptide was still expressed in inclusion bodies (the design of a purification protocol based on inclusion bodies was unsuccessful in our hands, data not shown). In an effort to further increase Kcoil solubility and expression, other soluble fusion protein tags were assessed including TRX, NusA and MBP. These tags were chosen as they not only protect the cellular host from peptide toxicity, but they can also prevent the target peptide partner from undergoing intracellular proteolysis (Y. Li, 2012; S. Sahdev,

S. K. Khattar, & K. S. Saini, 2008; X. Xu et al., 2007), typically resulting in a significant increase of the expression yield. The recombinant plasmids (pET-TEV-TRX, pET-TEV-NusA and pET-TEV-MBP) were transformed into BL21(DE3) *E. coli* cells. *E. coli* was used as a host because (i) it requires inexpensive carbon sources for growth, (ii) it is a well characterized organism with a very short doubling time allowing for rapid biomass growth and product accumulation and, finally, (iii) bioprocess scale-up is relatively easy (Baneyx, 1999; S. Kyle, A. Aggeli, E. Ingham, & M. J. McPherson, 2010; S. Sahdev et al., 2008). In addition, the use of a bacterial expression platform was well suited to the Kcoil peptide since no post-translational modifications (e.g., glycosylation) are required for its activity.

For expression level comparison, cultures were performed under generic conditions as described in the “Materials and Methods” section. SDS-PAGE analysis (data not shown) indicated that the highest expression level of the Kcoil peptide was obtained with the TRX-fusion protein (Baneyx, 1999; G. D. Davis, C. Elisee, D. M. Newham, & R. G. Harrison, 1999; D. Esposito & D. K. Chatterjee, 2006; S. Sahdev et al., 2008; J. Song, Chen, Lu, Hu, & Ding, 2011; Terpe, 2003). Of interest, TRX has also been reported to enhance the solubility of recombinant antimicrobial peptides sharing similar properties as our Kcoil peptide (e.g. positively charged and small size) (X. L. Jing et al., 2010; E. R. LaVallie, Z. Lu, E. A. Diblasio-Smith, L. A. Collins-Racie, & J. M. McCoy, 2000; Y. Li, 2009, 2011; Yang et al., 2009). It has been previously suggested that the good production yields recorded for cationic peptides fused to TRX were due to its anionic character (pI = 4.67) that can neutralize the high positive charge of cationic peptides, hence increasing the expression levels for this class of peptides. However, other studies have also suggested that the expression level might be related to (i) the mRNA stability of the partner (Yang et al., 2009), (ii) the chaperone-like activity of TRX (Y. Li, 2009; X. Xu et al., 2007) or (iii) its relatively low molecular-weight (~ 11.7 KDa), making the peptide of interest a large fraction of the fusion protein (Y. Li, 2011; Y. M. Shlyapnikov, Y. A. Andreev, S. A. Kozlov, A. A. Vassilevski, & E. V. Grishin, 2008).

4.6.2 Optimisation of Kcoil peptide purification

As the best expression level for biological Kcoil peptide production was observed when fused to TRX, further process development efforts were conducted using this expression vector following

IPTG induction (Figure 4.2). Cell disruption and fraction separation were performed as described in the “Materials and Methods” section. SDS-PAGE analysis of the soluble and insoluble fractions confirmed that the TRX-Kcoil complex was mostly expressed in the soluble fraction (Figure 4.3). Taking advantage of the N-terminal hexahistidine (His)₆ tag, a Ni²⁺-chelating affinity chromatography step was thus performed first to purify the fusion protein. The estimated yield of eluted protein after this step was almost 22 mg of protein per liter of bacterial culture (Table 4.2). TEV cleavage was then performed to remove the TRX tag from the Kcoil moiety.

After TEV cleavage, two expected bands of approximately 12 KDa and 8 KDa were detected by polyacrylamide gel electrophoresis. These bands corresponded to the TRX protein and to Kcoil homodimers resulting from the formation of intermolecular cysteine bridges, respectively, thereby confirming that the specific enzymatic cleavage reaction was nearly complete after 2 h (Figure 4.3). Monitoring the TEV cleavage reaction over 24h indicated that there was no difference with other longer incubation times (2h, 4h, 8h and 24h, data not shown). These results are in good agreement with previous reports indicating that protein cleavage by the TEV protease is highly specific and efficient. Furthermore, the use of the TEV protease is advantageous since its production in large quantities is easier than for other proteases, even at the laboratory scale (D. Esposito & D. K. Chatterjee, 2006).

Following Kcoil peptide cleavage, it was necessary to remove the TRX protein from the mixture before a final purification step by RP-HPLC (Figure 4.2). For this purpose, the solution mixture resulting from cleavage was directly applied to a SP-Sepharose FF column and the flow through collected. This strategy was selected as we were unable to efficiently capture the (His)₆-tagged thioredoxin alone after TEV cleavage, even after several treatments with denaturants (e.g., high concentration of urea and guanidine hydrochloride; data not shown) most likely due to either strong electrostatic interactions between the lysine residues of the Kcoil peptide and the anionic thioredoxin (J. McCoy & E. La Ville, 2001; Yang et al., 2009) or the presence of a loop within the active site of thioredoxin, which may favour small peptide binding. Noteworthy, TRX protein carrying peptide of interest in this active-site loop was reported to retain its structure (E. R. LaVallie et al., 1993), which may explain the inefficacy of denaturant treatment to release the Kcoil peptide.

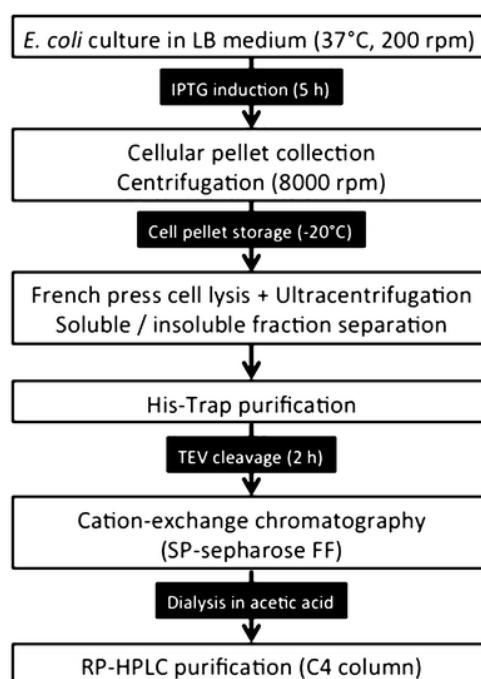


Figure 4.2 : Schematic diagram summarizing the optimized strategy developed for Kcoil peptide biological production and purification

Collected fractions were analysed by both absorbance measurement at 280 nm (to detect thioredoxin) and SDS-PAGE (for thioredoxin and Kcoil detection) in order to verify the efficacy of this second chromatography step. In our strategy, the Kcoil was successfully eluted at approximately 40% of the linear salt gradient (0 – 0.5 M NaCl) at a pH lower than its theoretical isoelectric point ($pI = 9.2$) (Figure 4.4.A) while the $(His)_6$ -thioredoxin protein was recovered in the flow through in agreement with its pI being equal to 4.67. These results were verified by SDS-PAGE (Figure 4.3). While the IEX-peak1 fraction did not contain any detectable K coil peptide, for the second peak that had been eluted from the ion exchange chromatography, gel staining revealed a band corresponding to an apparent molecular weight between 5 and 10 KDa. Since non-reducing conditions were used during SDS-PAGE experiments, this band may correspond to the formation of cysteine-bound Kcoil dimers. Cation exchange chromatography enabled us to separate almost 92% of the originally expressed $(His)_6$ -thioredoxin from Kcoil peptide (Table 4.2, Figure 4.4.A) using a very slow salt gradient (20 column volumes with 90 cm/h as a flow rate), and once again supporting the hypothesis that strong electrostatic interactions between the positively

charged Kcoil and the anionic residues of TRX protein resulted in a stable complex after TEV cleavage.

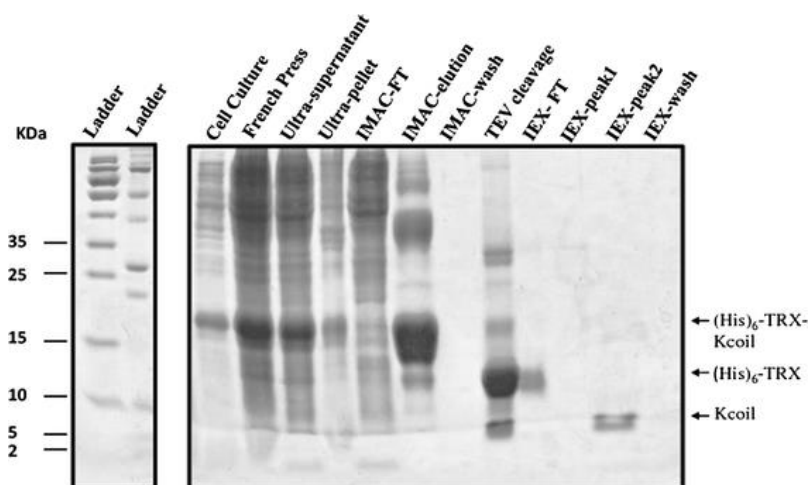


Figure 4.3 : SDS-PAGE analysis of heat-treated samples taken at each stage of the Kcoil-Thioredoxin fusion protein production and purification process. Two molecular weight marker ladder were used. **FT** flow through, **Ultra** ultracentrifugation

Based on our SDS-PAGE results, fractions corresponding to the second peak of the ion-exchange chromatography were pooled, concentrated, and subjected to a RP-HPLC purification step (Figure 4.2). This final purification was very efficient (97.4%), as 1.51 mg (i.e., 3.63 μ mol) of pure Kcoil peptide per liter of bacterial culture was obtained as quantified by the Orange II primary amine detection method (Table 4.2). Fractions corresponding to the Kcoil peptide were eluted from the preparative C₄ column using a linear gradient of acetonitrile with 0.05% of trifluoroacetic acid (Figure 4.4.B). The oxidized form of the peptide was eluted slightly before its reduced counterpart, as confirmed by mass spectrometry analysis. The absorbance profile at 215 nm is in agreement with the observation by Lee and colleagues related to the separation of the oxidized and reduced forms of a protein by RP-HPLC when using a hydrophobic column (J. Y. Lee, Yoon, Chung, Lee, & Lee, 2000). Of interest, the volumetric yield reported by Le and colleagues (V. C. Le & Letourneur, 2009a) for the bacterial production and purification of a Kcoil peptide fused to EGF was 0.107 μ mol/L. Their purification strategy was based on solubilization from inclusion bodies. In contrast, we here demonstrate that higher yields (3.6 μ mol/L) may be obtained using a soluble carrier protein such as thioredoxin. Our yield is similar to those reported for antibacterial bioactive peptides that were produced using the same fusion protein and that displayed similar size as our

Kcoil peptide ($M_w = 2.9 - 3.7$ KDa, e. g. Plantaricin E, F, J and K) (G. Pal & Srivastava, 2014). Higher yields have been obtained for other anti-microbial peptides (3.2 mg to 11 mg/L of bacterial culture) using thioredoxin as a carrier protein (X. L. Jing et al., 2010; Y. Li, 2012; Y. M. Shlyapnikov et al., 2008; X. Xu et al., 2007) suggesting that the hydrophobic nature of the Kcoil peptide may negatively impact its expression level. Others studies have also shown that prokaryotic production of auto-assembling amphiphilic peptides could attain gram per liter quantities using an inclusion body strategy and/or using a tandem repeat strategy; which cannot be applied in our case due to the important positive charge that would result from a tandem repeat Kcoil peptide (B. M. Hartmann, W. Kaar, R. J. Falconer, B. Zeng, & A. P. Middelberg, 2008; Hartmann et al., 2009; S. Kyle et al., 2010a; A. Prakash, S. J. Parsons, S. Kyle, & M. J. McPherson, 2012; J. M. Riley, A. Aggeli, R. J. Koopmans, & M. J. McPherson, 2009b). Thus, considering all the challenges associated to the Kcoil peptide primary sequence - 10 lysines out of 38 residues as well as a strong proportion of hydrophobic residues, the process we here report (Figure 4.2) lead to a significant yield of highly pure Kcoil peptide.

Table 4.2: Yields of fusion protein and final purified Kcoil peptide. Yields are reported by mg of protein produced per liter of bacterial culture

	Fusion protein yield	Theoretical peptide yield	Purified peptide	Step efficiency
IMAC	21.89 ^a	9.05 ^a	ND	ND
IEX- chromatography	20.1 ^a	ND	1.55 ^b	91.86 %
RP-HPLC	ND	1.55 ^b	1.51 ^b	97.41%

^a Yield determined by absorbance at 280nm.

^b Yield determined by Orange II quantification as described in materials and methods section.

ND: Not determined

A mass-spectrometry analysis (data not shown) of the eluted fractions from RP-HPLC was performed in order to confirm the identity of the biologically produced peptide via its molecular

weight. The ESI-TOF analysis of the biological Kcoil showed an average mass of 4159.9 Da, in excellent agreement with the Kcoil theoretical mass of 4158.9 Da while the second significant RP-HPLC peak corresponded to a mass of 8316.2 Da, unambiguously indicating that this peak corresponded to the oxidized form of the Kcoil peptide (theoretical mass of 8315.8 Da). Both SDS-PAGE and mass spectrometry results confirmed that the Kcoil peptide was highly pure.

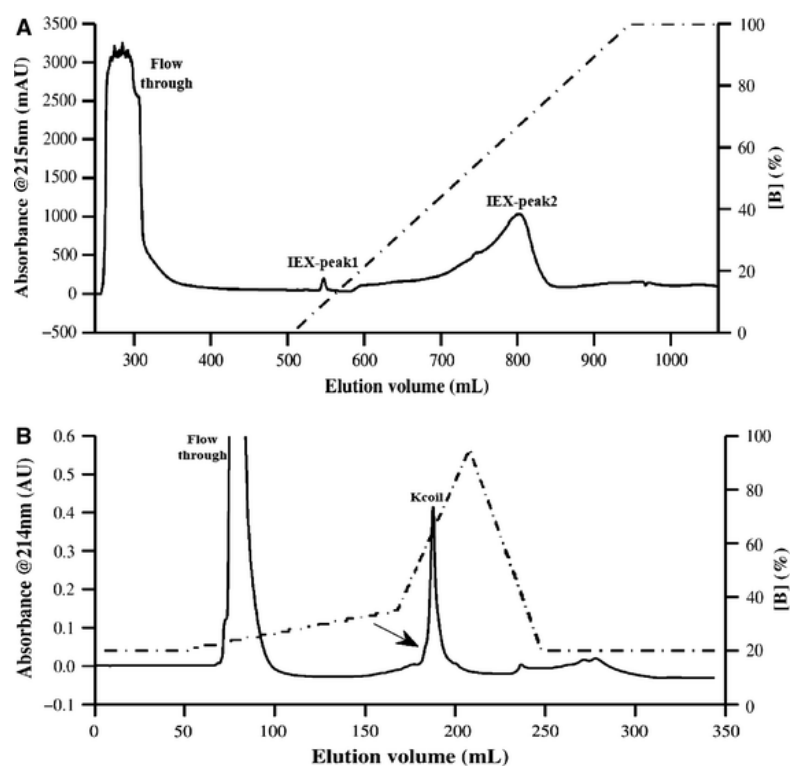


Figure 4.4 : **A.** Kcoil peptide and Thioredoxin fusion protein separation by cation exchange chromatography. After enzymatic digestion, the mixture was injected on a SP-Sepharose FF column using phosphate buffer (pH 7.4) as loading buffer and a 0–100 % linear gradient of NaCl (corresponding to 125-to-500 mM, dashed line) for elution. The nomenclature (IEX-peak1 and IEX-peak2) is the same as in Fig. 4.3. **B.** Reverse-phase HPLC analysis of SP-Sepharose eluted fractions. Kcoil peptide was eluted from the C4 column using a 20–35 % linear gradient (15 min) of buffer B (intermittent line) (acetonitrile with 0.05 % of TFA). Reduced Kcoil peptide was detected by absorbance at 214 nm (continuous line) at approximately 180 mL of eluted volume; the small oxidized fraction of Kcoil correspond to the shoulder (arrow) at the base of the Kcoil peak

4.6.3 Bioactivity assay on the BIACORE

In order to confirm the activity of the Kcoil peptide produced in bacteria, an SPR-based biosensor assay was performed according to a previously developed method (F. Murschel et al., 2013). SPR analysis was chosen to compare the kinetics of interactions of the biologically produced Kcoil peptide with its partner Ecoil peptide to those of a chemically synthesized Kcoil peptide. The ability of biologically produced Kcoil to be covalently immobilized to the dextran-coated surface via the thiol coupling procedure was first evaluated by monitoring the net mass accumulation on the surface (data not shown). The same assay was carried out using the chemically synthesised Kcoil as a positive control and gave similar results. As observed in Figure 4.5.A, the control corrected sensorgrams corresponding to the injection of the Ecoil-EGF fusion protein over both Kcoil surfaces gave almost superimposable curves. A more detailed SPR study was also performed by injecting increasing concentrations of Ecoil peptides on a surface displaying low amounts of Kcoil (< 60 RU, see Figure 4.5.B). The corresponding sensorgrams were globally fit to a simple Langmuirian model, from which a dissociation constant K_D of 137 pM was calculated. This value was close to that previously reported for Ecoil peptide binding to chemically produced Kcoil peptide ($K_D = 63$ pM) (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003), given that different peptide quantification methods (Orange II assay, as described above, vs. amino acid analysis) and instruments were used in both studies. Altogether, the biologically produced Kcoil peptide presented the same kinetic behaviour as its chemically synthesized equivalent when binding to its Ecoil partner.

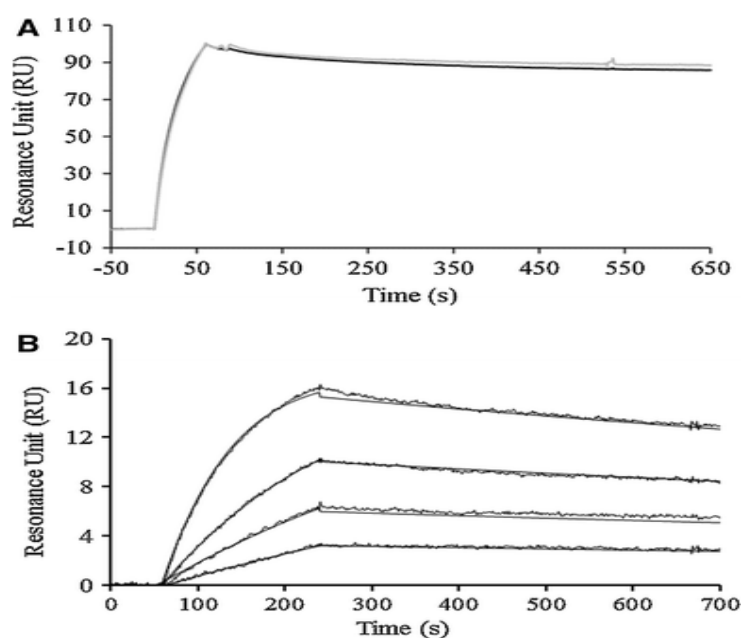


Figure 4.5: **A.** Control-corrected sensorgrams corresponding to the injection of 100 nM of E5-EGF over the same amount of either chemically-synthesized (gray) or bacteria-produced (black) Kcoil that had been immobilized at the biosensor surface. **B.** Kinetic analysis of E/Kcoil interaction using a simple binding model. Various concentrations of Ecoil peptide, ranging from 0.5 to 5 nM, were injected over less than 60 RU of immobilized bacteria-produced Kcoil. Both experimental data and global fit corresponding to a simple Langmuirian model are shown

In conclusion, we here report a novel approach for the bacterial production and subsequent purification of a *de novo* designed Kcoil peptide as an attractive alternative to its chemical synthesis. Among all the fusion proteins we tested, TRX was the best carrier for the production of soluble Kcoil peptide and subsequent purification. Finally, the bioprocess we developed (Figure 4.2) represents an easy and low cost approach that can expand the Ecoil/Kcoil heterodimer utilization to several applications in the biopharmaceutical and biomedical fields.

4.7 Acknowledgments

We would like to acknowledge the regional Center for Mass Spectrometry at University of Montreal for the peptide exact mass analysis and July Dorion-Thibaudeau and Frederic Murschel for their help during SPR assay development. This work was partly supported by the Natural

Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery Grant program and the Canada Research Chair on Protein-enhanced Biomaterials.

4.8 References

Aronsson, C., Dånmark, S., Zhou, F., Öberg, P., Enander, K., Su, H., & Aili, D. (2015). Self-sorting heterodimeric coiled coil peptides with defined and tuneable self-assembly properties. *Scientific Reports*, 5, 14063. doi: 10.1038/srep14063

Assal, Y., Mizuguchi, Y., Mie, M., & Kobatake, E. (2015). Growth Factor Tethering to Protein Nanoparticles via Coiled-Coil Formation for Targeted Drug Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 26(8), 1672-1677. doi: 0.1021/acs.bioconjchem.5b00266

Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 411-421. doi: 10.1016/S0958-1669(99)00003-8

Boucher, C., St-Laurent, G., Jolicoeur, M., Crescenzo, G. D., & Durocher, Y. (2010). Protein detection by Western blot via coiled-coil interactions. *Analytical Biochemistry*, 399(1), 138-140. doi: 10.1016/j.ab.2009.12.007

Boucher, C., St-Laurent, G., Loignon, M., Jolicoeur, M., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2008). The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags. *Tissue Engineering. Part A*, 14(12), 2069-2077. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0037

Bromley, E. H., & Channon, K. J. (2011). Alpha-helical peptide assemblies giving new function to designed structures. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 103, 231-275. doi: 10.1016/B978-0-12-415906-8.00001-7

Burkhard, P., Stetefeld, J., & Strelkov, S. V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends in Cell Biology*, 11(2), 82-88. doi: 10.1016/S0962-8924(00)01898-5

Chao, H., Bautista, D. L., Litowski, J., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (1998). Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 715(1), 307-329. doi: 10.1016/S0378-4347(98)00172-8

- Chao, H., Houston, M. E., Jr., Grothe, S., Kay, C. M., O'Connor-McCourt, M., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (1996). Kinetic study on the formation of a de novo designed heterodimeric coiled-coil: use of surface plasmon resonance to monitor the association and dissociation of polypeptide chains. *Biochemistry*, 35(37), 12175-12185. doi: 10.1021/bi9530604
- Cohen, C., & Parry, D. A. D. (1986). α -Helical coiled coils — a widespread motif in proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 11(6), 245-248. doi: 10.1016/0968-0004(86)90186-6
- Davis, G. D., Elisee, C., Newham, D. M., & Harrison, R. G. (1999). New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(4), 382-388. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19991120)65:4<382::AID-BIT2>3.0.CO;2-I
- De Crescenzo, G., Litowski, J. R., Hodges, R. S., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. *Biochemistry*, 42(6), 1754-1763. doi: 10.1021/bi0268450
- De Crescenzo, G., Pham, P. L., Durocher, Y., Chao, H., & O'Connor-McCourt, M. D. (2004). Enhancement of the antagonistic potency of transforming growth factor-beta receptor extracellular domains by coiled coil-induced homo- and heterodimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26013-26018. doi: 10.1074/jbc.M400655200
- De Crescenzo, G., Pham, P. L., Durocher, Y., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding to the extracellular domain of the type II TGF-beta receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding. *Journal of Molecular Biology*, 328(5), 1173-1183. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00360-7
- Drogoz, A., David, L., Rochas, C., Domard, A., & Delair, T. (2007). Polyelectrolyte Complexes from Polysaccharides: Formation and Stoichiometry Monitoring. *Langmuir*, 23(22), 10950-10958. doi: 10.1021/la7008545
- Esposito, D., & Chatterjee, D. K. (2006). Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(4), 353-358. doi: 10.1016/j.copbio.2006.06.003

- Fortier, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2013). A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery. *Biomaterials*, 34(4), 1344-1353. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.047
- Gerling-Driessen, U. I. M., Mujkic-Ninnemann, N., Ponader, D., Schöne, D., Hartmann, L., Koks, B., . . . Hartmann, L. (2015). Exploiting Oligo(amido amine) Backbones for the Multivalent Presentation of Coiled-Coil Peptides. *Biomacromolecules*, 16(8), 2394-2402. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00634
- Grigoryan, G., & Keating, A. E. (2008). Structural specificity in coiled-coil interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(4), 477-483. doi: 10.1016/j.sbi.2008.04.008
- Guzman, F., Barberis, S., & Illanes, A. (2007). Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2), 0-0. doi: 10.2225/vol10-issue2-fulltext-13
- Hartmann, B. M., Kaar, W., Falconer, R. J., Zeng, B., & Middelberg, A. P. (2008). Expression and purification of a nanostructure-forming peptide. *Journal of Biotechnology*, 135(1), 85-91. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.03.003
- Hartmann, B. M., Kaar, W., Yoo, I. K., Lua, L. H., Falconer, R. J., & Middelberg, A. P. (2009). The chromatography-free release, isolation and purification of recombinant peptide for fibril self-assembly. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(5), 973-985. doi: 10.1002/bit.22447
- Jing, X. L., Luo, X. G., Tian, W. J., Lv, L. H., Jiang, Y., Wang, N., & Zhang, T. C. (2010). High-level expression of the antimicrobial peptide plectasin in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, 61(3), 197-202. doi: 10.1007/s00284-010-9596-3
- Kohn, W. D., & Hodges, R. S. (1998). De novo design of alpha-helical coiled coils and bundles: models for the development of protein-design principles. *Trends in Biotechnology*, 16(9), 379-389. doi: 10.1016/S0167-7799(98)01212-8
- Kyle, S., Aggeli, A., Ingham, E., & McPherson, M. J. (2010). Recombinant self-assembling peptides as biomaterials for tissue engineering. *Biomaterials*, 31(36), 9395-9405. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.051

- LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F., & McCoy, J. M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *BioTechnology*, 11(2), 187-193.
- LaVallie, E. R., Lu, Z., Diblasio-Smith, E. A., Collins-Racie, L. A., & McCoy, J. M. (2000). Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology*, 326, 322-340. doi: 10.1016/S0076-6879(00)26063-1
- Le, P. U., Lenferink, A. E., Pinard, M., Baardsnes, J., Massie, B., & O'Connor-McCourt, M. D. (2009). *Escherichia coli* expression and refolding of E/K-coil-tagged EGF generates fully bioactive EGF for diverse applications. *Protein Expression and Purification*, 64(2), 108-117. doi: 10.1016/j.pep.2008.11.005
- Lee, J. Y., Yoon, C. S., Chung, I. Y., Lee, Y. S., & Lee, E. K. (2000). Scale-up process for expression and renaturation of recombinant human epidermal growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31 (Pt 3), 245-248. doi: 10.1042/BA19990101
- Li, Y. (2009). Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 54(1), 1-9. doi: 10.1042/ba20090087
- Li, Y. (2011). Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review. *Protein Expression and Purification*, 80(2), 260-267. doi: 10.1016/j.pep.2011.08.001
- Li, Y. (2012). A novel protocol for the production of recombinant LL-37 expressed as a thioredoxin fusion protein. *Protein Expression and Purification*, 81(2), 201-210. doi: 10.1016/j.pep.2011.10.011
- Liberelle, B., Bartholin, L., Boucher, C., Murschel, F., Jolicoeur, M., Durocher, Y., . . . De Crescenzo, G. (2010). New ELISA approach based on coiled-coil interactions. *Journal of Immunological Methods*, 362(1-2), 161-167. doi: 10.1016/j.jim.2010.09.027
- Liberelle, B., Boucher, C., Chen, J., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2010). Impact of epidermal growth factor tethering strategy on cellular response. *Bioconjugate Chemistry*, 21(12), 2257-2266. doi: 10.1021/bc1002604

- Lupas, A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(10), 375-382. doi: 10.1016/S0968-0004(96)10052-9
- McCoy, J., & La Ville, E. (2001). Expression and purification of thioredoxin fusion proteins. *Curr Protoc Protein Sci*, Chapter 6, Unit 6 7. doi: 10.1002/0471140864.ps0607s10
- Murschel, F., Liberelle, B., St-Laurent, G., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2013). Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor. *Acta Biomaterialia*, 9(6), 6806-6813. doi: 10.1016/j.actbio.2013.02.032
- Murschel, F., Zaimi, A., Noel, S., Jolicoeur, M., & De Crescenzo, G. (2015). Specific Adsorption via Peptide Tags: Oriented Grafting and Release of Growth Factors for Tissue Engineering. *Biomacromolecules*. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00955
- Pal, G., & Srivastava, S. (2014). Cloning and heterologous expression of plnE, -F, -J and -K genes derived from soil metagenome and purification of active plantaricin peptides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(3), 1441-1447. doi: 10.1007/s00253-013-5097-1
- Prakash, A., Parsons, S. J., Kyle, S., & McPherson, M. J. (2012). Recombinant production of self-assembling beta-structured peptides using SUMO as a fusion partner. *Microbial Cell Factories*, 11, 92. doi: 10.1186/1475-2859-11-92
- Riley, J. M., Aggeli, A., Koopmans, R. J., & McPherson, M. J. (2009). Bioproduction and characterization of a pH responsive self-assembling peptide. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(2), 241-251. doi: 10.1002/bit.22274
- Sahdev, S., Khattar, S. K., & Saini, K. S. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 307(1-2), 249-264. doi: 10.1007/s11010-007-9603-6
- Shlyapnikov, Y. M., Andreev, Y. A., Kozlov, S. A., Vassilevski, A. A., & Grishin, E. V. (2008). Bacterial production of latarcin 2a, a potent antimicrobial peptide from spider venom. *Protein Expression and Purification*, 60(1), 89-95. doi: 10.1016/j.pep.2008.03.011
- Song, J., Chen, W., Lu, Z., Hu, X., & Ding, Y. (2011). Soluble expression, purification, and characterization of recombinant human flotillin-2 (reggie-1) in *Escherichia coli*. *Molecular Biology Reports*, 38(3), 2091-2098. doi: 10.1007/s11033-010-0335-4

- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(5), 523-533. doi: 10.1007/s00253-002-1158-6
- Winkler, D. F., & Tian, K. (2015). Investigation of the automated solid-phase synthesis of a 38mer peptide with difficult sequence pattern under different synthesis strategies. *Amino Acids*, 47(4), 787-794. doi: 10.1007/s00726-014-1909-6
- Woolfson, D. N., & Mahmoud, Z. N. (2010). More than just bare scaffolds: towards multi-component and decorated fibrous biomaterials. *Chemical Society Reviews*, 39(9), 3464-3479. doi: 10.1039/c0cs00032a
- Xu, X., Jin, F., Yu, X., Ji, S., Wang, J., Cheng, H., . . . Zhang, W. (2007). Expression and purification of a recombinant antibacterial peptide, cecropin, from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 53(2), 293-301. doi: 10.1016/j.pep.2006.12.020
- Yang, Y. L., Tian, Z. G., Teng, D., Zhang, J., Wang, J. R., & Wang, J. H. (2009). High-level production of a candidacidal peptide lactoferrampin in *Escherichia coli* by fusion expression. *Journal of Biotechnology*, 139(4), 326-331. doi: DOI 10.1016/j.jbiotec.2009.01.003

CHAPITRE 5 ARTICLE 2: IMPACT OF RGD AMOUNT IN DEXTRAN-BASED HYDROGELS FOR CELL DELIVERY

5.1 Présentation de l'article

Dans ce chapitre de la thèse, on aborde le second objectif du projet où le but était de développer une structure tridimensionnelle (échafaudages) dans le but de véhiculer des cellules à un site de tissu endommagé. Les travaux présentés dans ce chapitre concerne le développement d'un hydrogel à base de dextrane préalablement fonctionnalisé avec le motif peptidique RGD. L'ajout de sels dans le mélange original ainsi qu'à la surface pendant la gélification a permis d'obtenir des macropores interconnectés, indispensables à la pénétration des cellules à l'intérieur de l'hydrogel. Les travaux ont été acceptés pour publication dans le journal "Carbohydrate Polymers" le 1^{er} janvier 2017.

5.2 Entête de l'article

"Impact of RGD amount in dextran-based hydrogels for cell delivery"

Nesrine RIAHI^a, Benoit LIBERELLE^a, Olivier HENRY^a, and Gregory DE CRESCENZO^{a*}

(a) Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologie Biomédicales (GRSTB), Bio-P² Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montreal, QC, Canada H3C 3A7.

5.3 Abstract

Dextran is one of the hydrophilic polymers that is used for hydrogel preparation. As any polysaccharide, it presents a high density of hydroxyl groups, which makes possible several types of derivatization and crosslinking reactions. Furthermore, dextran is an excellent candidate for hydrogel fabrication with controlled cell/scaffold interactions as it is resistant to protein adsorption and cell adhesion. The RGD peptide can be grafted to the dextran in order to promote selected cell adhesion and proliferation. Altogether, we have developed a novel strategy to graft the RGD

peptide sequence to dextran-based hydrogel using divinyl sulfone as a linker. The resulting RGD-functionalized dextran based hydrogels were transparent, presented a smooth surface and were easy to handle. The impact of varying RGD peptide concentrations, hydrogel porosity and topology upon human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) adhesion, proliferation and infiltration was investigated. Our results demonstrated that 0.1% of RGD-modified dextran within the gel was sufficient to support HUVEC cells adhesion to the hydrogel surface. Sodium chloride was added (i) to the original hydrogel mix in order to form a macroporous structure presenting interconnected pores and (ii) to the hydrogel surface to create small orifices essential for cells migration inside the matrix.

Keywords: *Hydrogel; Dextran; RGD peptide; Vinyl sulfone; Cell homing; Cell delivery*

5.4 Introduction

Hydrogels are hydrated three-dimensional networks. Despite that, they are mainly composed of hydrophilic polymers, they are insoluble due to the cross-links between their constituents, leading to matrix formation (Gasperini et al., 2014; Jonker et al., 2012). Their sponge-like structure is at the origin of their extensive use in tissue engineering applications as (i) space filling agents for reconstructive surgery, (ii) vehicles for bioactive molecules and (iii) cell delivery carriers to target specific tissue (Drury & Mooney, 2003; Van Tomme & Hennink, 2007). Hydrogels can be prepared using natural or synthetic water-soluble polymers depending on their subsequent applications (Lévesque et al., 2005; Van Tomme & Hennink, 2007). They are capable of absorbing large quantities of water and thus present an environment mimicking natural tissues (Gasperini et al., 2014; Lévesque et al., 2005; Maia et al., 2014). Nowadays, hydrogels have been tested to engineer several tissue types and organs (e. g. heart, bone, cartilage, muscle, liver and neurons) (Drury & Mooney, 2003; Silva et al., 2015) because of the mechanical support they can provide to cells in order for them to survive, differentiate and proliferate before they generate their own extracellular matrix. It is important to highlight that, for these applications, the macroscopic structure of the scaffold is as important as its chemical composition; a porous structure provides cells with better nutrient and waste transport, which directly impacts cell survival (Gasperini et al., 2014; Silva et al., 2015). For these reasons, porosity, pore size and interconnectivity are very important parameters (Lévesque et al., 2005).

Dextran is one of the used hydrophilic polymers for hydrogel preparation. It is a non-ionic bacterial homopolysaccharide, composed predominantly of linear α -1,6 linked D-glucopyranose residues. Dextran is biocompatible, non-toxic, biodegradable, affordable and easily modified (Cabral et al., 2014; Maia et al., 2014; Silva et al., 2015). Dextran has been used for a long time in biotechnology (e.g. in the design of matrices for separation, microcarriers for adherent cell growth) and biomedical applications (e.g. for drug delivery vehicle) (Lévesque et al., 2005; Massia et al., 2000; Purnama et al., 2015). Clinical use of dextran, especially low-molecular-weight, started more than 50 years ago as plasma volume expander, antithrombolytic agent, as well as in artificial tear and blood flow enhancer preparations (Mehvar, 2000; Van Tomme & Hennink, 2007). Dextran is highly hydrophilic and very stable over a wide range of pH (i.e. mild acid and alkaline conditions). As any polysaccharide, it presents a high density of hydroxyl groups, which make possible several types of derivatization and crosslinking reactions. Several biomedical utilizations of dextran have taken advantage of its slow degradation by human enzymes compared to other polysaccharides and specific cleavage by microbial dextranases in the gastrointestinal tract (Maia et al., 2014; Mehvar, 2000; Van Tomme & Hennink, 2007).

In order to avoid post-transplantation reactions (i.e. inflammatory response and fibrotic capsule formation) that lead to implant isolation from surrounding tissue (Massia et al., 2000), the control of the cellular interactions at the tissue/scaffold interface is crucial to promote an optimal integration within the host tissue (Massia et al., 2000; Silva et al., 2015). In that context, dextran is an excellent candidate for hydrogel fabrication with controlled cell/scaffold interactions as it is resistant to protein adsorption and cell adhesion (Lévesque et al., 2005). It thus provides a neutral base to which functionalities can be added by grafting the appropriate type(s) of biomolecules on the dextran chains (Massia et al., 2000; Noel et al., 2016). In this context, the RGD (Arg-Gly-Asp) motif is the most used peptidic sequence for material biofunctionalization as it is the minimal integrin-binding sequence found in many extracellular matrix (ECM) proteins. It promotes cell adhesion and can guide cell migration required for tissue regeneration (Ferreira et al., 2007; Monchaux & Vermette, 2007; Petreaca & Martins-Green, 2011; Woerly, Pinet, De Robertis, Van Diep, & Bousmina, 2001; Zustiak, Durbal, & Leach, 2010).

The present study reports the fabrication of a cell-homing scaffold made of a dextran-based hydrogel being functionalized with the RGD peptide. The impact of the RGD concentration,

hydrogel porosity and topology upon human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) adhesion, proliferation and infiltration are investigated.

5.5 Materials and Methods

5.5.1 Materials

HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) and Endothelial Growth Medium-2 (EBM-2 + EGM-2 SingleQuots kit containing fetal bovine serum (FBS, 2% v/v), growth factors (EGF, VEGF, IGF, FGF), ascorbic acid, heparin, hydrocortisone and antibiotics were bought from Lonza (Walkersville, MD). Amicon Ultra-15 centrifugal filter units (molecular weight cut-off = 10 kDa) were purchased from Millipore (Etobicoke, ON). Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (modified PBS, without calcium chloride and magnesium chloride), trisodium trimetaphosphate (STMP, $\geq 95\%$), divinyl sulfone (DVS, 99.7%), β -mercaptoethanol ($\geq 99\%$), sodium chloride (NaCl, $\geq 99\%$), RGD (Arg-Gly-Asp) and RGE (Arg-Gly-Glu) peptides were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, ON). 25- and 75-cm² CellBind flasks as well as 24-, 48- and 96-well culture plates were purchased from Corning (Corning, NY). 96-well non-treated plates and Pyrex cloning cylinder were obtained from Fisher Scientific Co. (Ottawa, ON). Dextran (Mw = 500 kDa) was obtained from Pharmacosmos A/S (Holbaek, Denmark). MilliQ water (18.2 M Ω ·cm; total organic compounds (TOC) = 4 ppb) was generated with a Millipore Gradient A10 purification system. Hydrochloric acid (HCl, 37.7% v/v), sodium hydroxide (NaOH, 99.3%) and ethanol (EtOH, 99.9%) were bought from VWR International, Ltd (Mont-Royal, QC).

5.5.2 VS-modified dextran (Dex-VS) production and characterization

The conjugation was performed by adapting Yu and Chau's protocol (Yu and Chau 2012). 0.15 g of dextran was dissolved in 7 mL of 30 mM of NaOH. 0.36 mL of 100% DVS was added to the mix and allowed to react under vigorous mixing. After 3 min, the pH was lowered below 5 using pure hydrochloric acid in order to stop the reaction. For purification purposes, dextran-VS was filtered using centrifugal filter units (10 kDa) against MilliQ water and the purified product was then freeze-dried. The chemical modification was assessed using ¹H NMR in D₂O. The degree of VS modification was 40%.

5.5.3 Peptide-modified Dex-VS production and characterization

This reaction was mediated by the vinyl sulfone groups (Yuri M. Shlyapnikov, Yaroslav A. Andreev, Sergey A. Kozlov, Alexander A. Vassilevski, & Eugene V. Grishin, 2008) distributed all over the polymer chain. RGD or RGE peptides (final concentration = 850 μ M) were reacted with VS-modified dextran (50 mg in a 2.5 mL of 100 mM phosphate buffer, pH 7.5) for 42h under stirring. Remaining VS groups were deactivated using a molar excess of β -mercaptoethanol (107 mM added to the reaction mix) for 4h under stirring. Centrifugal filter units (10 kDa) were also used for peptide-modified dextran purification against MilliQ water. The purified product was then freeze-dried and examined by ^1H -NMR in D_2O . Under our experimental conditions, 17.7% of the VS groups were coupled to RGD or RGE peptides.

5.5.4 Hydrogel preparation

Dextran-based hydrogels were synthesized under alkaline conditions using sodium trimetaphosphate (STMP) as crosslinking agent in multiwall plates. For that purpose, pristine dextran and modified dextran chains (Dex-VS, Dex-VS-RGD or Dex-VS-RGE, all at a ratio of 10 %: $W_{\text{modified}}/W_{\text{pristine}}$) were dissolved in 3 mL of an aqueous solution to reach a final concentration of 22% (w/v). The crosslinking agent (STMP) was then dissolved into the dextran solution at a final ratio of 33% ($W_{\text{STMP}}/W_{\text{total of Dex}}$). Finally, 300 μ L of 10 M NaOH was added to the final solution and the resulting viscous liquid was added to each well and allowed to react for 15 min at 50°C. The alkaline hydrogels were extensively washed with 100 mM phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4). For scanning electron microscopy analysis, hydrogels were rinsed with MilliQ water and freeze-dried. For cell culture experiments, hydrogels were rinsed using 10 mM PBS (pH 7.4) and kept overnight in 10 mM PBS at 4°C. For sterilization purpose, EtOH (70% v/v in MilliQ water) was added into each well for 30 min and the wells were subsequently rinsed extensively with 10 mM sterile PBS (at least five times).

5.5.5 Hydrogel porosity modification

Continuous pores inside the hydrogel were generated by adding NaCl to the dextran/STMP mixture prior crosslinking step. Different ratios (from 0:1 to 1:1 $W_{\text{NaCl}}:W_{\text{Dex}}$) were investigated. The resulting hydrogel was extensively washed with PBS for at least two days in order to remove the

excess of salt. When mentioned, macroporous hydrogel surface was created by covering the hydrogel with NaCl crystals at 10 min from the beginning of the crosslinking reaction at 50°C. NaCl-covered hydrogels were then placed in the oven at 50°C for the remaining gelation time in order to complete the crosslinking reaction.

5.5.6 HUVEC adhesion, proliferation and migration assays

HUVEC cultures were performed in EGM[®]-2 medium (prepared as mentioned by the supplier in the kit), renewed every two days. The cells were maintained in a humidified incubator (37°C, 5% CO₂). In all assays, cells were at passage 4 or 5. After an overnight pre-incubation of hydrogels in the complete medium, HUVEC were seeded at 14 000 cells/scaffold. After an adhesion period of 3h, hydrogels were rinsed three times with sterile PBS (pH7.4) and incubated for 30 min in the same conditions with basal media in order to eliminate poorly attached cells. Another three-time rinsing with PBS was performed before adding complete medium to each scaffold. For adhesion study (3h), resazurin assay was directly applied to selected samples otherwise hydrogels were re-incubated in the same conditions for 7 days. During this assay, replacement with fresh medium was performed every two days and a LIVE/DEAD test was also carried out to analyze HUVEC viability, proliferation and migration in complete medium by fluorescent microscopy. Hydrogels samples prepared for adhesion test were rinsed with PBS once and overnight-fixed with para-formaldehyde (4% w/v in PBS) for light microscopy observations using an AX10 Imager from Carl Zeiss Microscopy (Peabody, MA).

5.5.7 Cell imaging

Cell viability was assessed using a LIVE/DEAD test kit. Hydrogels were rinsed twice with PBS in order to eliminate serum traces and then incubated with 100 microliter of staining solution prepared by mixing 4 µL of commercial Calcein AM and 20 µL of Ethidium homodimer III for 30 min at room temperature. Cells were directly observed using an AX10 Imager from Carl Zeiss Microscopy.

5.5.8 Morphology characterization using Scanning Electron Microscopy

Freeze-dried hydrogels were cut longitudinally and gold sprayed for conductance. SEM images of the hydrogel top surface and the longitudinal section were obtained from a JEOL JSM-7600F equipped with a field emission gun (FEG) operating at 1 kV. A beam current of about 50 pA was used.

5.5.9 Hydrogel swelling studies

Liquid uptake measurements were performed by immersing freeze-dried gels in individual wells containing PBS for 24 h at room temperature. After eliminating excess of liquid using clean wipes, the swollen hydrogels were weighed thanks to a microbalance (Columbus, OH). The swelling ratio (Q) was calculated according to the formula bellow (Hiemstra, van der Aa, et al., 2007a):

$$Q (\%) = ((W_{\text{wet}} * 100) / W_{\text{dry}})$$

Where W_{wet} and W_{dry} correspond to the weight of swollen and dried gels, respectively.

5.5.10 Statistical analysis

As mentioned in the figure captions, all the results are expressed as mean value $\pm$ standard deviation (n , number of independent results, $n \geq 3$). Statistical analyses were performed using a student test (t-test). A p -value lower than 0.05 was considered as statistically significant.

5.6 Results

The objective of this study was to develop a three-dimensional dextran-based matrix to be used as a potential cell carrier for tissue engineering and regenerative medicine applications. Focusing on how a low-fouling polysaccharide-based scaffold can be transformed into a suitable substrate for cell adhesion, proliferation and migration, we have developed a novel strategy for RGD peptide grafting on polymeric precursors.

5.6.1 Peptide grafting on dextran chain

Dextran chain modification was divided into two main phases: divinyl sulfone molecules (DVS) were used as a linker to allow RGD peptide conjugation to polysaccharide chain (Figure 5.1, Steps

1 and 2). First, divinyl sulfone was reacted with the hydroxyl groups from the glucopyranose units of dextran to form a covalent bond (Figure 5.1, Step 1) (Lin et al., 2010; Noel et al., 2016). The protocol we designed was adapted from Yu's previous work (Y. Yu & Chau, 2012). The reaction was very fast (around 3 min), mediated by alkaline conditions and the resulting yield of modification was quite high (40%), allowing for the subsequent grafting of a large number of molecules. Since DVS is homobifunctional, the remaining free vinyl sulfone group after Step 1 may be used to graft molecules of interest to Dex-VS (e.g. adhesive peptides, growth factors) (Hiemstra, van der Aa, et al., 2007a; S. T. Lee et al., 2010; M. Lutolf & Hubbell, 2003; R. Zhang et al., 2007). The coupling reaction is a Michael-type addition and it is highly dependent on the pH. In order to optimize the coupling reaction of our peptides (RGD and RGE), different pHs (from 6 to 8) were tested and we noticed comparable conjugation yields for all tested conditions; we thus decided to continue working at a pH near physiological conditions (pH 7.4) (data not shown) and VS-modified dextran was reacted for 42h with RGE or RGD peptides (Figure 5.1, Step 2). The remaining vinyl sulfone groups that had not reacted with peptides were blocked by adding β -mercaptoethanol in order to avoid unwanted reactions in upcoming coupling and/or crosslinking reactions. RGD and RGE peptide derivatization of dextran was confirmed by ^1H -NMR (data not shown) and the pure final product was lyophilized for subsequent use.

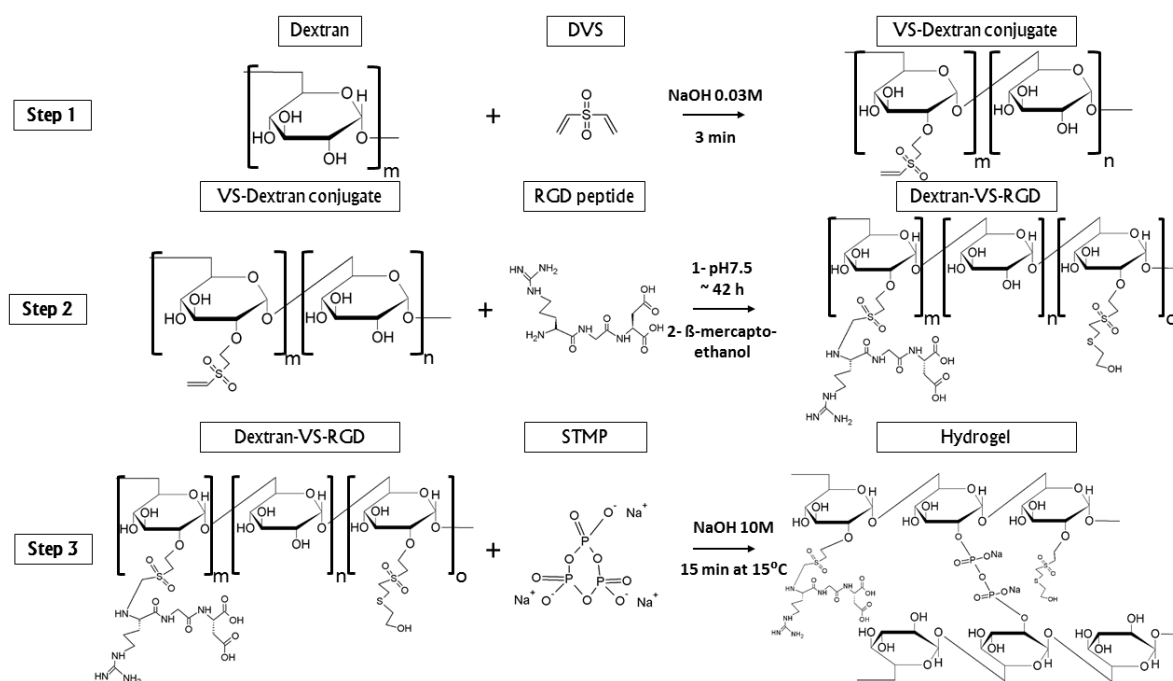


Figure 5.1: Schematic representation of the hydrogel formation process

5.6.2 Preparation of scaffolds

The peptide-derivatized dextrans were mixed with pristine dextran prior crosslinking with STMP in order to obtain a well-defined 3D scaffold (Figure 5.1, Step 3). Crosslinking reaction was carried out under alkaline conditions (NaOH, 10 M) and at 50°C. A W_{total} of polymer: W_{STMP} ratio of 3:1 was found to be optimal to obtain transparent, easy-to-handle and well-held scaffolds presenting a smooth surface (data not shown). Hydrogel were cooled into a small glass cylinder (6 x 8 mm) to ease manipulations (e.g., getting them out of the insert for microscopic observations). In order to verify the impact of our dextran modifications upon their cell adhesion properties, 10% of modified dextran (Dex-VS, Dex-VS-RGD or Dex-VS-RGE) were mixed with 90% of pristine dextran (Dex) for hydrogel preparation. The resulting scaffolds presented the same morphological aspect. RGE peptide was used as a negative control to demonstrate the specificity of the cell response to the adhesive extracellular matrix peptide (RGD peptide).

Furthermore, different RGD peptide contents (i.e., 0.1; 0.3; 1; 3 and 10%) were assessed to identify the lowest quantity required for cell adhesion on the surface of the hydrogel. Note that the percentage of added RGD-modified dextran is relative to the total amount of polymer crosslinked

by STMP for hydrogel preparation. The swollen hydrogels presented the same transparent aspect and were well-held.

5.6.3 Cellular assay

5.6.3.1 HUVEC adhesion assay

To assess the effect of the cell adhesive RGD peptide incorporated into the scaffold, HUVEC were seeded for 3 h on the hydrogels made of 100% pristine dextran (Dex) and a mix of 90% of pristine and 10 % of modified dextran (Dex-VS, Dex-VS-RGD and Dex-VS-RGE). A resazurin metabolic assay was directly carried out 3 h after cell seeding; results are shown in Fig 2A. HUVEC adhesion on the surface of Dex-VS-RGD based hydrogel was the highest we observed. A direct comparison to adhesion levels on Dex-VS-RGE indicated that the HUVEC adhesion was selective and greatly improved in presence of the specific peptide sequence of RGD.

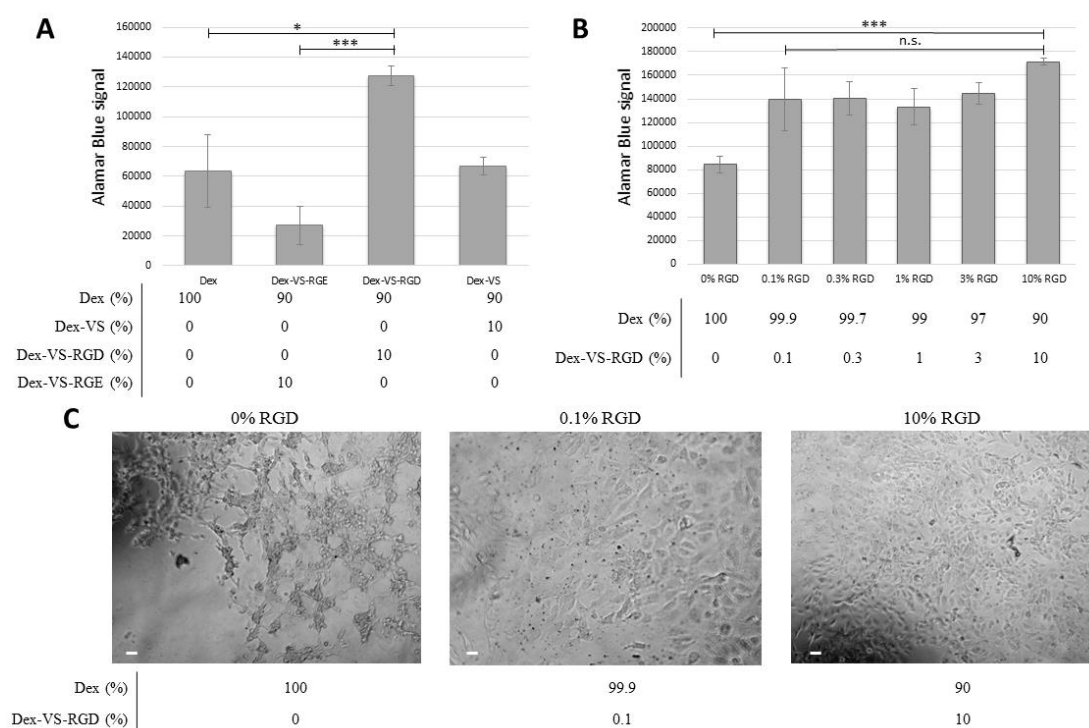


Figure 5.2: HUVEC adhesion on dextran-based hydrogels. Cell adhesion on hydrogel surface was assessed by metabolic assay (Alamar Blue) 3h post-seeding. Different hydrogel formulation were tested, i.e. hydrogels containing **A**. 90% dextran and 10% modified dextran (Dex-VS, Dex-VS-

RGE and Dex-VS-RGD). **B.** increasing Dex-VS-RGD content (from 0.1 to 10% $W_{\text{Dex-VS-RGD}}/W_{\text{Dex}}$). As a reference, results on hydrogels made of pristine dextran are shown. The data were expressed as mean values ($n = 3$ different scaffolds for each condition). Statistical differences are noticed * and *** for $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively and "n.s." means not statistically different. **C.** Optical microscopy images of paraformaldehyde-fixed HUVEC cells on three hydrogel surfaces of B. Scale bar = 50 μm

In order to evaluate the minimal amount of RGD peptide required to support HUVEC adhesion, different hydrogel formulations were then prepared by varying the Dex-VS-RGD ratio (from 0.1 to 10%) for a fixed total dextran quantity. As can be seen in Fig 5.2.B, increasing the RGD amount from 0.1% to 10% did not significantly improve cell adhesion onto the hydrogel surfaces ($p > 0.05$; confirmed by light microscopy inspection of fixed samples – Figure 5.2.C). Nevertheless, HUVECs showed a significantly higher adhesion on Dex-VS-RGD (10%) based hydrogels when compared to negative control (0% of RGD). Altogether, these results allowed us to conclude that 0.1% of RGD was sufficient to support HUVEC attachment to hydrogel surfaces and further increasing the percentage of RGD did not translate into significant improvement.

5.6.4 Hydrogel characterization

5.6.4.1 Morphology observations

The effect of hydrogel composition (Dex, Dex-VS, Dex-VS-RGD) on morphology was investigated by SEM. As shown in Fig 3A, all the gels presented a sponge-like structure with different pore sizes, thus clearly, illustrating the effect of dextran derivatization performed prior to crosslinking. Pristine dextran (Dex)-based hydrogels were characterized by larger pores than Dex-VS hydrogels. This is probably due to the hydrophobic character of vinyl sulfone molecules (Zhao et al., 2014). In presence of grafted RGD in the scaffold, the SEM micrographs (Figure 5.3.A) revealed larger pores as the peptide sequence might have kept dextran chains away from the crosslinking agent, resulting in bigger pores in the matrix.

Open-pore structures were generated by adding different porogens to the original hydrogel composition. Several weight ratios $W_{\text{total of dextran}}:W_{\text{porogen}}$ (i.e. 1:0.16; 1:0.25; 1:0.5; 1:1; 1:1.5) for different porogens (i.e., sodium carbonate, sodium bicarbonate and sodium chloride) were tested

and analyzed by SEM (data not shown) and the best results were obtained using 1:0.25 of $W_{\text{total of dextran}}:W_{\text{NaCl}}$ as shown in Fig 5.3A. That is, for this experimental condition, SEM analysis of the cross-section of the hydrogels allowed us to visualize well-interconnected pores of bigger sizes, which may contribute to enhance cell migration and penetration inside the hydrogel (Laverigne et al., 2012). Using sodium carbonate and bicarbonate, hydrogels were brittle and difficult to handle. These observations motivated our choice to use sodium chloride for the rest of the study for macroporous scaffolds preparation.

5.6.4.2 Swelling assay

Hydrogels are three-dimensional polymeric networks capable of retaining a high amount of biological fluids at steady state. For this reason, swelling measurement is an appropriate parameter to characterize the physical properties of the final crosslinked networks. Under our experimental conditions, the swelling degree could be affected by the crosslinking density and the electrostatic interactions that may occur between the polymer chains (Bejenariu, Popa, Dulong, Picton, & Le Cerf, 2009; Tao et al., 2016). Using STMP to crosslink dextran chains, there are two antagonistic phenomena that can influence the swelling level of the final hydrogel; increasing STMP quantity may reduce liquid uptake of the hydrogel because of the higher crosslinking density. But it can also result in greater liquid uptake as a result of the electrostatic repulsion introduced by the charges of the phosphate released by STMP (Bejenariu et al., 2009; Tao et al., 2016). Freeze-dried hydrogels were allowed to swell in PBS pH 7.4 for 24h. As can be seen in Fig 3B, adding an increasing quantity ($W_{\text{Dex}}: W_{\text{NaCl}}=1:0; 1:0.25; 1:0.5; 1:1$) of salt to the original formulation of hydrogels had a positive effect on swelling. Our results confirmed that adding salt led to the formation of opened macroporous structures inside the scaffold. The scaffolds might have absorbed liquid more easily, increasing the swelling ratio (Racksanti, Janhom, Punyanitya, Watanesk, & Watanesk, 2015).

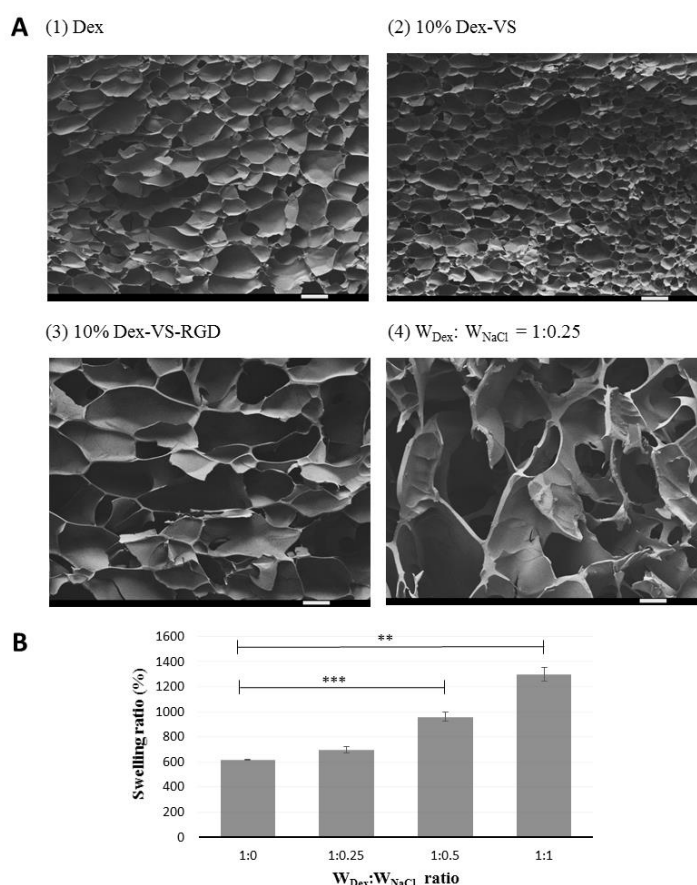


Figure 5.3: **A.** Scanning electron microscopy photographs illustrating the three-dimensional structure and pore size of the hydrogels resulting from the crosslinking of (1) pristine dextran (Dex) and (2, 3) modified dextrans (Dex-VS and Dex-VS-RGD, respectively). (4) Pore interconnection was observed when sodium chloride ($W_{\text{Dex}}:W_{\text{NaCl}} = 1:0.25$) was added to the original hydrogel formulation (scale bar correspond to 100 μm). **B.** Swelling ratio in PBS of hydrogel corresponding to various sodium chloride quantities added to 0.1% Dex-VS-RGD. Data correspond to average values ($n = 3$) and statistical differences were denoted by * if $p < 0.05$ **, if $p < 0.01$ and by *** if $p < 0.001$

Altogether, our results indicated that a $W_{\text{Dex}}:W_{\text{NaCl}}$ ratio of 1:0.25 might be optimal for our application since the gel physical properties were improved compared to the negative control (i.e. no salt added to the original formula) while maintaining a well-held and stable hydrogel over time. The higher the quantities of added salt, the higher the swelling degree. However, for $W_{\text{Dex}}:W_{\text{NaCl}}$ ratios of 1:0.5 and 1:1, SEM analysis showed the presence of heterogeneous structures with big

defects that might affect support stability over time and negatively impact cell growth (data not shown).

5.6.5 Cellular proliferation and migration into porous scaffold

SEM analysis of the generated macroporous hydrogels revealed smooth surfaces presenting very small holes (qualitative observation, Figure 5.4), which might limit cell penetration. Since the main objective of this work was to develop a cellular niche, it was important that the cells infiltrate the scaffold. For these reasons, a thin layer of sodium chloride was deposited at the surface of selected hydrogels in order to create more/larger orifices, and consequently, provide better access to the scaffold interior. Salt addition to the surface was assessed at two different time points (i.e. after 5 and 10 min after the beginning of the crosslinking reaction). SEM images of the hydrogel surfaces (Figure 5.4) showed the creation of small orifices on the surface of the treated hydrogels compared to the negative control. Sodium chloride crystals effect on the top of the scaffold was more pronounced when added after 10 min from the start of the crosslinking reaction at 50°C.

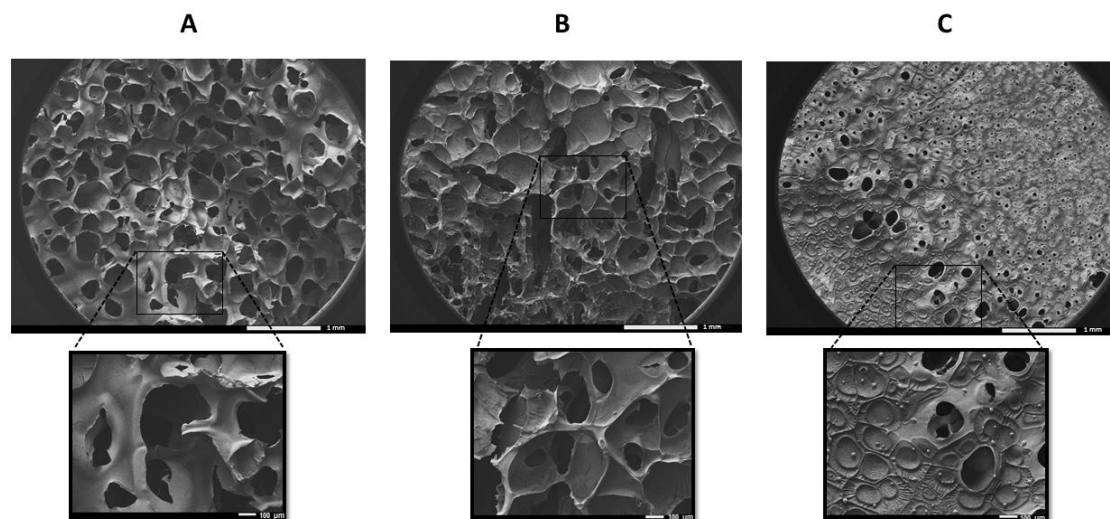


Figure 5.4: Surface morphology of the hydrogel by SEM. The hydrogel surface was covered by a thin layer of NaCl crystals at different time points (5 (A) and 10 (B) minutes) after the beginning of the crosslinking reaction. For the negative control (C), salt was not added neither to the hydrogel preparation mix, nor to the surface of the scaffold

HUVEC proliferation on selected scaffolds in complete medium was then studied for 7 days. The cell culture medium was refreshed every 2 days in order to maintain favorable culture conditions. Cell viability on 0.1% Dex-VS-RGD and 1% Dex-VS-RGD based hydrogel was analysed using a LIVE/DEAD assay. Cell penetration was assessed on macroporous hydrogels prepared by adding NaCl ($W_{\text{Dex}}:W_{\text{NaCl}}$) to the original formulation and to the surface at 10 min from the beginning of gelation. Non-porous hydrogels (no salt added) were used as a negative control. As shown in Figure 5.5.A., cells penetrated in the gels harboring pores at their surface; they migrated and could be visualized as white rings within the gels. These white rings migrated lower from the top of the gel and were more intense for 0.1% Dex-VS-RGD based hydrogels compared to 1% Dex-VS-RGD based hydrogels. A fluorescent microscopy analysis of the top of the hydrogels (Figure 5.5.C.) indicated that more green cells were present at the surface of 1% RGD-based hydrogels compared to 0.1% RGD-based hydrogels. To further confirm cell penetration inside the hydrogel, transverse sections of selected hydrogels were performed (Figure 5.5.B.) precisely within the white rings. These sections were analysed by fluorescent microscopy. Calcein AM-labeled cells were detected on the cross-sectional images. 0.1% Dex-VS-RGD based hydrogel displayed many viable cells whereas, a small number of green fluorescent live cells could be seen for 1% Dex-VS-RGD based hydrogel. These microscopic observations confirmed that cells infiltrated the scaffold and formed the visible white rings observed after 7 days of culture. Altogether, the higher concentration of RGD peptide in the hydrogel led to a better cell attachment to the surface but prevented cell penetration inside the scaffold. Of interest, no cytotoxicity was detected as no red cells were revealed using the LIVE/DEAD assay.

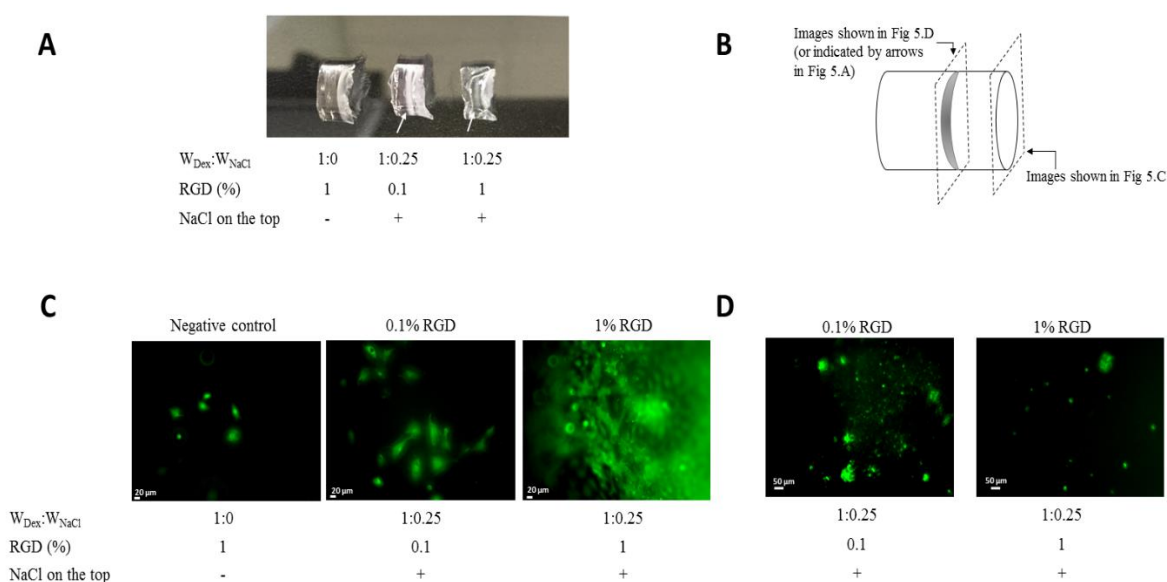


Figure 5.5: HUVEC adhesion and proliferation for 7 days on dextran-based hydrogels at different RGD ratio. **A**. Macroscopic images of the hydrogels showing a white ring (indicated by the arrows), which was observed by fluorescent microscopy (**C**). The gels were cut as indicated in (**B**) and each section analyzed by fluorescent microscopy (494 nm for excitation and 517 nm for emission). Cell organisation on the surface (**C**) and inside (**D**) the different hydrogels was assessed by Calcein AM-based coloration

5.7 Discussion

The present study describes the synthesis and characterization of a promising biocompatible dextran-based hydrogel as well as its ability to support HUVEC migration and proliferation. It has been highlighted that maintaining a high level of viable cells in implanted hydrogels remains a major obstacle for many clinical applications. Indeed, there is a need for stable cell delivery to the desired tissue while maintaining sufficient survivability to improve tissue regeneration (Robinson et al., 2016). The dextran based hydrogel we have developed may thus contribute to overcome these clinical barriers, since it is easy to handle, it can be modulated to the desired shape and it was demonstrated that it can hold viable cells for more than 7 days, allowing cell proliferation and local viable cell delivery. The use of dextran as the backbone of the scaffold is of great interest based on dextran availability and relatively low cost, low toxicity, biocompatibility, simple modification and ease elimination by clearance or by dextranases present in gastrointestinal tract (Ferreira et al.,

2007; Maia et al., 2014; Ribeiro et al., 2013; R. Zhang et al., 2007). Dextran has been highly utilized as a cell-resistant polymeric coating in order to allow peptide immobilization and, consequently, promote tunable cell-scaffold interactions in presence of very low backgrounds of cell adhesion (B. t. Liberelle et al., 2010; Luong & Gerecht, 2009; Massia et al., 2000). Based on previous work from our group (Fortier, Durocher, & De Crescenzo, 2014; Noel et al., 2016), vinyl sulfone was used as a linker for RGD peptide grafting on dextran chain. In fact, vinyl sulfone groups were greatly used to crosslink many synthetic and natural polymers (e.g. linear or armed polyethylene glycol, dextran, pluronic) to obtain hydrogels (Hiemstra, van der Aa, et al., 2007a; Hiemstra, van der Aa, Zhong, Dijkstra, & Feijen, 2007b; Hiemstra, Zhong, et al., 2007; S. T. Lee et al., 2010; Lin et al., 2010; M. Lutolf & Hubbell, 2003; Pitarresi, Tripodo, Triolo, Fiorica, & Giammona, 2009; R. Zhang et al., 2007). The subsequent coupling reaction presents many advantages: (i) it occurs under mild conditions and in a biocompatible medium via Michael-type addition (Lin et al., 2010), (ii) secondary products are non-toxic and (iii) finally DVS reacts with both thiol and amine groups in the same conditions (Budhavaram, Stauffer, & Barone, 2011; M. Lutolf & Hubbell, 2003; M. P. Lutolf, Tirelli, Cerritelli, Cavalli, & Hubbell, 2001; Pitarresi et al., 2009; R. Zhang et al., 2007). For all these reasons, we decided to use vinyl sulfone as a linker for efficient and stable grafting of adhesive peptides into the hydrogel by covalent linkage. To the best of our knowledge, the work we present here is the first to report the use of vinyl sulfone groups as linkers for adhesive peptide grafting into polysaccharide based hydrogels.

Pristine and modified dextran (Dex-VS, Dex-VS-RGD, Dex-VS-RGE) were crosslinked by STMP in alkaline conditions at 50°C allowing gel formation. Being non-toxic, STMP was highly utilized to crosslink oligo/polysaccharides (e.g. pullulan, dextran, functionalized dextran, cyclodextrin, Xanthan gum) or other polymers (i.e. polyvinyl alcohol; hyaluronan) in order to synthesize homogenous hydrogels (Abed et al., 2008; V Dulong et al., 2004; Gemma Leone et al., 2010; G. Leone et al., 2015; Maire et al., 2005; Morandim-Giannetti, Silva, Magalhães, Schor, & Bersanetti, 2015; Tao et al., 2016; Thébaud et al., 2007). Despite the harsh conditions of the crosslinking reaction (i.e. NaOH 10 M, 50°C), STMP utilization remains advantageous since the resulting secondary product is an inorganic pyrophosphate (PPi) that is easily eliminated (Autissier et al., 2010; Lack, Dulong, Picton, Cerf, & Condamine, 2007; Wintgens et al., 2015). STMP is also biocompatible; it is legally used in the USA to crosslink polymers in the food industry (Virginie

Dulong, Forbice, Condamine, Le Cerf, & Picton, 2011; Lack et al., 2007), a very important asset when developing a scaffold for biomedical applications. Cellular assays confirmed that the crosslinked RGD-modified dextran hydrogel was non-toxic: HUVEC adhered to the substrate, proliferated and migrated inside the hydrogel for 7 days of culture. It has been clearly demonstrated that even a small amount of RGD (i.e. 0.1%) was sufficient to support HUVEC adhesion to the desired hydrogel. This result contrasts with those from several studies in which dextran-containing hydrogels were coated with collagen and fibronectin. In fact, in these studies, macroporous hydrogels were obtained using higher amounts of porogen ($W_{\text{total of polysaccharide}}:W_{\text{NaCl}} = 1: 1.2$) or by freeze-drying the polysaccharide mixture during the cross-linking reaction, which might have damaged the hydrogel surface and, consequently, limited cell adhesion (Autissier et al., 2010; Fayol et al., 2013; Lavergne et al., 2012). On the contrary, the macroporous hydrogel presented here was generated by limiting the quantity of sodium chloride added to the original formulation. It allowed pore interconnections without altering the smooth aspect of the hydrogel surface. Our cell assay results confirmed that a $W_{\text{total of polysaccharide}}:W_{\text{NaCl}}$ ratio of 1:0.25 was sufficient to create an open pore structure. Such a structure is crucial for achieving good nutrient and solvent distribution inside the scaffold; it thus directly affects cell survival and proliferation within the matrix. Furthermore, the thin layer of sodium chloride applied to the top of each hydrogel leads to small orifice creation; these were crucial for cell penetration inside the scaffold after their initial attachment to the hydrogel at the beginning of the culture.

5.8 Conclusion

In this work, RGD-modified dextran was used for hydrogel fabrication with controlled cell/scaffold interactions. We have succeeded to promote HUVEC infiltration inside the scaffold by adjusting (i) the RGD content in the matrix, (ii) the nature and the concentration of porogen agents, and (iii) the orifice generation on the hydrogel surface. With our optimal conditions, cell proliferation and excellent cell viability inside the hydrogel were obtained for up to 7 days.

5.9 Acknowledgments

This work was financially supported by the Canada Research Chair on Protein-Enhanced Biomaterials. We would like to acknowledge the regional Center of NMR spectroscopy at

University of Montreal for NMR verification of different polymer modifications and the center for characterization and microscopy of materials at École Polytechnique de Montréal for Scanning Electron Microscopy analysis of prepared hydrogels.

5.10 References

- Abed, A., Deval, B., Assoul, N., Bataille, I., Portes, P., Louedec, L., . . . Meddahi-Pellé, A. (2008). A Biocompatible Polysaccharide Hydrogel–Embedded Polypropylene Mesh for Enhanced Tissue Integration in Rats. *Tissue Engineering Part A*, 14(4), 519-527. doi: 10.1089/tea.2007.0134
- Autissier, A., Le Visage, C., Pouzet, C., Chaubet, F., & Letourneur, D. (2010). Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomaterialia*, 6(9), 3640-3648. doi: 10.1016/j.actbio.2010.03.004
- Bejenariu, A., Popa, M., Dulong, V., Picton, L., & Le Cerf, D. (2009). Trisodium trimetaphosphate crosslinked xanthan networks: synthesis, swelling, loading and releasing behaviour. *Polymer Bulletin*, 62(4), 525-538. doi: 10.1007/s00289-008-0033-8
- Budhavaram, N. K., Stauffer, M., & Barone, J. R. (2011). Chemistry between crosslinks affects the properties of peptide hydrogels. *materials science and engineering: C*, 31(5), 1042-1049. doi: 10.1016/j.msec.2011.03.005
- Cabral, J. D., Roxburgh, M., Shi, Z., Liu, L., McConnell, M., Williams, G., . . . Moratti, S. C. (2014). Synthesis, physiochemical characterization, and biocompatibility of a chitosan/dextran-based hydrogel for postsurgical adhesion prevention. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(12), 2743-2756. doi: 10.1007/s10856-014-5292-3
- Drury, J. L., & Mooney, D. J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24(24), 4337-4351. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00340-5
- Dulong, V., Forbice, R., Condamine, E., Le Cerf, D., & Picton, L. (2011). Pullulan–STMP hydrogels: a way to correlate crosslinking mechanism, structure and physicochemical properties. *Polymer Bulletin*, 67(3), 455-466. doi: 10.1007/s00289-010-0435-2

- Dulong, V., Lack, S., Le Cerf, D., Picton, L., Vannier, J., & Muller, G. (2004). Hyaluronan-based hydrogels particles prepared by crosslinking with trisodium trimetaphosphate. *Synthesis and characterization. Carbohydrate Polymers*, 57(1), 1-6. doi: 10.1016/j.carbpol.2003.12.006
- Fayol, D., Le Visage, C., Ino, J., Gazeau, F., Letourneur, D., & Wilhelm, C. (2013). Design of Biomimetic Vascular Grafts With Magnetic Endothelial Patterning. *Cell Transplantation*, 22(11), 2105-2118. doi: 10.3727/096368912X661300
- Ferreira, L. S., Gerecht, S., Fuller, J., Shieh, H. F., Vunjak-Novakovic, G., & Langer, R. (2007). Bioactive hydrogel scaffolds for controllable vascular differentiation of human embryonic stem cells. *Biomaterials*, 28(17), 2706-2717. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.01.021
- Fortier, C., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2014). Surface modification of nonviral nanocarriers for enhanced gene delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9(1), 135-151. doi: 10.2217/nnm.13.194
- Gasparini, L., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2014). Natural polymers for the microencapsulation of cells. *Journal Of the Royal Society Interface*, 11:20140817(100), 1-19. doi: 10.1098/rsif.2014.0817
- Hiemstra, C., van der Aa, L. J., Zhong, Z., Dijkstra, P. J., & Feijen, J. (2007a). Novel in Situ Forming, Degradable Dextran Hydrogels by Michael Addition Chemistry: Synthesis, Rheology, and Degradation. *Macromolecules*, 40(4), 1165-1173. doi: 10.1021/ma062468d
- Hiemstra, C., van der Aa, L. J., Zhong, Z., Dijkstra, P. J., & Feijen, J. (2007b). Rapidly in Situ-Forming Degradable Hydrogels from Dextran Thiols through Michael Addition. *Biomacromolecules*, 8(5), 1548-1556. doi: 10.1021/bm061191m
- Hiemstra, C., Zhong, Z., van Steenberg, M. J., Hennink, W. E., & Feijen, J. (2007a). Release of model proteins and basic fibroblast growth factor from in situ forming degradable dextran hydrogels. *Journal of Controlled Release*, 122(1), 71-78. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.06.011
- Jonker, A. M., Löwik, D. W. P. M., & van Hest, J. C. M. (2012). Peptide- and Protein-Based Hydrogels. *Chemistry of Materials*, 24(5), 759-773. doi: 10.1021/cm202640w
- Lack, S., Dulong, V., Picton, L., Cerf, D. L., & Condamine, E. (2007). High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of polysaccharides crosslinked by sodium

trimetaphosphate: a proposal for the reaction mechanism. *Carbohydrate Research*, 342(7), 943-953. doi: 10.1016/j.carres.2007.01.011

Lavergne, M., Derkaoui, M., Delmau, C., Letourneur, D., Uzan, G., & Le Visage, C. (2012). Porous Polysaccharide-Based Scaffolds for Human Endothelial Progenitor Cells. *Macromolecular Bioscience*, 12(7), 901-910. doi: 10.1002/mabi.201100431

Lee, S. T., Im Yun, J., Jo, Y. S., Mochizuki, M., van der Vlies, A. J., Kontos, S., . . . Hubbell, J. A. (2010). Engineering integrin signaling for promoting embryonic stem cell self-renewal in a precisely defined niche. *Biomaterials*, 31(6), 1219-1226. doi : 10.1016/j.biomaterials.2009.10.054

Leone, G., Consumi, M., Aggravi, M., Donati, A., Lamponi, S., & Magnani, A. (2010). PVA/STMP based hydrogels as potential substitutes of human vitreous. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(8), 2491-2500. doi: 10.1007/s10856-010-4092-7

Leone, G., Volpato, M. D., Nelli, N., Lamponi, S., Boanini, E., Bigi, A., & Magnani, A. (2015). Continuous multilayered composite hydrogel as osteochondral substitute. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(8), 2521-2530. doi: 10.1002/jbm.a.35389

Lévesque, S. G., Lim, R. M., & Shoichet, M. S. (2005). Macroporous interconnected dextran scaffolds of controlled porosity for tissue-engineering applications. *Biomaterials*, 26(35), 7436-7446. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.054

Liberelle, B. t., Boucher, C., Chen, J., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2010). Impact of Epidermal Growth Factor Tethering Strategy on Cellular Response. *Bioconjugate Chemistry*, 21(12), 2257-2266. doi: 10.1021/bc1002604

Lin, C., Zhao, P., Li, F., Guo, F. F., Li, Z. Q., & Wen, X. J. (2010). Thermosensitive in situ-forming dextran-pluronic hydrogels through Michael addition. *Materials Science & Engineering. C: Materials for Biological Applications*, 30(8), 1236-1244. doi: 10.1016/j.msec.2010.07.004

Luong, E., & Gerecht, S. (2009). Stem Cells and Scaffolds for Vascularizing Engineered Tissue Constructs. In U. Martin (Ed.), *Engineering of Stem Cells* (pp. 129-172). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Lutolf, M., & Hubbell, J. (2003). Synthesis and physicochemical characterization of end-linked poly (ethylene glycol)-co-peptide hydrogels formed by Michael-type addition. *Biomacromolecules*, 4(3), 713-722. doi: 10.1021/bm025744e
- Lutolf, M. P., Tirelli, N., Cerritelli, S., Cavalli, L., & Hubbell, J. A. (2001). Systematic Modulation of Michael-Type Reactivity of Thiols through the Use of Charged Amino Acids. *Bioconjugate Chemistry*, 12(6), 1051-1056. doi: 10.1021/bc015519e
- Maia, J., Evangelista, M. B., Gil, H., & Ferreira, L. (2014). Dextran-based materials for biomedical applications. *Carbohydrates Applications in Medicine*, 31-53.
- Maire, M., Logeart-Avramoglou, D., Degat, M.-C., & Chaubet, F. (2005). Retention of transforming growth factor β 1 using functionalized dextran-based hydrogels. *Biomaterials*, 26(14), 1771-1780. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.06.003
- Massia, S. P., Stark, J., & Letbetter, D. S. (2000). Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading. *Biomaterials*, 21(22), 2253-2261. doi: 10.1016/S0142-9612(00)00151-4
- Mehvar, R. (2000). Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *Journal of Controlled Release*, 69(1), 1-25. doi: 10.1016/S0168-3659(00)00302-3
- Monchaux, E., & Vermette, P. (2007). Bioactive microarrays immobilized on low-fouling surfaces to study specific endothelial cell adhesion. *Biomacromolecules*, 8(11), 3668-3673. doi: 10.1021/bm7007907
- Morandim-Giannetti, A. d. A., Silva, R. C., Magalhães, O., Schor, P., & Bersanetti, P. A. (2015). Conditions for obtaining polyvinyl alcohol/trisodium trimetaphosphate hydrogels as vitreous humor substitute. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 1-10. doi: 10.1002/jbm.b.33473
- Noel, S., Fortier, C., Murschel, F., Belzil, A., Gaudet, G., Jolicœur, M., & De Crescenzo, G. (2016). Co-immobilization of adhesive peptides and VEGF within a dextran-based coating for vascular applications. *Acta Biomaterialia*, 37, 69-82. doi: 10.1016/j.actbio.2016.03.043
- Petreaca, M., & Martins-Green, M. (2011). Cell-ECM interactions in repair and regeneration. *Principles of regenerative medicine*, 19-65. doi: 10.1101/cshperspect.a005124

- Pitarresi, G., Tripodo, G., Triolo, D., Fiorica, C., & Giammona, G. (2009). Inulin vinyl sulfone derivative cross-linked with bis-amino PEG: new materials for biomedical applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 19(6), 419-423. doi: 10.1016/S1773-2247(09)50086-X
- Purnama, A., Aid-Launais, R., Haddad, O., Maire, M., Mantovani, D., Letourneur, D., . . . Le Visage, C. (2015). Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Delivery and Translational Research*, 5(2), 187-197. doi: 10.1007/s13346-013-0177-4
- Racksanti, A., Janhom, S., Punyanitya, S., Watanesk, R., & Watanesk, S. (2015). An approach for preparing an absorbable porous film of silk fibroin–rice starch modified with trisodium trimetaphosphate. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(8), (41517)41511-41517. doi: 10.1002/app.41517
- Ribeiro, M. P., Morgado, P. I., Miguel, S. P., Coutinho, P., & Correia, I. J. (2013). Dextran-based hydrogel containing chitosan microparticles loaded with growth factors to be used in wound healing. *Materials Science & Engineering. C: Materials for Biological Applications*, 33(5), 2958-2966. doi: 10.1016/j.msec.2013.03.025
- Robinson, S. T., Douglas, A. M., Chadid, T., Kuo, K., Rajabalan, A., Li, H., . . . Brewster, L. P. (2016). A novel platelet lysate hydrogel for endothelial cell and mesenchymal stem cell-directed neovascularization. *Acta Biomaterialia*, 36, 86-98. doi: 10.1016/j.actbio.2016.03.002
- Shlyapnikov, Y. M., Andreev, Y. A., Kozlov, S. A., Vassilevski, A. A., & Grishin, E. V. (2008). Bacterial production of latarcin 2a, a potent antimicrobial peptide from spider venom. *Protein Expression and Purification*, 60(1), 89-95. doi: 10.1016/j.pep.2008.03.011
- Silva, A. K. A., Juenet, M., Meddahi-Pellé, A., & Letourneur, D. (2015). Polysaccharide-based strategies for heart tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 116, 267-277. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.06.010
- Tao, Y., Zhang, R., Xu, W., Bai, Z., Zhou, Y., Zhao, S., . . . Yu, D. (2016). Rheological behavior and microstructure of release-controlled hydrogels based on xanthan gum crosslinked with sodium trimetaphosphate. *Food Hydrocolloids*, 52, 923-933. doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.09.006

- Thébaud, N.-B., Pierron, D., Bareille, R., Le Visage, C., Letourneur, D., & Bordenave, L. (2007). Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: A pre-requisite for vascular tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(2), 339-345. doi: 10.1007/s10856-006-0698-1
- Van Tomme, S. R., & Hennink, W. E. (2007). Biodegradable dextran hydrogels for protein delivery applications. *Expert Review of Medical Devices*, 4(2), 147-164. doi: 10.1586/17434440.4.2.147
- Wintgens, V., Lorthioir, C., Dubot, P., Sébille, B., & Amiel, C. (2015). Cyclodextrin/dextran based hydrogels prepared by cross-linking with sodium trimetaphosphate. *Carbohydrate Polymers*, 132, 80-88. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.06.038
- Woerly, S., Pinet, E., De Robertis, L., Van Diep, D., & Bousmina, M. (2001). Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGel™). *Biomaterials*, 22(10), 1095-1111. doi: 10.1016/S0142-9612(00)00354-9
- Yu, Y., & Chau, Y. (2012). One-Step “Click” Method for Generating Vinyl Sulfone Groups on Hydroxyl-Containing Water-Soluble Polymers. *Biomacromolecules*, 13(3), 937-942. doi: 10.1021/bm2014476
- Zhang, R., Bowyer, A., Eissenthal, R., & Hubble, J. (2007). A smart membrane based on an antigen- responsive hydrogel. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(4), 976-984. doi: 10.1002/bit.21255
- Zhao, Y., Zhang, X., Wang, Y., Wu, Z., An, J., Lu, Z., . . . Li, C. (2014). In situ cross-linked polysaccharide hydrogel as extracellular matrix mimics for antibiotics delivery. *Carbohydrate Polymers*, 105, 63-69. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.01.068
- Zustiak, S. P., Durbal, R., & Leach, J. B. (2010). Influence of cell-adhesive peptide ligands on poly(ethylene glycol) hydrogel physical, mechanical and transport properties. *Acta Biomaterialia*, 6(9), 3404-3414. doi: 10.1016/j.actbio.2010.03.040

CHAPITRE 6 ARTICLE 3: BIOAVAILABILITY OF IMMOBILIZED EPIDERMAL GROWTH FACTOR: COVALENT VERSUS NON-COVALENT GRAFTING

6.1 Présentation de l'article:

Ce chapitre présente les résultats obtenus par rapport à l'étude la comparaison de deux stratégies d'immobilisation d'une protéine d'intérêt (ici il s'agit du facteur de croissance épidermique, EGF) dans le but d'une co-immobilisation avec RGD sur l'hydrogel développé dans le chapitre précédent. Ces travaux sont présentés dans ce chapitre sous forme d'un rapport scientifique qui a été soumis pour publication dans le journal "Biointerphases".

6.2 Entête de l'article

"Bioavailability of immobilized epidermal growth factor: covalent versus non-covalent grafting"

Nesrine Riahi^a, Frederic Murschel^a, Sophie Lerouge^b, Yves Durocher^c, Olivier Henry^a, Gregory De Crescenzo^{a,*}

(a) Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologie Biomédicales (GRSTB), Bio-P² Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montreal, QC, Canada H3C 3A7.

(b) Laboratory of Endovascular Biomaterials (LBeV), Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montreal (CRCHUM), Montreal, QC, Canada

(c) Life Sciences | NRC Human Health Therapeutics Portfolio, Building Montreal-Royalmount, National Research Council Canada, Montreal (QC), Canada H4P 2R2

6.3 Abstract

In an effort to rationalize and optimize an anti-apoptotic coating combining chondroitin sulfate (CS) and epidermal growth factor (EGF) for vascular applications, we here report the comparison

of two grafting strategies aiming to display EGF in an oriented fashion on CS. For that purpose, we produced, purified and characterized a chimeric protein corresponding to EGF that was N-terminally fused to a cysteine and a coil peptide. The chimera was covalently immobilized via its free thiol group or captured via coiled-coil interactions at the surface of a biosensor or on a chondroitin sulfate coating in multi-well plates, mimicking the coating we previously developed for stent-graft surfaces. The interactions of grafted EGF with the soluble domain of its receptor or the impact of grafted EGF upon vascular smooth muscle survival in pro-apoptotic conditions indicated that the coiled-coil based tethering was the best approach to display EGF. These results, combined to direct ELISA measurements, indicated that the coiled-coil tethering approach allowed increasing the amount of bioavailable EGF when compared to covalent coupling, rather than the total amount of grafted EGF, while using much lower concentrations of tagged EGF during incubation.

6.4 Introduction

In the field of biomedical engineering, the development of smart materials promoting and sustaining tissue regeneration holds great promises for orthopedic, vascular and neural applications. In that endeavor, the decoration of implant surfaces and scaffolds with peptides and proteins, especially adhesion peptides and growth factors, has been extensively studied to mimic Nature's mechanisms for tissue growth and healing. Of interest, growth factor immobilization has been reported to preserve their biological activity in several cases while impeding cell membrane receptor internalization and degradation, thus, sustaining their local action (Ito, 2008; Masters, 2011; Sharon & Puleo, 2008a). When compared to bolus delivery, growth factor immobilization may also limit systemic side-effects while diminishing the prohibiting costs associated to their short half-life, when infused.

Researchers have initially investigated growth factor immobilization by adsorption because of the relative simplicity of the approach. However, adsorption does not allow to finely control protein orientation, which may mitigate protein interactions with cells and, thus, overall protein biological effect (Goddard & Hotchkiss, 2007; Rusmini, Zhong, & Feijen, 2007; Sharon & Puleo, 2008a). As an alternative, covalent binding of peptides and growth factors, on substrates harboring amino, carboxyl and thiol groups, has been proposed (Collier & Segura, 2011; Drumheller & Hubbell,

1994; Klim, Li, Wrighton, Piekarczyk, & Kiessling, 2010; Kuhl & Griffith-Cima, 1996; Moon et al., 2010; Sharon & Puleo, 2008a, 2008b). In most cases, the reactive groups targeted by these chemistries are multiple within the proteins. They may be present in the vicinity or at the active site of the growth factor, thus impacting its activity when immobilized (De Crescenzo, Grothe, Lortie, Debanne, & O'Connor-McCourt, 2000). Genetic engineering may be used to add specificity to grafting. First, the addition of amino acids providing a unique reactive group within the protein, such as a free thiol group on cysteine side-chain, can be used for site-specific covalent binding, as already reported for adhesion peptide (Delaittre, Greiner, Pauloehrl, Bastmeyer, & Barner-Kowollik, 2012) and VEGF grafting (Anderson, Chen, Iruela-Arispe, & Segura, 2009; Backer, Patel, Jehning, Claffey, & Backer, 2006). Also, the addition of a short peptide tag on the protein of interest has already been reported to drive its specific adsorption (Murschel, Zaimi, Noel, Jolicoeur, & De Crescenzo, 2015). At last, the addition of various tags that mediate interactions with specific biological partners have been proposed for affinity-based capture. Those include biotin interacting with streptavidin (De Crescenzo et al., 2000), antibody Fc domain interacting with protein A/G (Ogiwara, Nagaoka, Cho, & Akaike, 2005), proline-rich peptides interacting with SH3 domains (K. Vulic & Shoichet, 2012), heparin-binding domains to bind heparin (Katarina Vulic & Shoichet, 2014), collagen binding domains to bind collagen (Addi, Murschel, & De Crescenzo, 2016) to name a few (Cabanas Danés, Huskens, & Jonkheijm, 2014). For both covalent and affinity-based immobilization, substrate should be inert to avoid non-specific adsorption (Burnham, Turner, Szarowski, & Martin, 2006; Gonçalves, Martins, Oliveira, Almeida-Porada, & Barbosa, 2010; Liberelle et al., 2010; Rusmini et al., 2007). Furthermore, for a given growth factor, its amount and activity may also be influenced by the density, the length and the flexibility of the chemical spacer used to hold it to the surface (Ito, 2008).

Based on naturally occurring coiled-coil structures found in proteins, we have previously developed two de novo designed peptides (the Ecoil and the Kcoil), each composed of a distinct 7-amino acid motif (a heptad) that is repeated several times. On its own, each peptide is monomeric; when mixed, they specifically hetero-dimerize to form the canonical coiled-coil structure. We demonstrated the utility of this system to tether fully bioactive proteins in a specific, oriented and stable fashion on various surfaces and coatings, including polyethylene terephthalate (PET) (Boucher et al., 2010), polyethylenimine (Fortier, De Crescenzo, & Durocher, 2013), chondroitin

sulfate (P. Lequoy, Liberelle, De Crescenzo, & Lerouge, 2014) and carboxymethylated dextran (Liberelle et al., 2010). In our strategy, one of the two 35-amino acid-long (5 heptad-long) peptides (e.g., the Kcoil) is covalently bound to the surface via a unique engineered cysteine while the protein to be captured is expressed as a fusion protein containing the other coil peptide (e.g., the Ecoil). Capture is achieved via simple incubation. It has been demonstrated that the high stability of our coiled-coil structure was due to hydrophobic and ionic interactions, while the affinity and stability of the resulting complex can be controlled by varying the number of heptads of each coil peptide (Gregory De Crescenzo, Jennifer R. Litowski, Robert S. Hodges, & Maureen D. O'Connor-McCourt, 2003) or via peptide sequence variation (Litowski & Hodges, 2002). All these features have made this complex an attractive tool for biotechnological and biomedical applications. For example, we successfully demonstrated the utility of the coiled-coil approach to tether the epidermal growth factor (EGF) being N-terminally tagged with the Ecoil peptide on a coating made of chondroitin sulfate that had been decorated with the Kcoil peptide (P. Lequoy et al., 2014). This coating was shown to be promising to enhance the performance of stent-grafts employed for the endovascular treatment of abdominal aortic aneurysms or other vascular implants such as tissue-engineered vascular grafts. Notably, the oriented display of EGF was proven to give better results (better vascular smooth muscle cell survival) than a similar surface harboring amine-coupled EGF (P. Lequoy et al., 2014).

In an effort to rationalize and optimize our coating, we here explore a novel strategy to graft EGF in an oriented and covalent fashion. This was achieved by designing a chimeric protein corresponding to EGF being N-terminally tagged with both cysteine and Ecoil. Three grafting strategies described in Figure 6.1 were then assayed; their impact on protein performance was studied by surface plasmon resonance (SPR)-based biosensing, ELISA, as well as in an in vitro cell assay on chondroitin sulfate-coated surfaces.

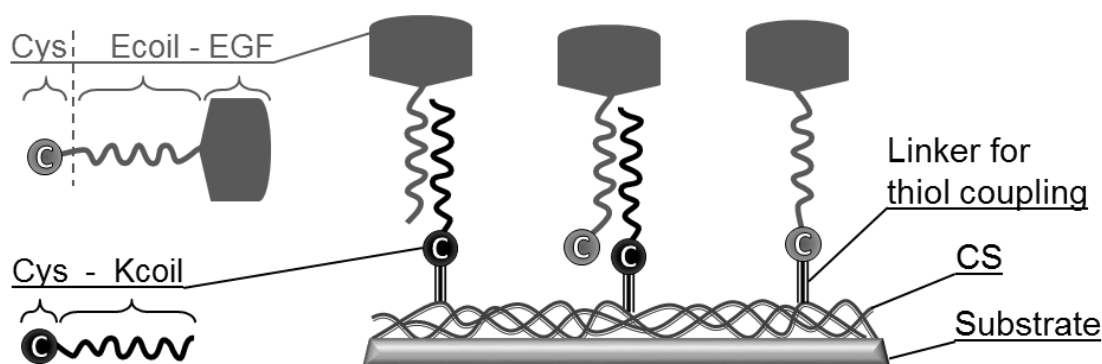


Figure 6.1: Strategies for the oriented grafting of Epidermal Growth Factor on chondroitin sulfate (CS). Non-covalent capture of (Left) Ecoil-EGF and (Middle) Cys-Ecoil-EGF via Ecoil/Kcoil coiled-coil interactions. (Right) Covalent grafting of Cys-Ecoil-EGF via direct thiol coupling

6.5 Experimental

6.5.1 Chemicals and Reagents

MilliQ water (18.2 M Ω ·cm; total organic compounds (TOC) = 4 ppb) was generated using a Millipore Gradient A 10 purification system. Amicon Ultra-15 Centrifugal filter units 10 kDa were purchased from MilliporeSigma (Oakville, ON). F17 free style medium, L-glutamine, geneticin as well as kolliphore were purchased from Invitrogen (Burlington, ON). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) was from GIBCO/BRL (Burlington, ON). Sodium chloride, Chondroitin-4-sulfate, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (modified PBS, without calcium chloride and magnesium chloride), fetal bovine serum, L-cysteine, acetic acid, anti-Mouse-HRP conjugate and sodium orthovanadate were purchased from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON). 25- and 75 cm² CellBind flasks, 250 mL shake flasks and 96-well microplates were purchased from Corning Inc (Corning, NY). HEPES buffered saline (HBS-EP), thiol coupling kit containing N-hydroxysuccinimide (NHS), ethyl-N'-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), 2(2-pyridinyldithio) ethaneamine (PDEA) and CM-5 sensor ships were obtained from GE Healthcare (Baie d'Urfe, Qc). 3-(2-pyridyldithio) propionyl hydrazide (PDPH), DMEM:F12 and pen-strep (penicillin-streptomycin) were purchased from ThermoFisher Scientific. Cysteine-tagged Kcoil peptide corresponding to the CGG-(KVSALKE)₅ sequence was synthesised in the peptide facility at University of Colorado, as described elsewhere(De Crescenzo, Litowski, et al.,

2003). The ectodomain of the EGF receptor fused to the Fc portion of an antibody (EGFRED-Fc) and the ELISA DuoSet kits for EGF quantification were purchased from R&D systems (R&D systems, Minneapolis, MN). TN1 peptone was purchased from Tekniscience (Terrebonne, Qc).

6.5.2 Cell Culture

Cell culture was carried out in a humidified incubator at 37°C and with 5% of CO₂. A human embryonic kidney (HEK) 293-6E cell line was used for recombinant protein expression of the Cys-Ecoil-EGF chimera. Cells were maintained in suspension in F17 free style medium supplemented with 4 mM of glutamine, 0.1% v/v of kolliphore and 25 µg/mL of geneticin (G-418). Cell culture of human carcinoma cell line (A-431) was performed in T-flasks in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% of fetal bovine serum. Vascular smooth muscle cells (VSMCs) from rat (a7r5 cell line; ATCC, Manassas, VA) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham's Media (DMEM:F12) supplemented with 1% pen-strep and 10% fetal bovine serum. VSMCs were used between passages 13 and 15 for all the experiments.

6.5.3 Recombinant Protein Production

The Cys-Ecoil-EGF construct was designed as follows: MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQECGGEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEKGGGGSGGGSGGGGSELHHHHHHHHGT*MNSDSECPLSHDGYCLHDGVC*MYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR. That is, a N-terminal signal peptide (underlined) was followed by a short linker containing the cysteine residue (QVQECG - italic). This was followed by five repeats of the Ecoil heptad - (EVSALEK)₅ - that was separated from the EGF ligand by a (G4S)₃-SEL(H)₈GT linker (bold). The corresponding cDNA sequence was flanked by EcoRI and BamHI sites on the 5' and 3' end respectively. The cDNA encoding the fusion construct was optimized with human codons bias, synthesized by Genewiz (South Plainfield, NJ, USA) and cloned into the pTT5 expression vector (J. Zhang et al., 2009) between EcoRI and BamHI restriction sites.

For protein production, HEK 293-6E cells were transiently transfected using 0.1% w/v plasmid and 0.14% w/v 25-kDa linear poly(ethylene imine) when cell density reached $1.5 \cdot 10^6$ cell/mL, as previously described (C. Boucher et al., 2008). 24 hours post-transfection, 0.5% w/v of TN1

peptone was added to the culture. The culture was stopped when mortality reached 20%, and centrifugation was performed for 20 min at 4500 g. The supernatant was filtered and kept overnight at 4°C. Cys-Ecoil-EGF was purified by Ion Metal Affinity Chromatography (IMAC): the supernatants containing the soluble protein was loaded on a Ni²⁺-charged 5-mL His-trap HP column using an ÄKTA explorer 10 system (GE Healthcare, Bai d'Urfe, Qc). The Cys-Ecoil-EGF protein was eluted by applying 10 column volumes of PBS containing 500 mM of imidazole (10 min, flow rate of 5 mL/min). Imidazole excess was removed using Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (10 kDa, 5 cycles of 45 min at 4500 g). Protein yield was determined using an Epoch™ Multi-volume multi-sample Spectrophotometer System (BioTek Instruments, USA). Protein expression monitoring during production and purification process was performed by SDS-PAGE as follows: Samples were prepared using 3:1 ratio of Laemmli sample buffer supplemented with 5% v/v of β-mercaptoethanol and were analysed on 15% polyacrylamide gels. Coomassie brilliant blue R-250 was used for gel staining.

6.5.4 Surface Plasmon Resonance (SPR)-based Assay

Real-time monitoring of the interactions between grafted Cys-Ecoil-EGF or Ecoil-EGF and the injected extracellular domain of the EGF receptor (EGFRED) fused to the Fc portion of an antibody (EGFRED-Fc) was performed using a Biacore T100 biosensor (25°C). All experiments were carried out on CM5 sensorchips with HBS-EP as running buffer. EGFRED-Fc was injected at various concentrations (2; 5; 10; 20; and 50 nM) for 60 s at 100 µL/min over mock and Cys-Ecoil-EGF or Ecoil-EGF surfaces. The dissociation of the resulting complex was also monitored at the same flow rate for 120 s. Resulting sensorgrams were double-referenced prior analysis. Kinetic constants were determined assuming a simple 1:1 binding model using the software provided by the biosensor manufacturer (C. Boucher et al., 2008). For Cys-Ecoil-EGF protein grafting on sensorchips, two distinct approaches were performed for the sake of comparison, as described in Figure 6.1:

(i) by coiled-coil interactions: 70 RU of Cys-Ecoil-EGF or Ecoil-EGF protein were captured by injecting them at 1 nM (100 µL/min) over 47 RU of covalently immobilized Cysteine-tagged Kcoil peptides via coiled-coil interactions (the Kcoil surface had been generated according to our already published protocol (Riahi, Cappadocia, Henry, Omichinski, & De Crescenzo, 2015)).

(ii) by thiol coupling procedure: 425 RU of Cys-Ecoil-EGF protein were covalently attached through the thiol group of their unique cysteine to the biosensor surface by adapting the thiol-based covalent coupling procedure we used for Kcoil grafting (Cys-Ecoil-EGF was diluted in 10 mM acetate buffer, pH 5 at around 1 μ M for coupling).

Note that in between EGFRED-Fc injections, guanidium hydrochloride (5 M) or acetate buffer (pH 5) with 1 M of NaCl were injected for the regeneration of the surfaces on which Cys-Ecoil-EGF was covalently bound or coiled-coil captured, respectively.

6.5.5 In Vitro Cell Assay to Evaluate Soluble Cys-Ecoil-EGF Bioactivity

A-431 cells were distributed in 48-well plate (250 μ L/well; 10^6 cell/well in DMEM supplemented with 10% serum). After an overnight incubation at 37°C, the cell monolayer was washed with PBS and the complete medium was replaced by serum-free DMEM. After 3 h of serum starvation, purified Cys-Ecoil-EGF was added to the wells at final concentrations ranging from 0 to 100 nM for precisely 5 min. Then, cells were washed twice with PBS supplemented with sodium orthovanadate and harvested using lysis buffer prepared as previously described (Cyril Boucher et al., 2008). Cell lysates were collected, centrifuged for 20 min at 10 000 g and supernatants were kept at 4°C for subsequent analysis of EGF receptor autophosphorylation by Western blot, as already described (Cyril Boucher et al., 2008).

6.5.6 Cys-Ecoil-EGF Grafting on Chondroitin Sulfate-coated Surfaces

Carboxylated CellBIND 96-well plates were modified with carbohydrazide using standard carbodiimide chemistry, then chondroitin sulfate was grafted according to our previously described protocol (Pauline Lequoy, Murschel, Liberelle, Lerouge, & De Crescenzo, 2016). Protein grafting was then performed on the chondroitin sulfate coating by adapting our previous protocol (Pauline Lequoy et al., 2016). That is:

(i) For oriented capture of Cys-Ecoil-EGF protein, cysteine-tagged Kcoil was grafted to CS-coated surface using a thiol coupling to PDPH linker. Then, Cys-Ecoil-EGF was captured via Kcoil/Ecoil interactions.

(ii) For covalent coupling of the Cys-Ecoil-EGF, the same covalent binding protocol was used by replacing the cysteine-tagged Kcoil with the Cys-Ecoil-EGF protein.

In each case, Cys-Ecoil-EGF quantification was performed by direct ELISA including a 1-h incubation of biotinylated anti-EGF antibody, followed by 20-min incubation of horseradish peroxidase-streptavidin conjugate, and finally 10-min incubation of the substrate solution. Substrate oxidation was monitored for 10 min by repetitious absorbance readings at 630 nm. Absorbance slopes (unit: 10^{-3} absorbance unit/s) were compiled and are referred to as arbitrary units in the manuscript (Murschel et al., 2015).

6.5.7 VSMC Survival in Serum-free Medium

Surfaces decorated with Cys-Ecoil-EGF were tested in a VSMC survival assay in serum-free medium. Cells were seeded at 20 000 cell/well in 96-well plates in complete medium and then incubated at 37°C, 5% of CO₂ for 24 h. Cells were rinsed two times with PBS in order to eliminate non and/or weakly adhered cells, then the complete medium was replaced by serum-free medium (DMEM:F12 with 1% of pen-strep) and was freshly replaced every two days for 5 days of culture. Cell density at j_0 (i.e. 24 hours of adhesion) and j_5 (at the end of culture) was evaluated using a metabolic assay (i.e. Resazurin) as previously described (P. Lequoy et al., 2014). Experiments were conducted in triplicates.

6.6 Results and discussions

6.6.1 Cys-Ecoil-EGF production and purification

A pTT5 expression plasmid was used for the production of an epidermal growth factor chimera bearing three tags: a cysteine extension and an Ecoil -(EVSALEK)₅ sequence- to enable capture through covalent thiol coupling and non-covalent coiled-coil interactions, respectively, as well as a (His)₈ tag for purification. All tags were added at the N-terminus of the human EGF sequence (see Figure 6.2.a), in accordance with our previous study on the influence of tag nature and position on the biological activity of the construct (C. Boucher et al., 2008). More specifically, the cysteine residue was positioned near the Ecoil, so that both coupling strategies would provide a comparable cross-linker length.

The double-tagged chimera, namely Cys-Ecoil-EGF, was produced by transient transfection of HEK 293-6E cells, using polyethyleneimine for pDNA condensation, and purified by IMAC. Cys-Ecoil-EGF production and purification were assessed by SDS-PAGE under reducing conditions (Figure 6.2.b). Purified Ecoil-EGF was used as control, and detected around 18 kDa, despite its expected 12-kDa molecular weight but in agreement with our previous reports (C. Boucher et al., 2008). The visible band (Figure 6.2) in the cell culture supernatant indicated that the Cys-Ecoil-EGF chimera was well secreted in the medium, and analysis of IMAC elution indicated an efficient purification. The purified product was quantified by spectrophotometry and stored at -80°C , then tested for biological activity *in vitro*.

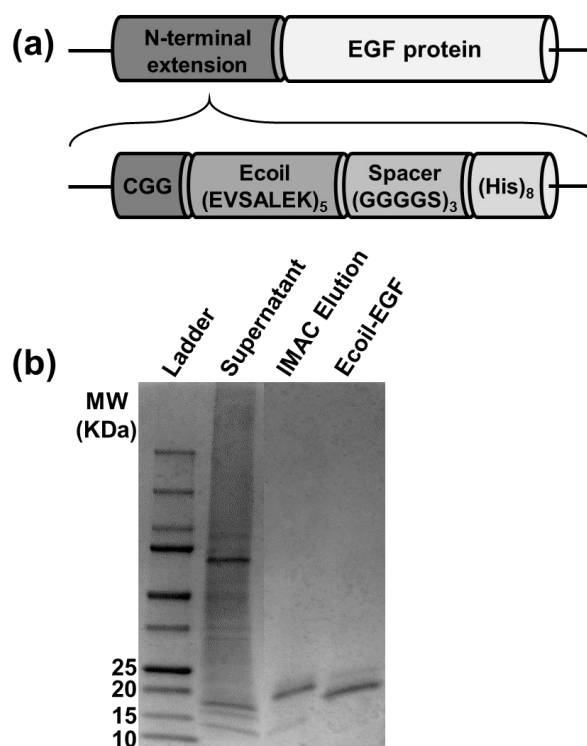


Figure 6.2: Cys-Ecoil-EGF production and purification. **a.** pTT5 expression plasmid for the production of the Cysteine-Ecoil-tagged hEGF. **b.** SDS-PAGE analysis of Cys-Ecoil-EGF production and purification in reducing conditions after Coomassie Blue staining. Purified Ecoil-EGF was used as control

6.6.2 Diffusible Cys-Ecoil-EGF bioactivity assay

A-431 cells overexpressing EGF receptors (EGFR) were amplified in multiwell-plates in DMEM with 10% FBS. When the cells were close to confluency, they were starved with serum-free medium for 3 hours, then incubated during 5 minutes with concentrations of Cys-Ecoil-EGF ranging from 0.1 to 100 nM, or Ecoil-EGF as control. After cell lysis, EGFR phosphorylation levels were analysed by Western Blot using an anti-phosphotyrosine antibody (Figure 6.3). Receptor phosphorylation for the different concentrations of Cys-Ecoil-EGF was comparable to the levels observed for A-431 cells incubated with Ecoil-EGF, and in accordance with our previous report (Boucher, C. et al., 2008). The absence of a visible band in the negative control (no growth factor) confirmed that the phosphorylation of the receptor we observed was indeed due to the biological activity of the EGF moiety of our construct. We already reported that the addition of the Ecoil tag at the N-terminus of EGF had no impact on its bioactivity in a diffusible state (Boucher, C. et al., 2008). Here we show that the further extension of the tag with a CGG sequence similarly did not induce any loss of biological activity either.

Altogether, a purified chimera of EGF was prepared with two additional moieties, that is, a free cysteine and an Ecoil tag while conserving the biological capabilities of the native growth factor in solution.

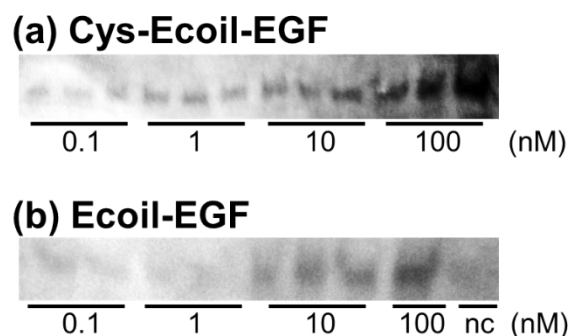


Figure 6.3: Cys-Ecoil-EGF bioactivity in solution. Western Blot analysis of EGF receptor phosphorylation in A431-cells, using an anti-phosphotyrosine antibody, after a 5-min incubation with different concentrations of recombinant **a.** Cys-Ecoil-EGF, or **b.** Ecoil-EGF as positive control. Negative control with no growth factor is indicated by: nc

6.6.3 Immobilized Cys-Ecoil-EGF bioactivity assays

We then further assessed that both added moieties enabled the grafting of Cys-Ecoil-EGF on a substrate of interest, and evaluated whether the immobilized growth factor displayed biological activity. More specifically, we tested if the immobilization of EGF in an oriented and covalent fashion (via thiol bond formation) would be better suited than its oriented non-covalent capture (via coiled-coil interactions) for the generation of smart coatings to be applied, for instance to stent-grafts or tissue engineered vascular grafts. Both grafting strategies were performed at the surface of an SPR biosensor as well as on cell culture wells on which our stent-graft coating made of chondroitin sulfate was re-created. On the one hand, the biosensing experiments allowed us to derive the apparent kinetic constants of binding between known quantities of immobilized EGF and its injected receptor ectodomain (EGFRED-Fc). On the other hand, EGF grafting in 96-well plates allowed assaying the ability of immobilized EGF to promote vascular smooth muscle cell survival in absence of serum in an in vitro cell assay.

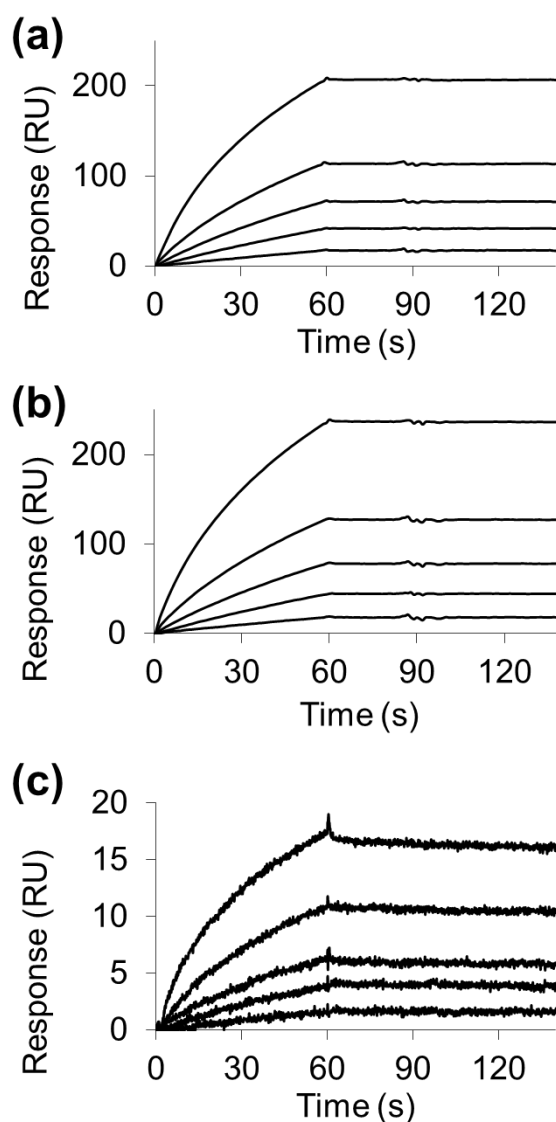


Figure 6.4 : Control-corrected sensorgrams corresponding to EGFRED-Fc injections over grafted (Cys-)Ecoil-EGF. EGFRED-Fc solutions of 2, 5, 10, 20 and 50 nM were injected over 70 RUs of **a.** Ecoil-EGF or **b.** Cys-Ecoil-EGF both captured at the biosensor surface by coiled-coil interactions, and **c.** 425 RUs of Cys-Ecoil-EGF that had been covalently immobilized vi thiol-based chemistry.

Results corresponding to SPR biosensing investigations are shown in Figure 6.4 while related kinetic constants are reported in Table 6.1. In a first set of experiments, our Cys-Ecoil-EGF construct was non-covalently captured on a biosensor surface where 47 RUs of the Kcoil peptide

had been covalently immobilized; its binding to EGFRED-Fc was compared to that recorded when Ecoil-EGF chimera had been captured via coiled-coil interactions. As shown in Figure 6.4.a. and 6.4.b., when both chimeras were captured at similar levels (i.e., 70 RUs), injections of EGFRED-Fc at concentrations ranging from 2 to 50 nM resulted in sets of sensorgrams characterized by a similar amplitude (that is, around 200-250 RUs for the end of injection of the highest EGFRED-Fc concentration) and an almost null dissociation of the complexes upon buffer injection (thus a high stability of the ligand-receptor complex), as expected for a dimeric EGFRED-Fc (C. Boucher et al., 2008) rather than monomeric soluble EGFRED (Le et al., 2009).

The high similarity between these interactions was further confirmed when globally fitting both sets of sensorgrams. Indeed, calculated kinetic (see k_a and k_d in Table 6.1), and thus apparent thermodynamic dissociation constants, were very similar ($K_{Dapp} = 45 \pm 15$ and 65 ± 15 pM for Cys-Ecoil-EGF and Ecoil-EGF, respectively, see Table 6.1). Thus, these results confirmed that, within the chimera, the Cysteine tag does not significantly affect EGF bioactivity neither in solution (Figure 6.3) nor when captured via coiled-coil interactions (Figure 6.4 and Table 6.1).

Table 6.1: Kinetic and thermodynamic constants calculated for the EGFRED-Fc binding to the different surfaces displaying EGF moieties

Grafting Method	Protein	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_{Dapp} (pM)
Coiled-coil	Ecoil-EGF	$(5.49 \pm 0.06) 10^5$	$(3.4 \pm 0.8) 10^{-5}$	62 ± 15
Coiled-coil	Cys-Ecoil-EGF	$(5.19 \pm 0.04) 10^5$	$(2.4 \pm 0.7) 10^{-5}$	45 ± 15
Covalent bond	Cys-Ecoil-EGF	$(7.44 \pm 0.04) 10^5$	$(2.9 \pm 0.1) 10^{-4}$	388 ± 16

In stark contrast, when the Cys-Ecoil-EGF construct was immobilized to the sensor surface via thiol covalent coupling, a drastic reduction in the amplitude of the recorded signal was observed when the same EGFRED-Fc concentrations were injected (Figure 6.4.c.): a maximal amplitude of 17 RUs vs more than 235 RUs was observed although 425 RUs vs 70 RUs of Cys-Ecoil-EGF had been grafted via thiol bond vs coiled-coil complex formation, respectively. These striking

differences between both modes of grafting also affected the kinetic and thermodynamic constants of the interaction, as shown by an increase in k_d for the cysteine mediated immobilization of the Cys-Ecoil-EGF chimera ((29 vs 2.4) 10^{-5} s^{-1} , Table 6.1). It is important to note, however, that this lower apparent stability may result mainly from the low amount of EGF being available for binding. Indeed, even though a simple model of binding adequately depicted our SPR data, the apparent high stability of the EGFRED-Fc/EGF complexes is due to the dimeric nature of the injected EGFRED-Fc. The dimeric EGFRED simultaneously binds to two EGF moieties, which creates an avidity situation that drastically affects the dissociation rate of the complex, as already observed with EGF binding to monomeric (Le et al., 2009) versus dimeric (C. Boucher et al., 2008) EGFRED. Thus, the density of bioavailable EGF directly affects the EGFRED-Fc ability to bind to two EGF moieties simultaneously, which in turn is reflected in both the amplitude of the signal (Figure 6.4) and k_d value (Table 6.1).

This SPR study was then complemented by investigating how cysteine- versus coiled-coil-mediated immobilization of EGF on chondroitin sulfate affected the levels of bioavailable EGF as well as its ability to promote vascular smooth muscle cell (VSMC) survival. This was achieved by direct ELISA and in an in vitro cell assay, respectively. In that endeavor, chondroitin sulfate coatings were created in multiple-well plates as already performed by our team (Lequoy, P. et al., 2016). Thiol-based chemistry was then applied to covalently bind cysteine-tagged Kcoil or Cys-Ecoil-EGF via their unique cysteine on chondroitin sulfate coatings. For the direct immobilization of Cys-Ecoil-EGF via the formation of a covalent bond, EGF chimera concentrations from 1 nM to 1 μM were tested. In parallel, for coiled-coil-mediated tethering, wells were first incubated with 1 μM of Kcoil for peptide covalent coupling then incubated with 0.01-10 nM Cys-Ecoil-EGF. For both grafting strategies, the amounts of captured EGF were then estimated by a direct ELISA assay we had previously developed and validated (Lequoy, P. et al., 2016). As shown in Figure 6.5.a., coiled-coil-mediated capture was much more efficient than cysteine covalent coupling, since the incubation of Cys-Ecoil-EGF at 1 nM on Kcoil surface lead to the capture of 12 ELISA arbitrary units, whereas the best thiol coupling condition (i.e. 100 nM of Cys-Ecoil-EGF) led to only 4 ELISA arbitrary units. The same coatings were then evaluated in an in vitro cell assay. We previously demonstrated that a coating combining chondroitin sulfate and EGF promoted VSMC survival and resistance to apoptosis in serum-free conditions. The anti-apoptotic effect was

significantly improved on CS surfaces exposing oriented EGF (i.e. Ecoil-EGF tethered via coiled-coil interactions) compared to random EGF (P. Lequoy et al., 2014). The same assay was used here to test the effect of coiled-coil mediated vs covalently bound Cys-Ecoil-EGF. As shown in Figure 6.5.b., increasing concentrations of incubated EGF increased VSMC survival for immobilized EGF quantities up to 3 ELISA arbitrary units. Cell survival then plateaued at a 30% value for higher quantities of grafted EGF. Of salient interest, the VSMC survival was the same for equivalent quantities of bioavailable Cys-Ecoil-EGF, independently of the capture method. Thus, capture resulting from low nanomolar solutions incubated on Kcoil surfaces gave similar outcomes for VSMC survival as surfaces resulting from covalent binding performed with 100-nM Cys-Ecoil-EGF concentrations (Figure 6.5.b.).

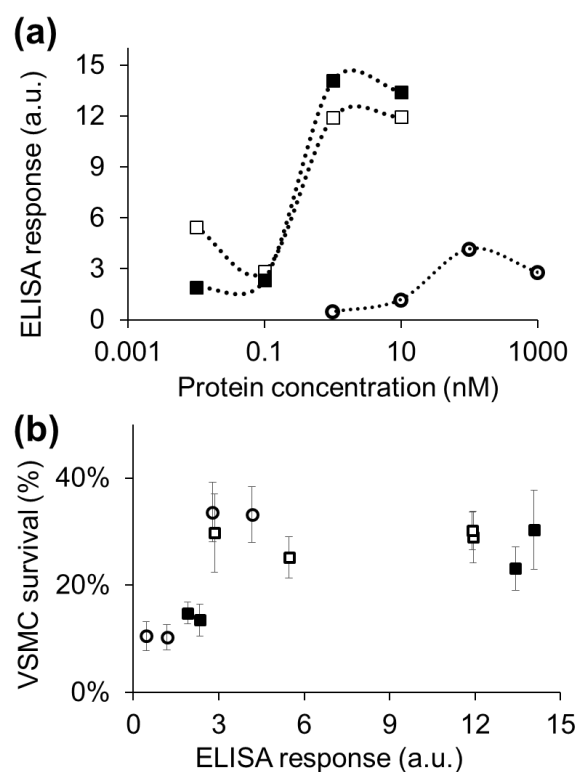


Figure 6.5 : Characterization of EGF grafting on chondroitin sulfate coating and its impact VSMC survival in pro-apoptotic conditions. **a.** Amounts of bioavailable grafted EGF was determined by direct ELISA for various concentrations of EGF chimera used during the grafting step (tethering

or covalent coupling). **b.** VSMC survival plotted as a function of bioavailable EGF (as shown in panel a.) for Ecoil-EGF (closed squares) and Cys-Ecoil EGF (open squares) that was tethered via coiled-coil interactions or Cys-Ecoil EGF covalently coupled via thiol-based chemistry (open circles).

Altogether, SPR measurements, direct ELISA and in vitro cell assay clearly demonstrate that the coiled-coil mediated tethering of Cys-Ecoil-EGF is a better strategy than its site-specific covalent immobilization for surface decoration.

The lower level of EGF we detected by ELISA after covalent immobilization can potentially be attributed to (i) a lower grafted amount, (ii) EGF unfolding due to the covalent coupling procedure and (iii) a sub-optimal display of the EGF moiety when thiol-bound vs coiled-coil-captured. However the first two explanations are unlikely, for the following reasons. First, our SPR-based assays indicated that 425 RUs of covalently bound Cys-Ecoil-EGF resulted in less EGFRED-Fc accumulation than 70 RUs of the same protein captured via coiled-coil interactions (Figure 6.4). Consequently, the differences in EGF levels we determined by ELISA are unlikely to be due to a lower EGF total amount within the coating. Second, the covalent coupling was performed at pH 5 (both in our SPR and in vitro cell assays). We have already demonstrated that a prolonged incubation of EGF at such a pH did not affect its ability to bind to its receptor (Liberelle et al., 2010). Thus, the differences cannot be attributed to EGF unfolding during covalent coupling.

The correlation between ELISA level and VSMC survival, independent of the mode of grafting (Figure 6.5), highly suggests that EGF capture via coiled-coil interactions enhances EGF display, making it more bioavailable than when covalently bound. Such an enhancement cannot be attributed to differences within the linker length since the engineered cysteine was added right after the Ecoil tag sequence. Thus, it is more likely that the coiled-coil interaction itself is responsible for the observed differences in EGF bioavailability. Two main phenomena may explain this behavior: (i) coiled-coil formation buries the hydrophobic residues and neutralizes the negative charges of the Ecoil moiety, which may limit unwanted interactions between the Ecoil and the chains of chondroitin sulfate chains; (ii) the coiled-coil heterodimer is a more rigid secondary structure than Ecoil alone. The heterodimer formation may thus maintain EGF away from the surface, which would enhance its availability for signaling, in good agreement with Fiorilli's *et al.* observations when performing dye coupling to surfaces using linkers harboring distinct flexibilities (Fiorilli et al., 2007)

6.7 SUMMARY AND CONCLUSIONS

In order to improve our anti-apoptotic chondroitin sulfate–EGF coating for endovascular implants, we have here investigated how the oriented covalent immobilization versus the oriented tethering (via coiled-coil interactions) of a chimeric EGF affected the performance of our coating. By combining an SPR-based biosensing approach, a direct ELISA and an in vitro cell assay, we conclude that the coiled-coil oriented recruitment of EGF is superior to its covalent immobilization. This results from a better display of EGF rather than an increased total grafted amount.

6.8 ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery Grant program, the Canada Research Chair on Protein-enhanced Biomaterials (G.D.C) as well as the Canada Research Chair on endovascular implants and biomaterials (S.L.).

6.9 References

- Addi, C., Murschel, F., & De Crescenzo, G. (2016). Design and use of chimeric proteins containing a collagen-binding domain for wound healing and bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* doi: 10.1089/ten.TEB.2016.0280
- Anderson, S. M., Chen, T. T., Iruela-Arispe, M. L., & Segura, T. (2009). The phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) by engineered surfaces with electrostatically or covalently immobilized VEGF. *Biomaterials*, 30(27), 4618-4628. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.030
- Backer, M. V., Patel, V., Jehning, B. T., Claffey, K. P., & Backer, J. M. (2006). Surface immobilization of active vascular endothelial growth factor via a cysteine-containing tag. *Biomaterials*, 27(31), 5452-5458. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.06.025
- Boucher, C., Ruiz, J. C., Thibault, M., Buschmann, M. D., Wertheimer, M. R., Jolicœur, M., . . . De Crescenzo, G. (2010). Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor

tethered via coiled-coil interactions. *Biomaterials*, 31(27), 7021-7031. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.072

Boucher, C., St-Laurent, G., Loignon, M., Jolicoeur, M., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2008). The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags. *Tissue Eng Part A*, 14(12), 2069-2077. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0037

Burnham, M. R., Turner, J. N., Szarowski, D., & Martin, D. L. (2006). Biological functionalization and surface micropatterning of polyacrylamide hydrogels. *Biomaterials*, 27(35), 5883-5891. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.08.001

Cabanas Danés, J., Huskens, J., & Jonkheijm, P. (2014). Chemical strategies for the presentation and delivery of growth factors. *Journal of materials chemistry. B: materials for biology and medicine*, 2(17), 2381 - 2394. doi: 10.1039/C3TB20853B

Collier, J. H., & Segura, T. (2011). Evolving the use of peptides as components of biomaterials. *Biomaterials*, 32(18), 4198-4204. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.02.030

De Crescenzo, G., Grothe, S., Lortie, R., Debanne, M. T., & O'Connor-McCourt, M. (2000). Real-time kinetic studies on the interaction of transforming growth factor alpha with the epidermal growth factor receptor extracellular domain reveal a conformational change model. *Biochemistry*, 39(31), 9466-9476. doi: 10.1021/bi992987r

De Crescenzo, G., Litowski, J. R., Hodges, R. S., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. *Biochemistry*, 42(6), 1754-1763. doi: 10.1021/bi0268450

Delaittre, G., Greiner, A. M., Pauloehrl, T., Bastmeyer, M., & Barner-Kowollik, C. (2012). Chemical approaches to synthetic polymer surface biofunctionalization for targeted cell adhesion using small binding motifs. *Soft Matter*, 8(28), 7323-7347. doi: 10.1039/c2sm07407a

Drumheller, P. D., & Hubbell, J. A. (1994). Polymer networks with grafted cell adhesion peptides for highly biospecific cell adhesive substrates. *Analytical Biochemistry*, 222(2), 380-388. doi: 10.1006/abio.1994.1506

- Fiorilli, S., Onida, B., Barolo, C., Viscardi, G., Brunel, D., & Garrone, E. (2007). Tethering of modified Reichardt's dye on SBA-15 mesoporous silica: the effect of the linker flexibility. *Langmuir*, 23(4), 2261-2268. doi: 10.1021/la062829i
- Fortier, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2013). A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery. *Biomaterials*, 34(4), 1344-1353. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.047
- Goddard, J. M., & Hotchkiss, J. H. (2007). Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science*, 32(7), 698-725. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002
- Goncalves, R., Martins, M. C., Oliveira, M. J., Almeida-Porada, G., & Barbosa, M. A. (2010). Bioactivity of immobilized EGF on self-assembled monolayers: optimization of the immobilization process. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 94(2), 576-585. doi: 10.1002/jbm.a.32723
- Ito, Y. (2008). Covalently immobilized biosignal molecule materials for tissue engineering. *Soft Matter*, 4(1), 46-56. doi: 10.1039/b708359a
- Klim, J. R., Li, L., Wrighton, P. J., Piekarczyk, M. S., & Kiessling, L. L. (2010). A defined glycosaminoglycan-binding substratum for human pluripotent stem cells. *Nat Methods*, 7(12), 989-994. doi: 10.1038/nmeth.1532
- Kuhl, P. R., & Griffith-Cima, L. G. (1996). Tethered epidermal growth factor as a paradigm for growth factor-induced stimulation from the solid phase. *Nature Medicine*, 2(9), 1022-1027. doi: 10.1038/nm0996-1022
- Le, P. U., Lenferink, A. E., Pinard, M., Baardsnes, J., Massie, B., & O'Connor-McCourt, M. D. (2009). *Escherichia coli* expression and refolding of E/K-coil-tagged EGF generates fully bioactive EGF for diverse applications. *Protein Expression and Purification*, 64(2), 108-117. doi: 10.1016/j.pep.2008.11.005
- Lequoy, P., Liberelle, B., De Crescenzo, G., & Lerouge, S. (2014). Additive benefits of chondroitin sulfate and oriented tethered epidermal growth factor for vascular smooth muscle cell survival. *Macromolecular Bioscience*, 14(5), 720-730. doi: 10.1002/mabi.201300443

- Lequoy, P., Murschel, F., Liberelle, B., Lerouge, S., & De Crescenzo, G. (2016). Controlled co-immobilization of EGF and VEGF to optimize vascular cell survival. *Acta Biomaterialia*, 29, 239-247. doi: 10.1016/j.actbio.2015.10.026
- Liberelle, B., Boucher, C., Chen, J., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2010). Impact of epidermal growth factor tethering strategy on cellular response. *Bioconjugate Chemistry*, 21(12), 2257-2266. doi: 10.1021/bc1002604
- Litowski, J. R., & Hodges, R. S. (2002). Designing heterodimeric two-stranded alpha-helical coiled-coils. Effects of hydrophobicity and alpha-helical propensity on protein folding, stability, and specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37272-37279. doi: 10.1074/jbc.M204257200
- Masters, K. S. (2011). Covalent growth factor immobilization strategies for tissue repair and regeneration. *Macromolecular Bioscience*, 11(9), 1149-1163. doi: 10.1002/mabi.201000505
- Moon, J. J., Saik, J. E., Poche, R. A., Leslie-Barbick, J. E., Lee, S. H., Smith, A. A., . . . West, J. L. (2010). Biomimetic hydrogels with pro-angiogenic properties. *Biomaterials*, 31(14), 3840-3847. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.104
- Murschel, F., Zaimi, A., Noel, S., Jolicoeur, M., & De Crescenzo, G. (2015). Specific Adsorption via Peptide Tags: Oriented Grafting and Release of Growth Factors for Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 16(11), 3445-3454. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00955
- Ogiwara, K., Nagaoka, M., Cho, C. S., & Akaike, T. (2005). Construction of a novel extracellular matrix using a new genetically engineered epidermal growth factor fused to IgG-Fc. *Biotechnology Letters*, 27(20), 1633-1637. doi: 10.1007/s10529-005-2605-0
- Riahi, N., Cappadocia, L., Henry, O., Omichinski, J., & De Crescenzo, G. (2016). Soluble expression, purification and functional characterization of a coil peptide composed of a positively charged and hydrophobic motif. *Amino Acids*, 48(2), 567-577. doi: 10.1007/s00726-015-2113-z
- Rusmini, F., Zhong, Z., & Feijen, J. (2007). Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules*, 8(6), 1775-1789. doi: 10.1021/bm061197b
- Sharon, J. L., & Puleo, D. A. (2008a). Immobilization of glycoproteins, such as VEGF, on biodegradable substrates. *Acta Biomaterialia*, 4(4), 1016-1023. doi: 10.1016/j.actbio.2008.02.017

Sharon, J. L., & Puleo, D. A. (2008b). The use of N-terminal immobilization of PTH(1-34) on PLGA to enhance bioactivity. *Biomaterials*, 29(21), 3137-3142. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.019

Vulic, K., & Shoichet, M. S. (2012). Tunable growth factor delivery from injectable hydrogels for tissue engineering. *Journal of the American Chemical Society*, 134(2), 882-885. doi: 10.1021/ja210638x

Vulic, K., & Shoichet, M. S. (2014). Affinity-based drug delivery systems for tissue repair and regeneration. *Biomacromolecules*, 15(11), 3867-3880. doi: 10.1021/bm501084u

Zhang, J., Liu, X., Bell, A., To, R., Baral, T. N., Azizi, A., . . . Durocher, Y. (2009). Transient expression and purification of chimeric heavy chain antibodies. *Protein Expression and Purification*, 65(1), 77-82. doi: 10.1016/j.pep.2008.10.011

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE

La science des biomatériaux a beaucoup progressé au cours de cette dernière décennie. Néanmoins, les chercheurs sont toujours en quête de nouveaux biomatériaux qui fournissent des modèles de culture cellulaire *in vitro* et dont la structure ressemble plus intimement à l'architecture des tissus humains. Dans ce contexte, un grand nombre d'hydrogels ont été étudiés puisque leur forte teneur en eau, leur morphologie, leur porosité, et leurs propriétés mécaniques contrôlables en font des matrices similaires à la matrice extracellulaire (ECM). Ce projet de doctorat a été réalisé dans un groupe de recherche dont l'axe de travail principal est le développement de biomatériaux protéinés. Les études précédentes du groupe ont majoritairement porté sur le développement de revêtements surfaciques biofonctionnels (c.-à-d. des surfaces où des facteurs de croissance ont été greffés, tels qu'EGF et VEGF) permettant ainsi une signalisation cellulaire soutenue dans le temps. La fonctionnalisation des différentes surfaces s'est appuyée sur l'utilisation du complexe peptidique Kcoil/Ecoil. L'efficacité de cet hétérodimère pour immobiliser de manière stable ces facteurs de croissance, et donc prolonger leur activité biologique, a été démontrée.

Ainsi, en se basant sur l'intérêt que présentent les hydrogels dans le domaine biomédical, il était naturel de se pencher sur l'utilisation de ce couple de peptides pour le développement et la décoration d'échafaudages moléculaires. L'auto-assemblage de précurseurs polymère-peptide coil nous était apparu comme très prometteur, car il pouvait être mis à profit pour bâtir un hydrogel présentant une structure interne hautement organisée, stable et ayant des propriétés mécaniques et une porosité facilement modifiables en jouant sur la séquence primaire des peptides utilisés.

Récemment, Hartgerink a montré que des peptides présentant le motif coiled-coil sont capables de former un hydrogel à fortes concentrations (mg/ml) (Dong, Paramonov, Aulisa, Bakota, & Hartgerink, 2007). Dans la même veine, des peptides et/ou des domaines protéiques ont été utilisés pour améliorer certaines propriétés des hydrogels telles que la biodégradabilité, mais aussi pour permettre leur biofonctionnalisation (grâce à des peptides d'adhésion comme le peptide RGD), ou encore, accroître leur sensibilité aux facteurs environnants (p.e. la température) ou à certaines molécules biologiquement actives (p.e. les protéases). Une des caractéristiques du motif "coiled-coil" est la spécificité de ce type d'interaction (c.-à-d. des interactions à la fois ioniques ou

électrostatiques mais aussi hydrophobes) avec une faible vitesse de dissociation, ce qui en fait un système idéal pour le greffage de biomolécules thérapeutiques. Différents types de polymères synthétiques et naturels ont été utilisés pour la préparation d'hydrogels à base de peptides coil. Récemment, trois systèmes de peptides distincts présentant la structure "coiled-coil" ont été conjugués au polymère HPMA (N-(2-Hydroxypropyl)méthacrylamide). L'auto-assemblage des précurseurs HPMA-peptide obtenus a permis de former un hydrogel stable. Cette même étude a montré que la longueur des peptides influence le processus de gélification. Le polyéthylène glycol (PEG) a aussi été couplé à des peptides synthétiques pour le développement de matrices à des fins biomédicales (Kopeček & Yang, 2009 ; Wu, Yang, Koňák, Kopečková, & Kopeček, 2008).

Bien que les recherches menées sur les peptides non-naturels (y compris les peptides utilisés dans le cadre de cette thèse) soient nombreuses, ces peptides sont encore produits par synthèse chimique (c.-à-d. par SPPS). Les études précédentes publiées par notre groupe de recherche utilisaient des quantités relativement faibles des peptides coil, ce qui ne posait pas de problème de coûts et de disponibilité, mais quand il s'agit de couplage à un polymère, de purification et de caractérisation du précurseur obtenu afin de préparer des échafaudages supramoléculaires tridimensionnels, il nous est apparu indispensable de trouver une alternative économiquement viable à la SPPS. C'est ainsi qu'est née l'idée de la production des peptides Kcoil et Ecoil en utilisant un système biologique, et plus particulièrement le système procaryote. Ainsi, ce projet de doctorat est composé de deux grandes parties : la première concerne le développement d'une approche pour effectuer la biosynthèse et la purification d'un peptide coil tandis que la deuxième concerne la conception et le développement d'un hydrogel utilisable pour implanter, mais aussi assurer la survie et la croissance de cellules d'intérêt dans l'organisme.

7.1 Production biologique du peptide synthétique Kcoil

Ayant déjà été intégré dans une protéine de fusion au facteur de croissance épidermique (EGF), le peptide Kcoil a été produit dans des cellules mammifères (HEK-293) (Cyril Boucher et al., 2008) mais aussi chez *E. coli* (P. U. Le et al., 2009). Cependant, la production du peptide seul n'a jamais été rapportée dans la littérature. L'utilisation d'un système procaryote, et plus particulièrement *E. coli*, est très avantageuse. Il s'agit d'une cellule hôte ayant une génétique bien caractérisée (Stuart Kyle, Amalia Aggeli, Eileen Ingham, & Michael J. McPherson, 2010) et qui ne requiert pour sa

croissance qu'une source de carbone peu coûteuse. *E. coli* est caractérisée par un temps de génération très court, ce qui permet une accumulation de biomasse rapide et, par conséquent, une production du produit potentiellement importante. Enfin, les bioprocédés se basant sur l'utilisation d'*E. coli* permettent une mise à l'échelle relativement facile comparativement aux autres plateformes d'expression (Stuart Kyle et al., 2010; Sudhir Sahdev, Sunil Khattar, & Kulvinder Saini, 2008). D'autres considérations très importantes en faveur du choix du système procaryote correspondent à l'absence de structure tridimensionnelle définie pour les peptides coils ainsi qu'à l'absence de modifications post-traductionnelles nécessaires pour assurer l'activité du peptide (Heman Chao et al., 1996). Cependant, la production bactérienne du peptide Kcoil présente un défi important en raison de la taille du peptide, de sa séquence comprenant à la fois des résidus hydrophobes combinés à des résidus chargés, et finalement de l'impossibilité de détecter le peptide par absorbance à 280 nm, compliquant d'autant plus le suivi du processus de purification.

Le procédé de production et de purification développé a été présenté dans le premier chapitre de cette thèse et a été publié dans le journal "Amino Acids". En effet, l'expression soluble du peptide a été testée en fusion avec 4 protéines, soient la Glutathione S-transferase (GST), la thiorédoxine (TRX), la N-utilisation substance protein A (NusA) et la Maltose binding Protein (MBP). L'expression sous forme insoluble a été également testée pour la production du Kcoil en supposant que les corps d'inclusions allaient camoufler la cytotoxicité du peptide, ce qui se traduirait par une amélioration du niveau d'expression. Cette stratégie ne s'est pas avérée très avantageuse dans le cas du peptide Kcoil, car le rendement final après purification n'était pas meilleur que celui correspondant à l'expression soluble du peptide Kcoil fusionné à la protéine Ketosteroid isomerase (KSI). L'utilisation de la GST n'a pas résolu le problème d'insolubilité, puisqu'une grande partie de la fraction produite par la bactérie a été exprimée dans les corps d'inclusion ; la récupération du peptide par solubilisation de ces vésicules étant impossible avec la GST, cette construction a été abandonnée. Le meilleur rendement d'expression soluble a été obtenu quand le peptide Kcoil a été exprimé en fusion avec la TRX, soit un rendement volumétrique de 1.5 mg par litre de culture bactérienne. Pour ce faire, après la lyse cellulaire et la centrifugation, le cœur du procédé de purification a consisté en trois étapes de chromatographie: une chromatographie d'affinité (IMAC) pour la purification du complexe His₆-TRX-Kcoil suivie d'une chromatographie échangeuse de cations pour la séparation de His₆-TRX et Kcoil après clivage enzymatique et, finalement, une

dernière chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC) pour la récupération du Kcoil pur en utilisant une colonne hydrophobe. La séquence du peptide ainsi que son activité biologique (c.-à-d. son interaction avec son partenaire Ecoil) ont été confirmées par spectroscopie de masse et par un essai basé sur la résonance plasmonique de surface, respectivement. Ce procédé peut paraître lourd à cause des trois chromatographies qu'il comporte, mais il ne demande que trois jours de travail continu depuis la récupération du culot cellulaire jusqu'au produit pur prêt pour la lyophilisation. La majorité des procédés rapportés dans la littérature comportent quant à eux deux étapes de chromatographie. Dans notre cas, il était impossible de dissocier le peptide Kcoil de la TRX après l'étape de clivage à la TEV-protéase sans utiliser la chromatographie échangeuse de cations. Ces observations nous ont conduits à supposer qu'il s'agit bien d'interactions électrostatiques entre les résidus chargés (c.-à-d. les lysines) du peptide et la protéine TRX (qui a un fort caractère anionique). Il faut noter que des conditions extrêmes de dénaturation (c.-à-d. l'utilisation d'urée ou de chlorure de guanidium) n'ont pas permis de dissocier le complexe (Edward R. LaVallie et al., 1993; John McCoy & Edward La Ville, 2001). Le rendement rapporté par Le et collègues (P. U. Le et al., 2009) pour la production de Kcoil-EGF était de 0,107 $\mu\text{mol/L}$. Leur stratégie de purification était basée sur la solubilisation des corps d'inclusion, ce qui alourdit le procédé. Pour notre part, nous avons réussi à produire 3,6 μmol de peptide Kcoil soluble par litre de culture, ce qui est dans le même ordre de grandeur que les rendements rapportés pour certains peptides antimicrobiens produits en utilisant le même système de fusion et qui présentaient des similarités structurales au peptide Kcoil (p.e. la plantaricine E, F, J et K de tailles variant entre 2,9 et 3,7 kDa) (Gargi Pal & Srivastava, 2013). Pour d'autres peptides antimicrobiens, des rendements plus élevés ont cependant été rapportés (de 3,2 mg à 11 mg / l de culture bactérienne); de telles différences étant attribuables à la présence, dans notre cas, d'une grande proportion de résidus hydrophobes, tel que constaté par d'autres groupes de recherche (X.-L. Jing et al., 2010; Kyle et al., 2012; Xiaoxia Xu et al., 2007). D'autres études ont aussi rapporté un accroissement notable du rendement de production pour des peptides amphiphiles qui s'auto-assemblent, pour atteindre des quantités de l'ordre du gramme par litre en utilisant la stratégie des corps d'inclusion. Dans notre cas, cette stratégie a donné un rendement plus faible qu'une approche de production sous forme soluble (B. Hartmann et al., 2008; S. Kyle, A. Aggeli, E. Ingham, & M.

J. McPherson, 2010b; Abhinav Prakash et al., 2012; J. Riley, A. Aggeli, R. Koopmans, & M. McPherson, 2009).

7.2 Conception, préparation et fonctionnalisation d'un hydrogel pour des applications en génie tissulaire

7.2.1 Hydrogel à base de dextrane

Dans cette seconde partie du projet de doctorat, le but était de développer une structure tridimensionnelle sur laquelle les cellules adhèrent, prolifèrent et migrent pour l'utiliser comme matrice dans le cas d'une transplantation cellulaire.

Afin de travailler dans un contexte neutre et de concevoir une structure dont les propriétés d'adhésion cellulaire peuvent être modifiables, le dextrane a été choisi comme le polymère de base pour la préparation de l'hydrogel. L'utilisation du dextrane offre plusieurs avantages : elle permet la manipulation des interactions au niveau de l'interface matériau/cellules, que ce soit par greffage de peptides d'adhésion ou même de facteurs de croissance, à cause de ses propriétés anti-adhésives/anti-adsorption (B. t. Liberelle et al., 2010; Luong & Gerecht, 2009; Massia et al., 2000). En plus de sa biodégradabilité, de sa non toxicité, de sa grande disponibilité sur le marché (ce qui réduit les coûts), le dextrane est facilement modifiable en ayant recours à une chimie simple (Ferreira et al., 2007; Maia et al., 2014; Ribeiro et al., 2013). Les hydrogels développés dans ce projet ont été testés avec les HUVEC, cellules primaires modèle des cellules endothéliales humaines. Le dextrane a été biofonctionnalisé (c.-à-d. que nous y avons greffé le peptide RGD) pour permettre l'adhésion de ces dernières, tel que vérifiée au bout de 3h d'inoculation. La biofonctionnalisation a été réalisée grâce un intermédiaire/espaceur, le divinyl sulfone (DVS) précédemment utilisé dans notre laboratoire et dont le principal avantage est sa réactivité envers les amines et les thiols dans les mêmes conditions (Budhavaram et al., 2011; M. Lutolf & Hubbell, 2003; Pitarresi et al., 2009). Le DVS a été grandement utilisé pour réticuler plusieurs types de polymères (c.-à-d. synthétiques ou naturels, linéaires ou branchés) en un réseau tridimensionnel (Hiemstra, van der Aa, et al., 2007b). Par contre, à notre connaissance, le travail présenté dans ce projet est le premier à rapporter l'utilisation du DVS comme intermédiaire pour la biofonctionnalisation.

Au départ, nous avons planifié de réticuler les chaînes polymériques en utilisant l'hétérodimère Kcoil/Ecoil. Plusieurs problèmes ont été rencontrés pendant la conjugaison des peptides au dextrane : l'oxydation des cystéines terminales du Kcoil et la difficulté à caractériser le produit de conjugaison par des méthodes classiques comme la RMN nous ont forcés à adopter une stratégie alternative. Ainsi, le couple Kcoil/Ecoil a été remplacé par le sodium trimétaphosphate (STMP) pour assurer la réticulation des chaînes de dextrane en un réseau tridimensionnel dans des conditions alcalines. Notre choix s'est porté sur le STMP car il est très utilisé pour la réticulation de polysaccharides, il est non toxique et il est déjà approuvé et utilisé dans l'industrie alimentaire. Le principal avantage de l'utilisation du STMP réside dans le fait que le produit secondaire de sa réaction avec les groupements carboxyl est un pyrophosphate inorganique (PPi) qui peut facilement être éliminé par un simple lavage.

Pour conclure, l'hydrogel a été obtenu en réticulant les chaînes du dextrane grâce au STMP. La biofonctionnalisation du dextrane a été réalisée quant à elle en amont de la gélification, et ce, en rajoutant des groupements vinyl sulfone sur 40% des carboxyl disponibles, et dont 17% fixeraient à leur tour des résidus RGD. Les gels obtenus étaient transparents, souples, présentaient une surface lisse et se tenaient bien.

La quantité de RGD minimale permettant d'obtenir une bonne adhésion des HUVEC sur la surface des gels a été optimisée. Plusieurs ratios $W_{\text{polymère-RGD}} : W_{\text{polymère total}}$ ont été testés et les résultats obtenus ont démontré qu'un ratio de 0.1% était amplement suffisant pour induire le même niveau d'adhésion que celui observé avec un ratio de 10%. Ce résultat est d'autant plus intéressant qu'il permet de résoudre un problème rencontré par le groupe du Prof. Letourneur, qui n'a pas réussi à améliorer l'adhésion à la surface de leurs gels polysaccharidique même en couvrant la surface avec un revêtement de collagène et de fibronectine (Autissier et al., 2010; Fayol et al., 2013; Lavergne et al., 2012). L'ajout d'un agent porogène dans le mélange original de l'hydrogel s'est avéré nécessaire pour assurer l'interconnexion des pores, critère très important pour que les cellules pénètrent dans l'hydrogel et y prolifèrent. Les observations par microscopie électronique ont révélé une structure interne homogène et bien organisée, une microporosité adéquate, mais sans interconnexion en absence d'agent porogène. Le chlorure de sodium, le bicarbonate de sodium et le carbonate de sodium ont été testés à différentes concentrations pour leur effet porogène, et la meilleure condition retenue fut celle correspondant à un ratio $W_{\text{polysaccharide total}} : W_{\text{porogène}}$ de 1:0.25

avec du chlorure de sodium. Ces conditions étaient suffisantes pour créer des macro-pores qui ont par la suite permis la migration des cellules à l'intérieur de la matrice. Cette migration a été confirmée par l'obtention d'un anneau cellulaire blanchâtre à ~ 2 mm de la surface des gels sur lesquels des cellules HUVEC avaient étéensemencées. Des grains de chlorure de sodium ont été ajoutés au mélange en cours de gélification dans le but de créer des petits orifices favorisant le passage des cellules à travers l'interface du gel. Il a été également remarqué que plus la quantité de RGD à la surface de l'hydrogel était élevée, moins les cellules pénétraient.

Il faut donc optimiser la quantité de RGD greffé afin de favoriser la formation d'un tapis cellulaire qui constituerait le point de départ pour la migration à l'intérieur de la structure sans toutefois ralentir la migration. L'équipe de Letourneur est parvenue pour sa part à développer des hydrogels poreux où les cellules pénètrent et forment des agrégats en ayant recours à deux stratégies : soit une forte concentration de chlorure de sodium ($W_{\text{polysaccharide}}:W_{\text{NaCl}} = 1:1.2$) ou un cycle de lyophilisation juste après gélification, ce qui a généré des macro-pores pouvant affecter l'aspect de la surface et gêner l'adhésion cellulaire (Autissier et al., 2010; Fayol et al., 2013; Lavergne et al., 2012).

7.2.2 Étude de l'impact de l'intermédiaire/espaceur sur la bioactivité de Cys-Ecoil-EGF

Une co-immobilisation d'un facteur de croissance avec les peptides RGD dans la matrice développée permettraient d'élargir les domaines d'application de cet hydrogel, par exemple, dans le cas de régénération tissulaire basée sur l'utilisation de cellules souches. Une protéine doublement étiquetée Cys-Ecoil-EGF a été conçue, produite et purifiée pour ces fins (Cyril Boucher et al., 2008). Différentes concentrations de la protéine pure Cys-Ecoil-EGF soluble ont été ajoutées au milieu de culture de cellules A-431 afin de démontrer que cette dernière est capable d'activer l'autophosphorylation du récepteur à la même concentration que le contrôle que nous avons déjà caractérisé (c.-à-d. la protéine sans la cystéine, Ecoil-EGF) (Cyril Boucher et al., 2008). L'étude la bioactivité de la protéine purifiée, en se basant sur un test de résonance plasmonique de surface, a cependant montré que la capture du domaine extracellulaire du récepteur à l'EGF (EGFRED) est fortement affectée par la méthode d'immobilisation utilisée sur la micropuce du biocapteur. Quand Cys-Ecoil-EGF est immobilisée par couplage chimique via son groupement thiol, la réponse

maximale enregistrée après injection de concentrations croissantes du récepteur EGFRED est moins importante ($R < 20$) que celle enregistrée dans le cas de l'immobilisation par interaction Kcoil/Ecoil ($R = 250$). Cependant, les réponses observées lorsque Cys-Ecoil-EGF et son contrôle (Ecoil-EGF) sont immobilisés via une interaction coiled-coil sont pratiquement identiques. L'analyse des sensogrammes enregistrés a en effet montré que la constante de dissociation thermodynamique apparente (K_D) correspondant à l'interaction entre EGFRED et la protéine Cys-Ecoil-EGF est presque identique à celle de Ecoil-EGF (soit 45 ± 15 et 62 ± 15 pM, respectivement). Néanmoins, le K_D obtenu dans le cas du couplage aléatoire par thiol est 6 fois moins important que celui du contrôle (c'est-à-dire 388 ± 16 pM). De plus, les valeurs cinétiques obtenues sont en accord avec celles déterminés ultérieurement (Cyril Boucher et al., 2008).

Pour approfondir les investigations concernant les causes de la différence de réponses, la survie des VSMC a été étudiée en présence de la protéine Cys-Ecoil-EGF immobilisée par couplage thiol ou par interaction Kcoil/Ecoil. L'analyse, par un test ELISA, de la densité approximative des protéines immobilisées a accompagné le test cellulaire afin de corréliser les résultats d'activité aux concentrations mesurées. Dans l'ensemble, les résultats SPR et ELISA nous permettent de conclure que les molécules de EGF immobilisées par couplage thiol sont inaccessibles ou mal orientées et donc incapables de se lier à leur récepteur ou encore à l'anticorps de détection en SPR ou en ELISA, respectivement. Notre conclusion est que la rigidité du complexe "coiled-coil" procure un avantage lors de l'accroche d'EGF. La structure définie du peptide Ecoil, lorsqu'en interaction avec le peptide Kcoil, contraste grandement avec celle du peptide Ecoil seul. Cette différence pourrait diminuer les interactions entre EGF et la surface lorsque le peptide Ecoil a une structure moins flexible et donc favoriser l'interaction de EGF avec son récepteur EGFRED, qu'il soit à la surface du biocapteur ou des puits de culture cellulaire. La survie des VSMC notée en présence des protéines Cys-Ecoil-EGF immobilisées sur un revêtement de chondroïtine sulfate est plus importante dans le cas d'une immobilisation orientée ($\sim 35\%$). Ce maximum de réponse cellulaire est enregistré en présence de faibles quantités de protéines immobilisées ; l'ajout de plus hautes densités de EGF disponible pour la signalisation n'augmente pas la survie cellulaire.

CHAPITRE 8 CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Ce projet de doctorat avait pour objectif global la conception et le développement d'une structure tridimensionnelle, plus précisément un hydrogel, qui constituerait une niche cellulaire nécessaire pour le transport des cellules pour des fins de régénération tissulaire ou d'organe. La structure envisagée se voulait d'utiliser l'hétérodimère Kcoil/Ecoil pour la réticulation des chaînes polymériques de dextrane. D'où le premier objectif de ce projet et le premier article qui rapporte le développement d'un procédé de production du peptide Kcoil chez *E.coli* afin de préparer l'échafaudage supramoléculaire à moindres coûts. Malgré tous les défis auxquels nous nous sommes heurtés (soit la taille du peptide, une séquence riche en résidus chargés et hydrophobes, aucun acide aminé absorbant à 280 nm), nous avons réussi à produire 1.5 mg de peptide Kcoil/L de culture bactérienne. Le procédé de production et de purification du peptide est novateur dans le domaine des peptides synthétiques et représente une alternative à la synthèse chimique.

Ensuite, la réticulation du dextrane en utilisant le trisodium trimétophosphate (STMP) a permis d'obtenir un hydrogel de structure interne homogène et bien organisée. Les gels obtenus étaient transparents, lisses, souples mais facilement manipulables, ce qui constitue un avantage majeur pour la préparation de substrats cellulaires adaptés au domaine biomédical. Ces travaux répondent donc parfaitement au deuxième objectif de ce projet de recherche, même si les moyens pour l'atteindre ont changé. En effet, la réticulation via l'hétérodimère Kcoil/Ecoil a été abandonnée à cause de plusieurs problèmes technologiques rencontrés. Dans le but de fonctionnaliser ces gels, le domaine peptidique RGD a été conjugué aux chaînes polymériques du dextrane en utilisant le divinyl sulfone (DVS) comme intermédiaire. Là encore, l'approche est très innovante puisque le DVS avait été utilisé pour la réticulation des gels et non pour la fonctionnalisation. La structure poreuse obtenue est un bon véhicule de cellules puisque aucune mort cellulaire n'a été observée pendant 7 jours de culture. De plus, les cellules ont pu migrer à l'intérieur du gel et continuer à croître. Les résultats de cette partie de la thèse ont été présentés sous forme d'un article qui a été accepté pour publication dans le journal "Carbohydrate polymers".

Dans le but de co-immobiliser un facteur de croissance et le peptide RGD dans l'hydrogel développé ci-dessus, la protéine Cys-Ecoil-EGF a été conçue, produite et purifiée. Étant

doublement étiquetée, elle permettait d'immobiliser EGF de deux manières différentes (c.-à-d. par couplage thiol ou par interaction "coiled-coil"). Notre étude quant à l'activité de la protéine couplée selon les deux approches a démontré que la rigidité du bras espaceur avait un fort impact sur l'activité de la protéine couplée. Les conclusions tirées de ces travaux ne répondent pas directement au troisième objectif énuméré au début du projet, mais nous permettent de choisir la meilleure stratégie pour l'immobilisation d'un facteur de croissance, EGF ou autre, afin de préserver son activité biologique. Cette étude a été soumise pour publications dans le journal "Biointerphases".

Certains points de l'étude peuvent ouvrir la voie à d'autres avenues intéressantes de recherche, comme suit:

8.1 Production biologique du peptide Kcoil

8.1.1 Co-expression des peptides Kcoil et Ecoil

Étant donné que les protéines de fusion les plus répondues ont été testées afin de sélectionner les meilleures conditions d'expression du peptide Kcoil, nous proposons de tester la co-expression des deux peptides (Ecoil et Kcoil) dans le même système (Fan, Wu, & Liu, 2010). Notre hypothèse est que la co-expression aboutirait à une amélioration du niveau d'expression. En effet, la présence simultanée des deux partenaires favoriserait leur interaction et donc masquerait le cœur hydrophobe et les charges des peptides individuels, ce qui rendrait le complexe moins nocif pour la bactérie et par conséquent améliorerait le rendement de production. La purification du complexe pourrait probablement aussi limiter les grosses pertes enregistrées dans le cas du Kcoil exprimé seul. Nous pensons que ces pertes étaient probablement dues à des interactions électrostatiques avec plusieurs types de matériaux utilisés dans le laboratoire, comme le polystyrène, tel que démontré par des membres du groupe de recherche (Frederic Murschel et al., 2015).

8.1.2 Production biologique des mutants et analogues des peptides Ecoil et Kcoil

La production des différents mutants et analogues (c.-à-d. K₃, K₄, K₅) des peptides Kcoil et Ecoil permettrait, de la même manière que pour le Kcoil, de réduire leurs coûts et élargir notre banque de peptides synthétiques ainsi que leurs domaines d'applications. Étant donné que les mutants

permettent le contrôle de l'affinité du complexe (c.-à-d. cœur hydrophobe), le rendement de l'expression soluble de certains en fusion à la thiorédoxine serait probablement meilleur que celui obtenu pour le Kcoil.

8.2 Conception et développement d'hydrogels

8.2.1 Peut-être un gel injectable ?

Étant donné que la réaction de gélification s'effectue à 50°C dans des conditions alcalines et en présence de sel, le gel doit être préparé d'avance et bien lavé pour éliminer toutes traces d'hydroxyde de sodium et de chlorure de sodium pouvant affecter la croissance cellulaire par la suite. Cependant, une étude récente portant sur le comportement rhéologique et la microstructure d'un hydrogel à base de xanthane réticulé par le trisodium trimétaphosphate a démontré qu'en jouant sur les ratios $W_{\text{xanthane}}:W_{\text{STMP}}$, il est possible d'obtenir un gel à 37°C après 3h d'incubation. La caractérisation de la structure interne par microscopie électronique a montré que l'organisation des pores est homogène avec une légère réduction de leur taille (Tao et al., 2016). Les gels injectables ont toujours eu de l'intérêt auprès des cliniciens, il serait intéressant de rechercher un ratio optimal ($W_{\text{dextrane}}:W_{\text{STMP}}$) permettant d'avoir un gel présentant des propriétés similaires à celles obtenues dans le cadre de ce projet, mais à 37°C. La gélification dans des conditions physiologiques serait un premier pas vers l'obtention d'un gel injectable à base de dextrane et de STMP.

8.2.2 Conception de gel à base de peptides "coils"

Les hydrogels à base de peptides qui s'auto-assemblent, notamment les coils, sont très avantageux bien que les coûts associés à leur fabrication soient encore prohibitifs, comme il a été discuté plus haut. Le peptide Kcoil a été produit dans un système bactérien afin de minimiser les coûts pour la préparation d'hydrogels en réticulant les chaînes polymériques du dextrane via l'hétérodimère Kcoil/Ecoil. Cependant, la conjugaison du peptide Kcoil sur le dextrane a été difficile à mener à terme et à caractériser en utilisant la RMN, méthode classique de caractérisation du produit de conjugaison pour ce type de chimie. Ceci était probablement dû à la formation d'homodimères Kcoil/Kcoil, suivie de la formation de ponts disulfures entre les peptides Kcoil. La cinétique

d'oxydation devait être plus rapide que celle de la réaction entre le vinyl sulfone et le thiol de la cystéine en N-terminal du Kcoil réduit, bien que toutes les précautions aient été appliquées pour éviter ce phénomène (absence de lumière et d'oxygène pendant le déroulement de la réaction). L'ajout de l'agent réducteur Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) au mélange réactionnel permettrait peut-être d'éviter cette réaction d'oxydation parasite et accroîtrait en conséquent le rendement de conjugaison (Burns, Butler, Moran, & Whitesides, 1991). Ainsi, la préparation de gels auto-assemblés de dextrane grâce aux peptide Kcoil/Ecoil peut être envisageable. L'utilisation de mutants du Kcoil et Ecoil (c.-à-d. substitution de certain résidus leucine vs alanine pour contrôler l'affinité du complexe), actuellement étudiée par l'un de mes collègues, permettrait une libération contrôlée de cellules ou de biomolécules thérapeutiques comme certains facteurs de croissance tels que l'EGF ou le VEGF. L'utilisation d'analogues de Kcoil et de Ecoil (K3, K4, K5, E3, E4 et E5), dont la cinétique a été précédemment étudiée (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003), permettrait de manipuler la densité de réticulation ainsi que la taille des pores selon la combinaison de dimère choisie.

BIBLIOGRAPHIE

- Abed, A., Deval, B., Assoul, N., Bataille, I., Portes, P., Louedec, L., . . . Meddahi-Pellé, A. (2008). A Biocompatible Polysaccharide Hydrogel–Embedded Polypropylene Mesh for Enhanced Tissue Integration in Rats. *Tissue Engineering Part A*, 14(4), 519-527. doi: 10.1089/tea.2007.0134
- Acharya, A., Rishi, V., & Vinson, C. (2006). Stability of 100 Homo and Heterotypic Coiled–Coil α – α' Pairs for Ten Amino Acids (A, L, I, V, N, K, S, T, E, and R). *Biochemistry*, 45(38), 11324-11332. doi: 10.1021/bi060822u
- Addi, C., Murschel, F., & De Crescenzo, G. (2016). Design and use of chimeric proteins containing a collagen-binding domain for wound healing and bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* doi: 10.1089/ten.TEB.2016.0280
- Aillon, K. L., Xie, Y., El-Gendy, N., Berkland, C. J., & Forrest, M. L. (2009). Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(6), 457-466. doi: 10.1016/j.addr.2009.03.010
- Ajikumar, P. K., Ng, J. K., Tang, Y. C., Lee, J. Y., Stephanopoulos, G., & Too, H.-P. (2007). Carboxyl-Terminated Dendrimer-Coated Bioactive Interface for Protein Microarray: High-Sensitivity Detection of Antigen in Complex Biological Samples. *Langmuir*, 23(10), 5670-5677. doi: 10.1021/la063717u
- Altunbas, A., & Pochan, D. (2012). Peptide-Based and Polypeptide-Based Hydrogels for Drug Delivery and Tissue Engineering, Peptide-Based Materials. In T. Deming (Ed.), (Vol. 310, pp. 135-167): Springer Berlin / Heidelberg.
- Anderson, S. M., Chen, T. T., Iruela-Arispe, M. L., & Segura, T. (2009). The phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) by engineered surfaces with electrostatically or covalently immobilized VEGF. *Biomaterials*, 30(27), 4618-4628. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.030

- Apostolovic, B., Danial, M., & Klok, H.-A. (2010). Coiled coils: attractive protein folding motifs for the fabrication of self-assembled, responsive and bioactive materials. *Chemical Society Reviews*, 39(9), 3541-3575. doi: 10.1039/B914339B
- Aronsson, C., Dänmark, S., Zhou, F., Öberg, P., Enander, K., Su, H., & Aili, D. (2015). Self-sorting heterodimeric coiled coil peptides with defined and tuneable self-assembly properties. *Scientific Reports*, 5, 14063. doi: 10.1038/srep14063
- Assal, Y., Mizuguchi, Y., Mie, M., & Kobatake, E. (2015). Growth Factor Tethering to Protein Nanoparticles via Coiled-Coil Formation for Targeted Drug Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 26(8), 1672-1677. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00266
- Autissier, A., Le Visage, C., Pouzet, C., Chaubet, F., & Letourneur, D. (2010). Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomaterialia*, 6(9), 3640-3648. doi: 10.1016/j.actbio.2010.03.004
- Backer, M. V., Patel, V., Jehning, B. T., Claffey, K. P., & Backer, J. M. (2006). Surface immobilization of active vascular endothelial growth factor via a cysteine-containing tag. *Biomaterials*, 27(31), 5452-5458. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.06.025
- Baldi, L., Hacker, D. L., Adam, M., & Wurm, F. M. (2007). Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnology Letters*, 29(5), 677-684. doi: 10.1007/s10529-006-9297-y
- Bals, C., Schambach, A., Meyer, J., Scheper, T., & Rinas, U. (2011). Expression and purification of bioactive soluble murine stem cell factor from recombinant Escherichia coli using thioredoxin as fusion partner. *Journal of Biotechnology*, 152(1-2), 1-8. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.01.012
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in Escherichia coli. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 411-421. doi: 10.1016/S0958-1669(99)00003-8
- Banta, S., Wheeldon, I. R., & Blenner, M. (2010). Protein Engineering in the Development of Functional Hydrogels. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 12(1), 167-186. doi: 10.1146/annurev-bioeng-070909-105334
- Basan, H., Gümüşderelioğlu, M., & Tevfik Orbey, M. (2007). Release characteristics of salmon calcitonin from dextran hydrogels for colon-specific delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(1), 39-46. doi: 10.1016/j.ejpb.2006.07.008

- Bejenariu, A., Popa, M., Dulong, V., Picton, L., & Le Cerf, D. (2009). Trisodium trimetaphosphate crosslinked xanthan networks: synthesis, swelling, loading and releasing behaviour. *Polymer Bulletin*, 62(4), 525-538. doi: 10.1007/s00289-008-0033-8
- Benoiton, N. L. (2016). *Chemistry of peptide synthesis*: CRC Press.
- Betancourt, T., Byrne, J. D., Sunaryo, N., Crowder, S. W., Kadapakkam, M., Patel, S., . . . Brannon-Peppas, L. (2009). PEGylation strategies for active targeting of PLA/PLGA nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91A(1), 263-276. doi: 10.1002/jbm.a.32247
- Bondalapati, S., Ruvinov, E., Kryukov, O., Cohen, S., & Brik, A. (2014). Rapid End-Group Modification of Polysaccharides for Biomaterial Applications in Regenerative Medicine. *Macromolecular Rapid Communications*, 35(20), 1754-1762. doi: 10.1002/marc.201400354
- Boucher, C., Liberelle, B., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2009). Epidermal Growth Factor Tethered through Coiled-Coil Interactions Induces Cell Surface Receptor Phosphorylation. *Bioconjugate Chemistry*, 20(8), 1569-1577. doi: 10.1021/bc9001147
- Boucher, C., Ruiz, J. C., Thibault, M., Buschmann, M. D., Wertheimer, M. R., Jolicoeur, M., . . . De Crescenzo, G. (2010). Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor tethered via coiled-coil interactions. *Biomaterials*, 31(27), 7021-7031. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.072
- Boucher, C., St-Laurent, G., Jolicoeur, M., Crescenzo, G. D., & Durocher, Y. (2010). Protein detection by Western blot via coiled-coil interactions. *Analytical Biochemistry*, 399(1), 138-140. doi: 10.1016/j.ab.2009.12.007
- Boucher, C., St-Laurent, G., Loignon, M., Jolicoeur, M., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2008). The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags. *Tissue Eng Part A*, 14(12), 2069-2077. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0037
- Britton, Z. T., Hanle, E. I., & Robinson, A. S. (2012). An expression and purification system for the biosynthesis of adenosine receptor peptides for biophysical and structural characterization. *Protein Expression and Purification*, 84(2), 224-235. doi: 10.1016/j.pep.2012.06.005

- Bromley, E. H., & Channon, K. J. (2011). Alpha-helical peptide assemblies giving new function to designed structures. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 103, 231-275. doi: 10.1016/B978-0-12-415906-8.00001-7
- Budhavaram, N. K., Stauffer, M., & Barone, J. R. (2011). Chemistry between crosslinks affects the properties of peptide hydrogels. *materials science and engineering: C*, 31(5), 1042-1049. doi: 10.1016/j.msec.2011.03.005
- Burdick, Jason A., Mauck, Robert L., & Gerecht, S. (2016). To Serve and Protect: Hydrogels to Improve Stem Cell-Based Therapies. *Cell Stem Cell*, 18(1), 13-15. doi: 10.1016/j.stem.2015.12.004
- Burkhard, P., Stetefeld, J., & Strelkov, S. V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends in Cell Biology*, 11(2), 82-88. doi: 10.1016/S0962-8924(00)01898-5
- Burnham, M. R., Turner, J. N., Szarowski, D., & Martin, D. L. (2006). Biological functionalization and surface micropatterning of polyacrylamide hydrogels. *Biomaterials*, 27(35), 5883-5891. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.08.001
- Burns, J. A., Butler, J. C., Moran, J., & Whitesides, G. M. (1991). Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine. *The Journal of Organic Chemistry*, 56(8), 2648-2650. doi: 10.1021/jo00008a014
- Cabanas Danés, J., Huskens, J., & Jonkheijm, P. (2014). Chemical strategies for the presentation and delivery of growth factors. *Journal of materials chemistry. B: materials for biology and medicine*, 2(17), 2381 - 2394. doi: 10.1039/C3TB20853B
- Cabral, J. D., Roxburgh, M., Shi, Z., Liu, L., McConnell, M., Williams, G., . . . Moratti, S. C. (2014). Synthesis, physiochemical characterization, and biocompatibility of a chitosan/dextran-based hydrogel for postsurgical adhesion prevention. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(12), 2743-2756. doi: 10.1007/s10856-014-5292-3
- Chao, H., Bautista, D. L., Litowski, J., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (1998). Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 715(1), 307-329.
- Chao, H., Houston, M. E., Grothe, S., Kay, C. M., O'Connor-McCourt, M., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (1996). Kinetic Study on the Formation of a de Novo Designed Heterodimeric Coiled-Coil:

Use of Surface Plasmon Resonance To Monitor the Association and Dissociation of Polypeptide Chains. *Biochemistry*, 35(37), 12175-12185. doi: 10.1021/bi9530604

Choe, U.-J., Sun, V., Tan, J.-K., & Kamei, D. (2012). Self-Assembled Polypeptide and Polypeptide Hybrid Vesicles: From Synthesis to Applicatio. *Topics in Current Chemistry*, 310,117-34. doi: 10.1007/128_2011_209.

Peptide - Based Materials. In T. Deming (Ed.), (Vol. 310, pp. 117-134): Springer Berlin / Heidelberg.

Cohen, C., & Parry, D. A. D. (1986). α -Helical coiled coils — a widespread motif in proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 11(6), 245-248. doi: 10.1016/0968-0004(86)90186-6

Collier, J. H., & Segura, T. (2011). Evolving the use of peptides as components of biomaterials. *Biomaterials*, 32(18), 4198-4204. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.02.030

Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C., & Alhaique, F. (2007). Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release*, 119(1), 5-24. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.01.004

Davis, G. D., Elisee, C., Newham, D. M., & Harrison, R. G. (1999). New fusion protein systems designed to give soluble expression in Escherichia coli. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(4), 382-388. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19991120)65:4<382::AID-BIT2>3.0.CO;2-I

Davis, L. (2012). *Basic methods in molecular biology*: Elsevier.

De Crescenzo, G., Grothe, S., Lortie, R., Debanne, M. T., & O'Connor-McCourt, M. (2000). Real-time kinetic studies on the interaction of transforming growth factor alpha with the epidermal growth factor receptor extracellular domain reveal a conformational change model. *Biochemistry*, 39(31), 9466-9476. doi: 10.1021/bi992987r

De Crescenzo, G., Litowski, J. R., Hodges, R. S., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. *Biochemistry*, 42(6), 1754-1763. doi: 10.1021/bi0268450

- De Crescenzo, G., Pham, P. L., Durocher, Y., Chao, H., & O'Connor-McCourt, M. D. (2004). Enhancement of the antagonistic potency of transforming growth factor-beta receptor extracellular domains by coiled coil-induced homo- and heterodimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26013-26018. doi: 10.1074/jbc.M400655200
- De Crescenzo, G., Pham, P. L., Durocher, Y., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding to the extracellular domain of the type II TGF-beta receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding. *Journal of Molecular Biology*, 328(5), 1173-1183. doi :10.1016/S0022-2836(03)00360-7
- Delaittre, G., Greiner, A. M., Pauloehrl, T., Bastmeyer, M., & Barner-Kowollik, C. (2012). Chemical approaches to synthetic polymer surface biofunctionalization for targeted cell adhesion using small binding motifs. *Soft Matter*, 8(28), 7323-7347. doi: 10.1039/c2sm07407a
- Delaittre, G., Pauloehrl, T., Bastmeyer, M., & Barner-Kowollik, C. (2012). Acrylamide-Based Copolymers Bearing Photoreleasable Thiols for Subsequent Thiol-Ene Functionalization. *Macromolecules*, 45(4), 1792-1802. doi: 10.1021/ma202670d
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297-306. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008
- Dong, H., Paramonov, S. E., Aulisa, L., Bakota, E. L., & Hartgerink, J. D. (2007). Self-Assembly of Multidomain Peptides: Balancing Molecular Frustration Controls Conformation and Nanostructure. *Journal of the American Chemical Society*, 129(41), 12468-12472. doi: 10.1021/ja072536r
- Drogoz, A., David, L., Rochas, C., Domard, A., & Delair, T. (2007). Polyelectrolyte Complexes from Polysaccharides: Formation and Stoichiometry Monitoring. *Langmuir*, 23(22), 10950-10958. doi: 10.1021/la7008545
- Drumheller, P. D., & Hubbell, J. A. (1994). Polymer Networks with Grafted Cell Adhesion Peptides for Highly Biospecific Cell Adhesive Substrates. *Analytical Biochemistry*, 222(2), 380-388. doi: 10.1006/abio.1994.1506
- Drury, J. L., & Mooney, D. J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24(24), 4337-4351. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00340-5

- Dulong, V., Forbice, R., Condamine, E., Le Cerf, D., & Picton, L. (2011). Pullulan–STMP hydrogels: a way to correlate crosslinking mechanism, structure and physicochemical properties. *Polymer Bulletin*, 67(3), 455-466. doi: 10.1007/s00289-010-0435-2
- Dulong, V., Lack, S., Le Cerf, D., Picton, L., Vannier, J., & Muller, G. (2004). Hyaluronan-based hydrogels particles prepared by crosslinking with trisodium trimetaphosphate. Synthesis and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 57(1), 1-6. doi: 10.1016/j.carbpol.2003.12.006
- Esipov, R. S., Makarov, D. A., Stepanenko, V. N., & Miroshnikov, A. I. (2016). Development of the intein-mediated method for production of recombinant thymosin β 4 from the acetylated in vivo fusion protein. *Journal of Biotechnology*, 228, 73-81. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.02.021
- Esposito, D., & Chatterjee, D. K. (2006). Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(4), 353-358. doi: 10.1016/j.copbio.2006.06.003
- Fan, F., Wu, Y., & Liu, J. (2010). Expression and purification of two different antimicrobial peptides, PR-39 and Protegrin-1 in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 73(2), 147-151. doi: 10.1016/j.pep.2010.05.012
- Fayol, D., Le Visage, C., Ino, J., Gazeau, F., Letourneur, D., & Wilhelm, C. (2013). Design of Biomimetic Vascular Grafts With Magnetic Endothelial Patterning. *Cell Transplantation*, 22(11), 2105-2118. doi: 10.3727/096368912X661300
- Ferreira, L. S., Gerecht, S., Fuller, J., Shieh, H. F., Vunjak-Novakovic, G., & Langer, R. (2007). Bioactive hydrogel scaffolds for controllable vascular differentiation of human embryonic stem cells. *Biomaterials*, 28(17), 2706-2717. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.01.021
- Fiorilli, S., Onida, B., Barolo, C., Viscardi, G., Brunel, D., & Garrone, E. (2007). Tethering of modified Reichardt's dye on SBA-15 mesoporous silica: the effect of the linker flexibility. *Langmuir*, 23(4), 2261-2268. doi: 10.1021/la062829i
- Fortier, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2013). A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery. *Biomaterials*, 34(4), 1344-1353. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.047

- Fortier, C., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2014). Surface modification of nonviral nanocarriers for enhanced gene delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9(1), 135-151. doi: 10.2217/nnm.13.194
- Frangioni, J. V., & Neel, B. G. (1993). Solubilization and Purification of Enzymatically Active Glutathione S-Transferase (pGEX) Fusion Proteins. *Analytical Biochemistry*, 210(1), 179-187. doi: 10.1006/abio.1993.1170
- Gasperini, L., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2014). Natural polymers for the microencapsulation of cells. *Journal Of the Royal Society Interface*, 11:20140817(100), 1-19. doi: 10.1098/rsif.2014.0817
- Gelain, F., Horii, A., & Zhang, S. (2007). Designer Self-Assembling Peptide Scaffolds for 3-D Tissue Cell Cultures and Regenerative Medicine. *Macromolecular Bioscience*, 7(5), 544-551. doi: 10.1002/mabi.200700033
- Gerling-Driessen, U. I. M., Mujkic-Ninnemann, N., Ponader, D., Schöne, D., Hartmann, L., Koks, B., . . . Hartmann, L. (2015). Exploiting Oligo(amido amine) Backbones for the Multivalent Presentation of Coiled-Coil Peptides. *Biomacromolecules*, 16(8), 2394-2402. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00634
- Goddard, J. M., & Hotchkiss, J. H. (2007). Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science*, 32(7), 698-725. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002
- Goncalves, R., Martins, M. C., Oliveira, M. J., Almeida-Porada, G., & Barbosa, M. A. (2010). Bioactivity of immobilized EGF on self-assembled monolayers: optimization of the immobilization process. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 94(2), 576-585. doi: 10.1002/jbm.a.32723
- Grigoryan, G., & Keating, A. E. (2008). Structural specificity in coiled-coil interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(4), 477-483. doi: 10.1016/j.sbi.2008.04.008
- Guerrero, J., Catros, S., Derkaoui, S. M., Lalande, C., Siadous, R., Bareille, R., . . . Amédée, J. (2013). Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis. *Acta Biomaterialia*, 9(9), 8200-8213. doi: 10.1016/j.actbio.2013.05.025

- Guzman, F., Barberis, S., & Illanes, A. (2007). Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2), 0-0. doi: 10.2225/vol10-issue2-fulltext-13
- Hacker, D. L., & Balasubramanian, S. (2016). Recombinant protein production from stable mammalian cell lines and pools. *Current Opinion in Structural Biology*, 38, 129-136. doi: 10.1016/j.sbi.2016.06.005
- Harper, S., & Speicher, D. W. (2001). Expression and Purification of GST Fusion Proteins *Current Protocols in Protein Science*: John Wiley & Sons, Inc.
- Harper, S., & Speicher, D. W. (2011). Purification of Proteins Fused to Glutathione S-Transferase Protein Chromatography. In D. Walls & S. T. Loughran (Eds.), (Vol. 681, pp. 259-280): Humana Press.
- Hartmann, B., Kaar, W., Falconer, R., Zeng, B., & Middelberg, A. (2008). Expression and purification of a nanostructure-forming peptide. *Journal of Biotechnology*, 135, 85 - 91. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.03.003
- Hartmann, B. M., Kaar, W., Yoo, I. K., Lua, L. H., Falconer, R. J., & Middelberg, A. P. (2009). The chromatography-free release, isolation and purification of recombinant peptide for fibril self-assembly. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(5), 973-985. doi: 10.1002/bit.22447
- Hastings, C. L., Roche, E. T., Ruiz-Hernandez, E., Schenke-Layland, K., Walsh, C. J., & Duffy, G. P. (2015). Drug and cell delivery for cardiac regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 84, 85-106. doi: 10.1016/j.addr.2014.08.006
- Hermanson, G. T. (1996). 5 - Heterobifunctional Cross-linkers *Bioconjugate Techniques* (pp. 228-286). San Diego: Academic Press.
- Haubner, R., Gratias, R., Diefenbach, B., Goodman, S. L., Jonczyk, A., & Kessler, H. (1996). Structural and Functional Aspects of RGD-Containing Cyclic Pentapeptides as Highly Potent and Selective Integrin $\alpha V\beta 3$ Antagonists. *Journal of the American Chemical Society*, 118(32), 7461-7472. doi:10.1021/ja9603721
- Hiemstra, C., van der Aa, L. J., Zhong, Z., Dijkstra, P. J., & Feijen, J. (2007a). Novel in Situ Forming, Degradable Dextran Hydrogels by Michael Addition Chemistry: Synthesis, Rheology, and Degradation. *Macromolecules*, 40(4), 1165-1173. doi: 10.1021/ma062468d

- Hiemstra, C., van der Aa, L. J., Zhong, Z., Dijkstra, P. J., & Feijen, J. (2007b). Rapidly in Situ-Forming Degradable Hydrogels from Dextran Thiols through Michael Addition. *Biomacromolecules*, 8(5), 1548-1556. doi: 10.1021/bm061191m
- Hiemstra, C., Zhong, Z., van Steenberg, M. J., Hennink, W. E., & Feijen, J. (2007c). Release of model proteins and basic fibroblast growth factor from in situ forming degradable dextran hydrogels. *Journal of Controlled Release*, 122(1), 71-78. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.06.011
- Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 18-23. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.010
- Ito, Y. (2008). Covalently immobilized biosignal molecule materials for tissue engineering. *Soft Matter*, 4(1), 46-56. doi: 10.1039/b708359a
- Jing, X.-L., Luo, X.-G., Tian, W.-J., Lv, L.-H., Jiang, Y., Wang, N., & Zhang, T.-C. (2010). High-Level Expression of the Antimicrobial Peptide Plectasin in Escherichia coli. *Current Microbiology*, 61(3), 197-202. doi: 10.1007/s00284-010-9596-3
- Joddar, B., & Ito, Y. (2011). Biological modifications of materials surfaces with proteins for regenerative medicine. *Journal of Materials Chemistry*, 21(36), 13737-13755. doi: 10.1039/C1JM10984G
- Jonker, A. M., Löwik, D. W. P. M., & van Hest, J. C. M. (2012). Peptide- and Protein-Based Hydrogels. *Chemistry of Materials*, 24(5), 759-773. doi: 10.1021/cm202640w
- Ju, H., Xueji, Z., & Wang, J. (2011). Biofunctionalization of nanomaterials. *NanoBiosensing: Principles, Development and Application*. Springer Science & Business Media.
- Kabu, S., Gao, Y., Kwon, B. K., & Labhasetwar, V. (2015). Drug delivery, cell-based therapies, and tissue engineering approaches for spinal cord injury. *Journal of Controlled Release*, 219, 141-154. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.08.060
- Keasling, J. D. (2008). Synthetic Biology for Synthetic Chemistry. *ACS Chemical Biology*, 3(1), 64-76. doi: 10.1021/cb7002434
- Kent, S. B. H. (2009). Total chemical synthesis of proteins. *Chemical Society Reviews*, 38(2), 338-351. doi: 10.1039/B700141J

- Kimmerlin, T., & Seebach, D. (2005). '100 years of peptide synthesis': ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to β -peptide assemblies*. *The Journal of Peptide Research*, 65(2), 229-260. doi: 10.1111/j.1399-3011.2005.00214.x
- Klim, J. R., Li, L., Wrighton, P. J., Piekarczyk, M. S., & Kiessling, L. L. (2010). A defined glycosaminoglycan-binding substratum for human pluripotent stem cells. *Nature Methods*, 7(12), 989-994. doi: 10.1038/nmeth.1532
- Ko, D. Y., Shinde, U. P., Yeon, B., & Jeong, B. (2013). Recent progress of in situ formed gels for biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 38(3-4), 672-701. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2012.08.002
- Kohn, W. D., & Hodges, R. S. (1998). De novo design of alpha-helical coiled coils and bundles: models for the development of protein-design principles. *Trends in Biotechnology*, 16(9), 379-389. doi: Doi 10.1016/S0167-7799(98)01212-8
- Koopmans, R. J., & Aggeli, A. (2010). Nanobiotechnology — quo vadis? *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 327-334. doi: 10.1016/j.mib.2010.01.012
- Kopeček, J. (2007). Hydrogel biomaterials: A smart future? *Biomaterials*, 28(34), 5185-5192. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.044
- Kopeček, J., & Yang, J. (2009). Peptide-directed self-assembly of hydrogels. *Acta Biomaterialia*, 5(3), 805-816. doi: 10.1016/j.actbio.2008.10.001
- Kopeček, J., & Yang, J. (2012). Smart Self-Assembled Hybrid Hydrogel Biomaterials. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(30), 7396-7417. doi: 10.1002/anie.201201040
- Kuhl, P. R., & Griffith-Cima, L. G. (1996). Tethered epidermal growth factor as a paradigm for growth factor-induced stimulation from the solid phase. *Nature Medicine*, 2(9), 1022-1027. doi: 10.1038/nm0996-1022
- Kumar, P., Pillay, V., Modi, G., E Choonara, Y., C du Toit, L., & Naidoo, D. (2011). Self-assembling peptides: implications for patenting in drug delivery and tissue engineering. *Recent patents on drug delivery & formulation*, 5(1), 24-51.

- Kyle, S., Aggeli, A., Ingham, E., & McPherson, M. J. (2010). Recombinant self-assembling peptides as biomaterials for tissue engineering. *Biomaterials*, 31(36), 9395-9405. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.051
- Kyle, S., James, K. A., & McPherson, M. J. (2012). Recombinant production of the therapeutic peptide lunasin. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 28. doi: 10.1186/1475-2859-11-28
- Lack, S., Dulong, V., Picton, L., Cerf, D. L., & Condamine, E. (2007). High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of polysaccharides crosslinked by sodium trimetaphosphate: a proposal for the reaction mechanism. *Carbohydrate Research*, 342(7), 943-953. doi: 10.1016/j.carres.2007.01.011
- LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F., & McCoy, J. M. (1993). A Thioredoxin Gene Fusion Expression System That Circumvents Inclusion Body Formation in the E. coli Cytoplasm. *Nature Biotechnology*, 11(2), 187-193. doi: 10.1038/nbt0293-187
- LaVallie, E. R., Lu, Z., Diblasio-Smith, E. A., Collins-Racie, L. A., & McCoy, J. M. (2000). [21] Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in Escherichia coli. In J. Thorner & S. D. Emr John N. Abelson (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 326, pp. 322-340): Academic Press.
- Lavergne, M., Derkaoui, M., Delmau, C., Letourneur, D., Uzan, G., & Le Visage, C. (2012). Porous Polysaccharide-Based Scaffolds for Human Endothelial Progenitor Cells. *Macromolecular Bioscience*, 12(7), 901-910. doi: 10.1002/mabi.201100431
- Le, P. U., Lenferink, A. E. G., Pinard, M., Baardsnes, J., Massie, B., & O'Connor-McCourt, M. D. (2009). Escherichia coli expression and refolding of E/K-coil-tagged EGF generates fully bioactive EGF for diverse applications. *Protein Expression and Purification*, 64(2), 108-117. doi: 10.1016/j.pep.2008.11.005
- Le, V. C., & Letourneur, D. (2009). Method for preparing porous scaffold for tissue engineering, cell culture and cell delivery: Google Patents.
- Lee, J. Y., Yoon, C. S., Chung, I. Y., Lee, Y. S., & Lee, E. K. (2000). Scale-up process for expression and renaturation of recombinant human epidermal growth factor from Escherichia coli inclusion bodies. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31 (Pt 3), 245-248.

- Lee, K.-H., Kwon, Y.-C., Yoo, S. J., & Kim, D.-M. (2010). Ribosomal synthesis and in situ isolation of peptide molecules in a cell-free translation system. *Protein Expression and Purification*, 71(1), 16-20. doi: 10.1016/j.pep.2010.01.016
- Lee, S. T., Im Yun, J., Jo, Y. S., Mochizuki, M., van der Vlies, A. J., Kontos, S., . . . Hubbell, J. A. (2010). Engineering integrin signaling for promoting embryonic stem cell self-renewal in a precisely defined niche. *Biomaterials*, 31(6), 1219-1226.
- Leone, G., & Barbucci, R. (2009). Polysaccharide Based Hydrogels for Biomedical Applications *Hydrogels* (pp. 25-41): Springer.
- Leone, G., Consumi, M., Aggravi, M., Donati, A., Lamponi, S., & Magnani, A. (2010). PVA/STMP based hydrogels as potential substitutes of human vitreous. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(8), 2491-2500. doi: 10.1007/s10856-010-4092-7
- Leone, G., Volpato, M. D., Nelli, N., Lamponi, S., Boanini, E., Bigi, A., & Magnani, A. (2015). Continuous multilayered composite hydrogel as osteochondral substitute. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(8), 2521-2530. doi: 10.1002/jbm.a.35389
- Lequoy, P., Liberelle, B., De Crescenzo, G., & Lerouge, S. (2014). Additive benefits of chondroitin sulfate and oriented tethered epidermal growth factor for vascular smooth muscle cell survival. *Macromolecular Bioscience*, 14(5), 720-730. doi: 10.1002/mabi.201300443
- Lequoy, P., Murschel, F., Liberelle, B., Lerouge, S., & De Crescenzo, G. (2016). Controlled co-immobilization of EGF and VEGF to optimize vascular cell survival. *Acta Biomaterialia*, 29, 239-247. doi: 10.1016/j.actbio.2015.10.026
- Lévesque, S. G., Lim, R. M., & Shoichet, M. S. (2005). Macroporous interconnected dextran scaffolds of controlled porosity for tissue-engineering applications. *Biomaterials*, 26(35), 7436-7446. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.054
- Li, J., Zheng, L., Li, P., & Wang, F. (2012). Intein-mediated expression, purification, and characterization of thymosin $\alpha 1$ -thymopentin fusion peptide in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 84(1), 1-8. doi: 10.1016/j.pep.2012.04.013
- Li, Y. (2009). Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 54(1), 1-9. doi: 10.1042/ba20090087

- Li, Y. (2011). Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review. *Protein Expression and Purification*, 80(2), 260-267. doi: 10.1016/j.pep.2011.08.001
- Li, Y. (2012). A novel protocol for the production of recombinant LL-37 expressed as a thioredoxin fusion protein. *Protein Expression and Purification*, 81(2), 201-210. doi: 10.1016/j.pep.2011.10.011
- Liberelle, B., Bartholin, L., Boucher, C., Murschel, F., Jolicoeur, M., Durocher, Y., . . . De Crescenzo, G. (2010). New ELISA approach based on coiled-coil interactions. *Journal of Immunological Methods*, 362(1-2), 161-167. doi: 10.1016/j.jim.2010.09.027
- Liberelle, B., Boucher, C., Chen, J., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2010). Impact of epidermal growth factor tethering strategy on cellular response. *Bioconjugate Chemistry*, 21(12), 2257-2266. doi: 10.1021/bc1002604
- Lim, F., & Sun, A. (1980). Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*, 210(4472), 908-910. doi:10.1126/science.6776628
- Lin, C., Zhao, P., Li, F., Guo, F. F., Li, Z. Q., & Wen, X. J. (2010). Thermosensitive in situ-forming dextran-pluronic hydrogels through Michael addition. *Materials Science & Engineering. C: Materials for Biological Applications*, 30(8), 1236-1244. doi: 10.1016/j.msec.2010.07.004
- Litowski, J. R., & Hodges, R. S. (2002). Designing heterodimeric two-stranded alpha-helical coiled-coils. Effects of hydrophobicity and alpha-helical propensity on protein folding, stability, and specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37272-37279. doi: 10.1074/jbc.M204257200
- Luong, E., & Gerecht, S. (2009). Stem Cells and Scaffolds for Vascularizing Engineered Tissue Constructs. In U. Martin (Ed.), *Engineering of Stem Cells* (pp. 129-172). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Lupas, A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(10), 375-382. doi: 10.1016/S0968-0004(96)10052-9
- Lutolf, M., & Hubbell, J. (2003). Synthesis and physicochemical characterization of end-linked poly (ethylene glycol)-co-peptide hydrogels formed by Michael-type addition. *Biomacromolecules*, 4(3), 713-722. doi: doi: 10.1021/bm025744e

- Lutolf, M. P., Tirelli, N., Cerritelli, S., Cavalli, L., & Hubbell, J. A. (2001). Systematic Modulation of Michael-Type Reactivity of Thiols through the Use of Charged Amino Acids. *Bioconjugate Chemistry*, 12(6), 1051-1056. doi: 10.1021/bc015519e
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249-270. doi: 10.1002/yea.1208
- Maia, J., Evangelista, M. B., Gil, H., & Ferreira, L. (2014). Dextran-based materials for biomedical applications. *Carbohydrates Applications in Medicine*, 31-53.
- Maire, M., Logeart-Avramoglou, D., Degat, M.-C., & Chaubet, F. (2005). Retention of transforming growth factor β 1 using functionalized dextran-based hydrogels. *Biomaterials*, 26(14), 1771-1780. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.06.003
- Majerle, A., Kidrič, J., & Jerala, R. (2000). Production of stable isotope enriched antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: an application to the production of a ^{15}N -enriched fragment of lactoferrin. *Journal of Biomolecular NMR*, 18(2), 145-151. doi: 10.1023/A:1008362401928
- Malinova, V., Nallani, M., Meier, W. P., & Sinner, E. K. (2012). Synthetic biology, inspired by synthetic chemistry. *FEBS Letters*, 586(15), 2146-2156. doi: 10.1016/j.febslet.2012.05.033
- Mao, A. S., Shin, J.-W., Utech, S., Wang, H., Uzun, O., Li, W., . . . Mooney, D. J. (2016). Deterministic encapsulation of single cells in thin tunable microgels for niche modelling and therapeutic delivery. *Nat Mater*, advance online publication. doi: 10.1038/nmat4781
- Martin, G. A., Kawaguchi, R., Lam, Y., DeGiovanni, A., Fukushima, M., & Mutter, W. (2001). High-yield, in vitro protein expression using a continuous-exchange, coupled transcription/translation system. *Biotechniques*, 31.
- Mason, J. M., & Arndt, K. M. (2004). Coiled Coil Domains: Stability, Specificity, and Biological Implications. *ChemBioChem*, 5(2), 170-176. doi: 10.1002/cbic.200300781
- Massia, S. P., Stark, J., & Letbetter, D. S. (2000). Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading. *Biomaterials*, 21(22), 2253-2261. doi: 10.1016/S0142-9612(00)00151-4
- Masters, K. S. (2011). Covalent Growth Factor Immobilization Strategies for Tissue Repair and Regeneration. *Macromolecular Bioscience*, 11(9), 1149-1163. doi: 10.1002/mabi.201000505

- McCoy, J., & La Ville, E. (2001). Expression and Purification of Thioredoxin Fusion Proteins. In H. L. Ploegh (Ed.), *Current Protocols in Protein Science* (Vol. 28, pp. 16.18.11-16.18.14): John Wiley & Sons, Inc.
- Mehvar, R. (2000). Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *Journal of Controlled Release*, 69(1), 1-25. doi: 10.1016/S0168-3659(00)00302-3
- Monchaux, E., & Vermette, P. (2007). Bioactive microarrays immobilized on low-fouling surfaces to study specific endothelial cell adhesion. *Biomacromolecules*, 8(11), 3668-3673. doi: 10.1021/bm7007907
- Moon, J. J., Saik, J. E., Poche, R. A., Leslie-Barbick, J. E., Lee, S.-H., Smith, A. A., . . . West, J. L. (2010). Biomimetic hydrogels with pro-angiogenic properties. *Biomaterials*, 31(14), 3840-3847. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.104
- Morandim-Giannetti, A. d. A., Silva, R. C., Magalhães, O., Schor, P., & Bersanetti, P. A. (2015). Conditions for obtaining polyvinyl alcohol/trisodium trimetaphosphate hydrogels as vitreous humor substitute. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 1-10. doi: 10.1002/jbm.b.33473
- Murschel, F., Liberelle, B., St-Laurent, G., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2013). Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor. *Acta Biomaterialia*, 9(6), 6806-6813. doi: 10.1016/j.actbio.2013.02.032
- Murschel, F., Zaimi, A., Noel, S., Jolicoeur, M., & De Crescenzo, G. (2015). Specific Adsorption via Peptide Tags: Oriented Grafting and Release of Growth Factors for Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 16(11), 3445-3454. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00955
- Nguyen, Q. V., Huynh, D. P., Park, J. H., & Lee, D. S. (2015). Injectable polymeric hydrogels for the delivery of therapeutic agents: A review. *European Polymer Journal*, 72, 602-619. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2015.03.016
- Nicodemus, G. D., & Bryant, S. J. (2008). Cell Encapsulation in Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 14(2), 149-165. doi: 10.1089/ten.teb.2007.0332
- Nicolas, J., Mura, S., Brambilla, D., Mackiewicz, N., & Couvreur, P. (2013). Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible

polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chemical Society Reviews*, 42(3), 1147-1235. doi: 10.1039/C2CS35265F

Nilsson, B. L., Soellner, M. B., & Raines, R. T. (2005). Chemical synthesis of proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 34(1), 91-118. doi: doi:10.1146/annurev.biophys.34.040204.144700

Noel, S., Fortier, C., Murschel, F., Belzil, A., Gaudet, G., Jolicœur, M., & De Crescenzo, G. (2016). Co-immobilization of adhesive peptides and VEGF within a dextran-based coating for vascular applications. *Acta Biomaterialia*, 37, 69-82. doi: 10.1016/j.actbio.2016.03.043

Oakley, M. G., & Kim, P. S. (1998). A Buried Polar Interaction Can Direct the Relative Orientation of Helices in a Coiled Coil. *Biochemistry*, 37(36), 12603-12610. doi: 10.1021/bi981269m

Ogiwara, K., Nagaoka, M., Cho, C. S., & Akaike, T. (2005). Construction of a novel extracellular matrix using a new genetically engineered epidermal growth factor fused to IgG-Fc. *Biotechnology Letters*, 27(20), 1633-1637. doi: 10.1007/s10529-005-2605-0

Pal, G., & Srivastava, S. (2014). Cloning and heterologous expression of plnE, -F, -J and -K genes derived from soil metagenome and purification of active plantaricin peptides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(3), 1441-1447. doi: 10.1007/s00253-013-5097-1

Pasqui, D., De Cagna, M., & Barbucci, R. (2012). Polysaccharide-Based Hydrogels: The Key Role of Water in Affecting Mechanical Properties. *Polymers*, 4(3), 1517. doi: 10.3390/polym4031517

Peppas, N. A., Huang, Y., Torres-Lugo, M., Ward, J. H., & Zhang, J. (2000). Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2(1), 9-29. doi: doi:10.1146/annurev.bioeng.2.1.9

Peppas, N. A., Slaughter, B. V., & Kannelberger, M. A. (2012). 9.20 - Hydrogels. In M. Editors-in-Chief: Krzysztow & M. Martin (Eds.), *Polymer Science: A Comprehensive Reference* (pp. 385-395). Amsterdam: Elsevier.

Peters, E. B., Christoforou, N., Leong, K. W., Truskey, G. A., & West, J. L. (2016). Poly(Ethylene Glycol) Hydrogel Scaffolds Containing Cell-Adhesive and Protease-Sensitive Peptides Support Microvessel Formation by Endothelial Progenitor Cells. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 9(1), 38-54. doi: 10.1007/s12195-015-0423-6

- Petreaca, M., & Martins-Green, M. (2011). Cell-ECM interactions in repair and regeneration. *Principles of regenerative medicine*, 19-65. doi: 10.1101/cshperspect.a005124
- Pham, P. L., Kamen, A., & Durocher, Y. (2006). Large-Scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. *Molecular Biotechnology*, 34(2), 225-237. doi: 10.1385/mb:34:2:225
- Pines, O., & Inouye, M. (1999). Expression and secretion of proteins in *E. coli*. *Molecular Biotechnology*, 12(1), 25-34. doi: 10.1385/mb:12:1:25
- Pitarresi, G., Tripodo, G., Triolo, D., Fiorica, C., & Giammona, G. (2009). Inulin vinyl sulfone derivative cross-linked with bis-amino PEG: new materials for biomedical applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 19(6), 419-423. doi: 10.1016/S1773-2247(09)50086-X
- Pósfai, G., Plunkett, G., Fehér, T., Frisch, D., Keil, G. M., Umenhoffer, K., . . . Blattner, F. R. (2006). Emergent Properties of Reduced-Genome <Escherichia coli>. *Science*, 312(5776), 1044-1046. doi: 10.1126/science.1126439
- Prakash, A., Parsons, S., Kyle, S., & McPherson, M. (2012). Recombinant production of self-assembling beta-structured peptides using SUMO as a fusion partner. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 92. doi: 10.1186/1475-2859-11-92
- Prakash, A., Parsons, S. J., Kyle, S., & McPherson, M. J. (2012). Recombinant production of self-assembling beta-structured peptides using SUMO as a fusion partner. *Microbial Cell Factories*, 11, 92. doi: 10.1186/1475-2859-11-92
- Purnama, A., Aid-Launais, R., Haddad, O., Maire, M., Mantovani, D., Letourneur, D., . . . Le Visage, C. (2015). Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Delivery and Translational Research*, 5(2), 187-197. doi: 10.1007/s13346-013-0177-4
- Racksanti, A., Janhom, S., Punyanitya, S., Watanesk, R., & Watanesk, S. (2015). An approach for preparing an absorbable porous film of silk fibroin–rice starch modified with trisodium trimetaphosphate. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(8), (41517)41511-41517. doi: 10.1002/app.41517

- Raibaut, L., Ollivier, N., & Melnyk, O. (2012). Sequential native peptide ligation strategies for total chemical protein synthesis. *Chemical Society Reviews*, 41(21), 7001-7015. doi: 10.1039/C2CS35147A
- Riahi, N., Cappadocia, L., Henry, O., Omichinski, J., & De Crescenzo, G. (2016). Soluble expression, purification and functional characterization of a coil peptide composed of a positively charged and hydrophobic motif. *Amino Acids*, 48(2), 567-577. doi: 10.1007/s00726-015-2113-z
- Ribeiro, M. P., Morgado, P. I., Miguel, S. P., Coutinho, P., & Correia, I. J. (2013). Dextran-based hydrogel containing chitosan microparticles loaded with growth factors to be used in wound healing. *Materials Science & Engineering. C: Materials for Biological Applications*, 33(5), 2958-2966. doi: 10.1016/j.msec.2013.03.025
- Riley, J., Aggeli, A., Koopmans, R., & McPherson, M. (2009). Bioproduction and characterization of a pH responsive self-assembling peptide. *Biotechnology and Bioengineering*, 103, 241 - 251. doi: 10.1002/bit.22274
- Robinson, S. T., Douglas, A. M., Chadid, T., Kuo, K., Rajabalan, A., Li, H., . . . Brewster, L. P. (2016). A novel platelet lysate hydrogel for endothelial cell and mesenchymal stem cell-directed neovascularization. *Acta Biomaterialia*, 36, 86-98. doi: 10.1016/j.actbio.2016.03.002
- Rusmini, F., Zhong, Z., & Feijen, J. (2007). Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules*, 8(6), 1775-1789. doi: 10.1021/bm061197b
- Sahdev, S., Khattar, S., & Saini, K. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 307(1-2), 249-264. doi: 10.1007/s11010-007-9603-6
- Satakarni, M., & Curtis, R. (2011). Production of recombinant peptides as fusions with SUMO. *Protein Expression and Purification*, 78, 113 - 119. doi: 10.1016/j.pep.2011.04.015
- Sharon, J. L., & Puleo, D. A. (2008a). Immobilization of glycoproteins, such as VEGF, on biodegradable substrates. *Acta Biomaterialia*, 4(4), 1016-1023. doi: 10.1016/j.actbio.2008.02.017
- Sharon, J. L., & Puleo, D. A. (2008b). The use of N-terminal immobilization of PTH(1-34) on PLGA to enhance bioactivity. *Biomaterials*, 29(21), 3137-3142. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.019

- Sharpe, S., Yau, W.-M., & Tycko, R. (2005). Expression and purification of a recombinant peptide from the Alzheimer's β -amyloid protein for solid-state NMR. *Protein Expression and Purification*, 42(1), 200-210. doi: 10.1016/j.pep.2005.03.005
- Shen, W., Xue, Y., Liu, Y., Kong, C., Wang, X., Huang, M., . . . Zhou, M. (2016). A novel methanol-free *Pichia pastoris* system for recombinant protein expression. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 178. doi: 10.1186/s12934-016-0578-4
- Shim, M., Shi Kam, N. W., Chen, R. J., Li, Y., & Dai, H. (2002). Functionalization of Carbon Nanotubes for Biocompatibility and Biomolecular Recognition. *Nano Letters*, 2(4), 285-288. doi: 10.1021/nl015692j
- Shlyapnikov, Y. M., Andreev, Y. A., Kozlov, S. A., Vassilevski, A. A., & Grishin, E. V. (2008). Bacterial production of latarcin 2a, a potent antimicrobial peptide from spider venom. *Protein Expression and Purification*, 60(1), 89-95. doi: 10.1016/j.pep.2008.03.011
- Silva, A. K. A., Juenet, M., Meddahi-Pellé, A., & Letourneur, D. (2015). Polysaccharide-based strategies for heart tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 116, 267-277. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.06.010
- Smith, D. B., & Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67(1), 31-40. doi: 10.1016/0378-1119(88)90005-4
- Song, J., Chen, W., Lu, Z., Hu, X., & Ding, Y. (2011). Soluble expression, purification, and characterization of recombinant human flotillin-2 (reggie-1) in *Escherichia coli*. *Molecular Biology Reports*, 38(3), 2091-2098. doi: 10.1007/s11033-010-0335-4
- Song, L., Zhu, W.-S., Dong, J.-L., Li, Z.-Y., & Liu, X.-H. (2012). Expression and purification of two alternative peptides for mechano-growth factor in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 34(2), 231-237. doi: 10.1007/s10529-011-0762-x
- Sorensen, H. (2010). Towards universal systems for recombinant gene expression. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 1. doi: 10.1186/1475-2859-9-27
- Studier, F. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41, 207 - 234. doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016

- Sun, G., & Mao, J. J. (2012). Engineering dextran-based scaffolds for drug delivery and tissue repair. *Nanomedicine (London, England)*, 7(11), 1771-1784. doi: 10.2217/nnm.12.149
- Tao, Y., Zhang, R., Xu, W., Bai, Z., Zhou, Y., Zhao, S., . . . Yu, D. (2016). Rheological behavior and microstructure of release-controlled hydrogels based on xanthan gum crosslinked with sodium trimetaphosphate. *Food Hydrocolloids*, 52, 923-933. doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.09.006
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(5), 523-533. doi: 10.1007/s00253-002-1158-6
- Thébaud, N.-B., Pierron, D., Bareille, R., Le Visage, C., Letourneur, D., & Bordenave, L. (2007). Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: A pre-requisite for vascular tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(2), 339-345. doi: 10.1007/s10856-006-0698-1
- Van Tomme, S. R., & Hennink, W. E. (2007). Biodegradable dextran hydrogels for protein delivery applications. *Expert Review of Medical Devices*, 4(2), 147-164. doi: 10.1586/17434440.4.2.147
- Vincentelli, R., Cimino, A., Geerlof, A., Kubo, A., Satou, Y., & Cambillau, C. (2011). High-throughput protein expression screening and purification in *Escherichia coli*. *Methods*, 55(1), 65-72. doi: 10.1016/j.ymeth.2011.08.010
- Vladkova, T. G. (2010). Surface Engineered Polymeric Biomaterials with Improved Biocontact Properties. *International Journal of Polymer Science*, 2010. doi: 10.1155/2010/296094
- Vulic, K., & Shoichet, M. S. (2012). Tunable growth factor delivery from injectable hydrogels for tissue engineering. *Journal of the American Chemical Society*, 134(2), 882-885. doi: 10.1021/ja210638x
- Vulic, K., & Shoichet, M. S. (2014). Affinity-based drug delivery systems for tissue repair and regeneration. *Biomacromolecules*, 15(11), 3867-3880. doi: 10.1021/bm501084u
- Winkler, D. F., & Tian, K. (2015). Investigation of the automated solid-phase synthesis of a 38mer peptide with difficult sequence pattern under different synthesis strategies. *Amino Acids*, 47(4), 787-794. doi: 10.1007/s00726-014-1909-6

- Wintgens, V., Lorthioir, C., Dubot, P., Sébille, B., & Amiel, C. (2015). Cyclodextrin/dextran based hydrogels prepared by cross-linking with sodium trimetaphosphate. *Carbohydrate Polymers*, 132, 80-88. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.06.038
- Woerly, S., Pinet, E., De Robertis, L., Van Diep, D., & Bousmina, M. (2001). Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGel™). *Biomaterials*, 22(10), 1095-1111. doi: 10.1016/S0142-9612(00)00354-9
- Woolfson, D. N., & Mahmoud, Z. N. (2010). More than just bare scaffolds: towards multi-component and decorated fibrous biomaterials. *Chemical Society Reviews*, 39(9), 3464-3479. doi: 10.1039/c0cs00032a
- Wu, K., Yang, J., Koňák, Č., Kopečková, P., & Kopeček, J. (2008). Novel Synthesis of HPMACopolymers Containing Peptide Grafts and Their Self-Assembly Into Hybrid Hydrogels. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 209(5), 467-475. doi: 10.1002/macp.200700486
- Wurm, F., & Bernard, A. (1999). Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(2), 156-159. doi: 10.1016/S0958-1669(99)80027-5
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1393-1398. doi: 10.1038/nbt1026
- Xu, C., & Kopeček, J. (2008). Genetically Engineered Block Copolymers: Influence of the Length and Structure of the Coiled-Coil Blocks on Hydrogel Self-Assembly. *Pharmaceutical Research*, 25(3), 674-682. doi: 10.1007/s11095-007-9343-z
- Xu, X., Jin, F., Yu, X., Ji, S., Wang, J., Cheng, H., . . . Zhang, W. (2007). Expression and purification of a recombinant antibacterial peptide, cecropin, from Escherichia coli. *Protein Expression and Purification*, 53(2), 293-301. doi: 10.1016/j.pep.2006.12.020
- Yang, Y. L., Tian, Z. G., Teng, D., Zhang, J., Wang, J. R., & Wang, J. H. (2009). High-level production of a candidacidal peptide lactoferrampin in Escherichia coli by fusion expression. *Journal of Biotechnology*, 139(4), 326-331. doi: DOI 10.1016/j.jbiotec.2009.01.003
- Yarranton, G. T. (1992). Inducible vectors for expression in mammalian cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 3(5), 506-511. doi: 10.1016/0958-1669(92)90078-W

- Yu, Y., & Chau, Y. (2012). One-Step “Click” Method for Generating Vinyl Sulfone Groups on Hydroxyl-Containing Water-Soluble Polymers. *Biomacromolecules*, 13(3), 937-942. doi: 10.1021/bm2014476
- Yu, Y. B. (2002). Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(8), 1113-1129. doi: 10.1016/s0169-409x(02)00058-3
- Zhang, J., Liu, X., Bell, A., To, R., Baral, T. N., Azizi, A., . . . Durocher, Y. (2009). Transient expression and purification of chimeric heavy chain antibodies. *Protein Expression and Purification*, 65(1), 77-82. doi: 10.1016/j.pep.2008.10.011
- Zhang, R., Bowyer, A., Eiseenthal, R., & Hubble, J. (2007). A smart membrane based on an antigen- responsive hydrogel. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(4), 976-984. doi: 10.1002/bit.21255
- Zhao, Y., Zhang, X., Wang, Y., Wu, Z., An, J., Lu, Z., . . . Li, C. (2014). In situ cross-linked polysaccharide hydrogel as extracellular matrix mimics for antibiotics delivery. *Carbohydrate Polymers*, 105, 63-69. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.01.068
- Zustiak, S. P., Durbal, R., & Leach, J. B. (2010). Influence of cell-adhesive peptide ligands on poly(ethylene glycol) hydrogel physical, mechanical and transport properties. *Acta Biomaterialia*, 6(9), 3404-3414. doi: 10.1016/j.actbio.2010.03.040