Adsorption des protéines sur les nanomatériaux. Biochimie et physico-chimie d'un nouveau stress

Stéphanie Devineau

▶ **To cite this version:**

Stéphanie Devineau. Adsorption des protéines sur les nanomatériaux. Biochimie et physico-chimie d'un nouveau stress. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112215 . tel-00903842v2

HAL Id: tel-00903842

https://theses.hal.science/tel-00903842v2

Submitted on 15 Nov 2013

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE Chimie Paris Sud

Laboratoire de Radiolyse, UMR CEA-CNRS 3299

DISCIPLINE CHIMIE

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 4 Octobre 2013 par

Stéphanie DEVINEAU

Adsorption des protéines sur les nanomatériaux
Biochimie et physico-chimie d'un nouveau stress

Directeurs de thèse :	Serge PIN	Directeur de Recherche CNRS, CEA Saclay
	Jean Philippe RENAULT	Chercheur, CEA Saclay

Composition du jury :

Président du jury :	Claire SMADJA	Professeur, Université Paris Sud
Rapporteurs :	Jean-Michel BETTON	Directeur de Recherche CNRS, Institut Pasteur
	Emmanuel PAUTHE	Professeur, Université de Cergy-Pontoise
Examinateurs :	Michel DESMADRIL	Directeur de Recherche CNRS, Université Paris Sud
	Francelyne MARANO	Professeur, Université Paris Diderot

Remerciements

Je remercie très chaleureusement mes directeurs de thèse, Serge Pin et Jean Philippe Renault, qui ont développé ce projet au sein du Laboratoire de Radiolyse et m'ont invitée à les rejoindre. Ce fut un réel plaisir de travailler et d'échanger avec eux au cours de ces trois années, avec une grande liberté et de nombreuses collaborations qui ont rendu cette thèse très enrichissante. Merci !

Je remercie également chaleureusement Jean-Michel Betton, Michel Desmadril, Francelyne Marano, Emmanuel Pauthe et Claire Smadja, qui ont accepté de faire parti de ce jury et de s'atteler à la lecture de ce manuscrit. J'ai beaucoup apprécié la justesse de leurs questions, leur amabilité et les nouvelles pistes de réflexion qu'ils m'ont proposées.

Je remercie Géraldine Klein et Christelle Mathé, qui nous ont rejoints sur ce projet au cours de leur post-doctorat, pour leur compétence, leur gentillesse et leur soutien. Je remercie également toutes les personnes avec qui nous avons pu collaborer lors de ce projet, pour leur accueil, leur ouverture et la possibilité de partager points de vue et réflexions avec des approches différentes et enrichissantes, en chimie, en biologie ou en physique. Je remercie Frédéric Galactéros du CHU Henri Mondor ainsi que Véronique Baudin-Creuza, Laurent Kiger et Michael Marden du CHU du Kremlin-Bicêtre pour la mise à disposition de l'hémoglobine humaine et de l'hémoglobine S, pour leur accueil au sein du laboratoire Inserm U779 et pour des discussions toujours intéressantes.

Je remercie Jean-Christophe Aude, Yves Boulard et Jean Labarre de l'iBiTec-S au CEA avec qui nous avons travaillé dans le cadre du Programme Transversal de Toxicologie du CEA, ce qui nous a permis de développer une nouvelle approche associant protéomique et physico-chimie. Je remercie également Gilles Lagniel qui a réalisé les électrophorèses bidimensionnelles.

Je tiens à remercier tout particulièrement les personnes qui m'ont accompagnée lors des mesures sur grands instruments, à Saclay et à Grenoble, pour des nuits de manips toujours surprenantes et enthousiasmantes. Un grand merci à Gérard Baldacchino et Mickaël Bouhier du Laboratoire de Radiolyse, ainsi qu'à Serge et Jean Philippe. Je remercie également Jean-Louis Hazemann, Olivier Proux, Vincent Ranieri et Denis Testemale pour leur accueil et leur aide lors des mesures sur la ligne FAME à l'ESRF, ainsi que Marie-Hélène Mathon et Jean-Marc Zanotti pour leur accueil et leur aide sur les spectromètres PAXY et MIBEMOL du LLB au CEA.

Je remercie Loussiné Zargarian du LBPA à l'Ecole Normale Supérieure de Cachan, ainsi que Serge Fermadjian, pour la formation et la mise à disposition du dichrographe. Je remercie Camille

Loupiac de PAPC à l'Université de Bourgogne pour la formation et la mise à disposition du microcalorimètre DSC, ainsi que Fabrice Neiers du CSGA à l'INRA de Dijon pour l'acquisition des données de microcalorimétrie ITC. Je remercie également Thomas Gustavsson du SPAM au CEA pour les mesures de fluorescence ultrarapide.

Je remercie Régis Daniel, Florence Gonnet et Véronique Legros du LAMBE à l'Université d'Evry où nous avons pu réaliser les mesures par spectrométrie de masse, dans le cadre du Programme C'Nano Ile-de-France, malgré une forte demande sur ce type d'appareil.

Je remercie chaleureusement Claire Boulogne du centre Imagif du CNRS à Gif-sur-Yvette et Pierre-Eugène Coulomb du LSI à l'Ecole Polytechnique pour la formation à la microscopie électronique à transmission.

Je remercie tous les membres du Laboratoire de Radiolyse pour leur sympathie, Hugues Badet, Imène Boughattas, Stéphane Esnouf, Charles Klett, Sophie Le Caër, Sandrine Moreau, Daniel Ortiz, Eleonora Pellizzi et un merci sportif à notre équipe de coureurs, Anna Balcerzyk, Gérard Baldacchino et Georges Vigneron. Je remercie également Jules Bussières et Yoann Gasnier pour leur aide lors de leur stage d'IUT sur ce projet, en espérant qu'ils en garderont un bon souvenir.

Un grand merci enfin à mes amis et à ma famille pour qui la thèse est aussi une drôle d'aventure, qui en présage de nouvelles encore plus enthousiasmantes ! Merci aux cavalières toujours pleines de ressources, Albane, Aurélie, Alexandra et Stéphanie, à Bénédicte toujours entre deux peintures, à Philippe, fin cuisinier et coureur de haut vol, et à Sylvain et Sophie, pour leur bonne humeur et leur patience.

SOMMAIRE

Chapitre 1 – Introduction 1

1. Pourquoi étudier l'adsorption des protéines sur les surfaces ? 1
   - 1.1 Les premières études 1
   - 1.2 Les enjeux en biotechnologies 2
   - 1.3 De nouvelles questions sur les nanomatériaux : quelle toxicité ? 7
   - 1.4 Un risque de toxicité par adsorption des protéines 15
2. Etat d'une protéine adsorbée 18
   - 2.1 Structure 18
   - 2.2 Activité 19
   - 2.3 De nombreuses inconnues 19
3. Les modèles d'adsorption des protéines 20
4. Choix des protéines et des nanomatériaux étudiés 27
5. Approche expérimentale 30

Bibliographie 32

Chapitre 2 – Matériels & Méthodes 38

1. Tampons et produits chimiques 38
2. Nanomatériaux 39
   - 2.1 Microscopie électronique à transmission 39
   - 2.2 Isotherme de sorption d'azote (BET) 40
   - 2.3 Zétamétrie 40
   - 2.4 Diffusion de neutrons aux petits angles 42
   - 2.5 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier 43
3. Purification des protéines 43
4. Adsorption des protéines 45
   - 4.1 Spectroscopie UV-visible 45
   - 4.2 Microcalorimétrie ITC 46
   - 4.3 Cartographie de surface par irradiation 49
   - 4.4 Analyse des protéines d'un extrait cellulaire de levure 52
5. Structure des protéines adsorbées 55

5.1 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier 55
5.2 Dichroïsme circulaire 55
5.3 Spectroscopie de fluorescence 56
5.4 Spectroscopie d'absorption X 56
5.5 Microcalorimétrie DSC 56
6. Activité des hémoprotéines adsorbées 57
6.1 Fixation de ligands de la metmyoglobine 57
6.2 Oxygénation de l'hémoglobine 59
7. Dynamique des protéines adsorbées 62
7.1 Diffusion incohérente élastique de neutrons 63
7.2 Diffusion incohérente inélastique de neutrons 63
Bibliographie 65

Chapitre 3 – Caractérisation des nanomatériaux 67

1. Quels critères pour caractériser les nanomatériaux ? 68
2. Nanoparticules de silice 70
2.1 Chimie de la silice colloïdale 70
2.2 Taille des particules et agrégation 75
2.3 Surface spécifique 79
2.4 Charge de surface 80
3. Verres de silice nanoporeux 81
Les points clés 85
Bibliographie 86

Chapitre 4 – Mécanismes d'adsorption des protéines 88

1. Isothermes d'adsorption 90
2. Modèles d'isothermes appliqués à l'adsorption des protéines 95
3. Caractérisation de l'adsorption des protéines sur la silice nanostructurée 104
3.1 Effet du matériau 106
3.2 Effet de la protéine 107
3.3 Effet du pH et du tampon 109
3.4 Comparaison avec d'autres systèmes de la littérature 112
4. Réversibilité de l'adsorption 114

5. Energie d'adsorption de la myoglobine sur les nanoparticules de silice 117
6. Echelle d'affinité des protéines pour les nanoparticules de silice 123
6.1 Compétition entre hémoglobine et sérum albumine 124
6.2 Adsorption de protéines à partir d'un extrait cellulaire de levure 125
6.3 Identification des protéines de levure adsorbées et non adsorbées 127
7. Critères structuraux d'adsorption des protéines de levure sur les nanoparticules de silice 133
7.1 Analyse statistique de la séquence primaire 134
7.2 Interprétation des critères identifiés 136
7.3 Flexibilité des protéines adsorbées et non adsorbées 139
8. Comparaison de l'adsorption des protéines de levure et des protéines modèles 142
8.1 Discussion des critères structuraux d'adsorption des protéines 142
8.2 Modèle d'adsorption des protéines sur une surface de silice 145
Les points clés 147
Bibliographie 148

Chapitre 5 – Structure des protéines adsorbées 152

1. Surface occupée par la myoglobine et l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice 153
2. Structure secondaire des protéines adsorbées sur la silice 156
2.1 Hémoglobine et nanoparticules de silice 20 nm 157
2.2 Myoglobine et nanoparticules de silice 7 nm 162
2.3 Comparaison avec d'autres systèmes d'adsorption protéine-silice 169
2.4 Quel lien entre résidus basiques, adsorption et perte d'hélicité ? 170
3. Stabilité de la myoglobine adsorbée sur la silice 172
3.1 Température et enthalpie de dénaturation 172
3.2 Quelle relation entre adsorption, perte de structure et dénaturation ? 176
4. L'hème, site actif de la myoglobine et de l'hémoglobine 180
4.1 Hémoglobine et nanoparticules de silice 20 nm 181
4.2 Myoglobine et nanoparticules de silice 7 nm 184
4.3 Application de la spectroscopie d'absorption X aux hémoprotéines adsorbées 188
5. Environnement des résidus tryptophane de l'apomyoglobine adsorbée sur la silice 196
6. Cartographie des surfaces d'interaction entre myoglobine et silice par irradiation 200
Les points clés 208
Bibliographie 211

Chapitre 6 – Dynamique des protéines adsorbées 215

1. Introduction à la diffusion incohérente de neutrons 219
2. Mobilité de la myoglobine adsorbée 221
3. Densité d'états vibrationnels de la myoglobine adsorbée 223
4. Discussion 228

Les points clés 231

Bibliographie 232

Chapitre 7 – Activité des protéines adsorbées 234

1. Fixation de ligands de la metmyoglobine 235
   - 1.1 Azoture 236
   - 1.2 Imidazole 238
2. Oxygénation de notre protéine modèle, l'hémoglobine de porc 241
   - 2.1 Oxygénation de l'hémoglobine adsorbée 241
   - 2.2 Effet des protons 243
   - 2.3 Effet du DPG et de l'IHP 246
   - 2.4 Effet de la température 251
   - 2.5 Oxygénation de l'hémoglobine désorbée 254
3. Ouverture sur l'hémoglobine humaine 255
   - 3.1 Adsorption et oxygénation de l'hémoglobine A 255
   - 3.2 Oxygénation d'un hémolysat 260
   - 3.3 Oxygénation de l'hémoglobine pontée DCL 264
   - 3.4 Oxygénation de l'hémoglobine S 266
4. Discussion des modifications d'activité de l'hémoglobine adsorbée 269
   - 4.1 Modèles de coopérativité 270
   - 4.2 Un effet global et reproductible 275

Les points clés 279

Bibliographie 280

Tableau récapitulatif : affinité et coopérativité de l'hémoglobine libre et adsorbée sur les nanoparticules de silice 284

Conclusion et Perspectives 285

CHAPITRE 1
Introduction

1. Pourquoi étudier l'adsorption des protéines sur les surfaces ?

1.1 Les premières études

L'étude de l'adsorption des protéines sur les surfaces débute dès le début du 20e siècle sur des systèmes modèles dans lesquels une protéine purifiée interagit avec un solide. Nelson et Griffin montrent dès 1916 que l'invertase, une protéine qui hydrolyse le saccharose, s'adsorbe sur le charbon (*1*) puis Willstatter et Schneider observent en 1924 une diminution de l'activité enzymatique de l'invertase adsorbée sur un minéral argileux, la kaolinite (*2*). Les études réalisées dans les années 1950 mesurent l'adsorption et l'activité de quelques protéines modèles, telles que la trypsine, le lysozyme, l'invertase, l'albumine, sur différents types de matériaux, et s'intéressent en particulier à l'effet du pH, de la salinité et des ions présents lors de l'adsorption. Hitchcock démontre ainsi en 1925 que l'adsorption de l'ovalbumine sur une membrane de collodion (matériau à base de nitrocellulose utilisé pour les pansements et de nombreuses autres applications) est pH dépendante (*3*) et peut être décrite par l'isotherme de Langmuir, développée quelques années plus tôt pour l'adsorption de molécules de gaz sur une surface (*4*).

L'adsorption des protéines sur des surfaces apparaît rapidement comme un phénomène commun à des systèmes très différents. Les trois grandes thématiques de recherche associées à l'adsorption des protéines à cette époque sont ainsi :

- la biochimie des sols, où l'adsorption des enzymes sur les minéraux argileux est étudiée pour évaluer l'influence de la perte d'activité enzymatique sur la dégradation de la matière organique dans les sols et la formation d'humus (*5*). McLaren étudie l'activité de différentes enzymes adsorbées sur la kaolinite et la montmorillonite (*6, 7*), et propose même d'utiliser l'adsorption des enzymes dans l'espace interfeuillet des phylosilicates pour évaluer la taille des protéines (*8*) ;
- la purification des protéines par chromatographie, où l'adsorption des protéines sur les résines est centrale (*9*), par exemple sur la silice pour la chromatographie d'adsorption. Zittle a notamment étudié l'effet de l'adsorption sur la résine sur l'activité des enzymes (*10*). L'adsorption des protéines sur minéraux argileux est aussi utilisée pour la purification des protéines (*11*) ;

- les conditions d'étude des protéines au laboratoire, car à partir de solutions diluées en protéines, leur adsorption sur la verrerie de laboratoire a été mise en évidence et s'accompagne d'une modification de l'activité des protéines adsorbées (*12, 13*)ce qui peut biaiser une analyse de l'activité d'enzymes diluées. Ce phénomène nous conduit encore aujourd'hui à passiver les surfaces pour de nombreux tests biologiques, par adsorption de la sérum albumine par exemple (*14, 15*), mais aussi pour des applications en médecine (*16*).

Les surfaces étudiées sont soit hydrophiles (argiles, silice microporeuse ou verres) mais de nature, réactivité et géométrie différente, soit hydrophobes (carbone, polymères). Dans presque tous les cas, une adsorption des protéines est observée : il s'agit donc d'un phénomène général.

Les protéines adsorbées sont décrites par James en 1966 comme un « film » qui se forme à l'interface solide/solution (*17*). Jusque dans les années 1970, la vision la plus générale est une adsorption des protéines sur les surfaces dépendante des conditions physico-chimiques du milieu, peu ou pas réversible, sans modification de leur conformation mais accompagnée de modifications d'activité, qui sont interprétées par des effets d'échange d'ions avec la surface.

Dans le même temps, de nouveaux enjeux apparaissent :la biocompatibilité des matériaux (*18*), le développement des biotechnologies (*19*), la vectorisation des médicaments (*20*), pour lesquels l'influence et la compréhension des mécanismes d'adsorption des protéines sur les surfaces sont indispensables. La littérature étant très riche sur ces différentes thématiques, les articles cités de façon non exhaustive dans cette introduction sont des exemples choisis ou des revues.

1.2 Les enjeux en biotechnologies

Biocompatibilité des matériaux

Les biomatériaux sont de nature variée et ont des utilisations très diverses : implants chirurgicaux, membranes d'hémodialyse, prothèses dentaires, lentilles de contact par exemple. Les premières études portaient plus spécifiquement sur l'hémocompatibilité, c'est-à-dire sur la compatibilité entre un matériau et le sang. Lorsqu'un matériau est en contact avec le sang, le premier risque est la coagulation qui peut entraîner une thrombose (*21, 22*) : les protéines du plasma s'adsorbent à sa surface, notamment le fibrinogène et le facteur de von Willebrand, ce qui provoque l'adhésion et l'activation des plaquettes, qui à leur tour relarguent les facteurs de coagulation du sang et déclenchent la coagulation (*23*).De plus, les plaquettes se fixent spécifiquement sur le fibrinogène adsorbé sur la surface, une adsorption qui dépend du type de surface (*22*). La biocompatibilité du

matériau (membrane de dialyse ou implant) est alors directement liée à l'adsorption de certaines protéines sur la surface.

D'autres protéines peuvent interagir avec la surface : l'adsorption des immunoglobulines et des protéines du complément conduit à l'activation des leucocytes et à la libération de radicaux libres, provoquant stress oxydant et inflammation (*24, 25*). Dans le cas des membranes d'hémodialyse, la modification de la conformation de la β2-microglobuline et son accumulation dans l'organisme crée un risque important d'amylose (*23, 25*).

La présence de protéines adsorbées sur la surface modifie également les interactions entre cellules et matériaux, en favorisant leur adhésion par exemple (*26*). De la même façon, l'adhésion de bactéries à la surface d'un implant est facilitée par l'adsorption préalable de protéines, ce qui crée un risque d'infection bactérienne (*27*). De façon plus surprenante, les nanotubes de carbone pourraient être utilisés au sein d'un film de polymères comme antimicrobien grâce à leur effet de toxicité sur les bactéries (*28*).

Pour augmenter la biocompatibilité, la solution adoptée est souvent d'empêcher, ou du moins de contrôler, l'adsorption des protéines à la surface des matériaux. La fonctionnalisation des surfaces par des polymères (*29*), comme le polyéthylène glycol (*30*) et l'héparine (*25, 31*), par des multicouches de polyélectrolytes formés par l'adsorption successive de polyanions ou polycations (*32*) ou par des protéines (*15*) peuvent être des moyens de limiter l'adsorption ou la perte de structure des protéines adsorbées (*30*) et la réponse biologique associée. Un des enjeux pour améliorer la biocompatibilité des matériaux est de comprendre les mécanismes d'adsorption des protéines et les modifications des protéines adsorbées.

Nanovecteurs de médicaments

L'adsorption des protéines joue aussi un rôle lors de la préparation et l'administration de certains médicaments (*33*). Une protéine thérapeutique peut être adsorbée sur un vecteur pour permettre son administration, par exemple sur des nanoparticules (NP) de polymère biodégradable (*34*). L'objectif est dans ce cas d'adsorber la plus grande quantité possible de médicament pour limiter la quantité de vecteur à administrer, ce qui dépend du type de surface et du matériau utilisé, mais aussi de protéger le principe actif de la dégradation en milieu biologique (*35, 36*). La libération du principe actif dépendra également du type d'interaction avec le vecteur. Les nano-objets sont étudiés comme vecteurs de principes actifs, que ce soit sous la forme de liposomes, de nanoparticules de polymères ou d'oxydes sur lesquelles les principes actifs seraient exposés à la surface ou de NP poreuses au sein desquelles se trouverait le principe actif (*34, 35*). Les silices

mésoporeuses sont un exemple de matériau nanostructuré étudié pour la vectorisation de médicaments (*37*).

L'adsorption d'une protéine thérapeutique peut aussi se produire de façon involontaire sur le système utilisé pour son administration, par exemple sur un cathéter en silicone. La conformation et l'activité de la protéine peuvent être modifiées par l'adsorption, ce qui pourrait réduire de façon importante l'efficacité du traitement (*38*).

Dans le cas d'une injection intraveineuse, l'adsorption des protéines du sérum sur le vecteur, lorsque celui-ci est un colloïde (liposome, nanoparticule...) influence sa biodistribution (*20*). L'adsorption des protéines du complément, des immunoglobulines, du fibrinogène mais aussi d'autres protéines du sérum (comme la β2-glycoprotéine) à la surface d'un liposome accélère son élimination du sang vers les organes riches en cellules immunitaires comme le foie et la rate, ce qui limite la biodisponibilité du principe actif et peut engendrer une certaine toxicité au niveau de ces organes (*39, 40*). L'adsorption des protéines sur les nanoparticules est d'autant plus importante que la surface développée est très grande, comparée à des matériaux plus classiques utilisés par exemple pour les implants, et confère une véritable « identité biologique » aux nanomatériaux.

Un des enjeux pour la vectorisation des nanoparticules est le contrôle de l'adsorption des protéines du sérum pour éviter l'élimination trop rapide du sang du vecteur ainsi que de la molécule thérapeutique.

Vaccins : un cas particulier

Il existe quelques applications plus anciennes des nanomatériaux pour lesquelles la taille nanométrique n'était pas nécessairement bien identifiée même si elle était déjà utilisée. Des adjuvants à base d'aluminium, qui contiennent en réalité des nanoparticules d'aluminium ou d'hydroxyde d'aluminium, sont commercialisés et utilisés depuis plus de 70 ans dans les vaccins pour augmenter leur efficacité (*41*). De plus, (très) peu d'informations sont fournies par l'industrie pharmaceutique quant à leur fabrication. Les deux principaux adjuvants à base d'aluminium (ou d'hydroxyde d'aluminium) sont Adju-Phos® et Alhydrogel® fabriqués par la société Brenntag. Les particules d'aluminium ont une taille de quelques nanomètres et forment des agrégats de 1 à 10 µm en solution (*42, 43*).

Les mécanismes d'action des adjuvants à base d'aluminium étaient jusqu'alors peu connus et ne sont étudiés que depuis quelques années (*44*). Les chercheurs suspectent que l'adsorption des toxines ou des protéines recombinantes contenues dans les vaccins sur les nanoparticules

d'aluminium soit à l'origine de l'efficacité accrue des vaccins grâce à une modification de la structure des antigènes adsorbés (*44, 45*). L'adsorption des antigènes pourrait également diminuer leur stabilité (*46*). Ces adjuvants présentent par ailleurs des effets indésirables, comme une agrégation des particules lors de la lyophilisation ou une inflammation locale lors de l'injection due au dépôt des particules qui peut entraîner l'accumulation de cellules phagocytaires, en particulier en cas d'injections répétées (pour un traitement de désensibilisation par exemple) (*47*). Un enjeu est donc de comprendre l'effet des nanoparticules d'aluminium sur l'efficacité biologique du vaccin mais aussi d'évaluer leur toxicité potentielle.

Nanosondes pour l'imagerie

Les nano-objets offrent de nouvelles possibilités d'imagerie pour la médecine. En plus de leurs propriétés intrinsèques (matériau magnétique…), les nanoparticules pourraient être adressées à des cellules cibles, par exemple des cellules tumorales, en greffant à leur surface des anticorps spécifiques de marqueurs du cancer, comme un anticorps anti-$\alpha_5\beta_3$intégrine pour l'imagerie de l'angiogenèse (*36*). Des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer ont été utilisées comme agent de contraste en Imagerie par Résonnance Magnétique (IRM) pour le diagnostic (*48*).

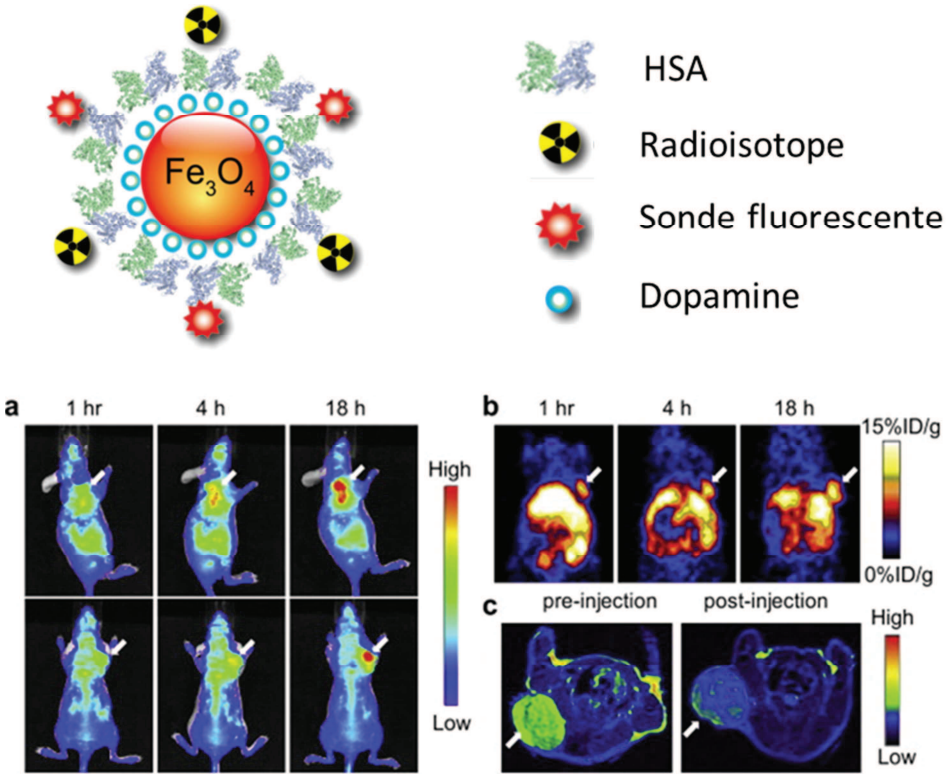


Figure 1-1. *Exemple d'application des nanoparticules à l'imagerie in vivo du petit animal : imagerie par fluorescence proche infrarouge (a), par émission de positrons (b) et par imagerie par résonnance magnétique (c) (49)*

La figure 1-1 (page précédente) présente une nanoparticule « multisonde » mise au point par Xie *et al* (*49*) pour l'imagerie *in vivo* et appliquée chez la souris : une nanoparticule d'oxyde de fer magnétique est recouverte de sérum albumine puis marquée à l'aide de radioisotopes et de molécules fluorescentes. La localisation de la nanoparticule dans l'organisme est alors visible par IRM, par tomographie par émission de positrons (TEP) et par fluorescence proche infrarouge (NIRF). L'adsorption de protéines sur la nanoparticule est ici nécessaire pour permettre le marquage de la NP par un radioisotope et une sonde fluorescente et la circulation de la nanoparticule dans le sang.

De plus, les nanoparticules pourraient aussi être utilisées directement pour le traitement : par effet hyperthermique, les nanoparticules magnétiques adressées à des cellules cibles pourraient elles-mêmes agir par chauffage sous l'effet d'un champ hyperfréquence, un effet recherché pour le traitement des tumeurs cancéreuses (*50*). L'enjeu est dans ce cas d'assurer la vectorisation de la nanoparticule aux cellules cibles.

Bioréacteurs et biocapteurs

Comparés aux catalyseurs chimiques, les enzymes présentent l'avantage d'une grande activité catalytique, d'une grande spécificité et d'être actives à température ambiante, mais l'inconvénient d'une plus faible stabilité (*51*). L'adsorption des protéines sur des surfaces peut modifier leur activité, leur structure mais également leur stabilité (*52*). L'adsorption des enzymes en particulier est recherchée lorsqu'elle permet d'augmenter l'activité, la stabilité et la résistance d'une enzyme pour le développement de bioréacteurs dans l'industrie (*19*). Par ailleurs, l'immobilisation sur un support est nécessaire pour facilement séparer enzyme et produit à la fin de la réaction. L'immobilisation des enzymes sur un support solide peut se faire par adsorption, mais aussi par liaison covalente et fixation spécifique de l'enzyme sur une surface fonctionnalisée, par exemple pour la fixation de la glucose isomérase sur une céramique poreuse *via* la réaction entre une fonction amine de la surface et une fonction acide carboxylique de l'enzyme (*51, 53*). La glucose isomérase immobilisée catalyse la transformation du glucose en un mélange glucose/fructose produit en quantités industrielles et utilisé pour sucrer les sodas (Coca Cola...).

L'immobilisation d'anticorps sur une surface, développée plus récemment sur micropuce, est très utilisée pour les tests immunologiques (*54*). L'adsorption, l'orientation et la fonctionnalité des anticorps adsorbés définissent l'efficacité, la stabilité et la sensibilité du test. L'adsorption des anticorps sur la surface peut être irréversible grâce à une forte affinité non spécifique, par exemple pour une surface de silice. Cependant, l'adsorption s'accompagne dans ce cas d'une perte de

structure et d'activité très défavorable (*55*). L'attachement covalent est souvent adopté pour conserver toute la spécificité des anticorps immobilisés (*54*).

Dans d'autres cas, l'adsorption des protéines est indésirable dans les réacteurs industriels : lors de la pasteurisation du lait, les protéines s'adsorbent en grandes quantités sur les parois du réacteur (*56*) et encrassent les dispositifs. L'adsorption des protéines est un phénomène indésirable sur les membranes de filtration (*57*), sur les biocapteurs, dans les bioréacteurs utilisés dans l'industrie agroalimentaires, pour ne donner ici que quelques exemples.

Grâce à leur grande surface spécifique, les nanomatériaux pourraient être utilisés dans l'industrie, pour la filtration, la catalyse ou comme support d'enzymes immobilisées (*58-60*). L'enjeu est aussi de déterminer la toxicité potentielle de ces nanomatériaux supports lorsqu'ils sont manipulés par les opérateurs.

1.3 De nouvelles questions sur les nanomatériaux : quelle toxicité ?

Les nanomatériaux sont les matériaux dont au moins une des dimensions est comprise entre 1 et 100 nm. Ils représentent un enjeu actuel car leur utilisation est de plus en plus courante dans des domaines aussi variés que les matériaux de construction, la santé, les cosmétiques ou l'alimentation, ce qui pose un problème d'exposition et de toxicité potentielle.

Pourtant, les nanoparticules en tant que telles ne sont pas si nouvelles, ce sont leur utilisation, leur production et leur variété qui ont explosées ces dernières années avec le développement des nanotechnologies (Fig. 1-2).

Figure 1-2. *Quelques dates relatives à l'étude des nanomatériaux et repères historiques : la vie quotidienne à Paris, un soir au cinéma, alunissage d'Armstrong et lancement du satellite Hubble*

La silice colloïdale existe depuis la fin du 19e siècle : les premières suspensions stables de silice colloïdales sont mises au point dans les années 1930, Iler étudie de façon intensive leurs propriétés dans les années 1950 (*61, 62*) et Stöber met au point le procédé de synthèse des particules de silice qui porte son nom dans les années 1960 (*63*).

Une des premières études de l'adsorption des protéines sur la silice colloïdale est réalisée par Bixler en 1959 (*13*). Vroman montre en 1969 qu'un effet de compétition entre protéines s'opère lors de l'adsorption : les protéines de plus grande affinité « déplacent » les protéines de plus faible affinité sur la surface(*64*).

Les premières études de la toxicité des nanoparticules sont sans doute celles des particules ultrafines issues de la combustion du diesel réalisées dans les 1980-1990, on peut citer notamment le travail d'Oberdoerster (*65, 66*). La petite taille et l'utilisation croissante des nanomatériaux pose le problème de leur toxicité, puisque celle-ci diffère des matériaux de même nature mais de taille micrométrique et n'est donc pas connue (*66, 67*). L'étude de la nanotoxicologie, qui nécessite de nouveaux outils aussi bien de mesure que d'analyse, s'est ainsi développée ces dernières années (*68, 69*).

Exposition

Le Woodrow Institute répertoriait en 2011 plus de 1300 produits contenant des nanomatériaux sur le marché mondial (*70*). Les nanoparticules les plus utilisées sont les nanoparticules d'argent, de silice, d'oxyde de titane, d'alumine et de carbone (nanotubes et fullerènes) et sont d'ores et déjà produites à l'échelle industrielle (Tableau 1-1). BASF a ainsi réalisé 250 M€ de bénéfices sur la vente de produits liés aux nanotechnologies en 2010 (*71*). Plus récemment, le marché mondial actuel des nanomatériaux a été estimé à 20 milliards d'euros par la Commission Européenne.

Nanoparticules	Production mondiale / française en 2008(*70*)
Carbone	10 Mt / 240 000 t
SiO_2	2 Mt / 485 000 t
TiO_2	2 Mt / 250 000 t
Ag	1500 t / 500 t
Al_2O_3	- / 469 000 t

***Tableau 1-1**. Production mondiale et française en 2008 des nanoparticules les plus utilisées dans les produits de consommation courante (Mt : million de tonnes)*

Le nano-argent est utilisé pour ses propriétés bactéricides, par exemple dans les lessives et les vêtements. Le nano-dioxyde de titane est utilisé pour ses propriétés photocatalytiques et de filtre UV dans les crèmes solaires, les dentifrices, les ciments. Les nanotubes de carbone sont utilisés pour leurs propriétés mécaniques dans les matériaux. Les nanoparticules d'alumine sont utilisées dans les plastiques, les peintures et les vernis (*72*). Les nanoparticules de silice sont utilisées depuis longtemps dans l'industrie agroalimentaire comme antiagglomérant sous le sigle E551, dans le sel, le sucre, les préparations industrielles (*73*) (Fig. 1-3).

Figure 1-3.*Exemples de produits contenant des nanoparticules de silice, transformées ou non : incorporées aux pneus Energy Saver de Michelin, dans le sucre SiboSibon et la préparation pour cappuccino Maxwell House comme antiagglomérant sous le sigle E551 et fumée de silice incorporée au ciment Winitoor pour la fabrication de bétons*

Elles sont également utilisées pour la fabrication de pneus (pneus Energy Saver de Michelin) en complément du noir de carbone pour améliorer les propriétés mécaniques des polymères. Les nanoparticules utilisées dans ce cas ont une taille comprise entre 8 et 16 nm et sont agglomérées avant transport et incorporation dans les pneus. Cependant, les étapes de fabrication puis d'usure et finalement de recyclage peuvent libérer la silice sous forme de nanoparticules.

Les nanoparticules de silice peuvent être incorporées aux emballages alimentaires pour améliorer la conservation des aliments, comme dans les films de polyamide Durethan commercialisés par Bayer. Elles sont également désignées sous le nom de « fumée de silice », qui est un sous-produit de l'industrie du silicium. Les fumées de silice sont incorporées au ciment pour améliorer la résistance du béton et utilisées pour la fabrication des bétons dits de haute et très haute performance.

Pourtant, les fabricants donnent une image bien différente et très « naturelle » de leurs produits (Fig. 1-4).

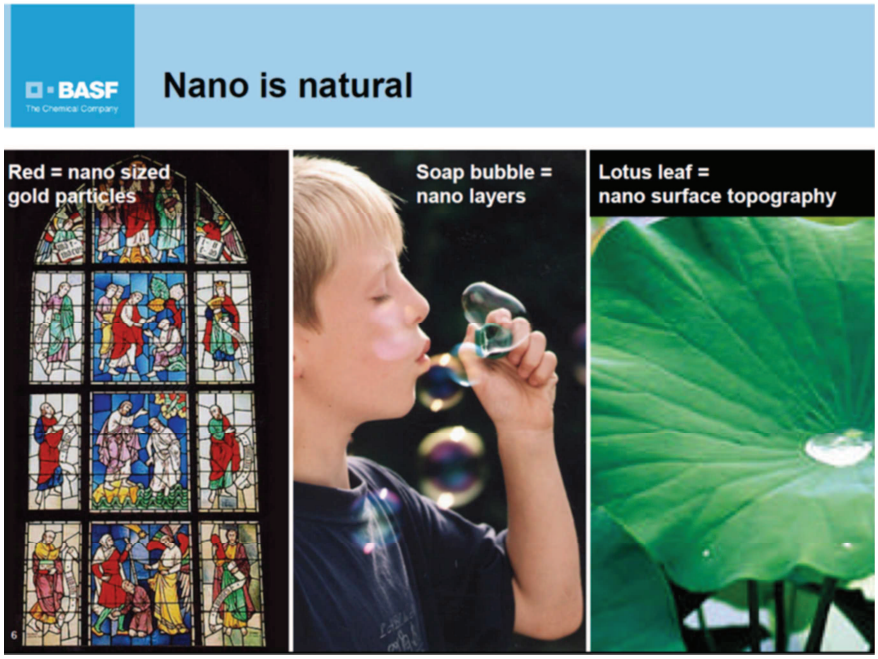


Figure 1-4. *Présentation des nanomatériaux par BASF en 2010 (71) : à gauche, peinture rouge avec nanoparticules d'or, au centre nanofilms de savon, à droite feuilles de lotus nanostructurées*

L'utilisation croissante des NP dans des produits de consommation courante suscite inquiétude et questions du grand public quant aux risques liés spécifiquement aux nanomatériaux, car les nanotechnologies se sont développées et ont été utilisées avant que la toxicité des nanomatériaux ne soit étudiée ou totalement écartée (*74, 75*). En effet, la réglementation était jusqu'à présent basée sur la nature des produits utilisés (Directive REACH pour l'Union Européenne) : les nanoparticules de silice, de dioxyde de titane ou d'argent pouvaient être utilisées car SiO_2 est inerte, TiO_2 est utilisé comme contrôle négatif en toxicologie et Ag est un bactéricide bien connu. Le risque « nano » n'était pas étudié pour ces matériaux et n'apparaissait pas dans la législation.

Cela a conduit au développement des études de nanotoxicologie, suivies en France par l'Anses pour le volet scientifique (*72*), et à l'organisation d'un débat public sur les nanotechnologies pour le volet sociétal (*76*). Le débat qui s'est tenu en 2009-2010 a été mouvementé et plusieurs réunions ont été annulées. Il en ressort une forte polarisation des positions entre « pro » et « anti ». De plus, le risque de toxicité humaine ou environnementale n'était pas le seul considéré, une question d'éthique portait sur le développement de nanocapteurs ou nanopuces communicantes qui pourraient être implantées dans le corps humain et du risque qu'ils représenteraient pour la liberté individuelle (*76*).

Depuis 2012, la déclaration de la production ou de l'utilisation de nanoparticules est obligatoire en France (décret n°2012-232). Une consultation publique organisée par la Commission Européenne

est en cours (du 21 juin au 13 septembre 2013) pour prendre en compte le risque potentiel lié aux nanomatériaux dans la directive REACH (*77*).

L'exposition aux nanomatériaux peut donc prendre des formes très diverses : travailleurs et consommateurs peuvent être exposés à des nano-objets de nature, taille, forme très variés incorporés au sein des produits avec ou sans revêtement de surface. Toutes les voies d'exposition sont possibles, par contact avec la peau (cosmétiques), par inhalation (usinage, dégradation) et par ingestion (produits et emballages alimentaires).

La toxicologie des NP présentée dans cette introduction est vue sous l'angle des interactions entre protéines et NP. L'incorporation, la biodistribution, l'internalisation et les mécanismes de cytotoxicité des NP sont tout d'abord exposés.

Incorporation

En cas d'exposition, le risque de **pénétration à travers le derme** des nanoparticules d'oxyde de titane et de zinc contenues dans les crèmes solaires reste limité, sauf si la peau est lésée. Une autre situation d'exposition est l'utilisation de nanoparticules de noir de carbone dans les encres de tatouage, ce qui pourrait faciliter leur incorporation (*78*). La quantité de nanoparticules susceptibles de passer dans le sang, et d'être ainsi transportées aux organes, pour la peau lésée ou par un tatouage n'est pas connue (*67*).

L'inhalation des nanoparticules est la voie d'exposition qui a été la plus étudiée et plusieurs études *in vivo* ont été réalisées par instillation intratrachéales ou inhalation de nanoparticules d'oxydes ou nanotubes de carbone chez le rat et la souris (*79*). Deux parallèles avec des risques connus ont suscité ces recherches : d'une part la similitude de forme et de taille entre nanotubes de carbone et fibres d'amiante dont l'utilisation a causé la mort de très nombreux travailleurs et qui est à l'origine d'un scandale sanitaire, d'autre part la toxicité importante des particules ultrafines, particules issues de la combustion du diesel ou poussière de silice, ces dernières pouvant provoquer la silicose chez les travailleurs exposés(*65*).

De par leur petite taille, les nanoparticules peuvent se déposer jusque dans les alvéoles pulmonaires (*65*). Une accumulation de nanotubes de carbone ou de nanoparticules de silice conduit à l'accumulation de macrophages. Des effets toxiques au niveau pulmonaire (fibrose) ont été observés sans incorporation et translocation des nanoparticules dans le sang (*79*). Il semble cependant que les nanoparticules, en particulier les nanoparticules de silice, ne soient pas toutes prises en charge par les macrophages et qu'elles puissent traverser l'épithélium après inhalation

(*68, 80*). Une observation similaire a été réalisée sur les nanoparticules d'argent (*69*) et l'endocytose de nanoparticules de noir de carbone par les cellules épithéliales bronchique a été observée *in vitro* (*81*).

L'élimination des particules déposées dans les poumons par clairance muco-ciliaire pourrait être inefficace chez les fumeurs chez qui ce mécanisme est altéré. D'autre part, des nanoparticules métalliques sensibles à la dissolution pourraient relarguer des ions toxiques (cadmium, argent, fer, zinc, cobalt, nickel...) qui seraient facilement absorbées au niveau des poumons (*82*). L'inhalation de nanoparticules présente ainsi un risque important de toxicité, par accumulation, translocation ou dissolution.

Une autre voie d'entrée possible du nano-argent après inhalation serait le passage direct par le nerf olfactif au cerveau, sans passage à travers la barrière hémato-encéphalique (*69*). Ces observations n'ont cependant jamais été confirmées chez l'homme.

Le risque d'**incorporation par le tractus gastro-intestinal** n'a été étudié que très récemment et reste très peu connu (*73*). L'interaction entre les nanoparticules et le mucus intestinal, qui forme un réseau de glycoprotéines et d'autres molécules, pourrait notamment influencer la capacité des nanoparticules à traverser ou non cette barrière (*83*). L'ingestion de nanoparticules d'argent conduit à une accumulation d'argent chez le rat (*69*). Cependant, il est impossible de conclure quant à l'incorporation de l'argent sous forme de nanoparticules ou d'ions après dissolution. Cette remarque peut s'appliquer de façon plus générale aux nanoparticules métalliques qui peuvent se dissoudre sous forme d'ions toxiques en milieu biologique.

Par ailleurs, l'étude épidémiologique des effets des NP basée sur la surveillance des travailleurs se développe en France (*84*).

Enfin, lorsque les nanomatériaux sont utilisés en nanomédecine, une injection directe dans le sang est appliquée pour l'injection de vaccins (adjuvants contenant des nanoparticules d'aluminium) et de médicaments (nanovecteurs).

Biodistribution

La biodistribution des nanoparticules chez le rat ou la souris dépend du type d'injection, de la dose, du type de nanoparticules et de leur taille. Les nanoparticules de silice par exemple, lorsqu'elles sont injectées par voie intraveineuse, sont préférentiellement distribuées dans le foie et la rate, mais peuvent aussi se trouver dans les reins, avec une élimination principalement dans les urines et la bile en une quinzaine de jours (*68*). Une inflammation au niveau du foie a pu être observée.

De plus, lorsque les nanoparticules sont en contact avec le milieu biologique, elles se couvrent d'une **couronne de protéines adsorbées** (corona) : l'objet qui est véhiculé dans l'organisme n'est donc plus la nanoparticule « nue » mais la nanoparticule entourée de protéines de nature, structure et fonction différentes, ce qui lui confère une nouvelle « identité »(*85-88*). La nature des protéines adsorbées, qui dépend également du type d'exposition, détermine en grande partie la cascade de réactions qui va se produire par la suite : reconnaissance cellulaire, phagocytose, internalisation, organes ciblés et toxicité (*89-92*).

L'adsorption d'immunoglobulines ou des protéines du complément sur les nanoparticules conduit à leur opsonisation, puis à leur prise en charge par les cellules du système immunitaire vers le foie ou la rate et à une élimination rapide de la circulation sanguine (*20*). L'opsonisation peut conduire à l'accumulation des nanoparticules dans le foie et à son inflammation. L'adsorption d'autres protéines, comme la sérum albumine ou la β2-glycoprotéine, peut aussi augmenter la vitesse d'élimination des nano-objets du sang (*40*). Pour modifier la biodistribution des vecteurs de médicaments, ou augmenter leur temps de présence dans la circulation sanguine, les nanoparticules sont fonctionnalisées, idéalement afin d'être adressées à l'organe ciblé (*34*).

Endocytose

L'internalisation des nanoparticules dans les cellules est possible *via* différents mécanismes : par pinocytose, assisté ou non par les clathrines, et pour les plus gros objets (agrégats, fibres) par phagocytose (*93*). Elle dépend du type cellulaire, des nanoparticules (taille, forme, surface hydrophile/hydrophobe) mais aussi de la chimie de surface des nanoparticules (protéines adsorbées, surface fonctionnalisée).

L'endocytose d'une nanoparticule peut ainsi être favorisée ou limitée en fonction de la couronne de protéines et de molécules présentes. L'adsorption de la transferrine sur les nanoparticules d'or, mais aussi de polymères chargés positivement ou de peptides de transport (Cell Penetrating Peptide) est utilisée pour favoriser l'internalisation des nano-objets pour des applications en médecine ou pharmacologie (*93*) (Fig. 1-5). Au contraire, la fonctionnalisation de la surface par des polymères comme le PEG peut empêcher leur internalisation.

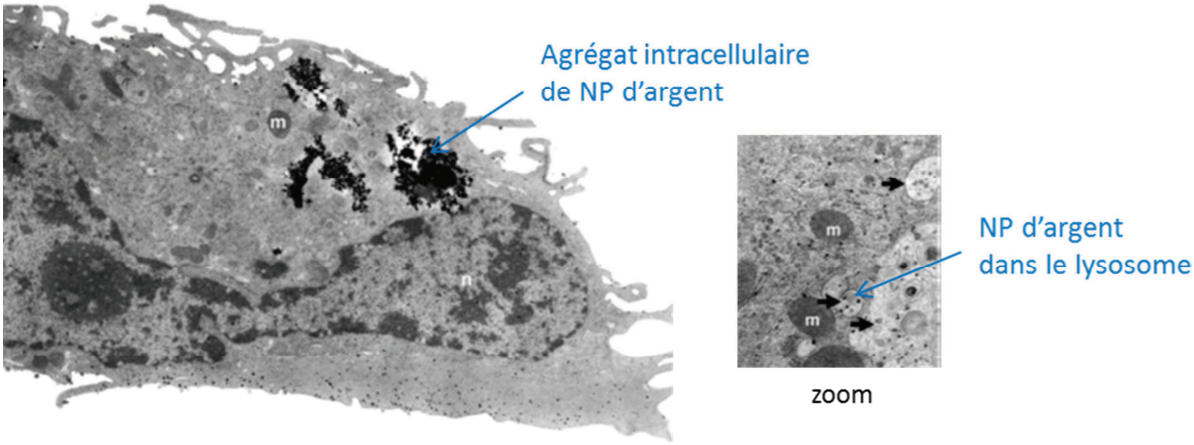


Figure 1-5. *Image par microscopie électronique à transmission d'un macrophage après exposition à des nanoparticules d'argent recouvertes d'un peptide : les nanoparticules d'argent sont présentes à la fois sous forme d'agrégats de grande taille dans le cytoplasme (à gauche) et de particules dans les lysosomes (zoom) (m : mitochondrie, n : noyau) (94)*

La phagocytose des nanotubes de carbone peut conduire, comme pour les fibres d'amiante, à une phagocytose « frustrée » à cause de la longueur des nanotubes (> 1µm) : les radicaux et hydrolases du macrophage sont relargués dans le milieu et sont à l'origine de l'inflammation pulmonaire observée chez le rat après inhalation des nanotubes (*93*). Plusieurs études ont montré que la phagocytose des nanotubes de carbone, mais aussi des nanoparticules de silice, dépendait de la présence ou non d'une couronne de protéines adsorbées : les macrophages ne semblent reconnaître que les nanotubes de carbone ayant adsorbée la sérum albumine à leur surface (*90, 95*), ce qui montre que l'adsorption puis la modification de la protéine adsorbée ont des conséquences biologiques et des implications fortes pour la toxicité des nanomatériaux.

Mécanismes de toxicité intracellulaire

Lorsque les nanoparticules sont internalisées, elles peuvent se trouver dans une vésicule, libres dans le cytoplasme ou dans le lysosome (Fig. 1-5). Elles sont plus rarement localisées dans le noyau. Leur distribution subcellulaire, notamment au niveau des autres organelles, est assez mal connue et dépend à nouveau du type de nanoparticule et de cellule. Par contre, différents effets cytotoxiques ont pu être identifiés, comme une altération des mitochondries, qui montre que des nanoparticules d'oxyde de cérium peuvent interagir avec celles-ci (*96*).

Les principaux effets cytotoxiques identifiés des nanoparticules sont la dissolution des métaux et la libération d'ions toxiques, des dommages aux membranes et un stress oxydant (*93*). Des effets génotoxiques plus rares ont été observés par dommage à l'ADN, par exemple avecdes nanoparticules d'oxyde de cuivre et d'oxyde de titane. En réalité, les mécanismes moléculaires de

toxicité des NP sont encore mal connus et différentes voies de signalisation pourraient être impliquées (*97*).

Un stress oxydant est observé *in vitro* pour de nombreuses nanoparticules, même lorsque celles-ci ne sont pas *a priori* elles-mêmes génératrices d'espèces réactives de l'oxygène, comme c'est le cas des nanoparticules de silice (*68, 98*). La présence d'impuretés métalliques ou de protéines à cofacteurs métalliques adsorbées sur la nanoparticule pourrait expliquer cet effet. La production d'espèces réactives de l'oxygène dans la cellule peut activer la voie des MAP kinases puis les facteurs de transcription tels que NFκB qui conduisent à l'expression d'enzymes anti-oxydantes (*97*).

Les NP peuvent également interagir avec des récepteurs membranaires (par exemple lorsqu'elles présentent à leur surface un anticorps spécifique de l'intégrine) ou des canaux ioniques et activer la voie de signalisation et les processus biologiques qui leur sont associés, comme une modification de l'homéostasie (*97*).

L'étude de la toxicité des NP est rendue plus compliquée du fait de l'absence de protocoles standards d'analyse (*99*). Les résultats obtenus *in vitro* sont difficiles à comparer entre différentes études qui utilisent des conditions expérimentales très différentes et dont les résultats sont parfois contradictoires. De plus, certaines méthodes d'analyse peuvent être perturbées par la présence des nanomatériaux (*100*).

L'effet cytotoxique des nanoparticules dépend également des protéines et molécules adsorbées à leur surface. La cytotoxicité des nanoparticules de titane est plus faible lorsque des protéines du sérum sont adsorbées en surface, malgré une plus grande quantité de nanoparticules internalisées (*92*). Cela montre que la simple mise en suspension des nanoparticules dans un milieu de culture avant de réaliser un test in vitro n'est pas suffisante : les protéines présentes et adsorbées à la surface des nanoparticules étudiées doivent être identifiées et caractérisées, elles doivent également être représentatives du milieu dans lequel vont « baigner » les nanoparticules avant d'être exposées aux cellules.

1.4 Un risque de toxicité par adsorption des protéines

L'adsorption des protéines pourrait elle-même générer une toxicité directe, à l'échelle moléculaire, par la modification de la structure et de l'activité des protéines adsorbées (Fig. 1-6).

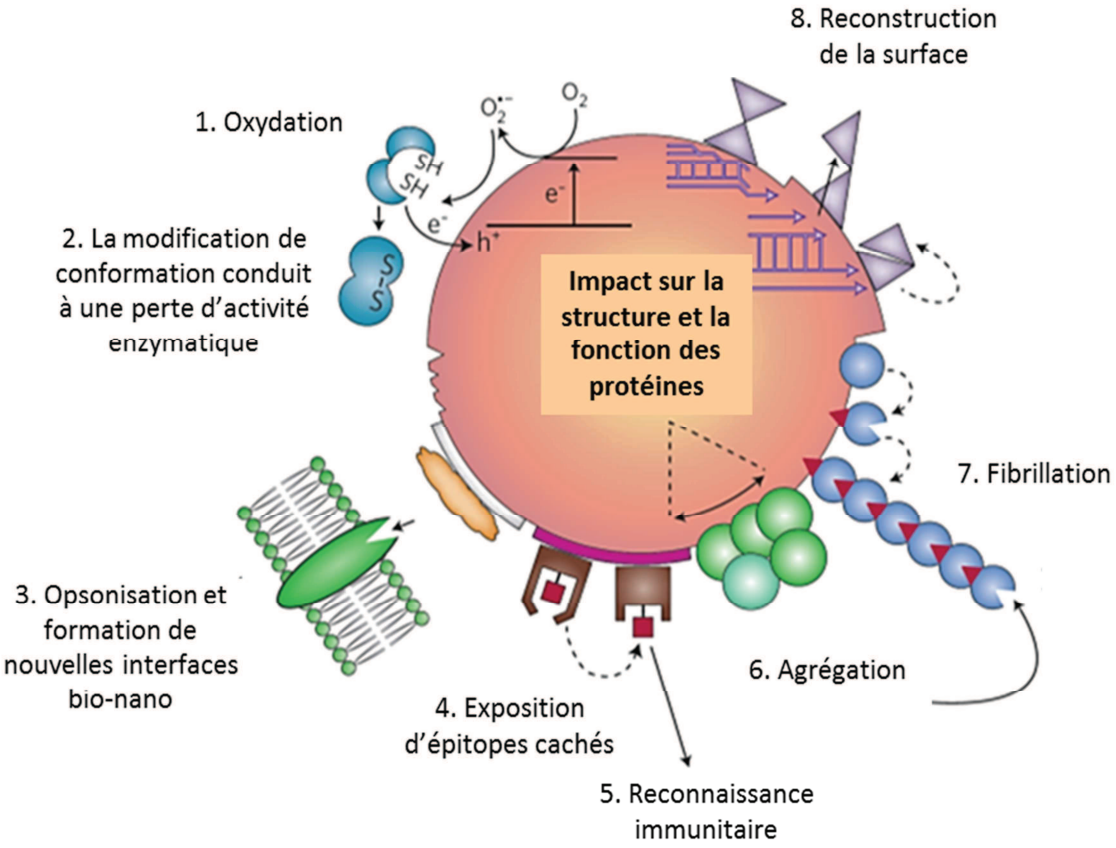


Figure 1-6. *Toxicité potentielle due à l'interaction directe entre protéines et nanoparticules d'après Nel (93). Dans le modèle de Nel, la reconstruction de la surface libère de l'énergie qui permet la modification de structure des protéines adsorbées. La numérotation n'est pas chronologique.*

L'opsonisation par l'adsorption d'immunoglobulines, de protéines du complément ou d'autres protéines (n°3 sur Fig. 1-6) peut conduire à l'adsorption de plaquettes dans le sang, à la phagocytose dans les alvéoles pulmonaires, ce qui crée un nouveau contact entre nanoparticules et cellules.

Plusieurs hypothèses sont proposées et basées sur l'observation d'une modification de la structure des protéines adsorbées. Les risques possibles de toxicité à l'échelle moléculaire sont la plus grande sensibilité à l'oxydation de la protéine adsorbée (1), la modification de sa structure et la perte d'activité enzymatique (2). La modification de la structure de la protéine pourrait conduire à l'exposition de nouveaux épitopes (4), déclenchant une réaction immunitaire contre une protéine du soi, similaire à une réaction auto-immune (5).L'exposition de nouveaux épitopes peut-elle conduire à des réactions inflammatoires, de type allergie, par exemple lorsque les nanoparticules sont présentes dans l'alimentation (nanoparticules de silice + cacahuète) ?

L'adsorption pourrait également provoquer l'agrégation (6) et la fibrillation des protéines (7), associée notamment à un risque de maladies neurodégénératives en cas d'entrée des nanoparticules dans le cerveau. Quelques études ont rapporté l'agrégation de protéines en présence de nanoparticules *in vitro* : Linse a montré que la fibrillation de la β2-microglobuline pouvait être déclenchée par des nanotubes de carbone, des quantum dots et des nanoparticules d'oxyde de cérium, même si rien ne prouve qu'un tel processus puisse avoir lieu en milieu biologique (*101*). Chen a montré, cette fois sur des cellules, que des nanoparticules de silice pouvaient pénétrer dans le noyau de la cellule et provoquer l'agrégation de protéines nucléaires, notamment de la topoisomérase, ce qui conduit à l'arrêt de la réplication, de la transcription et de la division cellulaire (*102*). L'adsorption de certaines protéines plus sensibles à l'agrégation pourrait donc avoir des conséquences graves sur la cellule.

L'adsorption de certaines protéines pourrait au contraire diminuer la toxicité cellulaire des nanoparticules : c'est le cas lors de l'adsorption préalable de la glutathione transférase sur les nanoparticules de silice (*103*). Comment l'adsorption de deux protéines pourrait-elle conduire dans un cas à la fibrillation, dans un autre à un effet protecteur ?

Les effets de l'adsorption des protéines sur les nanomatériaux restent encore très mystérieux : qu'est-ce qu'une protéine adsorbée ? Est-ce une protéine native ou une protéine dénaturée ? Quelle est sa structure et son activité ? Quels sont les paramètres qui vont déterminer l'adsorption d'une protéine aux dépens d'une autre en milieu biologique ?

Nous avons choisi d'étudier l'adsorption des protéines sur les nanomatériaux pour les raisons suivantes :

- un risque de toxicité des nanoparticules qui dépend de la couronne de protéines adsorbées à leur surface et des modifications des protéines adsorbées (*85-87*). Une meilleure connaissance des interactions entre protéines et nanomatériaux est nécessaire pour mieux comprendre leurs effets biologiques ;
- de nouvelles applications, parmi lesquelles des applications médicales où le phénomène d'adsorption des protéines est essentiel, et des applications industrielles où l'adsorption d'enzymes sur un nouveau type de support peut être recherchée ;
- des spécificités : les nanomatériaux présentent des géométries (courbure) et des propriétés (réactivité) différentes de celles des surfaces planes, permettant d'étudier l'influence de nouveaux paramètres sur l'adsorption. De plus, les plus petites nanoparticules ont une

taille équivalente aux protéines de grande taille, ce qui change complètement le rapport d'échelle entre protéine et surface ;

- une très grande surface spécifique qui permet d'utiliser de nouvelles techniques d'analyse pour étudier les protéines adsorbées (comme la diffusion de neutrons, voir chap. 6).

Le travail réalisé au cours de cette thèse cherche donc à répondre à ces deux questions simples :

- **Quel est l'état de la protéine adsorbée sur une nanoparticule ?**
- **Quel est le processus d'adsorption qui conduit à cet état ?**

L'objectif est de caractériser de la façon la plus complète possible la structure, la dynamique et l'activité d'une protéine adsorbée et de déterminer quels mécanismes ont permis son adsorption.

2. Etat d'une protéine adsorbée

2.1 Structure

Les premières études sur la structure des protéines adsorbées sur des surfaces ont été réalisées dans les années 1970 grâce à la spectroscopie infrarouge (*104*), à la spectroscopie de fluorescence (*105*)et au dichroïsme circulaire (*106-108*). Depuis, la structure des protéines adsorbées sur des surfaces planes, des microparticules ou des nanoparticules est presque systématiquement étudiée à l'aide d'une de ces techniques. L'adsorption des protéines s'accompagne presque toujours d'une diminution de la structure secondaire organisée des protéines (*45, 109, 110*), à quelques rares exceptions près où des interactions plus spécifiques conduisent à la formation d'hélices (*111*). Les modifications de structure observées dépendent de la nature de la surface (hydrophobe/hydrophile) mais aussi de la nature de la protéine (*52*). Ces modifications de structure suggèrent que l'interaction avec la surface représente un stress pour la protéine, dont l'état est souvent rapproché d'un état dénaturé lorsqu'il s'accompagne d'une perte d'activité (voir §2.2).

Cependant, ces techniques ne permettent qu'une mesure globale et moyenne de la structure de la protéine adsorbée : les modifications locales de la structure restent inconnues. Quelques analyses sur des systèmes très spécifiques, comme les immunoglobulines, ont été réalisées pour déterminer l'orientation de la protéine adsorbée sur la surface (si l'on assimile la protéine à un solide, par quel « côté » va-t-elle s'adsorber ?) (*18*). Ce type d'information reste encore inconnu pour la plupart des systèmes.

L'étude de la dénaturation en température des protéines adsorbées par microcalorimétrie DSC a mis en évidence une hétérogénéité de conformation des protéines adsorbées (*112, 113*), sans que l'on puisse donner une structure pour chacune de ces différentes conformations. Malgré le grand nombre de systèmes étudiés, la structure des protéines adsorbées n'est donc définie que de manière globale et moyenne.

L'adsorption des protéines sur les nanomatériaux présente quelques spécificités par rapport aux surfaces planes : la modification de structure des protéines dépend de la taille et de la courbure de la nanoparticule (*114*). Cependant, aucune règle générale sur un effet plus marqué des nanoparticules de plus grande ou de plus petite taille ne peut être déduite, car cela semble variable pour chaque système protéine-nanoparticule.

Les références sont citées comme exemples, une étude plus détaillée est réalisée dans la thèse lors de la discussion des résultats de chaque chapitre.

2.2 Activité

Les modifications d'activité des protéines adsorbées sont beaucoup plus variées : leur activité peut augmenter, diminuer ou rester constante (*115-117*), alors même que les modifications de structure vont toutes dans le même sens et indiquent plutôt une perte de structure secondaire des protéines adsorbées.

La perte d'activité enzymatique est en générale interprétée comme une conséquence de la perte de structure de la protéine. La perte d'activité du lysozyme adsorbée sur les nanoparticules de silice est ainsi expliquée par la modification de l'hélice du site actif de l'enzyme (*93*). L'interprétation du maintien ou de l'augmentation de l'activité des protéines adsorbées est plus délicate. Les explications avancées sont très générales et liées à l'orientation de la protéine sur la surface et l'accessibilité du site actif. Il manque clairement une vision plus précise des relations entre structure et activité des protéines adsorbées sur les surfaces, car la perte de structure moyenne observée n'est pas suffisante pour expliquer les effets de l'adsorption sur l'activité des protéines.

2.3 De nombreuses inconnues

Site(s) d'interaction entre protéine et surface

Les résidus et régions d'interaction entre protéine et surface sont inconnus pour la plupart des systèmes. De plus, l'adsorption très souvent irréversible des protéines laisse penser qu'elles sont ancrées sur la surface grâce à plusieurs points de contact (à l'image d'un polymère, voir §3).

Beaucoup plus récemment, quelques analyses par échange H/D des amides ont permis d'identifier de larges zones potentielles d'interaction entre protéine et surface (*118, 119*).

Il reste encore de nombreuses inconnues sur les relations entre mécanismes d'adsorption et perte de structure, notamment l'identification plus complète des résidus impliqués dans l'adsorption.

Liens entre structure, activité et effets biologiques

Les relations entre perte de structure et modification d'activité d'une part, entre perte de structure et effets biologiques d'autre part, ne sont pas bien identifiées. Quel est le lien entre la modification de structure et la biocompatibilité d'un matériau ? Comment l'adsorption conduit-elle à une plus ou moins grande internalisation ou à une plus ou moins grande cytotoxicité ? Il reste encore de nombreuses questions sur les mécanismes moléculaires d'interaction entre nanoparticules et milieu biologique.

Dynamique des protéines adsorbées

La dynamique des protéines adsorbées est presque totalement inconnue. L'hypothèse avancée dans la littérature est que la déstructuration de la protéine s'accompagne d'une augmentation du nombre de degrés de liberté et donc de flexibilité de la protéine adsorbée (*120*). Pourtant, quelques études récentes par anisotropie de fluorescence et par RMN laissent penser que l'adsorption conduirait au contraire à une diminution de la dynamique des protéines adsorbées (*121, 122*). La relation entre structure et dynamique des protéines adsorbées est donc mal comprise et nécessite de nouvelles études.

3. Les modèles d'adsorption des protéines

L'adsorption des protéines sur les surfaces est un phénomène étudié depuis longtemps, les différentes approches et modèles proposés pour expliquer les interactions entre protéines et surfaces sont présentés ci-dessous. Permettent-ils d'expliquer tous les processus observés ?

Un premier parallèle avec l'adsorption des polymères sur une surface

Si le modèle de Langmuir, qui décrit l'adsorption des gaz sur les surfaces, est utilisé très tôt pour décrire les isothermes d'adsorption des protéines sur les surfaces(*3*), l'adsorption des protéines est toutefois rapidement rapprochée de celle des polymères, qui comme les protéines sont des macromolécules susceptibles d'interagir en plusieurs points avec la surface, à la différence des petites molécules étudiées jusqu'alors (*17, 123*). A la manière d'un velcro, un polymère est adsorbé

sur la surface par plusieurs « pattes », si une ou deux « pattes » se décollent, il en reste toujours plusieurs autres pour maintenir le polymère adsorbé (*124, 125*) (Fig. 1-7).

Figure 1-7. *Adsorption d'un polymère flexible sur une surface par plusieurs points d'ancrage, d'après (120)*

Les polymères formés de très longues chaînes, branchés ou non, sont flexibles et peuvent se mouvoir avec un grand nombre de degrés de liberté en solution. Les interactions entre polymères et surface sont favorisées par des interactions spécifiques, qui peuvent être des interactions électrostatiques dans le cas des polyélectrolytes de charge opposée à la surface, et seraient défavorisées par la perte d'entropie associée à une conformation « figée » (*120*). Comme pour les polymères poly-amphotères, l'adsorption des protéines sur la surface serait maximum à leur point isoélectrique (*3, 9*) grâce aux interactions électrostatiques avec la surface (*126*). Toutefois, polymères et protéines peuvent s'adsorber sur une surface malgré un effet de répulsion électrostatique, d'autres mécanismes sont donc impliqués (*120*).

De plus, une hétérogénéité de conformation des polymères adsorbés est observée. Par exemple, lors de l'adsorption du polystyrène sur une surface de silice, les premières chaines s'adsorbent « à plat » avec un grand nombre de points de contact avec la surface, tandis que les chaines adsorbées plus tardivement sont moins fortement adsorbées et présentent une conformation différente (*127*). Il y a donc un étalement des polymères sur la surface lorsque la surface disponible est grande. Or la structure des protéines adsorbées évolue, comme pour les polymères (*124*), avec le temps de résidence à la surface et avec la surface disponible : les protéines adsorbées pour les temps de contact les plus longs et à faible concentration sont celles qui se désorbent le moins (*128*). Selon un processus similaire, les protéines pourraient « s'étaler » sur la surface au cours du temps, ce qui maximiserait les forces d'interaction avec la surface (*18, 129*).

Le modèle d'adsorption des protéines de Norde

A partir de l'étude de l'adsorption de protéines modèles en fonction du type de surface et des conditions physico-chimiques, Norde propose un modèle d'adsorption des protéines qui explicite

les mécanismes sous-jacents à l'adsorption et qui vise à prédire l'adsorption ou la non adsorption des protéines sur une surface (*120, 130*). Le modèle de Norde a été largement utilisé et repris dans les études d'adsorption des protéines (*18, 131*).

D'après le modèle de Norde, l'adsorption des protéines dépend du point isoélectrique et de la stabilité de la structure de la protéine d'une part, de la charge et de l'hydrophobicité de la surface d'autre part (tableau 1-2). La stabilité est définie dans ce modèle par rapport aux modifications structurales des protéines adsorbées : Norde définit des protéines « dures » qui subissent peu de modifications structurales lors de l'adsorption, et des protéines « molles » qui perdent une partie de leur structure lors de l'adsorption (*132*).

Protéine	Surface hydrophile		Surface hydrophobe
	+	-	
Dure / Charge +	NA	A	A
Dure / Charge -	A	NA	A
Molle / Charge +	A	A	A
Molle / Charge -	A	A	A

Tableau 1-2. *Conditions d'adsorption des protéines sur la surface selon le modèle de Norde (120) en fonction de la stabilité structurale de la protéine (protéine « dure », protéine « molle »), de son point isoélectrique (charge globale de la protéine), de la charge et de l'hydrophobicité de la surface. Prédiction de l'adsorption (A) ou de la non adsorption (NA) de la protéine sur la surface.*

On constate que dans la plupart des cas les protéines s'adsorbent sur les différentes surfaces selon ce modèle, la non adsorption restant une exception. Pour Norde, l'adsorption des protéines sur les surfaces hydrophobes est toujours favorable quelles que soient la charge globale de la surface et de la protéine : la déshydratation de la surface par la protéine adsorbée (interaction hydrophobe) est prédominante par rapport aux effets de répulsion électrostatique et devient ainsi le mécanisme majeur de l'adsorption des protéines sur les surfaces hydrophobes. Une fois adsorbée, les protéines s'étalent sur la surface et augmentent leur surface d'interaction. Norde conclut de façon plus générale en disant que toute protéine s'adsorbe sur une surface hydrophobe et que l'adsorption des protéines augmente avec l'hydrophobicité de la surface. Une exception cependant : la mucine, une glycoprotéine , s'adsorbe en quantité plus importante sur les surfaces hydrophiles par rapport aux surfaces hydrophobes grâce à ses chaînes oligosaccharidiques (*133, 134*).

Au contraire, Norde stipule qu'il n'y a pas d'effet de déshydratation de la surface lors de l'adsorption des protéines sur les surfaces hydrophiles. D'autres mécanismes doivent donc

expliquer l'adsorption des protéines, car les interactions de van der Waals sont trop faibles pour permettre à elles-seules l'adsorption : dans le cas où protéine et surface sont de charge opposée, il s'agit d'interactions électrostatiques entre protéine et surface ; dans le cas où protéine et surface sont de même charge, seules les protéines « molles » pourraient s'adsorber sur la surface : la répulsion électrostatique serait masquée par la formation d'une couche de contre-ions à l'interface, et le mécanisme moteur de l'adsorption serait la perte de structure de la protéine adsorbée. La modification de la structure de la protéine adsorbée correspondrait à une perte de structure ordonnée et serait associée à un gain important d'entropie conformationnelle à l'origine de l'adsorption. Les protéines « dures » dont la structure ne serait pas modifiée ne pourraient pas s'adsorber.

Relation entre perte de structure et entropie des protéines adsorbées

La perte de structure est donc un processus moteur de l'adsorption des protéines dans le modèle de Norde grâce au gain d'entropie. Ce modèle est repris par Haynes, qui ajoute un paramètre supplémentaire (*131*) : une perte de structure secondaire de la protéine adsorbée serait associée à une augmentation du nombre de degrés de liberté de la chaine peptidique, et donc d'une augmentation de la dynamique conduisant à un gain d'entropie, favorable à l'adsorption. L'idée que la perte de structure est un des moteurs de l'adsorption des protéines, sous la forme d'un processus de relaxation, est couramment reprise à la manière d'une « donnée initiale » sans réelle discussion ou démonstration expérimentale (*135, 136*).

Pourtant d'après ce modèle, la protéine adsorbée « s'étale » sur la surface, à l'image d'un polymère fortement adsorbé. La protéine ainsi « collée » sur la surface peut-elle gagner en entropie alors que l'adsorption des polymères conduit justement à « figer » leur conformation et à une perte d'entropie, défavorable à l'adsorption ? Etudier la structure des protéines adsorbées n'est pas suffisante pour établir avec certitude quels mécanismes conduisent à l'adsorption dans le cas d'une surface hydrophile : une analyse de la dynamique de la protéine adsorbée est également nécessaire.

Les mécanismes d'adsorptions des protéines revus par Czeslik

Pour déterminer si une protéine est « dure » ou « molle » et prédire son adsorption, la stabilité structurale des protéines est supposée équivalente à la stabilité en température : les protéines « dures » sont les protéines qui ont une température de dénaturation élevée et les protéines « molles » celles qui ont une température de dénaturation plus faible (*122*).

Dans une revue plus récente, Czeslik complète le modèle d'adsorption de Norde par des données thermodynamiques de l'adsorption des protéines (*32*). Il reprend les mécanismes d'adsorption suivants :

i) Interactions de van der Waals : une contribution favorable mais de faible amplitude à l'énergie d'adsorption des protéines
ii) Interactions électrostatiques : une contribution importante de l'adsorption
iii) Interactions hydrophobes : la contribution majeure de l'adsorption, par déshydratation des chaînes latérales hydrophobes et de la surface
iv) Modification de la conformation et gain d'entropie : la modification de conformation de la protéine adsorbée n'est pas nécessairement associée à une augmentation du nombre de degrés de liberté, cette interprétation est discutée

Czeslik montre bien qu'il n'y a pas de mesure expérimentale du gain d'entropie associé à la modification de la conformation des protéines adsorbées, mais il estime dans un premier temps que ce mécanisme est probable car très favorable (une contribution très favorable est nécessaire dans le modèle de Norde pour expliquer l'adsorption des protéines de même charge globale que la surface) et qu'il explique selon lui la plus grande adsorption des protéines de faible stabilité structurale (*32*). Pourtant, il rapporte dans un autre article une diminution de la mobilité des résidus tryptophane de protéines adsorbées sur la silice, ce qui correspond à une perte d'entropie lors de l'adsorption (*122*). Czeslik conclut finalement que pour ce système, le gain d'entropie par perte de structure est peu probable, et propose une augmentation des interactions avec la surface lors de l'étalement de la protéine pour expliquer l'adsorption.

Cette nouvelle interprétation n'explique pas pour autant la contribution entropique favorable mesurée par microcalorimétrie sur d'autres systèmes lors de l'adsorption (*137*). Il reste donc des zones d'ombre sur les mécanismes à l'origine de ce gain d'entropie, qui reste un des moteurs de l'adsorption des protéines sur les surfaces hydrophiles.

Ce qui reste inexpliqué

Certaines observations restent inexpliquées avec les modèles actuels d'adsorption des protéines sur les surfaces, parmi lesquelles :

1) Quelle hétérogénéité de conformation des protéines adsorbées ?

L'adsorption des polymères sur une surface conduit à une grande hétérogénéité de conformations (53) et il a été montré que la structure des protéines adsorbée évoluait au cours du temps, depuis

un premier contact jusqu'à l'étalement de la protéine sur la surface (*129*). Une fois l'équilibre atteint, l'analyse de la structure par dichroïsme circulaire ou par spectroscopie infrarouge, ne donne qu'une mesure moyenne de la structure des protéines adsorbées. Existe-t-il cependant une hétérogénéité de structure des protéines adsorbées ?

Quelques études par microcalorimétrie ont montré une augmentation du nombre de conformations de la protéine adsorbée par rapport à la protéine libre (*52, 112*). Norde interprète cette hétérogénéité uniquement par une différence de surface disponible par molécule et donc un plus ou moins grand degré d'étalement, certaines protéines gardant leur structure native, d'autres étant modifiées (*120*). La conformation des protéines adsorbées sans limitation de la surface disponible est-elle pour autant homogène ? Quel serait le moteur de l'adsorption irréversible des protéines qui conserverait leurs structures natives ?

2) Quelle dynamique des protéines adsorbées ?

La modification de la structure de la protéine adsorbée s'accompagne-t-elle d'une augmentation ou d'une diminution de sa dynamique ? Très peu de données existent dans la littérature sur la dynamique des protéines adsorbées (*122*). A l'aide de deux mesures très différentes, RMN du solide et anisotropie de fluorescence, deux études montrent cependant que l'adsorption pourrait conduire à une diminution de la dynamique des protéines.

Une étude par RMN du ^{13}C de la stathérine, une phosphoprotéine salivaire qui inhibe la croissance de l'hydroxyapatite, a montré une diminution de la structure en hélices de la protéine adsorbée sur l'hydroxyapatite ainsi qu'une diminution de la dynamique de la protéine à l'échelle de la dizaine à la centaine de microsecondes, avec toutefois quelques limitations pour une analyse plus poussée des données (*121*). Une étude par anisotropie de fluorescence du lysozyme et de la SNase adsorbés sur la silice a montré que l'amplitude de mouvement de réorientation des tryptophanes à l'échelle de la nanoseconde diminuait lors de l'adsorption (*122*). Les deux processus identifiés se produisent par ailleurs à des échelles de temps très différentes. Les données manquent encore pour avoir une vision globale de la dynamique des protéines adsorbées.

3) Quelles relations entre perte de structure et modifications d'activité ?

Alors qu'une modification de la structure des protéines adsorbées est observée pour de nombreux systèmes, à quelques exceptions près (la subtilisine, une protéase sécrétée, gagne en hélicité lorsqu'elle est adsorbée sur le Téflon® (*132*)), les variations d'activité des protéines adsorbées sont

nettement plus diverses : la conservation, la diminution ou l'augmentation de l'activité de la protéine adsorbée semblent dépendre de chaque protéine (*52, 115, 138*).

Si la perte de structure des protéines est un mécanisme moteur de l'adsorption, comment expliquer l'augmentation de l'activité de certaines enzymes adsorbées ? S'agit-il d'un simple effet d'orientation du site actif vers le milieu environnant ou d'autres mécanismes spécifiques de l'interface avec le solide peuvent-ils jouer, à la manière de certaines lipases qui deviennent actives lorsqu'elles sont adsorbées à l'interface lipides/eau (*139*) ?

4) Quels sont les critères d'affinité des protéines pour une surface ?

La plupart des études sont réalisées sur une protéine purifiée isolée adsorbée sur une surface. La prédiction de l'adsorption d'une protéine isolée ne s'applique pas ou peu à l'adsorption des protéines à partir d'un milieu complexe riche en protéines, par exemple lorsqu'un biomatériau est en contact le sang. En effet, la composition en protéines adsorbée diffère de celle du milieu environnant : en fonction de leur abondance et de leur affinité, certaines protéines sont préférentiellement adsorbées à l'interface (*40, 64, 140*). Or les critères définis jusqu'à présent, point isoélectrique et stabilité structurale, ne permettent pas de déterminer l'affinité d'une protéine pour une surface et de prédire l'adsorption des protéines lorsque celles-ci sont en compétition.

D'autres critères restent à identifier pour passer de la prédiction de l'adsorption/non adsorption du modèle de Norde, à une échelle d'affinité des protéines pour une surface.

5) Quelles sont les bases moléculaires de l'adsorption ?

Quels sont les acides aminés directement impliqués dans l'adsorption des protéines, et au contraire existe-t-il des déterminants moléculaires de la non adsorption de certaines protéines ? Quels sont le ou les sites d'interaction entre une protéine et une surface ? Les bases moléculaires de l'adsorption sont peu connues et il reste difficile d'identifier précisément les sites d'interaction d'une protéine avec une surface.

Certaines études ont permis de mettre en évidence pour un système donné la zone d'interaction de la protéine avec la surface (*118, 141*), ou de souligner le rôle de certains acides aminés dans l'adsorption : par exemple, les résidus arginine et lysine jouent un rôle important lors de l'adsorption du lysozyme sur l'hydroxyapatite (*141*). Ce type d'observation est-il généralisable à d'autres systèmes ou reste-t-il spécifique d'une interaction protéine/surface donnée ? Pourrait-on utiliser des critères moléculaires pour prédire l'adsorption des protéines sur une surface ?

Au-delà de la prédiction de l'adsorption, le contrôle de l'adsorption, de la structure et de l'activité des protéines adsorbées est une étape clé pour de nombreuses applications. Dans cette thèse, nous essaierons de mieux comprendre les mécanismes d'adsorption des protéines sur les surfaces et leurs conséquences en termes de structure, d'activité et de dynamique des protéines adsorbées. De plus, nous nous intéressons à un système à l'équilibre, l'aspect cinétique de l'adsorption des protéines n'est donc pas étudié.

4. Choix des protéines et des nanomatériaux étudiés

En fonction des applications, un très grand nombre de nanomatériaux différents est utilisé : liposomes, oxydes, métaux, polymères, céramiques... L'adsorption des protéines dépend fortement du type de surface et les mécanismes de l'adsorption sur une surface hydrophile ne sont probablement pas applicables à l'adsorption sur une surface hydrophobe. Bien que cela soit recherché, il semble difficile de définir des règles générales pour l'adsorption des protéines sur des systèmes aussi différents.

Au cours de cette thèse, nous avons choisi d'étudier les surfaces d'oxydes hydrophiles pour lesquelles les mécanismes d'adsorption, en particulier les relations entre charge / structure / adsorption, sont encore mal compris. La silice nanostructurée, qui est produite et utilisée à l'échelle industrielle et présente un risque important de toxicité, a été étudiée comme surface d'oxyde hydrophile modèle.

Deux approches ont été développées : nous avons étudié d'une part l'adsorption de protéines modèles purifiées sur la silice nanostructurée, ce qui permet d'analyser la structure, la dynamique et l'activité des protéines adsorbées, et d'autre part l'adsorption des protéines à partir d'un milieu complexe, un extrait cellulaire de levure, contenant plusieurs milliers de protéines susceptibles d'interagir avec la surface. Leur adsorption a été caractérisée afin d'identifier de possibles déterminants de l'adsorption des protéines sur la surface de silice.

Silice nanostructurée

L'adsorption des protéines sur la silice peut se développer sur la silice présente naturellement dans l'environnement : cristaux de quartz et cristobalite pour la silice cristalline, chalcédoine et thèque des diatomées pour la silice amorphe par exemple, ou sur des matériaux manufacturés, de façon intentionnelle ou par exposition accidentelle.

Voici quelques exemples de situations réelles(ou possibles) d'adsorption de protéines sur la silice, en particulier sur la silice nanostructurée :

- *Silice biogénique* : les silaffines sont des protéines impliquées dans la biominéralisation des frustules de diatomées (*142*)
- *Biomatériau* : une céramique à base de silice est étudiée comme matrice pour la reconstruction du tissu osseux (*143*)
- *Pharmacologie* : les nanoparticules de silice mésoporeuses sont étudiées comme vecteurs possibles de médicaments (*37*)
- *Support d'enzyme immobilisée* : dans l'industrie agroalimentaire, la silice poreuse est utilisée comme support pour l'immobilisation de la lactase qui catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose (*51, 144*)
- *Biocapteurs* : une micropuce en silice est utilisée pour immobiliser des anticorps et réaliser un test immunologique directement à partir du sang (*54*) ; un biocapteur pour la mesure de la concentration en urée est réalisé en immobilisant une uréase sur une silice poreuse (*145*)
- *Chromatographie* : purification des protéines à l'aide de verres de silice poreux (*146*)
- *Production industrielle* : les nanoparticules de silice amorphes sont très utilisées dans l'industrie pour la production de pneus, de matériaux de construction et d'aliments comme le sel, le sucre, les gâteaux apéritifs (additif E551) (*73*)
- *Exposition accidentelle* : après inhalation, la poussière de silice cristalline provoque la silicose, l'une des plus anciennes maladies professionnelles. Dans le cas plus spécifique des nanoparticules de silice amorphes, celles-ci peuvent traverser la barrière pulmonaire après inhalation, passer dans le sang et être transportées jusqu'aux organes (*80*)

Les matériaux représentés sont tous siliceux mais ont des géométries, tailles et cristallinité différentes (Fig. 1-8). Dans notre étude, afin de ne pas nous limiter à un seul type de matériau, nous avons étudié différents types de silice amorphe nanostructurée : les nanoparticules de silice de 7 et 20 nm de diamètre d'une part, les verres de silice de porosité 8 et 50 nm d'autre part.

Les verres de silice de porosité contrôlée (CPG, Controlled Pore Glass) ont été développés comme supports de chromatographie pour une séparation par taille. Ils présentent l'avantage d'être très homogènes avec une taille de pore bien identifiée, ce qui permet d'utiliser un matériau dont la taille et la géométrie sont connues et homogènes pour notre étude, sachant que ces paramètres influencent l'adsorption des protéines.

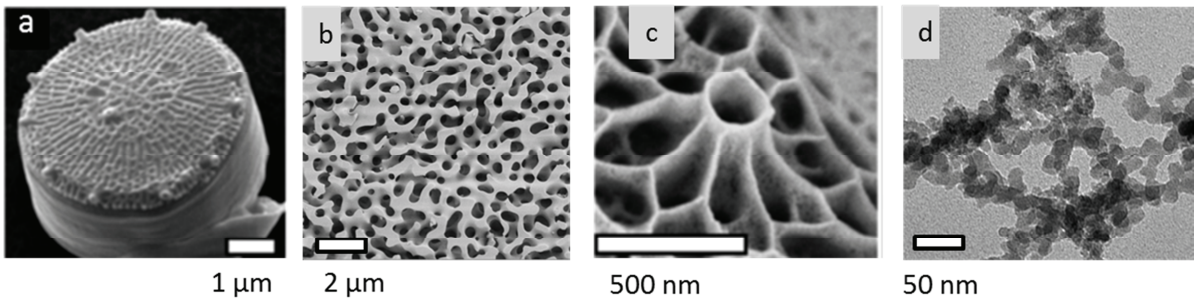


Figure 1-8. *Exemple de silice amorphe micro et nanostructurées, biogénique et synthétique. Frustules de diatomées : (a) frustule de Thalassiosira pseudonana,(c) détail de la frustule de Thalassiosira weissflogii, d'après (142). Silice synthétique : (b) verre de silice poreux (CPG), (d) nanoparticules de silice (Sigma)*

Les nanoparticules de silice que nous avons étudiées sont représentatives des nanoparticules produites industriellement. Notre choix s'est porté vers des nanoparticules produites à grande échelle et disponibles en grandes quantités plutôt que vers une synthèse en laboratoire, qui fournirait en petite quantité un produit peu comparable à ceux utilisés par l'industrie. La caractérisation des nanoparticules et des verres de silice est présentée dans le chapitre 3.

Protéines modèles pour l'étude de l'adsorption

Les protéines modèles que nous avons choisies d'étudier sont la myoglobine, l'hémoglobine et la sérum albumine. Ces protéines peuvent être disponibles en grandes quantités et leurs caractéristiques biochimiques et structurales sont bien connues. De plus, elles sont différentes selon les deux critères définis par Norde pour l'adsorption des protéines sur les surfaces hydrophiles : point isoélectrique et stabilité structurale. La myoglobine et l'hémoglobine présentent respectivement une structure monomérique et tétramérique, un facteur qui n'a, à notre connaissance, jamais été pris en compte dans l'étude de l'adsorption des protéines. L'intérêt des hémoprotéines est aussi d'avoir un atome de fer, ce qui fournit une sonde supplémentaire et facilement accessible de leur site actif par spectroscopie. L'hémoglobine et la sérum albumine peuvent par ailleurs se trouver en contact avec des nanoparticules de silice, soit après exposition et passage dans le sang, soit sur des dispositifs et capteurs qui utilisent le sang.

La myoglobine de cœur de cheval et la sérum albumine bovine sont achetées sous forme lyophilisée chez Sigma. L'hémoglobine de porc est purifiée à partir du sang de porc (voir chap. 2). Pour compléter notre panel de protéines modèles, l'apomyoglobine a été préparée à partir de la myoglobine pour étudier l'adsorption d'une protéine structuralement identique mais beaucoup moins stable (*147*). L'adsorption des protéines modèles est étudiée sur les différents types de silice

nanostructurée en fonction des caractéristiques des protéines, des matériaux et des conditions du milieu (voir chap. 4).

Pour étudier l'adsorption des protéines à partir d'un milieu complexe, nous avons cherché à identifier à partir d'un extrait cellulaire de levure les protéines adsorbées et non adsorbées sur les nanoparticules de silice. L'extrait cellulaire de levure a été utilisé car les outils d'analyse et d'identification des protéines de levure par électrophorèse bidimensionnelle sont bien connus (voir chap. 4).

5. Approche expérimentale

Nous avons tout d'abord caractérisé de la façon la plus complète possible les nanomatériaux étudiés. Les critères de caractérisation et les études réalisées sont présentés dans le chapitre 3.

Les techniques d'étude des protéines adsorbées, sur des surfaces planes ou sur des nanomatériaux, sont nombreuses. Au cours de cette thèse, nous avons cherché à comprendre quels étaient les mécanismes d'adsorption des protéines, en analysant l'adsorption de protéines modèles aux caractéristiques différentes sur la silice nanostructurée. Puis nous avons réalisé une étude systématique de l'adsorption à partir d'un milieu complexe en identifiant les protéines de levure adsorbées et non adsorbées sur les NP de silice à partir d'un extrait cellulaire, afin de déterminer les critères d'adsorption des protéines sur la silice. La structure, la dynamique et l'activité des protéines adsorbées a ensuite été étudiée plus finement pour deux protéines modèles, la myoglobine et l'hémoglobine adsorbées sur les nanoparticules de silice, à l'aide de techniques classiques, mais aussi en développant des techniques de biophysique et de protéomique jusqu'ici peu ou pas utilisées pour l'étude des protéines adsorbées.

Les techniques classiques d'étude appliquées aux protéines adsorbées sont :

- La mesure des isothermes d'adsorption dans différentes conditions
- L'étude de la désorption
- L'étude de la stabilité en température des protéines adsorbées par microcalorimétrie DSC
- L'étude de la structure des protéines adsorbées par spectroscopie UV-visible, spectroscopie infrarouge, spectroscopie de fluorescence et dichroïsme circulaire

Ces analyses présentent l'avantage de fournir des données solides sur l'adsorption des protéines sur la silice nanostructurée et d'être facilement comparable aux données de la littérature pour d'autres systèmes. Cependant, certaines méthodes doivent être adaptées à des solutions

colloïdales qui diffusent la lumière. Dans la littérature, certaines techniques comme la spectroscopie UV-visible et la calorimétrie n'ont été que peu utilisées pour caractériser les protéines adsorbées en raison de la difficulté à maîtriser les phénomènes propres à ce type d'échantillon, comme la diffusion de la lumière ou l'hétérogénéité des échantillons.

L'étude de l'activité des protéines adsorbées est basée sur la mesure de l'oxygénation de l'hémoglobine par tonométrie, qui n'avait à notre connaissance jamais été appliquée à l'hémoglobine adsorbée sur les NP. L'hémoglobine était particulièrement intéressante pour cette étude car la fixation d'un gaz, à la différence d'une réaction enzymatique, ne nécessite ni substrat ni cofacteurs, qui peuvent interagir, tout comme la protéine, avec les nanoparticules en suspension et créer des « interférences » lors de la mesure (*99, 100*). De plus, un contrôle a systématiquement été réalisé, que ce soit pour les mesures de structure ou d'activité, dans des conditions où les protéines ne sont pas adsorbées sur les nanomatériaux pour s'assurer que les NP n'altéraient pas les mesures (voir chap. 2).

Des techniques qui n'avaient jusqu'à présent pas ou peu été appliquées aux protéines adsorbées ont également été développées au cours de la thèse. Il s'agit de :

- La mesure de l'énergie d'adsorption par microcalorimétrie ITC
- La cartographie de surface par irradiation des zones d'interaction entre protéine et silice
- L'identification des protéines adsorbées et non adsorbées à partir d'un extrait cellulaire par électrophorèse bidimensionnelle
- L'analyse statistiques des caractéristiques des protéines adsorbées et non adsorbées
- L'étude par spectroscopie d'absorption X des hémoprotéines adsorbées
- L'étude par diffusion incohérente élastique et inélastique de neutrons de la dynamique de la protéine adsorbée

La caractérisation des nanomatériaux est présentée dans le chapitre 3. L'étude des mécanismes d'adsorption de protéines modèles purifiées, mais aussi de protéines d'un extrait cellulaire de levure, sur la silice nanostructurée, est détaillée dans le chapitre 4. La structure, la dynamique et l'activité de la myoglobine et de l'hémoglobine adsorbées sur les nanoparticules de silice est ensuite détaillée dans les chapitres 5, 6 et 7. Une vision intégrée de l'adsorption des protéines ainsi que les liens entre résultats sont discutés dans chaque chapitre. Nous terminerons par une conclusion et des perspectives.

Bibliographie

1. Nelson J. M., Griffin E. G. (1916) Adsorption of invertase, *J. Am. Chem. Soc. 38*, 1109-1115.
2. Willstatter R., Schneider K. (1924) *Z. physiol. Chem.133*, 193.
3. Hitchcock D. I. (1925) Proteins films on collodion membranes, *The Journal of general physiology 8*, 61-74.
4. Langmuir I. (1918) The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum, *Journal of the American Chemical Society 40*, 1361-1403.
5. Kiss I. (1958) Invertase activity in clay mineral - soil mixtures, *Nature 182*, 203-204.
6. McLaren A. D. (1954) The adsorption and reactions of enzymes and proteins on kaolinite, *Journal of Physical Chemistry 58*, 129-137.
7. McLaren A. D., Estermann E. F. (1957) Influence of pH on the activity of chymotrypsin at a solid-liquid interface, *Archives of Biochemistry and Biophysics 68*, 157-160.
8. McLaren A. D., Peterson G. H. (1961) Montmorillonite as a caliper for size of protein molecules, *Nature 192*, 960-961.
9. Shepard C. C., Tiselius A. (1949) The chromatography of proteins - The effect of salt concentration and pH on the adsorption of proteins to silica gel, *Discussions of the Faraday Society*, 275-285.
10. Zittle C. A. (1953) Adsorption studies of enzymes and other proteins, *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry 14*, 319-374.
11. Bleuart S. (2005) Proteins from complex media and purified proteins obtained thereby, France.
12. Bull H. B. (1956) Adsorption of bovine serum albumin on glass, *Biochimica et Biophysica Acta 19*, 464-471.
13. Bixler R. L., Niemann C. (1959) Surface effects in α-chymotrypsin-catalyzed hydrolyses, *Journal of the American Chemical Society 81*, 1412-1417.
14. Sweryda-Krawiec B., Devaraj H., Jacob G., Hickman J. J. (2004) A new interpretation of serum albumin surface passivation, *Langmuir 20*, 2054-2056.
15. Convert L., Chabot V., Zermatten P.-J., Hamel R., Cloarec J.-P., Lecomte R., Aimez V., Charette P. G. (2012) Passivation of KMPR microfluidic channels with bovine serum albumin (BSA) for improved hemocompatibility characterized with metal-clad waveguides, *Sensors and Actuators B: Chemical 173*, 447-454.
16. Mulvihill J. N., Faradji A., Oberling F., Cazenave J.-P. (1990) Surface passivation by human albumin of plasmaperesis circuits reduces platelet accumulation and thrombus formation. Experimental and clinical studies, *Journal of Biomedical Materials Research 24*, 155-163.
17. James L. K., Augenste L. G. (1966) Adsorption of enzymes at interfaces - Film formation and effect on activity, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology 28*, 1-40.
18. Andrade J. D., Hlady V. (1986) Protein adsorption and materials biocompatibility - a tutoralial review and suggested hypotheses, *Advances in Polymer Science 79*, 1-63.
19. Burstein C. (2000) *Biotechnologie enzymatique*.
20. Semple S. C., Chonn A., Cullis P. R. (1998) Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour in vivo, *Advanced Drug Delivery Reviews 32*, 3-17.
21. Vroman L. (1964) Effects of hydrophobic surfaces upon blood coagulation, *Thrombosis Et Diathesis Haemorrhagica 10*, 455-493.
22. Vroman L. (2009) When blood is touched, *Materials 2*, 1547-1557.
23. Hakim R. M. (1993) Clinical implications of hemodialysis membrane biocompatibility, *Kidney International 44*, 484-494.
24. Chenoweth D. E. (1984) Complement activation during hemodiolysis - Clinical observations, proposed mechanisms and theoretical implications, *Artificial Organs 8*, 281-287.
25. Chanard J., Lavaud S., Randoux C., Rieu P. (2003) New insights in dialysis membrane biocompatibility: relevance of adsorption properties and heparin binding, *Nephrology Dialysis Transplantation 18*, 252-257.
26. Hindie M., Degat M.-C., Gaudiere F., Gallet O., Van Tassel P. R., Pauthe E. (2011) Pre-osteoblasts on poly(L-lactic acid) and silicon oxide: Influence of fibronectin and albumin adsorption, *Acta Biomaterialia 7*, 387-394.
27. Kasemo B. (2002) Biological surface science, *Surface Science500*, 656-677.
28. Aslan S., Deneufchatel M., Hashmi S., Li N., Pfefferle L. D., Elimelech M., Pauthe E., Van Tassel P. R. (2012) Carbon nanotube-based antimicrobial biomaterials formed via layer-by-layer assembly with polypeptides, *Journal of Colloid and Interface Science 388*, 268-273.

29. Huang N.-P., Michel R., Voros J., Textor M., Hofer R., Rossi A., Elbert D. L., Hubbell J. A., Spencer N. D. (2000) Poly(l-lysine)-g-poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces: Surface-Analytical Characterization and Resistance to Serum and Fibrinogen Adsorption, *Langmuir 17*, 489-498.
30. Zhang M., Li X. H., Gong Y. D., Zhao N. M., Zhang X. F. (2002) Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG, *Biomaterials 23*, 2641-2648.
31. Larsson R., Selén G., Björklund H., Fagerholm P. (1989) Intraocular PMMA lenses modified with surface-immobilized heparin: evaluation of biocompatibility in vitro and in vivo, *Biomaterials 10*, 511-516.
32. Czeslik C. (2004) Factors ruling protein adsorption, *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-International Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics 218*, 771-801.
33. Pinholt C., Hartvig R. A., Medlicott N. J., Jorgensen L. (2011) The importance of interfaces in protein drug delivery - why is protein adsorption of interest in pharmaceutical formulations?, *Expert Opinion on Drug Delivery 8*, 949-964.
34. Soppimath K. S., Aminabhavi T. M., Kulkarni A. R., Rudzinski W. E. (2001) Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *Journal of Controlled Release 70*, 1-20.
35. Couvreur P., Kante B., Roland M., Speiser P. (1979) Adsorption of antineoplastic drugs to polyalkylcyanoacrylate nanoparticles and their release in calf serum, *Journal of Pharmaceutical Sciences 68*, 1521-1524.
36. Ferrari M. (2005) Cancer nanotechnology: opportunities and challenges, *Nat Rev Cancer 5*, 161-171.
37. Slowing I. I., Trewyn B. G., Giri S., Lin V. S. Y. (2007) Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications, *Advanced Functional Materials 17*, 1225-1236.
38. Tzannis S. T., Hrushesky W. J. M., Wood P. A., Przybycien T. M. (1997) Adsorption of a formulated protein on a drug delivery device surface, *Journal of Colloid and Interface Science 189*, 216-228.
39. Oja C. D., Semple S. C., Chonn A., Cullis P. R. (1996) Influence of dose on liposome clearance: critical role of blood proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1281*, 31-37.
40. Chonn A., Semple S. C., Cullis P. R. (1995) β2-glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes in vivo, suggesting a significant role in the immune clearance of "non-self" particles, *Journal of Biological Chemistry 270*, 25845-25849.
41. Gupta R. K. (1998) Aluminum compounds as vaccine adjuvants, *Advanced Drug Delivery Reviews 32*, 155-172.
42. Zhu D., Huang S., Gebregeorgis E., McClellan H., Dai W., Miller L., Saul A. (2009) Development of a direct alhydrogel formulation immunoassay (DAFIA), *Journal of Immunological Methods 344*, 73-78.
43. Clausi A. L., Merkley S. A., Carpenter J. F., Randolph T. W. (2007) Inhibition of aggregation of aluminum hydroxide adjuvant during freezing and drying, *Journal of Pharmaceutical Sciences 97*.
44. Clapp T., Siebert P., Chen D., Braun L. J. (2011) Vaccines with aluminum-containing adjuvants: optimizing vaccine efficacy and thermal stability, *Journal of Pharmaceutical Sciences 100*, 388-401.
45. Regnier M., Metz B., Tilstra W., Hendriksen C., Jiskoot W., Norde W., Kersten G. (2012) Structural perturbation of diphtheria toxoid upon adsorption to aluminium hydroxide adjuvant, *Vaccine 30*, 6783-6788.
46. Jones L. S., Peek L. J., Power J., Markham A., Yazzie B., Middaugh C. R. (2005) Effects of adsorption to aluminum salt adjuvants on the structure and stability of model protein antigens, *Journal of Biological Chemistry 280*, 13406-13414.
47. Lindblad E. B. (2004) Aluminium compounds for use in vaccines, *Immunol Cell Biol 82*, 497-505.
48. Huang J., Zhong X., Wang L., Yang L., Mao H. (2012) Improving the Magnetic Resonance Imaging contrast and detection methods with engineered magnetic nanoparticles, *Theranostics 2*, 86-102.
49. Xie J., Chen K., Huang J., Lee S., Wang J., Gao J., Li X., Chen X. (2010) PET/NIRF/MRI triple functional iron oxide nanoparticles, *Biomaterials 31*, 3016-3022.
50. Pankhurst Q. A., Connolly J., Jones S. K., Dobson J. (2003) Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *Journal of Physics D-Applied Physics 36*, R167-R181.
51. Klibanov A. M. (1983) Immobilized enzymes and cells as practical catalysts, *Science 219*, 722-727.
52. Zoungrana T., Findenegg G. H., Norde W. (1997) Structure, stability, and activity of adsorbed enzymes, *Journal of Colloid and Interface Science 190*, 437-448.
53. Iwakura M., Nakamura D., Takenawa T., Mitsuishi Y. (2001) An approach for protein to be completely reversible to thermal denaturation even at autoclave temperatures, *Protein Engineering 14*, 583-589.
54. Yakovleva J., Davidsson R., Lobanova A., Bengtsson M., Eremin S., Laurell T., Emnéus J. (2002) Microfluidic enzyme immunoassay using silicon microchip with immobilized antibodies and chemiluminescence detection, *Analytical Chemistry 74*, 2994-3004.

55. Jinn-Nan L., I-Nan C., Andrade J. D., Herron J. N., A. Christensen D. (1991) Comparison of site-specific coupling chemistry for antibody immobilization on different solid supports, *Journal of Chromatography A 542*, 41-54.
56. Hiddink J., Lalande M., Maas A. J. R., Streuper A. (1986) Heat treatment of whipping cream. 1. Fouling of the pasteurization equipment, *Milchwissenschaft-Milk Science International 41*, 542-546.
57. Robertson B. C., Zydney A. L. (1990) Protein adsorption in asymmetric ultrafiltration membranes with highly constricted pores, *Journal of Colloid and Interface Science 134*, 563-575.
58. Kim J., Grate J. W., Wang P. (2006) Nanostructures for enzyme stabilization, *Chem. Eng. Sci. 61*, 1017-1026.
59. Ge J., Lu D., Liu Z., Liu Z. (2009) Recent advances in nanostructured biocatalysts, *Biochemical Engineering Journal 44*, 53-59.
60. Gupta M. N., Kaloti M., Kapoor M., Solanki K. (2011) Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization, *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol. 39*, 98-109.
61. Iler R. K., Dalton R. L. (1956) Degree of hydration of particles of colloidal silica in aqueous solution, *Journal of Physical Chemistry 60*, 955-957.
62. Iler R. K. (1979) *The Chemistry of Silica*, John Wiley & Sons, New York.
63. Stober W. (1967) Formation of silicic acid in aqueous suspensions of different silica modifications, *Advances in Chemistry Series*, 161-182.
64. Vroman L., Adams A. L. (1969) Findings with recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces, *Surface Science 16*, 438.
65. Oberdoerster G., Ferin J., Finkelstein J., Wade P., Corson N. (1990) Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles?, *J. Aerosol Science 21*, 381-387.
66. Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. (2005) Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, *Environ. Health Perspect. 113*, 823-839.
67. Warheit D. B., Sayes C. M., Reed K. L., Swain K. A. (2008) Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks, *Pharmacol. Ther. 120*, 35-42.
68. Napierska D., Thomassen L. C. J., Lison D., Martens J. A., Hoet P. H. (2010) The nanosilica hazard: another variable entity, *Part. Fibre Toxicol. 7*.
69. Wijnhoven S. W. P., Peijnenburg W. J. G. M., Herberts C. A., Hagens W. I., Oomen A. G., Heugens E. H. W., Roszek B., Bisschops J., Gosens I., Van de Meent D., Dekkers S., De Jong W. H., Van Zijverden M., Sips A. J. A. M., Geertsma R. E. (2009) Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment, *Nanotoxicology 3*, 109-U178.
70. Woodrow Institute. www.nanotechproject.org.
71. Iden R. (2010) BASF: With future technology to sustainable success.
72. AFSSET. (2008) Evaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement.
73. Dekkers S., Krystek P., Peters R. J. B., Lankveld D. P. K., Bokkers B. G. H., van Hoeven-Arentzen P. H., Bouwmeester H., Oomen A. G. (2011) Presence and risks of nanosilica in food products, *Nanotoxicology 5*, 393-405.
74. Geai J. P. (2010) Nanoparticules: entre grande peur et immenses espoirs, *UFC Que Choisir 480*, 3.
75. Sarkar D. (2011) Des nanoparticules altèrent la barrière protégeant le cerveau, *Le monde.fr*.
76. CNDP. (2010) Compte-rendu du débat public sur le développement et la régulation des nanotechnologies.
77. Commission-Européenne. http://ec.europa.eu/nanotechnology/index_en.html.
78. Hara K., Aoki K., Usui Y., Shimizu M., Narita N., Ogihara N., Nakamura K., Ishigaki N., Sano K., Haniu H., Kato H., Nishimura N., Kim Y. A., Taruta S., Saito N. (2011) Evaluation of CNT toxicity by comparison to tattoo ink, *Materials Today 14*, 434-440.
79. Warheit D. B., Webb T. R., Colvin V. L., Reed K. L., Sayes C. R. (2007) Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics, *Toxicol. Sci. 95*, 270-280.
80. Rousset M., Pujalté I., Morille M., Apolit C., L'Azou B., Passagne I. (2011) Assessment of uptake and toxicity of silica (SiO2) nanoparticles, *Toxicology Letters 205, Supplement*, S170.
81. Baulig A., Sourdeval M., Meyer M., Marano F., Baeza-Squiban A. (2003) Biological effects of atmospheric particles on human bronchial epithelial cells. Comparison with diesel exhaust particles, *Toxicology in Vitro 17*, 567-573.

82. Cox L. A. (2006) Quantifying potential health impacts of cadmium in cigarettes on smoker risk of lung cancer: a portfolio-of-mechanisms approach, *Risk Analysis 26*, 1581-1599.
83. Crater J. S., Carrier R. L. (2010) Barrier properties of gastrointestinal mucus to nanoparticle transport, *Macromolecular Bioscience 10*, 1473-1483.
84. Boutou-Kempf O., Marchand J.-L., Radauceanu A., Witschger O., Imbernon E., Hlth Risks N. (2011) Development of a French Epidemiological Surveillance System of Workers Producing or Handling Engineered Nanomaterials in the Workplace, *Journal of Occupational and Environmental Medicine 53*, S103-S107.
85. Cedervall T., Lynch I., Lindman S., Berggard T., Thulin E., Nilsson H., Dawson K. A., Linse S. (2007) Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104*, 2050-2055.
86. Monopoli M. P., Walczyk D., Campbell A., Elia G., Lynch I., Bombelli F. B., Dawson K. A. (2011) Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society 133*, 2525-2534.
87. Walczyk D., Bombelli F. B., Monopoli M. P., Lynch I., Dawson K. A. (2010) What the cell "sees" in bionanoscience, *Journal of the American Chemical Society 132*, 5761-5768.
88. Lynch I., Dawson K. A. (2008) Protein-nanoparticle interactions, *Nano Today 3*, 40-47.
89. Sund J., Alenius H., Vippola M., Savolainen K., Puustinen A. (2011) Proteomic characterization of engineered nanomaterial-protein interactions in relation to surface reactivity, *Acs Nano 5*, 4300-4309.
90. Dutta D., Sundaram S. K., Teeguarden J. G., Riley B. J., Fifield L. S., Jacobs J. M., Addleman S. R., Kaysen G. A., Moudgil B. M., Weber T. J. (2007) Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials, *Toxicol. Sci. 100*, 303-315.
91. Lesniak A., Fenaroli F., Monopoli M. R., Aberg C., Dawson K. A., Salvati A. (2012) Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells, *Acs Nano 6*, 5845-5857.
92. Tedja R., Lim M., Amal R., Marquis C. (2012) Effects of serum adsorption on cellular uptake profile and consequent impact of titanium dioxide nanoparticles on human lung cell Lines, *Acs Nano*.
93. Nel A. E., Madler L., Velegol D., Xia T., Hoek E. M. V., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M. (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface, *Nat Mater8*, 543-557.
94. Haase A., Arlinghaus H. F., Tentschert J., Jungnickel H., Graf P., Mantion A., Draude F., Galla S., Plendl J., Goetz M. E., Masic A., Meier W., Thunemann A. F., Taubert A., Luch A. (2011) Application of laser postionization secondary neutral mass spectrometry/time-of-flight secondary ion mass spectrometry in nanotoxicology: visualization of nanosilver in human macrophages and cellular responses, *Acs Nano 5*, 3059-3068.
95. Walkey C. D., Olsen J. B., Guo H., Emili A., Chan W. C. W. (2012) Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake, *Journal of the American Chemical Society 134*, 2139-2147.
96. Hussain S., Al-Nsour F., Rice A. B., Marshburn J., Yingling B., Ji Z., Zink J. I., Walker N. J., Garantziotis S. (2012) Cerium dioxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human peripheral blood monocytes, *Acs Nano 6*, 5820-5829.
97. Marano F., Hussain S., Rodrigues-Lima F., Baeza-Squiban A., Boland S. (2011) Nanoparticles: molecular targets and cell signalling, *Archives of Toxicology85*, 733-741.
98. Hussain S., Boland S., Baeza-Squiban A., Hamel R., Thomassen L. C. J., Martens J. A., Billon-Galland M. A., Fleury-Feith J., Moisan F., Pairon J.-C., Marano F. (2009) Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount, *Toxicology 260*, 142-149.
99. Schrurs F., Lison D. (2012) Focusing the research effort, *Nature Nanotechnology7*, 546-548.
100. Guadagnini R., Halamoda Kenzaoui B., Cartwright L., Pojana G., Magdolenova Z., Bilanicova D., Saunders M., Juillerat L., Marcomini A., Huk A., Dusinska M., Fjellsbo L. M., Marano F., Boland S. (2013) Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests, *Nanotoxicology, In press*.
101. Linse S., Cabaleiro-Lago C., Xue W.-F., Lynch I., Lindman S., Thulin E., Radford S. E., Dawson K. A. (2007) Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104*, 8691-8696.

102. Chen M., von Mikecz A. (2005) Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO2 nanoparticles, *Experimental Cell Research 305*, 51-62.
103. Shi J., Karlsson H. L., Johansson K., Gogvadze V., Xiao L., Li J., Burks T., Garcia-Bennett A., Uheida A., Muhammed M., Mathur S., Morgenstern R., Kagan V. E., Fadeel B. (2012) Microsomal glutathione transferase 1 protects against toxicity induced by silica nanoparticles but not by zinc oxide nanoparticles, *Acs Nano*.
104. Matsui T., Tanaka S., Akaike T., Sakurai Y., Nitadori Y., Kataoka K., Tsuruta T. (1978) Study of plasma proteins adsorbed on polymer surfaces by Fourier transform infrared spectrometry, *Journal of Bioengineering 2*, 539-541.
105. Hlady V., Reinecke D. R., Andrade J. D. (1986) Fluorescence of adsorbed protein layers: I. Quantitation of total internal reflection fluorescence, *Journal of Colloid and Interface Science 111*, 555-569.
106. McMillin C. R., Walton A. G. (1974) Circular dichroism technique for study of adsorbed protein structure, *Journal of Colloid and Interface Science 48*, 345-349.
107. Norde W., Favier J. P. (1992) Structure of adsorbed and desorbed proteins, *Colloids and Surfaces 64*, 87-93.
108. Kondo A., Oku S., Higashitani K. (1991) Structural changes in protein molecules adsorbed on ultrafine silica particles, *Journal of Colloid and Interface Science 143*, 214-221.
109. Lundqvist M., Sethson I., Jonsson B. H. (2004) Protein adsorption onto silica nanoparticles: Conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability, *Langmuir 20*, 10639-10647.
110. Cukalevski R., Lundqvist M., Oslakovic C., Dahlback B., Linse S., Cedervall T. (2011) Structural changes in apolipoproteins bound to nanoparticles, *Langmuir 27*, 14360-14369.
111. Lundqvist M., Nygren P., Jonsson B. H., Broo K. (2006) Induction of structure and function in a designed peptide upon adsorption on a silica nanoparticle, *Angew. Chem.-Int. Edit. 45*, 8169-8173.
112. Steadman B. L., Thompson K. C., Middaugh C. R., Matsuno K., Vrona S., Lawson E. Q., Lewis R. V. (1992) The effects of surface adsorption on the thermal stability of proteins, *Biotechnol. Bioeng. 40*, 8-15.
113. Larsericsdotter H., Oscarsson S., Buijs J. (2001) Thermodynamic analysis of proteins adsorbed on silica particles: Electrostatic effects, *Journal of Colloid and Interface Science 237*, 98-103.
114. Vertegel A. A., Siegel R. W., Dordick J. S. (2004) Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme, *Langmuir 20*, 6800-6807.
115. Fischer N. O., McIntosh C. M., Simard J. M., Rotello V. M. (2002) Inhibition of chymotrypsin through surface binding using nanoparticle-based receptors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99*, 5018-5023.
116. Pandey P., Singh S. P., Arya S. K., Gupta V., Datta M., Singh S., Malhotra B. D. (2007) Application of thiolated gold nanoparticles for the enhancement of glucose oxidase activity, *Langmuir 23*, 3333-3337.
117. Sanfins E., Dairou J., Hussain S., Busi F., Chaffotte A. F., Rodrigues-Lima F., Dupret J.-M. (2011) Carbon black nanoparticles impair acetylation of aromatic amine carcinogens through inactivation of arylamine N-acetyltransferase enzymes, *Acs Nano 5*, 4504-4511.
118. Nagadome H., Kawano K., Terada Y. (1993) Identification of the adsorbing site of lysozyme onto the hydroxyapatite surface using hydrogen-exchange and H1-NMR, *Febs Letters 317*, 128-130.
119. Engel M. F. M., Visser A. J. W. G., van Mierlo C. P. M. (2004) Conformation and orientation of a protein folding intermediate trapped by adsorption, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101*, 11316-11321.
120. Norde W. (2008) My voyage of discovery to proteins in flatland ... and beyond, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 61*, 1-9.
121. Drobny G. P., Long J. R., Shaw W. J., Cotten M., Stayton P. S. (2007) Structure and dynamics of proteins adsorbed to biomaterial Interfaces, In *eMagRes*, John Wiley & Sons, Ltd.
122. Czeslik C., Royer C., Hazlett T., Mantulin W. (2003) Reorientational dynamics of enzymes adsorbed on quartz: A temperature-dependent time-resolved TIRF anisotropy study, *Biophysical Journal 84*, 2533-2541.
123. Koral J., Ullman R., Eirich F. R. (1958) The adsorption of polyvinyl acetate, *The Journal of Physical Chemistry 62*, 541-550.
124. Frantz P., Granick S. (1991) Kinetics of polymer adsorption and desorption, *Physical Review Letters 66*, 899-902.
125. Hugel T., Grosholz M., Clausen-Schaumann H., Pfau A., Gaub H., Seitz M. (2001) Elasticity of single polyelectrolyte chains and their desorption from solid supports studied by AFM based single molecule force spectroscopy, *Macromolecules 34*, 1039-1047.

126. Norde W., Lyklema J. (1978) Adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surfaces. 1. Adsorption isotherms. Effects of charge, ionic strength and temperature, *Journal of Colloid and Interface Science 66*, 257-265.
127. Douglas J. F., Schneider H. M., Frantz P., Lipman R., Granick S. (1997) The origin and characterization of conformational heterogeneity in adsorbed polymer layers, *Journal of Physics-Condensed Matter 9*, 7699-7718.
128. Soderquist M. E., Walton A. G. (1980) Structural changes in proteins adsorbed on polymer surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science 75*, 386-397.
129. van der Veen M., Stuart M. C., Norde W. (2007) Spreading of proteins and its effect on adsorption and desorption kinetics, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 54*, 136-142.
130. Norde W., Lyklema J. (1979) Thermodynamics of protein adsorption - Theory with special reference to the adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at polystyrene surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science 71*, 350-366.
131. Haynes C. A., Sliwinsky E., Norde W. (1994) Structural and electrostatic properties of globular proteins at a polystyrene water interface, *Journal of Colloid and Interface Science 164*, 394-409.
132. Lyklema J., Norde W. (1996) Interfacial behaviour of biomacromolecules, (Jacobasch, H., Ed.), pp 9-17, Springer Berlin / Heidelberg.
133. Shi L., Caldwell K. D. (2000) Mucin adsorption to hydrophobic surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science 224*, 372-381.
134. McColl J., Yakubov G. E., Ramsden J. J. (2007) Complex desorption of mucin from silica, *Langmuir 23*, 7096-7100.
135. Nakanishi K., Sakiyama T., Imamura K. (2001) On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon, *Journal of Bioscience and Bioengineering 91*, 233-244.
136. Rabe M., Verdes D., Seeger S. (2011) Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces, *Advances in Colloid and Interface Science 162*, 87-106.
137. Goobes G., Goobes R., Shaw W. J., Gibson J. M., Long J. R., Raghunathan V., Schueler-Furman O., Popham J. M., Baker D., Campbell C. T., Stayton P. S., Drobny G. P. (2007) The structure, dynamics, and energetics of protein adsorption - lessons learned from adsorption of statherin to hydroxyapatite, *Magn Reson Chem 45*.
138. Welsch N., Becker A. L., Dzubiella J., Ballauff M. (2012) Core-shell microgels as "smart" carriers for enzymes, *Soft Matter 8*, 1428-1436.
139. Beverung C. J., Radke C. J., Blanch H. W. (1999) Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements, *Biophys Chem 81*, 59-80.
140. Jung S. Y., Lim S. M., Albertorio F., Kim G., Gurau M. C., Yang R. D., Holden M. A., Cremer P. S. (2003) The Vroman effect: a molecular level description of fibrinogen displacement, *Journal of the American Chemical Society 125*, 12782-12786.
141. Aizawa T., Koganesawa N., Kamakura A., Masaki K., Matsuura A., Nagadome H., Terada Y., Kawano K., Nitta K. (1998) Adsorption of human lysozyme onto hydroxyapatite: identification of its adsorbing site using site-directed mutagenesis, *FEBS Letters 422*, 175-178.
142. Hildebrand M. (2008) Diatoms, biomineralization processes, and genomics, *Chemical Reviews 108*, 4855-4874.
143. Meseguer-Olmo L., Bernabeu-Esclapez A., Ros-Martinez E., Sanchez-Salcedo S., Padilla S., Martin A. I., Vallet-Regi M., Clavel-Sainz M., Lopez-Prats F., Meseguer-Ortiz C. L. (2008) In vitro behaviour of adult mesenchymal stem cells seeded on a bioactive glass ceramic in the SiO2-CaO-P2O5 system, *Acta Biomaterialia 4*, 1104-1113.
144. Petzelbauer I., Kuhn B., Splechtna B., Kulbe K. D., Nidetzky B. (2002) Development of an ultrahigh-temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose. IV. Immobilization of two thermostable beta-glycosidases and optimization of a packed-bed reactor for lactose conversion, *Biotechnol Bioeng 77*, 619-631.
145. Limbut W., Thavarungkul P., Kanatharana P., Asawatreratanakul P., Limsakul C., Wongkittisuksa B. (2004) Comparative study of controlled pore glass, silica gel and poraver for the immobilization of urease to determine urea in a flow injection conductimetric biosensor system, *Biosens Bioelectron 19*, 813-821.
146. Haller W. (1965) Chromatography on Glass of Controlled Pore Size, *Nature 206*, 693-696.
147. Colonna G., Balestrieri C., Bismuto E., Servillo L., Irace G. (1982) Heme and cystein micro-environments of tuna apomyoglobin - Evidence of 2 independent unfolding regions, *Biochemistry 21*, 212-215.

CHAPITRE 2
Matériels & Méthodes

De nombreuses méthodes ont été utilisées, les méthodes et protocoles expérimentaux sont exposés brièvement pour les méthodes les plus courantes et détaillés pour les méthodes moins habituelles.

1. Tampons et produits chimiques

L'eau ultrapure MilliQ (MilliPore, 18 MΩ.cm, COT = 5 ppb) est utilisée pour la préparation des échantillons. Différents tampons – BisTris-HCl, Tris-HCl et Phosphate – ont été utilisés afin de couvrir une large gamme de pH allant de pH 6 à pH 9, le tampon Phosphate à pH 7,4 étant celui qui se rapproche les plus des conditions physiologiques. Les tampons BisTris-HCl à pH 6 et Tris-HCl à pH 9 ont été préparés en dissolvant dans de l'eau MilliQ les sels BisTris (Sigma B9754) et Tris (Sigma T6066) puis en ajustant le pH par ajout d'acide chlorhydrique concentré. Le tampon Phosphate est préparé en dissolvant les sels de phosphate monosodique NaH_2PO_4 (Fisher Scientific S3720) et disodique Na_2HPO_4 (Sigma 71649) dans de l'eau MilliQ en quantités appropriées pour obtenir le pH voulu. Le tampon isotonique utilisé pour les suspensions de globules rouges est composé de NaCl 140 mM et BisTris-HCl 50 mM à pH 7,4.

Eau lourde

L'eau lourde (Euriso-top D215) utilisée pour les mesures par spectroscopie infrarouge et par diffusion de neutrons est de pureté de 99,97%. Les échantillons sont préparés sous tente avec un flux permanent d'argon de qualité 6.0 (Messer).

Solutions de désorption

Plusieurs solutions ont été utilisées pour tester la désorption des protéines adsorbées : l'eau MilliQ, les solutions tampons, les solutions salines NaCl de cation monovalent et $CaCl_2$ de cation divalent de concentration 1 M et une solution de morpholine C_4H_9NO à une concentration de 50 mM. Les sels NaCl (Sigma S7653) et $CaCl_2$ (Merck 2384) sont dissous dans l'eau MilliQ. La morpholine (Sigma 252360) est diluée dans un tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4.

Effecteurs de l'hémoglobine

Le 2,3-diphosphoglycerate (DPG) (Sigma D5764) est dissous dans une solution tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6 et ajouté en excès dans un rapport de 10 équivalents DPG par tétramère

d'hémoglobine, ce qui représente 10 fois le rapport stœchiométrique (*1*). Le DPG étant sensible à l'hydrolyse, les solutions sont préparées juste avant la mesure. L'inositol hexaphosphate (IHP) (Sigma, phytate P0109) est préparé dans les mêmes conditions.

Ligands de la myoglobine

L'azoture de sodium NaN_3 (Sigma 71289) est dissous dans le tampon utilisé pour la mesure : BisTris-HCl 100 mM à pH 6, Phosphate 100 mM à pH 7,4 et Tris-HCl 100 mM à pH 8,7. Les solutions contenant de l'azoture en milieu acide sont préparées sous hotte pour prévenir tout dégagement du gaz HN_3 toxique. L'imidazole $C_3H_4N_2$ (Sigma I2399) est préparé dans les mêmes conditions.

2. Nanomatériaux

Les nanoparticules (NP) de silice de 7 nm (Sigma S5130) et 20 nm (Sigma 637238) sont pesées sous hotte sur une balance Mettler Toledo précise à 10^{-5} g couplée à un kit antistatique Haug-PRX U alimenté par une haute tension de 8 kV. Les NP sont mises en suspension dans chacun des tampons utilisés et les solutions sont agitées au vortex avant utilisation. Les silices nanoporeuses CPG 8 nm (Millipore CPG75C) et CPG 50 nm (Millipore CPG500C) sont pesées et mise en solution dans les mêmes conditions.

2.1 Microscopie électronique à transmission

Les images de microscopie électronique à transmission ont été réalisées sur deux microscopes : sur un microscope Jeol JEM-1400 (cathode LaB_6) équipé d'une caméra Orius SC1000 à une tension de 60 kV dans le cadre de la plateforme de microscopie électronique en transmission Imagif du CNRS (Centre de Recherche de Gif) ; sur un microscope Philips CM 30 STEM (cathode LaB_6) équipé d'un détecteur EDX à une tension de 300 kV au Laboratoire des Solides Irradiés (CEA-Ecole Polytechnique). Les images sont réalisées en champ clair.

Les NP sont mises en suspension dans l'eau ou dans l'éthanol (séchage plus rapide) à une concentration de 0,5 mg/mL et placées dans un bain à ultrasons pendant 10 min. Un volume de 3 µL est déposé sur une grille carbone-Cu 400 mesh. Après 5 min de séchage, la grille est introduite dans le microscope pour observation. La distribution de taille des NP est déterminée par analyse d'image à l'aide du logiciel ImageJ.

2.2 Isotherme de sorption d'azote (BET)

La surface spécifique des NP a été mesurée par isotherme de sorption d'azote à 77 K sur un appareil Micromeritics (ASAP 2010 Instrument) au Laboratoire de Mesure et de Modélisation de la Migration des Radionucléides (CEA Saclay). Pour s'assurer d'un séchage complet de la surface des NP avant mesure, un échantillon de 1g est séché sous vide à 90°C pendant 1h puis à 205°C pendant 2h. Une monocouche de molécules de gaz s'adsorbe à la surface de l'échantillon et la quantité d'azote nécessaire pour saturer la surface est mesurée. La surface spécifique est ensuite calculée selon la méthode BET (Brunauer-Emmet-Teller) de 0.06 à 0.2 P_0 (*2*). Les autres méthodes (BJF, DFT) ne sont pas adaptées à notre système car la forme des isothermes et l'absence d'hystérésis montrent que les NP de silice n'ont pas de porosité interne (voir chap. 3, §2.3).

2.3 Zétamétrie

La charge de surface d'une particule n'est pas une grandeur mesurable, mais elle peut être approchée par le potentiel zeta ζ généré par le déplacement de particules chargées dans un champ électrique (Fig. 2-1).

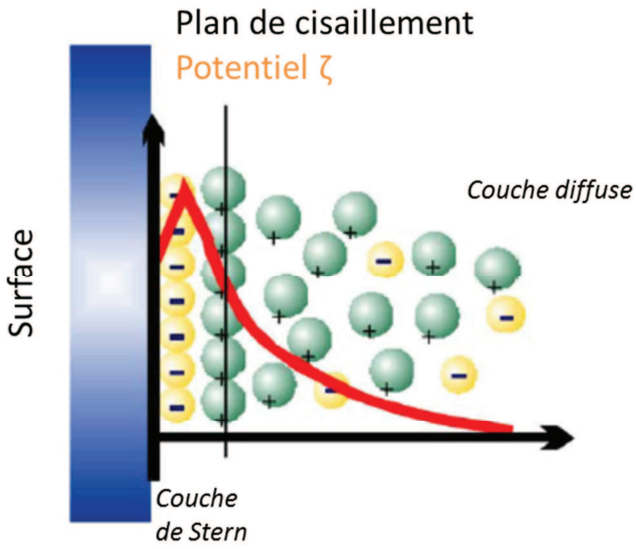


Figure 2-1. *Représentation de la formation du plan de cisaillement lorsqu'une particule chargée se déplace en solution, d'après (3). Le potentiel électrocinétique est représenté en rouge en fonction de la distance à la surface ; le potentiel ζ est défini sur le plan de cisaillement, à l'interface entre la couche de Stern et la couche diffusive.*

D'après le modèle de Stern, lorsqu'une particule chargée se déplace dans une solution ou qu'une solution est contrainte à l'écoulement entre deux surfaces chargées, une double couche de contre-ions, appelée couche de Stern, se forme sur la surface. La concentration en ions diminue ensuite avec l'éloignement à la surface et constitue la couche diffuse. La limite entre la couche de Stern et la

couche diffuse est appelée plan de cisaillement. C'est à ce niveau qu'est mesuré le potentiel ζ. Il dépend donc de la charge de la surface, du pH, des espèces en solution et de la force ionique qui influence l'épaisseur de la couche de Stern.

Concrètement, les NP en suspension sont soumises à un champ électrique ce qui génère leur mouvement. Leur vitesse $\vec{v}$ dépend du champ électrique $\vec{E}$ et de leur mobilité électrophorétique μ_e (eq. 1). La mobilité électrophorétique est mesurée par vélocimétrie laser, c'est-à-dire par le décalage en fréquence d'un laser généré par les particules en mouvement.

$$\vec{v} = \mu_e \cdot \vec{E} \quad \text{(eq. 1)}$$

La mobilité électrophorétique ($m^2.s^{-1}.V^{-1}$) est reliée au potentiel ζ (V) par l'équation de Henry pour des particules sphériques (eq. 2). La viscosité η de la solution apparaît car dès lors que la particule est en mouvement, une force de friction de sens opposée à la force électrique et dépendant de la viscosité du milieu s'applique.

$$\zeta = \frac{3}{2} \cdot \frac{\eta}{\varepsilon_0 \varepsilon f(\kappa a)} \mu_e \quad \text{(eq. 2)}$$

avec

- η la viscosité de la solution (Pa.s) (≈$8{,}9.10^{-4}$ Pa.s pour l'eau à 25°C)
- ε_0 la permittivité du vide (≈8,85.10-12 $C^2.N^{-1}.m^{-2}$)
- ε la constante diélectrique du milieu (≈80 pour l'eau à 25°C)
- f(κa) une fonction dépendant du rayon de la particule a et de l'épaisseur de la couche de Stern définie par κ qui est l'inverse de la distance de Debye-Hückel

Les deux formes limites de l'équation de Henry sont κa<<1 quand l'épaisseur de la couche diffuse est importante devant celle des particules, ce qui se traduit par f(κa) = 1, et κa>>1 lorsque l'épaisseur de la couche diffuse est négligeable devant la taille des particules, ce qui se traduit par f(κa)=3/2. Ces deux formes limites correspondent aux modèles de Hückel (κa<<1) (eq. 3) et de Smoluchowski (κa>>1) (eq. 4) (*4*). Nous avons utilisé le modèle de Smoluchowski qui s'applique aux solutions ayant une concentration moyenne en électrolytes (*5*).

$$\zeta = \frac{3}{2} \cdot \frac{\eta}{\varepsilon_0 \varepsilon} \mu_e \quad \text{(eq. 3)}$$

$$\zeta = \frac{\eta}{\varepsilon_0 \varepsilon} \mu_e \quad \text{(eq. 4)}$$

Les mesures ont été réalisées sur un Malvern Zeta Nanosizer sur les NP de silice 7 et 20 nm en suspension à une concentration de 0,1 mg/mL dans les tampons BisTris-HCl, Phosphate ou Tris-HCl 100 mM de pH 6 à pH 9. Le potentiel ζ est la moyenne de 5 mesures.

Sur le même appareil, une analyse par diffusion de la lumière des solutions de NP en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 a été réalisée, dans les mêmes conditions que pour la zétamétrie, pour vérifier qu'il n'y avait pas d'agrégats de taille supérieure à 100 nm dans nos solutions (voir chap. 3, §2.1).

2.4 Diffusion de neutrons aux petits angles

La diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) permet de mesurer la distribution de taille des NP à partir de l'interaction entre neutrons et noyaux. La variation d'intensité diffusée I est mesurée en fonction de l'angle de diffusion θ qui est relié au vecteur d'onde q (eq. 5), où λ est la longueur d'onde des neutrons :

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} sin \frac{\theta}{2} \qquad \text{(eq. 5)}$$

Les mesures ont été réalisées sur le spectromètre PAXY au Laboratoire Léon Brillouin (CEA-CNRS), sur le réacteur Orphée à Saclay. Les NP sont analysées dans une cuve en quartz Suprasil de 1 mm à température ambiante. Les mesures sont réalisées suivant deux configurations correspondant à une distance entre l'échantillon et le détecteur de 2m et 5m et une longueur d'onde de 6Å et de 9Å respectivement, ce qui permet de couvrir une large gamme de diffusion en vecteurs d'onde q tout en superposant une partie des mesures et en évitant les diffusions multiples.

Après normalisation, la mesure I(q) est modélisée par une distribution de particules en ajustant les paramètres de taille, de forme et d'interaction. Pour les NP 7 et 20 nm, le facteur de forme qui représente au mieux les données est celui d'une sphère. La fonction de distribution en taille est ensuite ajustée suivant un traitement classique des données (*6*).

Tout l'intérêt de la DNPA est de pouvoir reproduire ces mesures sur des NP en suspension pour évaluer leur état d'agrégation. Les mesures sont réalisées sur les NP en suspension dans D_2O à une concentration de 30 mg/mL. L'eau deutérée est utilisée pour réduire la diffusion incohérente du solvant, ce qui limite le bruit de fond.

2.5 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a été utilisée pour :

1) Caractériser la chimie de surface de la silice nanostructurée
2) Analyser la structure secondaire de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice (voir §5.1)

Les NP de silice et les CPG ont été préalablement hydratés par agitation dans l'eau MilliQ pendant 1h puis séchés à 150°C pendant une nuit pour permettre la déshydratation des échantillons (molécules d'eau adsorbées) sans destruction des groupements silanols formés lors de l'hydratation. Les échantillons sont préparés sous forme de pastille dans du bromure de potassium par compression à 10^9 Pa pendant 5 min puis analysés par transmission sur un spectromètre Bruker Vertex 70 à température ambiante et sous flux d'argon de qualité 6.0. La ligne de base est mesurée sur une pastille préparée sans silice. Pour chaque échantillon, 256 spectres mesurés de 900 à 4000 cm^{-1} avec une résolution de 0,5 cm^{-1} ont été moyennés. Le traitement des spectres est réalisé sur le logiciel Omnic.

3. Purification des protéines

Hémoglobine

Le sang de porc a été récupéré à la saignée à l'abattoir Harang à Houdan, avec l'autorisation de la Division Départementale de Protection des Populations. Il est immédiatement mélangé à une solution anticoagulante composée d'acide citrique à 4,8 g/L (Fluka 27487), de citrate de sodium à 13,2 g/L (Sigma S1804) et de dextrose à 14,7 g/L (Sigma D9434) dans un rapport de volume de 1 pour 5. Le sang est transporté à 4°C dans une glacière et purifié dès l'arrivée au laboratoire. L'hémoglobine de porc (*Sus scrofa domesticus*) est purifiée à partir du sang selon la méthode de purification standard de Perutz (*7*) (lavages par NaCl à 9 g/L et hémolyse dans l'eau MilliQ à 4°C). Les membranes des hématies sont précipitées par ajout dans un rapport de 1 pour 10 en volume de tampon Phosphate 2,8 M à pH 6,8. La solution est agitée doucement pendant 5 min puis centrifugée à 20 000 g pendant 30 min. Le surnageant limpide est dialysé quatre fois contre de l'eau MilliQ à 4°C à travers une membrane de dialyse SPectra/Por de seuil de rétention 50 kDa puis passée sur une résine AG 501-X8 (Bio-Rad) pour éliminer le 2,3-disphosphoglycerate (DPG) selon le protocole de Jelkmann (*8*) et centrifugé à 20 000 g pendant 10 min.

La solution d'hémoglobine est conservée à 4°C pendant une quinzaine de jours au maximum. Avant utilisation, elle est centrifugée à 20 000 g pendant 5 min. Pour s'assurer de l'intégrité de la protéine, notamment de l'absence d'oxydation en methémoglobine, un spectre UV-visible est enregistré sur le

spectrophotomètre Shimadzu UV-2450 (voir §4.1). Le rapport des absorbances à 576 et 541 nm est un bon indicateur de la dénaturation, oxydation ou de dommages de l'hémoglobine (*9, 10*).

Les hémoglobines humaines HbA et HbS ont été purifiées par l'équipe de Michael Marden au CHU du Kremlin-Bicêtre à partir de sang périmé. L'hémoglobine pontée Hb DCL a été gracieusement fournie par la société Baxter.

Comme pour la purification de l'hémoglobine de porc, la suspension de globules rouges est préparée par centrifugation à 1500 g pendant 5 min d'un échantillon de sang puis lavages dans du sérum physiologique et centrifugations successives à 4°C. Le culot globulaire est ensuite remis en suspension dans un tampon isotonique BisTris-HCl 50 mM, NaCl 140 mM à pH 7,4. L'hémolysat est préparé par ajout de 2 mL d'eau MilliQ à 4°C à 100 µL du culot globulaire, puis centrifugé à 20 000 g pendant 10 min pour l'élimination des membranes et repris dans le tampon d'étude (BisTris-HCl ou Phosphate).

Sérum albumine

La sérum albumine bovine (BSA) lyophilisée (Sigma A7030) est mise en solution et dialysée dans de l'eau MilliQ à 4°C quatre fois avec une membrane Spectra/Por de seuil de rétention 50 kDa puis centrifugée à 20 000 g pendant 10 min.

Metmyoglobine

La metmyoglobine de cœur de cheval lyophilisée (Sigma M1882) est préparée de la même façon que la sérum albumine et dialysée à travers une membrane Spectra/Por de seuil de rétention 12-14 kDa.

Apomyoglobine

L'apomyoglobine est purifiée à partir de la metmyoglobine de cœur de cheval selon la méthode de précipitation dans l'acétone acide (*11*). Le précipité est repris dans l'eau MilliQ à 4°C. A la fin de la purification, la concentration en apomyoglobine est mesurée par spectrophotométrie à 280 nm (ε=13 500 $M^{-1}.cm^{-1}$) et la concentration en hème (libre ou fixé) est mesurée à 409 nm (ε=180 000 $M^{-1}.cm^{-1}$) (*12*) (voir §4.1). Le rapport de concentration apomyoglobine/hème doit être inférieur à 5‰. Si ce n'est pas le cas, l'apomyoglobine est purifiée par une seconde précipitation dans l'acétone acide.

Pour s'assurer du bon repliement de l'apomyoglobine à la fin de la purification, le spectre de l'apomyoglobine est mesuré par dichroïsme circulaire (Fig. 2-2) (voir §5.2). Un spectre typique de l'apomyoglobine est obtenu : il est similaire à celui de la myoglobine, à l'exception d'une plus grande prédominance du pic à 210 nm comparé au pic à 222 nm et indique un bon repliement de la protéine après purification (*13*).

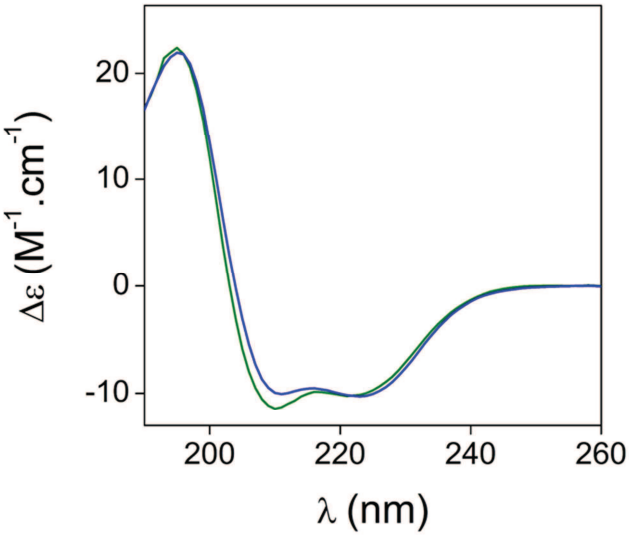


Figure 2-2. *Spectres en dichroïsme circulaire de la myoglobine (bleu) et de l'apomyoglobine (vert) dans l'eau MilliQ à 4°C à une concentration de 10 µM*

L'apomyoglobine est peu stable à température ambiante : les solutions sont conservées à 4°C et les expériences ont également été réalisées à 4°C.

4. Adsorption des protéines

4.1 Spectroscopie UV-visible

La spectroscopie UV-visible a été utilisée pour mesurer :

1) la concentration en protéine des solutions
2) les spectres d'absorption des hémoprotéines adsorbées sur les NP de silice
3) les isothermes d'adsorption des protéines sur les nanomatériaux
4) la fixation de ligands de la metmyoglobine libre et adsorbée sur les NP (voir §6.1)
5) l'oxygénation de l'hémoglobine libre et adsorbée sur les NP (voir §6.2)

Les solutions sont analysées dans des cuves en quartz Suprasil de 1 cm de trajet optique à température ambiante de 250 à 800 nm sur un spectrophotomètre double faisceau Shimadzu UV-2450. Les mesures sur les solutions sans NP (mesures de concentration et isothermes d'adsorption) sont réalisées suivant un montage classique en transmission après soustraction de la ligne de base mesurée sur le tampon. Les solutions contenant les NP de silice en suspension ne peuvent pas être analysées de cette façon car la diffusion de la lumière par les NP est trop importante et le signal mesuré trop faible. Pour adapter la mesure à ce type d'échantillon, nous avons utilisé une sphère d'intégration Shimadzu ISR-2200 qui permet de collecter de 250 à 800 nm toute la lumière diffusée et augmente la sensibilité de la mesure pour des solutions colloïdales (*14*). La ligne de base est mesurée sur une suspension de NP dans le tampon. Les spectres obtenus sont de bonne qualité,

même si la diffusion n'est pas totalement corrigée dans le proche UV. Les mesures réalisées avec la sphère d'intégration sur les solutions sans NP sont par ailleurs parfaitement identiques à celles du montage classique.

Concentration en protéines

La concentration en BSA est mesurée à 280 nm avec un coefficient d'extinction molaire ε_{278} =44 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ (*15*). La concentration de l'hémoglobine, exprimée usuellement en concentration molaire d'hème, est mesurée à 576 nm, pic d'absorbance spécifique de la forme oxygénée avec ε_{576} = 15 150 $M^{-1}.cm^{-1}$ (*16*). Le spectre de la metmyoglobine dépend du pH de la solution (voir chap. 7, §1) (*17*). La concentration de la metmyoglobine est donc mesurée au point isobestique à 623 nm avec ε_{623}=3 500 $M^{-1}.cm^{-1}$ (*17*).

Isotherme d'adsorption

Une isotherme d'adsorption représente la quantité de protéine adsorbée en fonction de la concentration de protéine libre en solution. La quantité de protéine adsorbée est déterminée par différence entre les concentrations mesurées i) sur une solution de référence contenant la protéine sans NP et ii) sur le surnageant de la solution contenant la protéine et les NP. La concentration en NP est de 4,5 mg/mL (diluée à partir d'une solution mère à 60 mg/mL) et la concentration en protéine varie de 5 à 100 µM. Les solutions sont agitées doucement sur une roue pendant 4h à température ambiante puis centrifugées à 20 000 g pendant 10 min pour séparer les NP avec la protéine adsorbée du surnageant avec la protéine libre.

La quantité de protéine adsorbée est exprimée en mg/m² à partir de la surface spécifique mesurée par BET pour chacun des matériaux. La surface est plus appropriée que la masse des NP car leur réactivité est avant tout liée à leur grande surface spécifique (*18*). Une incertitude de 5% sur les mesures a été déterminée par la répétition de 5 mesures identiques.

Les modèles utilisés pour représenter les isothermes d'adsorption des protéines sur les NP de silice sont présentés dans le chapitre 4 (voir §2).

4.2 Microcalorimétrie ITC

L'énergie d'adsorption de la myoglobine sur les NP de silice a été mesurée par titration microcalorimétrique isotherme (Isothermal Titration Calorimetry) par mesure de la quantité de chaleur dégagée par ajouts successifs de myoglobine à une suspension de NP à 25°C. Les mesures ont

été réalisées sur un Microcal VP-ITC (GE Healthcare) au Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (INRA-CNRS-Université de Bourgogne) à Dijon.

Des aliquotes de 10 µL de myoglobine à une concentration de 1 mM sont ajoutés à une solution de NP de silice à une concentration de 3 mg/mL avec un temps d'équilibre de 8 min entre chaque ajout. Toutes les solutions sont préparées en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 pour éviter un effet de pH. La solution contenue dans la cuve est continuellement agitée, ce qui évite toute décantation des NP au cours de la mesure. La concentration en myoglobine de la cuve varie de 2 à 150 µM au cours de l'expérience, de manière similaire à la gamme de concentration en protéine des isothermes d'adsorption. Le rapport de concentration Mb/NP permet de saturer la surface des NP par la myoglobine à la fin de l'expérience. Les variations de chaleur mesurées lors de la dilution de la myoglobine d'une part (sans NP) et la dilution des NP d'autre part (sans myoglobine) ont été soustraites à la mesure finale.

Le traitement des données s'effectue en deux étapes. La première étape consiste à traiter les données brutes : la quantité de chaleur mesurée au cours du temps est intégrée et normalisée à la quantité de protéine en solution pour obtenir la quantité de chaleur ΔQi (Kcal/mol) pour chaque injection (Fig. 2-3). L'intégration est réalisée à l'aide du logiciel ITC Data Analysis en ajustant manuellement la ligne de base pour une meilleure intégration. La même procédure est appliquée aux mesures témoin. La quantité de chaleur due à la dilution et mesurée sur les témoins est moyennée et soustraite du ΔQi obtenu pour le système myoglobine-NP.

La seconde étape consiste à appliquer un modèle de fixation pour déterminer les paramètres thermodynamiques de l'adsorption, c'est-à-dire la variation d'enthalpie ΔH, le nombre de sites de fixation n et la constante d'association K.

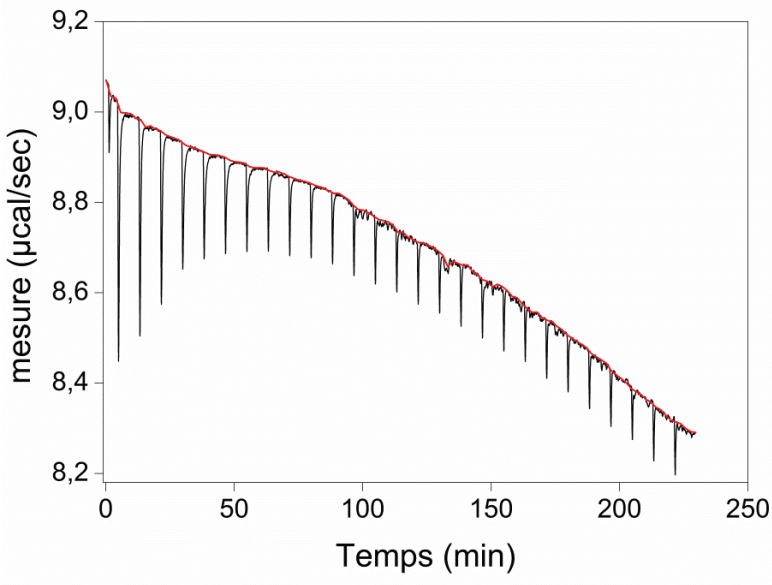


Figure 2-3. *Données ITC brutes (en noir) et ligne de base ajustée pour l'intégration des pics (en rouge) correspondant à la quantité de chaleur mesurée lors de l'adsorption de la myoglobine sur les NP de silice 7 nm en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4*

Nous avons utilisé le modèle SSIS (Single Set of Identical Sites) où un seul type de site de fixation intervient et où le nombre de sites est inconnu. Cependant, les données utilisées par le modèle sont les concentrations molaires en protéine et en ligand, ce qui a peu de sens pour les NP. Nous avons donc adapté les équations utilisées pour le traitement des données ITC à notre système en exprimant une concentration molaire en sites de fixation M_t à la place d'une concentration en ligands. M_t représente la quantité de sites de fixation par gramme de NP multipliée par la concentration massique en NP.

Le modèle SSIS peut être exprimé en fonction du nombre de sites occupés par la myoglobine sur la silice (eq. 6), avec Θ la fraction de sites occupés et X_{libre} la concentration de myoglobine libre en solution, corrigée des effets de dilution (eq. 7).

$$K = \frac{\Theta}{(1-\Theta)\cdot X_{libre}} \qquad \text{(eq. 6)}$$

$$X_t = X_{libre} + n \cdot M_t \cdot \Theta \qquad \text{(eq. 7)}$$

Ce qui donne par combinaison :

$$\Theta^2 - \Theta\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{KnM_t}\right) + \frac{X_t}{nM_t} = 0 \qquad \text{(eq .8)}$$

A pression constante, toute l'énergie est libérée sous forme de chaleur, soit une variation d'énergie interne ΔU=ΔQ=ΔH rapportée au nombre de sites déjà occupés dans l'équation 9.

$$Q = nM_t V_0 \Theta \cdot \Delta \qquad \text{(eq. 9)}$$

La résolution de l'équation 8 et la combinaison avec l'équation 9 nous donne la solution ci-dessous pour la quantité de chaleur totale Q :

$$Q = nM_t V_0 \cdot \frac{\Delta H}{2} \cdot \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{KnM_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{KnM_t}\right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}}\right] \qquad \text{(eq. 10)}$$

La mesure ITC correspond à l'incrément de chaleur pour chaque injection ΔQi, soit la dérivée de Q par rapport à la quantité de myoglobine $V_0.X_t$ (eq. 11).

$$\frac{1}{V_0} \cdot \frac{dQ}{dX_t} = \frac{\Delta H}{2} \cdot \left[1 - \frac{\frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{KnM_t} - 1}{\sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{KnM_t}\right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}}}\right] \qquad \text{(eq. 11)}$$

Pour un jeu de paramètres (K, n, ΔH), ΔQi est calculé à l'aide de l'équation 11 et comparé à ΔQi mesuré. En utilisant la méthode des moindres carrés et par itérations, le meilleur ajustement du modèle aux données est alors obtenu. Les variations d'énergie de Gibbs et d'entropie sont ensuite calculées à partir de la constante d'équilibre (eq. 12) et de la relation de Gibbs-Helmholtz (eq. 13).

$$\Delta_r G^0 = -RT ln\, K \qquad \text{(eq. 12)}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad \text{(eq. 13)}$$

4.3 Cartographie de surface par irradiation

Les mesures de cartographie de surface sont réalisées en quatre étapes :

1) Irradiation γ des solutions de myoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice
2) Désorption de la myoglobine adsorbée
3) Digestion de la myoglobine par la trypsine
4) Analyse par spectrométrie de masse et identification des résidus oxydés

La préparation des solutions, l'irradiation et la désorption ont été réalisées au Laboratoire de Radiolyse au CEA. La digestion enzymatique et l'analyse par spectrométrie de masse ont été réalisées au Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement à l'Université d'Evry.

Irradiation

Les solutions sont composées de metmyoglobine à une concentration de 3 µM dans l'eau MilliQ avec ou sans NP de silice à une concentration de 30 mg/mL. Un volume de 3 mL est irradié à température ambiante par une source de ^{137}Cs dans une Gammacell MDS-Nordion (Theratronics) pendant 2 min à 6h avec un débit de dose de 6 Gy/min, soit une dose reçue de 12 à 2160 Gy. La production de radicaux hydroxyles par les rayons γ est de 0,28 µM/Gy. La quantité produite de $HO^{\bullet}$ dans les solutions est donc de 3 à 600 µM. Les solutions sont agitées toutes les 30 min au cours de l'irradiation pour permettre une bonne homogénéisation des solutions.

Désorption

Pour permettre sa digestion, la myoglobine adsorbée sur les NP de silice est désorbée par la morpholine à une concentration de 30 mM sous agitation pendant une nuit. Cela permet la désorption complète de la myoglobine, tandis que la désorption en milieu basique n'est pas totale. Les NP sont éliminées par centrifugation à 20 000 g pendant 10 min puis la solution est dialysée contre de l'eau MilliQ pendant une nuit pour éliminer la morpholine.

Un contrôle réalisé par la suite sur une solution de myoglobine traitée à la morpholine sans NP montre que celle-ci n'induit pas d'oxydation de la protéine. Cette étape est donc « invisible » pour la suite de la mesure et la comparaison des oxydations par irradiation des solutions de myoglobine libre et adsorbée sur les NP.

Digestion enzymatique

La trypsine utilisée pour la digestion est une trypsine de porc modifiée par méthylation pour limiter son autodigestion (Promega V511). Elle est conservée à -80°C. La myoglobine est diluée à 0,015 µM dans un tampon de bicarbonate d'ammonium à 25 mM (Sigma A6141) puis chauffée à 95°C pendant 5 min. La trypsine est ajoutée à 37°C avec un rapport trypsine/myoglobine de 1/50. Les solutions sont maintenues à 37°C pendant une nuit pour permettre la digestion complète de la myoglobine.

Pour s'assurer que toute la myoglobine a bien été digérée, un aliquote de chaque solution est analysé sur un spectromètre de masse MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) Voyager-De STR3 (Applied Biosystem). L'aliquote est mélangé à une matrice d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique à 10 g/L conditionnée dans du méthanol, déposé sur une cible (AB Sciex) et séché à température ambiante. L'échantillon est ensuite ionisé par un laser à une puissance de 2800 kW/cm². L'absence de peptides de masse supérieure à 10 kDa indique une digestion correcte de la myoglobine. Cette étape est indispensable avant l'analyse par spectrométrie de masse couplée à la

chromatographie (nanoLC) pour éviter de boucher la colonne avec des protéines non digérées. Le protocole de digestion est adapté en fonction de chaque protéine.

Analyse par nanoLC-MS/MS

Les peptides ainsi digérés sont analysés par spectrométrie de masse en tandem couplée à une colonne de chromatographie (nanoLC-MS/MS) sur un spectromètre LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific). Les peptides sont séparés sur une colonne de chromatographie pour obtenir une plus grande résolution de l'analyse en masse. Une première élution de 2 µL de solution contenant 7.10^{-13} moles de myoglobine est réalisée sur une pré-colonne C18 (300 µm diamètre intérieur, 5 mm de longueur, Dionex) pour dessaler la solution, puis sur une colonne C18 (75 µm, 15 cm, Dionex) avec une solution composée de 98% d'eau MilliQ, 2% d'acétonitrile et 0,1% d'acide formique, et enfin sur la colonne NanoLC Ultimate 3000 (Dionex) avec une solution composée de 80% d'acétonitrile, de 20% d'eau MilliQ et de 0,1% d'acide formique. L'élution est réalisée pendant 50 min à un flux de 300 nL/min. Un spectre typique mesuré sur un échantillon de myoglobine irradié est présenté ci-dessous (Fig. 2-4).

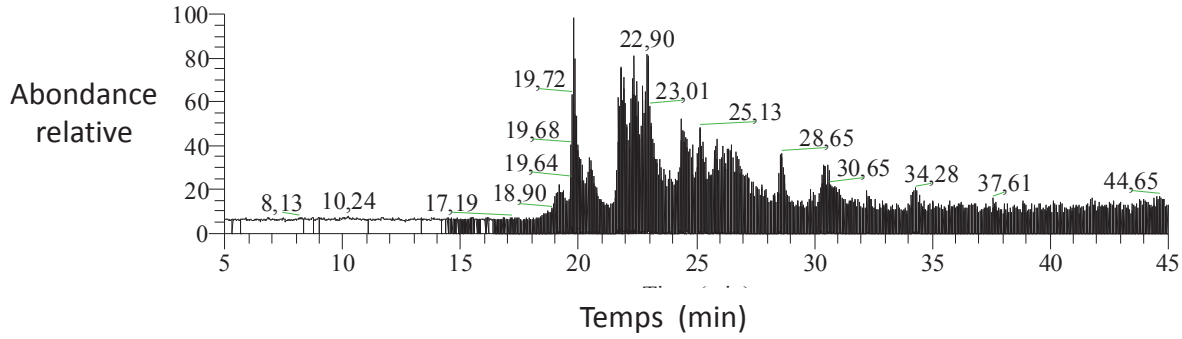


Figure 2-4. *Première séparation nanoLC des peptides de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice et irradiée à 360 Gy avant ionisation et analyse par spectrométrie de masse en tandem sur le spectromètre LTQ-Orbitrap XL. Chaque peptide est identifié par son temps d'élution (en min)*

Les peptides sont ensuite ionisés par électrospray (tension de 1,4 kV, température de 200°C) et analysés dans le premier module LTQ à trappe ionique linéaire. Les cinq peptides les plus abondants, caractérisés par leur rapport masse/charge, sont à nouveau fragmentés et analysés dans le second module Orbitrap XL qui fonctionne comme un piège à champ électrostatique et permet ainsi de réaliser une analyse MS/MS en deux étapes. La résolution obtenue est inférieure à 5 ppm.

Toutes les analyses sont répétées sur trois échantillons différents et les résultats comparés. Pour identifier les peptides et les résidus oxydés au sein de ce peptide, les données sont analysées sur le

logiciel MASCOT (avec une recherche limitée à la metmyoglobine de cœur de cheval) sur lequel les différentes modifications possibles des résidus par attaque radicalaire ont été préalablement entrées (*19*). Les résidus oxydés identifiés sont ensuite comparés entre myoglobine libre et myoglobine adsorbée.

4.4 Analyse des protéines d'un extrait cellulaire de levure

L'étude des protéines d'un extrait cellulaire de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) s'est déroulée en plusieurs étapes :

1) Marquage des protéines au ^{35}S
2) Mesure d'une isotherme d'adsorption sur les NP par scintillation liquide
3) Identification des protéines adsorbées/non adsorbées par électrophorèse bidimensionnelle
4) Analyse statistiques des critères physico-chimiques et structuraux des protéines

Les expériences ont été réalisées au Laboratoire de Biologie Intégrative (CEA).

Marquage des protéines au ^{35}S

La souche de levure utilisée est la souche S288C (*Matα SUC2 mal mel gal2 CUP1*) (*20*). Les cellules sont cultivées sous agitation à 30°C dans 1L de milieu de culture de levure synthétique pauvre en glucose (SD, 6,7 g/L de base azote avec NH_4SO_4 et 20 g/L de glucose) jusqu'à une concentration cellulaire de 2.10^7 cellules/mL. Les cellules sont isolées par centrifugation, resuspendues dans un tampon phosphate salin (PBS) contenant 5% de glycérol et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (cocktail Roche sans EDTA, avec 1 mM PMSF) puis cassées sous presse. L'extrait est centrifugé à 20 000 g pendant 30 min à 4°C et le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques solubles est récupéré. La concentration en protéines de l'extrait est mesurée selon la méthode Bradford (*21*). 1L de culture cellulaire de levure permet de récupérer en moyenne 4 mL de solution contenant 20 g/L de protéines solubles.

Pour produire les protéines marquées au ^{35}S, 50 mL de la culture de cellules de levure non marquées sont centrifugés et resuspendus dans un milieu sans sulfate pendant 30 min. Les cellules sont ensuite marquées en ajoutant 1 à 2 mCi de méthionine-^{35}S pendant 30 min. Dans ces conditions, la quasi-totalité du ^{35}S est utilisée pour la synthèse protéique et la quantité de ^{35}S accumulé dans les métabolites est inférieure à 1%. L'extrait protéique est ensuite préparé de la même façon que l'extrait non marqué, mais pour un volume 10 fois plus faible. Au final, 0,5 mL de solution est obtenu avec une concentration en protéines solubles de 2 g/L et une activité de 2 Ci/L.

Les protéines marquées au ^{35}S sont utilisées comme traceur pour la mesure des isothermes d'adsorption et pour les électrophorèses 2D. Elles sont mélangées à l'extrait non marqué afin d'obtenir la concentration en protéine et l'activité nécessaire pour chaque type d'expérience.

Mesure d'une isotherme d'adsorption sur un extrait cellulaire par scintillation liquide

L'extrait cellulaire de protéines de levure contenant les protéines marquées en tampon PBS à pH 7,4 avec une concentration finale en protéine de 0,15 à 9 g/L est mis en contact avec les NP de silice à une concentration de 5 g/L. Les solutions sont agitées doucement pendant 3h à 20°C puis centrifugées à 6000 g pendant 2 min. A la différence des isothermes d'adsorption mesurées par spectroscopie UV-visible sur une protéine purifiée, l'isotherme d'adsorption est mesurée ici sur l'ensemble des protéines solubles de l'extrait : pour déterminer la quantité de protéines adsorbées, le culot de NP a été lavé une fois dans le tampon PBS puis la radioactivité des protéines adsorbées a été mesurée par comptage par scintillation liquide sur un scintillateur Wallac 1409 DSA. Aucune modification du comptage due à la présence des NP de silice lors des tests n'a été observée.

Electrophorèse bidimensionnelle

Un échantillon contenant 5 g/L de NP et 1 g/L de protéines contenant des protéines marquées est préparé. Dans ces conditions, 37% des protéines sont adsorbés et 63% des protéines sont non adsorbés. Ces conditions correspondent à un excès de surface par rapport aux protéines et ont été choisies pour étudier les différences d'affinité entre protéines pour la silice, tout en s'affranchissant des effets de compétition pour la surface qui se produisent lorsqu'on atteint le plateau de l'isotherme (à partir d'une concentration en protéine de 5 g/L). Après agitation et centrifugation, les protéines du surnageant ont été concentrées par un facteur 5 par évaporation. Après 15 min d'incubation à 30°C dans un tampon pour électrophorèse 2D (*22*), un aliquote de bleu de bromophénol est ajouté et l'identification par électrophorèse bidimensionnelle des protéines de levure non adsorbée est réalisée en suivant un protocole classique (*23*). Une préparation identique est réalisée sur l'extrait total, pour obtenir une carte de référence des protéines solubles de l'extrait cellulaire.

Les culots contenant les NP et les protéines adsorbées sont lavés deux fois dans 200 µL de PBS puis incubés pendant 15 min à 30°C dans le tampon pour électrophorèse 2D. Le tampon est suffisamment dénaturant pour désorber totalement les protéines des NP. La solution est centrifugée à 20 000 g pendant 3 min et le surnageant contenant uniquement les protéines est récupéré. L'absence de protéines dans le culot est confirmée par comptage par scintillation liquide. Un aliquote de bleu de

bromophénol est ajouté au surnageant et les protéines de levure adsorbées sont identifiées par électrophorèse 2D.

Après électrophorèse, les gels sont révélés au bleu de Coomassie (R-250), séchés et analysés par autoradiographie après un temps d'exposition adapté. Les images sont enregistrées sur un Phosphorimager (Molecular Dynamics, Storm). Les expériences sont répétées sur trois échantillons indépendants pour chaque analyse. L'identification des protéines de levure sur les gels 2D est réalisée à partir d'une carte de référence du laboratoire (*23*). Cependant, à partir de plusieurs milliers de protéines présentes en quantités variables au sein d'une cellule de levure, seule une centaines de protéines solubles est identifiée par électrophorèse 2D. Les protéines non solubles, ou les protéines solubles de très faible/très forte masse ou charge ne sont pas visibles sur le gel.

La mesure quantitative des protéines adsorbées, non adsorbées et de l'extrait total est obtenue par analyse de l'image « radioactive » à l'aide du logiciel Progenesis Samespots (v3.0). Les points identifiés automatiquement par le logiciel ont été vérifiés avant analyse. L'intensité de chacun des « spots » de protéine est normalisée à l'intensité totale du gel, ce qui permet de comparer les intensités relatives entre différents gels. Cette valeur est utilisée pour calculer directement l'enrichissement ou l'appauvrissement des protéines à la surface de la silice. Pour classer les protéines en fonction de leur affinité, nous avons choisi un seuil arbitraire de 1,5 pour séparer les protéines enrichies dans la couronne (rapport d'intensité > 1,5), les protéines appauvries dans la couronne (rapport d'intensité < 1/1,5 = 0,6) et les protéines présentes dans la couronne et dans la solution en quantité équivalente (rapport d'intensité compris entre 0,6 et 1,5).

Analyse statistique des critères physico-chimiques et structuraux des protéines

Les séquences primaires des protéines de levure identifiées sont produites par l'UCSC (séquençage du génome de la levure S. cerevisiae). A partir des séquences primaires de chacune des protéines adsorbées et non adsorbées, les critères physico-chimiques moyens de chaque groupe sont calculés à l'aide du logiciel Profeat sur plus de 400 critères (*24*). Une analyse statistique des différences à l'aide du test de Brunher-Munzel (*25*) a permis d'identifier des critères spécifiques des protéines adsorbées ou non adsorbées. Certains critères calculés spécifiquement sont détaillés dans le chapitre 4 (voir §7).

5. Structure des protéines adsorbées

5.1 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La solution analysée est composée de myoglobine (5 mM) préparée dans D_2O, avec ou sans NP de silice ajoutées en quantité suffisante pour permettre l'adsorption complète de la myoglobine. Un mince film de solution est déposé entre deux fenêtres de CaF_2 séparées par un espaceur en Mylar de 25 µm. Le serrage de la cellule est très délicat en présence de NP car l'épaisseur de l'échantillon n'est pas homogène et les fenêtres se cassent très facilement.

Les mesures sont ensuite réalisées selon le même protocole que pour l'analyse de la silice (voir §2.5).

5.2 Dichroïsme circulaire

Les spectres ont été mesurés sur un dichrographe Jobin-Yvon CD6 au Laboratoire de Biologie et Pharmacologie Appliquée à l'ENS Cachan. Les solutions analysées dans une cuve en quartz Suprasil de 1 mm de trajet optique sont composées de 10 µM de protéine en tampon 10 mM BisTris-HCl, Phosphate ou Tris-HCl (pour rester dans la fenêtre de mesure de l'appareil) avec ou sans NP de silice à une concentration de 1 à 7 mg/mL et sont doucement agitées avant mesure. Les spectres sont enregistrés de 190 à 260 nm et la correction de ligne de base réalisée sur le tampon ou la solution de NP (celle-ci ne présente toutefois pas un signal supérieur à celui du tampon). De plus, intercaler une deuxième cuve en quartz de 1 mm contenant uniquement la suspension de NP, devant ou derrière la cuve contenant la solution de protéine, ne modifie pas le signal mesuré. Comme pour les mesures d'activité, un contrôle négatif a été réalisé en mesurant le spectre d'une solution d'hémoglobine à pH 9 en présence de NP lorsque la protéine n'est pas adsorbée. Aucune différence avec le spectre de la protéine libre en solution n'a été observée.

Les données sont exprimées sous la forme de la différence de coefficient d'extinction molaire par résidu Δε (eq. 14) :

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_{gauche} - \varepsilon_{droite} = \frac{\Delta A}{l \cdot C \cdot N} \qquad \text{(eq. 14)}$$

avec ΔA la différence d'absorbance entre lumière polarisée gauche et droite, l la longueur du trajet optique (cm), C la concentration en protéine (M) et N le nombre de liaisons peptidiques

Quatre spectres ont été moyennés pour chaque échantillon et montrent une bonne reproductibilité des mesures. Les spectres UV-visibles mesurés avant et après le spectre de dichroïsme ne présentent pas de différences, ce qui montre qu'il n'y a pas de modification de la protéine au cours de la

mesure. Le calcul de l'hélicité et la déconvolution des spectres est discutée dans le chapitre 5 (voir §2).

5.3 Spectroscopie de fluorescence

Les mesures de fluorescence ont été réalisées sur un fluorimètre Horiba Jobin-Yvon Fluoromax 4. Les solutions composées de 10 µM d'apomyoglobine en tampon 10 mM BisTris-HCl à pH 6 avec ou sans NP de silice à une concentration de 1 à 9 mg/mL sont agitées doucement pendant une heure à 4°C avant la mesure puis analysées dans une cuve en quartz Suprasil de 1 cm de trajet optique. La longueur d'onde d'excitation de fluorescence utilisée est 295 nm pour permettre une excitation sélective des résidus tryptophane de la protéine. Aucun déplacement de la longueur d'onde du maximum d'excitation de l'apomyoglobine n'a été observé en présence de NP. Les spectres d'émission de fluorescence sont enregistrés de 300 à 450 nm et normalisés par rapport à une référence interne. Les spectres sont ensuite lissés sur 5 points successifs à l'aide du logiciel Origin.

5.4 Spectroscopie d'absorption X

Les hémoprotéines ont été analysées par spectroscopie XANES (X-Ray Absorption Near-Edge Structure) sur la ligne FAME à l'ESRF (Grenoble). Les spectres sont mesurés de 7100 à 7500 eV autour du seuil K d'absorption du fer (E = 7112 eV) par fluorescence sur un détecteur Canberra 30 éléments. Les échantillons sont composés de metmyoglobine ou d'oxyhémoglobine à une concentration de 2 mM en tampon 100 mM BisTris-HCl, Phosphate ou Tris-HCl, avec ou sans NP de silice à une concentration de 90 mg/mL. La metmyoglobine a également été analysée sous sa forme ligandée à l'azoture en ajoutant l'azoture préparé dans le même tampon à une concentration finale de 100 mM.

Un volume de 300 µL est analysé dans un capillaire en quartz de 3 mm de diamètre et de 10 cm de hauteur (Capillary Tube Supplies, UK) à température ambiante. Pour éviter la dégradation de la protéine sous faisceau au cours de la mesure, au moins 4 spectres ont été mesurés en des points différents de l'échantillon et moyennés. La taille du faisceau est de 150 µm et les points de mesure sont distants de 1 mm en hauteur. Les spectres n'ont été moyennés que s'ils présentaient une bonne reproductibilité. Ils ont ensuite été traités à l'aide du logiciel Athéna.

5.5 Microcalorimétrie DSC

La température et l'enthalpie de dénaturation de la myoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice ont été mesurées par microcalorimétrie DSC (Differential Scanning Calorimetry) au Laboratoire Procédés Alimentaires et Physico-Chimie de l'Université de Bourgogne (Dijon). Les mesures sont réalisées de 25 à 110 °C avec un gradient en température de 0,5°C/min sur un microcalorimètre DSC

III (Setaram Instruments). Après une première analyse, une seconde montée en température est effectuée pour évaluer la réversibilité de la dénaturation. Les échantillons de 600 mg environ sont composés de myoglobine à une concentration de 15 g/L avec ou sans NP de silice à une concentration de 180 g/L préparés dans D_2O. Les solutions analysées ont été préparées dans D_2O sans tampon, afin d'analyser les mêmes échantillons par microcalorimétrie et par diffusion incohérente de neutrons (voir §18). Les mesures ont été répétées 3 fois et moyennées. La variation d'enthalpie de dénaturation de la protéine a été calculée par intégration du thermogramme.

6. Activité des hémoprotéines adsorbées

6.1 Fixation de ligands de la metmyoglobine

La fixation de l'azoture (N_3^-) et de l'imidazole (Im) sur la metmyoglobine est suivie par spectrophotométrie en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 540 nm après fixation du ligand. Pour illustrer les modifications des spectres de la metmyoglobine lors de la fixation de ligands, le spectre de Mb-N_3 est représenté de 300 à 700 nm (Fig. 2-5) et les spectres mesurés pour une fraction croissante de Mb-Im sont présentés centrés sur la mesure de l'absorbance à 540 nm (Fig. 2-6).

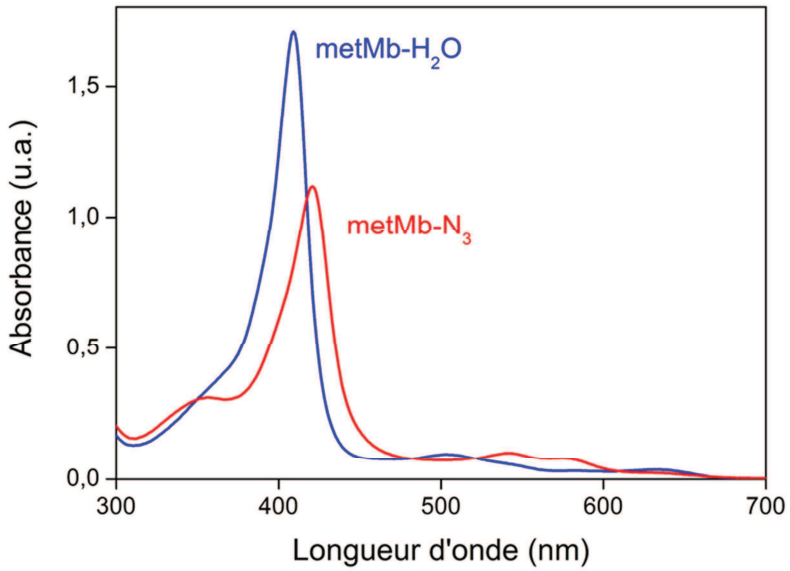


Figure 2-5. *Spectres UV-visible de l'aquometMb (en bleu) et de la metMb-N_3 (en rouge) en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6*

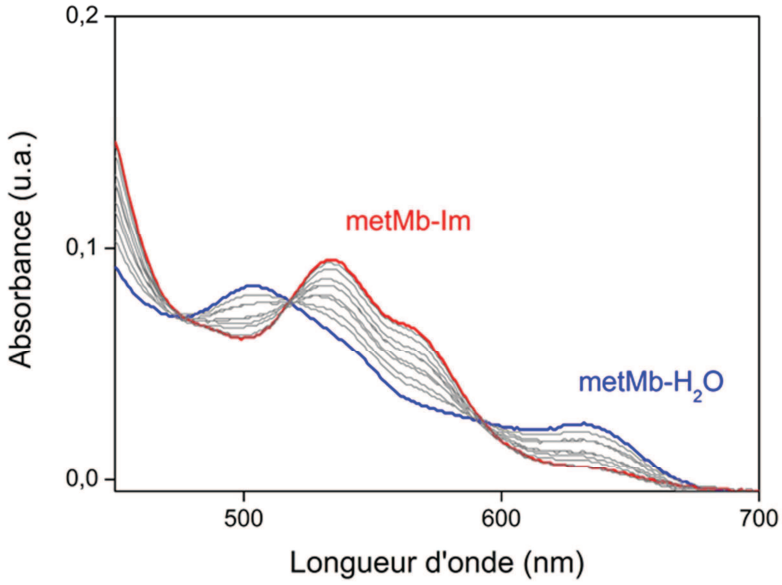


Figure 2-6. *Spectres visible de l'aquometMb (en bleu) et de la metMb-Im (en rouge) en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 centrés sur la mesure de l'absorbance à 540 nm*

La fraction de metmyoglobine ligandée Mb-N_3 ou Mb-Im est calculée suivant l'équation 15 (par exemple pour l'azoture) :

$$MbN_3 = \frac{A_x - A_0}{A_l - A_0} \qquad \text{(eq. 15)}$$

Avec A_l, A_0 et A_x l'absorbance mesurée à 540 nm respectivement sur la metmyoglobine totalement ligandée, non ligandée et sur un point de mesure. L'absorbance mesurée à 700 nm est soustraite pour corriger de légers effets de diffusion. Des aliquotes d'une solution mère d'azoture ou d'imidazole à une concentration de 100 à 300 mM sont ajoutés à une solution de myoglobine à une concentration de 10 µM, avec ou sans NP de silice à une concentration de 15 mg/mL, en tampon 100 mM BisTris-HCl à pH 6, Phosphate à pH 7,4 et Tris-HCl à pH 8,7. L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à l'aide de la sphère d'intégration.

Pour vérifier que les NP de silice n'interfèrent pas avec la mesure, la fixation de l'azoture sur la metmyoglobine a été mesurée en présence de NP de silice à pH 9, conditions dans lesquelles la grande majorité des molécules de myoglobine ne sont pas adsorbées. Aucune différence par rapport à la mesure sur la solution de référence sans NP n'a été observée.

Constante d'association

Les données sont représentées sous la forme d'un diagramme de Hill (*26*) (eq. 16), avec Y la fraction de metmyoglobine ligandée, C_l la concentration en azoture ou en imidazole, K_a la constante

d'association du ligand avec la metmyoglobine et n le coefficient de Hill qui définit la coopérativité du système (voir chap7, §1).

$$log\frac{Y}{1-Y} = n.\log C_l - logK_a \qquad \text{(eq. 16)}$$

Une régression linéaire de pente n = 1 (système non coopératif) sur un graphe en échelle logarithmique permet de calculer la constante d'association K_a de l'azoture et de l'imidazole avec la metmyoglobine libre et adsorbée.

6.2 Oxygénation de l'hémoglobine

Méthode tonométrique

L'oxygénation de l'hémoglobine a été mesurée par tonométrie à 25°C (*27*) (Fig. 2-7). Les solutions composées de l'hémoglobine à une concentration de 50 µM (en monomères Hb) avec ou sans NP à une concentration de 34 mg/mL en tampon 100 mM BisTris-HCl, Phosphate ou Tris-HCl sont équilibrés pendant une nuit.

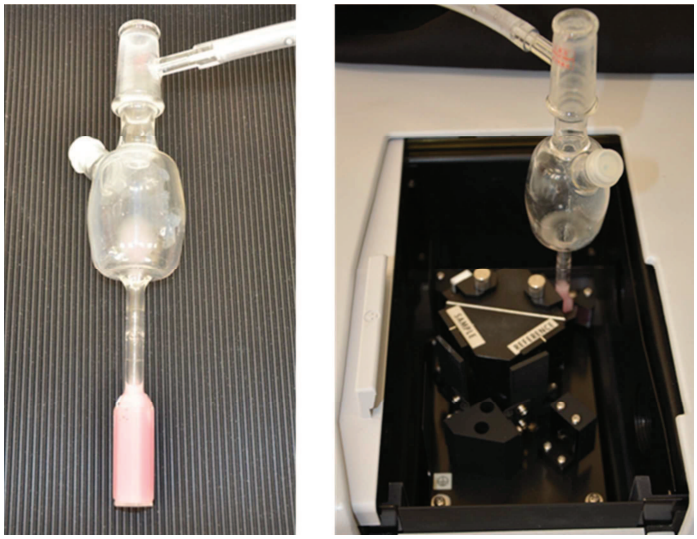


Figure 2-7. *Photographie du tonomètre contenant 5 mL de solution d'hémoglobine (50 µM) avec NP de silice (34 mg/mL) (à gauche), placé dans la sphère d'intégration du spectrophotomètre pour mesure (à droite)*

L'hémoglobine est désoxygénée sous un léger flux d'argon de qualité 6.0 sous agitation douce, après bullage dans l'eau MilliQ pour éviter de sécher la solution. Le dégazage de 5 mL de solution prend une à deux heures dans un tonomètre de 70 mL. La désoxygénation ne modifie pas l'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice. En effet, le surnageant reste totalement transparent après décantation des NP en quelques heures, l'hémoglobine désoxygénée reste donc adsorbée sur les NP

de silice. Des volumes contrôlés d'air sont ensuite ajoutés aux solutions pour l'oxygénation à l'aide d'une seringue Hamilton étanche aux gaz puis l'absorbance à 576 nm est mesurée (Fig. 2-8).

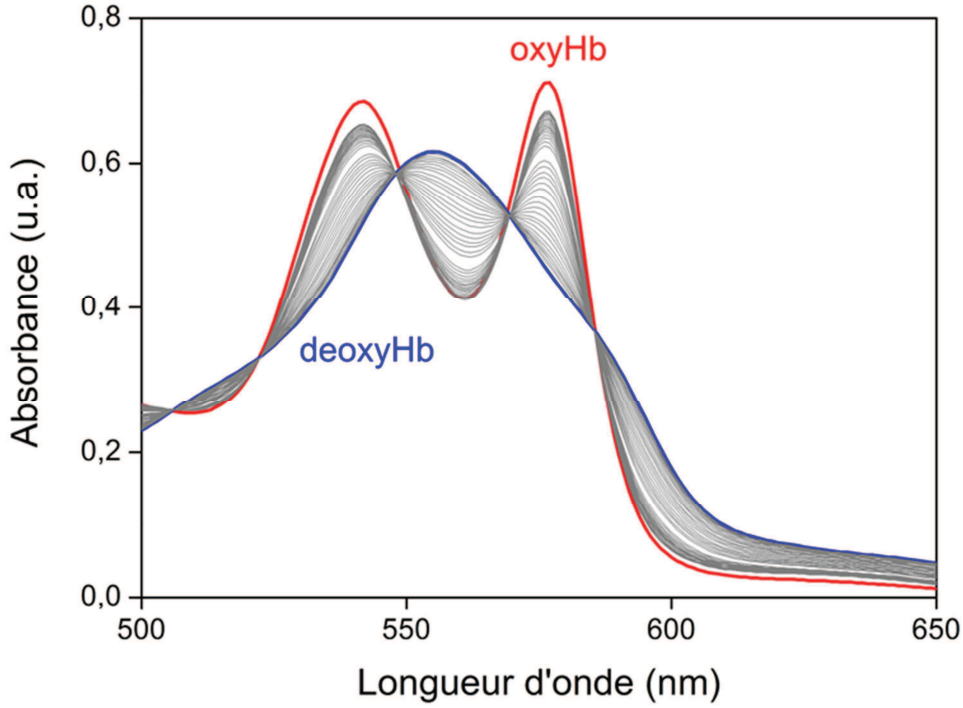


Figure 2-8. *Spectres visible mesurés au cours de l'oxygénation de l'hémoglobine en présence de DPG en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6 dans un tonomètre : déoxyHb (en bleu), oxyHb (en rouge) et spectres intermédiaires (en gris)*

La pression partielle en oxygène de la solution est calculée en fonction du volume d'air ajouté et de la pression atmosphérique pour une teneur en oxygène de l'air de 21%. La fraction d'oxyhémoglobine est calculée de la même façon que la fraction de metmyoglobine ligandée (eq. 15), à partir de l'absorbance à 576 nm de l'oxyhémoglobine et de la déoxyhémoglobine et corrigée de légers effets de diffusion par la soustraction de l'absorbance à 700 nm.

Après un cycle de mesure de désoxygénation/oxygénation, le rapport d'absorbance à 576 et 541 nm (ε_{541nm} = 14250 $M^{-1}.cm^{-1}$ (*17*)) et l'absorbance à 630 nm sont mesurés pour s'assurer qu'il n'y a pas eu d'oxydation de l'hémoglobine en methémoglobine lors de la mesure.

Les mesures d'oxygénation ont également été réalisées en présence d'un effecteur, IHP ou DPG à une concentration de 125 µM préalablement mis en solution dans le tampon, ajouté avant ou après adsorption de l'hémoglobine sur les NP. Aucune modification de pH des solutions ou de l'adsorption de l'hémoglobine n'a été mesurée lors de l'ajout des effecteurs.

Pour vérifier que les NP de silice n'interfèrent pas avec la mesure, l'oxygénation de l'hémoglobine a été mesurée en présence de NP de silice à pH 9, conditions dans lesquelles l'hémoglobine n'est pas

adsorbée. Aucune différence par rapport à la mesure sur la solution de référence sans NP n'a été observée.

Mesure sur HEMOX

Les courbes d'oxygénation de l'hémoglobine humaine ont été mesurées sur un appareil HEMOX au Laboratoire INSERM U779 au CHU du Kremlin-Bicêtre. Dans ce cas, l'absorbance est mesurée à 576 nm au cours de la désoxygénation sous un flux d'azote et la teneur en oxygène du milieu est mesurée par une sonde. Les solutions thermostatées à 37°C sont préparées aux mêmes concentrations que pour la mesure d'oxygénation par tonométrie, avec en plus 10 µL d'une solution anti-mousse (AFA-25, TCS Scientific) nécessaire en raison du plus fort bullage de gaz à travers la solution. Aucune modification de l'adsorption n'est observée en présence de ce composé. Quelques µL d'une solution de dithionite $Na_2S_2O_4$ (50 mM) préparée dans le tampon désoxygéné sont ajoutés en fin de désoxygénation pour piéger l'oxygène éventuellement présent et s'assurer que toute l'hémoglobine a bien été désoxygénée. Aucune modification de la protéine après mesure n'a été observée.

Coefficient de Hill et P_{50}

Le coefficient de Hill est un indicateur de la coopérativité de l'hémoglobine lors de la fixation de l'oxygène : l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène augmente au cours de l'oxygénation. Les courbes d'oxygénation sont représentées sous la forme d'un diagramme de Hill (eq. 17) :

$$log\,\frac{Y}{1-Y} = n.\log P_{O2} - logP_{50} \qquad \text{(eq. 17)}$$

avec Y la fraction d'oxyhémoglobine, P_{O2} la pression partielle en oxygène, n le coefficient de Hill et P_{50} la pression partielle correspondant à l'oxygénation de 50% de l'hémoglobine

La régression linéaire sur un graphe en échelle logarithmique (voir chap. 7, §2) et la mesure de la pente et de l'ordonnée à l'origine permettent de calculer les valeurs de n et de la P_{50}. La P_{50} est un indicateur de l'affinité de l'hémoglobine : plus la P_{50} est élevée, plus la pression partielle en oxygène doit être forte pour oxygéner 50% des molécules, plus l'affinité de l'hémoglobine est faible. Le coefficient de Hill est un indicateur de la coopérativité de l'hémoglobine lors de la fixation d'oxygène : en théorie, il est au maximum de 4 pour un tétramère. En pratique, le coefficient de Hill mesuré pour l'hémoglobine est comprise entre 2,8 et 3 au maximum, à l'incertitude près.

7. Dynamique des protéines adsorbées

Les mesures de diffusion incohérente de neutrons de la myoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice ont été réalisées sur le spectromètre à temps de vol MIBEMOL au Laboratoire Léon Brillouin (CEA Saclay). La principale contribution par diffusion incohérente de neutrons des échantillons est celle des atomes d'hydrogène qui ont une très grande section efficace de diffusion incohérente devant les autres atomes (Si, D, O, C, N) (*28*). La protéine est en solution dans D_2O, ce qui permet de mesurer uniquement la diffusion des neutrons par les atomes d'hydrogène de la protéine. Puisque les atomes d'hydrogène sont répartis de façon homogène dans la protéine, leur dynamique reflète la dynamique globale de la protéine.

Deux types de mesures ont été réalisés : par diffusion élastique de neutrons (les neutrons diffusés conservent leur énergie incidente) pour mesurer le déplacement carré moyen des atomes d'hydrogène, et par diffusion inélastique de neutrons (transfert d'énergie entre neutrons et échantillons) pour mesurer la densité d'états vibrationnels de la myoglobine (*29*). Les mêmes échantillons sont analysés pour les deux types d'expérience.

Les échantillons sont composés de metmyoglobine à une concentration de 10 mM en solution dans D_2O avec ou sans NP de silice à une concentration de 1,3 g/mL. Les solutions sont analysées dans une cellule cylindrique en aluminium (V = 8 mL) dont la géométrie assure une bonne transmission des neutrons à travers l'échantillon et permet de minimiser les diffusions multiples. Pour ces mesures, nous avons travaillé dans D_2O dans les mêmes conditions que pour la microcalorimétrie DSC (voir §5.5). De plus, les constantes d'adsorption de la myoglobine sur les NP de silice dans l'eau MilliQ et en tampon Phosphate sont très similaires. Dans le cas de l'échantillon contenant les NP de silice, la quantité de myoglobine qui n'est pas adsorbée sur la surface représente 5% de la quantité totale de myoglobine. Les NP ont été préalablement mises en suspension et lavées plusieurs fois dans D_2O : l'hydrogène apporté par la surface de silice représente au final moins de 1% de la quantité d'hydrogène de la protéine (après calcul). De la même façon, la metmyoglobine lyophilisée a été mise en solution dans 25 mL de D_2O puis dialysée deux fois contre 300 mL de D_2O pour échanger puis éliminer tous les atomes d'hydrogènes échangeables de la myoglobine (environ 20% des atomes d'hydrogène, cette fraction est calculée).

La résolution de la mesure dépend i) du temps d'ouverture, plus ce temps est court, plus l'incertitude sur l'instant de départ est faible, ii) de la longueur d'onde incidente, plus elle est grande, plus le temps de parcours des neutrons est long, plus l'incertitude sur le temps de vol est faible (*29*).

Cependant, plus le temps d'ouverture est court, moins le flux de neutrons est important. La configuration choisie est donc un compromis entre flux et résolution.

7.1 Diffusion incohérente élastique de neutrons

Les mesures par diffusion élastique de neutrons ont été réalisées de 4K à 298K dans un cryostat à hélium avec un pas de 2K. La longueur d'onde incidente des neutrons est fixée à 9Å, ce qui correspond à une résolution fine de 28 µeV. Les angles de diffusion Q s'étendent de 0,3 à 1,4 $Å^{-1}$. Les détecteurs sont calibrés avec un échantillon de vanadium, qui est un matériau dont la diffusion est purement incohérente. Les intensités de diffusion élastique des échantillons sont corrigées de la diffusion mesurée sur la cellule vide et sur le solvant par soustraction et normalisés au spectre mesuré à la température la plus basse (T = 4K) pour compenser des effets d'auto-écrantage. L'intensité de diffusion élastique I_{el} est donnée par le facteur de Debye-Waller dans l'approximation gaussienne (eq. 18).

$$S(Q,\omega{\sim}0) \equiv I_{el}(Q) = e^{-<u^2>Q^2} \qquad \text{(eq. 18)}$$

Le déplacement carré moyen $<u^2>$ est ensuite calculé et représenté point par point en fonction de la température à l'aide du programme QENSH.

7.2 Diffusion incohérente inélastique de neutrons

Les mesures de diffusion inélastique de neutrons ont été réalisées à 240K et à 298K. La longueur d'onde incidente des neutrons est fixée à 5,2 Å pour avoir un flux de neutrons suffisant. La résolution est de 140 µeV. Dans ces conditions, l'échelle de temps sondée est comprise entre 0,2 et 20 ps. Un ensemble de spectres en transfert d'énergie des neutrons diffusés ont été mesurés pour une gamme d'angle de diffusion Q allant de 0,5 à 2,1 $Å^{-1}$. Pour avoir une bonne statistique, les données ont été accumulées pendant 4h à 8h pour chaque échantillon. Les données ont été analysées à l'aide de logiciels de traitement de données utilisés au LLB et normalisées à la quantité de myoglobine des échantillons.

L'intensité diffusée est proportionnelle au facteur de structure dynamique incohérent $S_{inc}(Q, \omega)$ qui représente la probabilité pour un neutron d'être diffusé par les noyaux diffuseurs avec un transfert de moment ħQ et un transfert d'énergie ħω, avec ħ la constante réduite de Planck (eq. 19).

$$S_{inc}(Q,\omega) = e^{-<u^2>Q^2/3} \cdot \left[EISF(Q)\delta(\omega) + L(Q,\omega) \cdot \left(1 - ESIF(Q)\right)\right] + S_{inel}(Q,\omega) \quad \text{(eq. 19)}$$

δ est la fonction Dirac et EISF est le facteur de structure incohérent élastique qui module l'intensité de diffusion élastique par l'intensité de diffusion quasiélastique représentée par la fonction gaussienne L(Q).

L'intensité de diffusion incohérente est ensuite reliée à la densité d'états vibrationnels des atomes d'hydrogène g(ω). Cette information est extraite des spectres de diffusion inélastique en calculant pour chaque angle la quantité : $g_i(2\theta,\omega) = I(2\theta,\omega)^* \omega$ / facteur de population de Bose $(\omega,T)/Q(2\theta,\omega)^2$ (eq. 20).

$$g_i(2\theta,\omega) = \frac{\omega \cdot S_{inc}(Q,\omega)}{n(\omega) \cdot Q^2(2\theta,\omega)} \quad \text{(eq. 20)}$$

Avec n(ω) le facteur de population de Bose. La densité d'états vibrationnels s'écrit alors :

$$g(\omega) = \int_0^\infty g_i(2\theta,\omega) d\theta \quad \text{(eq. 21)}$$

Pour minimiser les erreurs, les mesures ont été répétées sur la même cellule, tout d'abord pour le solvant (ou la solution de NP) puis pour la solution de myoglobine libre (ou de myoglobine adsorbée sur les NP). Les densités d'états vibrationnels peuvent s'écrire respectivement :

$$g_{protéine\ libre}(\omega) =$$

$$\left[g_{solvant+protéine}(\omega) - g_{cellule\ vide}(\omega)\right] - x \cdot \left[g_{solvant}(\omega) - g_{cellule\ vide}(\omega)\right]$$

et

$$g_{protéine\ adsorbée}(\omega) =$$

$$\left[g_{solvant+NP+protéine}(\omega) - g_{cellule\ vide}(\omega)\right] - y \cdot \left[g_{solvant+NP}(\omega) - g_{cellule\ vide}(\omega)\right]$$

Nous avons calculé les facteurs x = 0,88 et y = 0,86 qui prennent en compte le volume occupé par la protéine en solution et le rapport NP/eau de nos échantillons. Le volume spécifique de la myoglobine utilisé est de 0,741 mL/g (*30*). Cette approche permet de corriger des modifications éventuelles des propriétés de l'eau dans les mélanges NP/eau mais ne prend pas en compte l'impact de la couche d'hydratation de la myoglobine, qui devrait être de l'ordre du %, ce qui ne peut pas modifier notre analyse des données.

Pour comparer les données mesurées sur la myoglobine libre et adsorbée, les densités d'états vibrationnels g(ω) ont été normalisées à la quantité de myoglobine, ce qui peut être une source d'erreur. Pour minimiser cet effet, la concentration en myoglobine a été mesurée après dilution par spectroscopie visible avec une incertitude évaluée à 0,5% (voir §8). Pour les échantillons de myoglobine adsorbée sur les NP, la quantité de protéine a été mesurée par calcination et pesée sur trois échantillons différents, avec une incertitude évaluée à 0,5%.

Bibliographie

1. Benesch R., Benesch R. E., Yu C. I. (1968) Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 59*, 526-532.
2. Brunauer S., Emmett P. H., Teller E. (1938) Adsorption of gases in multimolecular layers, *Journal of the American Chemical Society 60*, 309-319.
3. Cai K. Y., Frant M., Bossert J., Hildebrand G., Liefeith K., Jandt K. D. (2006) Surface functionalized titanium thin films: Zeta-potential, protein adsorption and cell proliferation, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 50*, 1-8.
4. Doane T. L., Chuang C.-H., Hill R. J., Burda C. (2012) Nanoparticle zeta-potentials, *Accounts of Chemical Research 45*, 317-326.
5. Hunter R. (1981) *Zeta potential in colloid science*, New York.
6. Mathon M. H., de Novion C. H. (1999) From intensity to structure of materials, *Journal De Physique Iv 9*, 127-146.
7. Perutz M. F. (1968) Preparation of haemoglobin crystals, *Journal of Crystal Growth 2*, 54-56.
8. Jelkmann W., Bauer C. (1976) What is the best method to remove 2,3-diphosphoglycerate from hemoglobin, *Analytical Biochemistry 75*, 382-388.
9. Elantri S., Sire O., Alpert B. (1990) Relationship between protein solvent proton exchange and progressive conformation and fluctuation changes in hemoglobin, *Eur. J. Biochem. 191*, 163-168.
10. Sire O., Zentz C., Pin S., Chinsky L., Turpin P. Y., Martel P., Wong P. T. T., Alpert B. (1997) Long-range effects in liganded hemoglobin investigated by neutron and UV Raman scattering, FTIR, and CD spectroscopies, *Journal of the American Chemical Society 119*, 12095-12099.
11. Rossi-Fanelli A., Antonini E., Caputo A. (1958) Studies on the structure of hemoglobin I. Physicochemical properties of human globin, *Biochimica et Biophysica Acta 30*, 608-615.
12. Colonna G., Irace G., Parlato G., Aloj S. M., Balestrieri C. (1978) Effect of evolution on homologous proteins - Comparison between chromophore microenvironments of italian water buffalo (Bos bubalus L) and sperm whale apomyoglobin, *Biochimica et biophysica acta 532*, 354-367.
13. Nishii I., Kataoka M., Tokunaga F., Goto Y. (1994) Cold denaturation of the molten globule states of apomyoglobin and a profile for protein folding, *Biochemistry 33*, 4903-4909.
14. Nonoyama A., Garcia-Lopez A., Garcia-Rubio L. H., Leparc G. F., Potter R. L. (2011) Hypochromicity in red blood cells: an experimental and theoretical investigation, *Biomedical Optics Express 2*, 2126-2143.
15. Sober H. A. (1973) Handbook of biochemistry: selected data for molecular biology.
16. Banerjee R., Alpert Y., Leterrie.F, Williams R. J. P. (1969) Visible absorption and electron spin resonance spectra of isolated chains of human hemoglobin. Discussion of chain-mediated heme-heme interaction, *Biochemistry 8*, 2862-2867.
17. Antonini E. (1971) *Hemoglobin and myoglobin in their interactions with ligands*, Vol. 21, New York.
18. Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, *Environ. Health Perspect. 113*, 823-839.
19. Lemignon M. (2010) Régulation de la voie alterne du complément par le facteur H : élucidation de son assemblage avec C3b par marquage oxydatif et pontage chimique couplés à la spectrométrie de masse, Université d'Evry Val d'Essone.
20. Mortimer R. K., Johnston J. R. (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center, *Genetics 113*, 35-43.
21. Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry 72*, 248-254.
22. Mathé C., Devineau S., Aude J.-C., Lagniel G., Chédin S., Legros V., Mathon M. H., Renault J. P., Pin S., Boulard Y., Labarre J. (2013) Structural determinants for protein adsorption/non-adsorption to silica surface, *Submitted*.
23. Maillet I., Lagniel G., Perrot M., Boucherie H., Labarre J. (1996) Rapid identification of yeast proteins on two-dimensional gels, *J Biol Chem 271*, 10263-10270.
24. Profeat. http://jing.cz3.nus.edu.sg/cgi-bin/prof/prof.cgi.
25. Brunner E., Munzel U. (2000) The nonparametric Behrens-Fisher problem: Asymptotic theory and a small-sample approximation, *Biometrical Journal 42*, 17-25.
26. Hill A. V. (1913) The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide. I, *The Biochemical journal 7*, 471-480.

27. Giardina B., Amiconi G. (1981) Measurement of binding of gaseous and nongaseous ligands to hemoglobins by conventional spectrophotometric procedures, *Methods in Enzymology 76*, 417-427.
28. Bee M. (1988) *Quasielastic neutron scattering: principles and applications in solid state chemistry, biology and materials science*.
29. Zanotti J.-M. (2005) Vibrations et relaxations dans les molécules biologiques. Apports de la diffusion incohérente inélastique de neutrons, *J. Phys. 130*, 87-113.
30. Harding S. E. (1980) Viscosity parameters for myoglobin, *Ircs Medical Science-Biochemistry 8*, 610-610.

CHAPITRE 3
Caractérisation des nanomatériaux

Les nanomatériaux sont définis comme les matériaux ayant au moins une dimension inférieure à 100 nm. Ils sont séparés des matériaux micrométriques car leur petite taille leur confère des propriétés originales, comme une plus grande résistance mécanique (nanotubes de carbone) ou de nouvelles propriétés de fluorescence (quantum dots) et une plus grande réactivité grâce à un rapport surface/volume important, d'où leur utilisation pour la création de nouveaux catalyseurs ou biocapteurs de plus grande efficacité (*1*). Du point de vue biologique, leur petite taille pourrait conduire à leur incorporation et à leur internalisation après inhalation, ingestion ou contact, et leur grande réactivité peut induire des dommages aux cellules (*2-6*).

Cette nouvelle classe des nanomatériaux regroupe cependant des objets qui peuvent être très différents : un feuillet de graphène, une nanoparticule d'or, un quantum dot et une fibre de silice sont autant de nanomatériaux aux propriétés distinctes. Il existe des différences de géométrie : fibres (une dimension <100 nm), feuillets et nanotubes (deux dimensions <100 nm) et nanoparticules (trois dimensions <100 nm) ; de taille : de 1 à 100 nm ; de chimie : métaux, oxydes, polymères, lipides... ; ou encore de forme cristalline : carbone et diamant, anatase et rutile... Compte-tenu de leur diversité, il est important de caractériser au mieux les nanomatériaux étudiés, pour comprendre l'effet d'un paramètre en particulier, comme la surface ou la chimie, et permettre la comparaison des études entre elles (*7-9*).

Une autre interrogation liée à la diversité des nanomatériaux est celle des savoir si des propriétés communes à une famille de nanomatériaux, notamment en termes de toxicité, peuvent être définies et extrapolées à d'autres objets ou si au contraire chaque nanomatériau représente un système particulier et doit être étudié spécifiquement (*10*). Par exemple, si la toxicité des nanoparticules de silice amorphe de 20 nm est connue pour un type de cellules, peut-on extrapoler ces résultats aux nanoparticules de silice de 5 et 100 nm, ou aux nanoparticules de silice cristalline ?

La même question se pose pour l'étude des interactions entre protéines et NP. Par exemple, deux études montrent que la protéine étudiée, l'anhydrase carbonique ou le lysozyme, subit des modifications plus importantes sur les NP de silice de plus grande taille (*11, 12*). On serait alors tenter de dessiner une tendance selon laquelle une NP de silice de petite taille serait moins « agressive » pour une protéine qu'une NP de silice de grande taille. Cependant, la première étude

porte sur des NP de 6 et 15 nm tandis que la seconde analyse des NP de 20 et 200 nm. La nanoparticule de grande taille et de moindre effet de la première étude devient la nanoparticule de petite taille et de plus grand effet dans la seconde. Pour comprendre ce type de système, il est donc nécessaire de disposer de plus d'informations sur les propriétés des nanomatériaux et sur les interactions entre protéine et nanoparticules (*13*).

1. Quels critères pour caractériser les nanomatériaux ?

Pour étudier les interactions entre protéines et silice nanostructurée, nous avons choisi de travailler sur des nanoparticules de silice produites industriellement et dans une moindre mesure sur des verres de silice nanoporeuse. Avant d'étudier les interactions protéine-silice, nous devons caractériser nos nanomatériaux, mais selon quels critères ? La taille, la surface et la chimie sont-elles suffisantes ? L'étude des nanomatériaux est récente et des méthodes standards de caractérisation ne sont pas encore développées. Les fabricants fournissent certaines caractéristiques: en général la taille moyenne et la surface spécifique. Nous allons vérifier ces données et les compléter par d'autres informations qui nous paraissent nécessaires pour notre étude, notamment la charge et l'état d'agrégation en solution, mais quid des critères communs entre études ?

La nécessité de définir des critères communs de caractérisation des nanomatériaux a été mise en avant récemment par plusieurs scientifiques (*7, 10*). Ce travail a été suivi par la publication par l'OCDE d'une liste de 59 critères détaillée ci-dessous (liste diffusée par l'Anses) (*14, 15*). Si l'objectif de la thèse n'est pas de caractériser l'ensemble de ces critères, qui recouvrent des domaines très variés, les propriétés qui nous paraissaient les plus pertinentes pour notre étude ont été déterminées.

Liste des critères de caractérisation des nanomatériaux définie par l'OCDE
Les critères connus ou mesurés sur les NP silice sont indiqués en vert

Informations sur le nanomatériau, identification

- Nom
- Numéro CAS
- Formule structurelle / structure moléculaire
- Composition du nanomatériau testé
- Morphologie de base
- Description de la chimie de surface
- Principales utilisations commerciales
- Activité catalytique connue
- Méthode de production

Sûreté du matériau

- Inflammabilité
- Explosivité
- Incompatibilité

Propriétés physico-chimiques et caractérisation du matériau

- Agglomération / agrégation
- Solubilité dans l'eau
- Phase cristalline
- Pulvérulence
- Taille des cristallites

- Image(s) représentative(s) obtenue(s) par microscopie électronique à transmission
- Distribution des particules par taille
- Surface spécifique
- Potentiel zêta (charge de surface)
- Chimie de surface
- Activité photocatalytique
- Densité brute
- Porosité
- Coefficient de partage octanol-eau, s'il y a lieu
- Potentiel de réduction-oxydation
- Potentiel de formation de radicaux
- Autres informations pertinentes

Devenir dans l'environnement

- Stabilité de la dispersion dans l'eau
- Dégradabilité biotique
- Biodégradabilité facile
- Essai de simulation sur la dégradation ultime dans les eaux de surface
- Essai de simulation pour les sols
- Essai de simulation pour les sédiments
- Essai de simulation pour les eaux usées
- Identification du (des) produit(s) de dégradation
- Autres essais concernant le (les) produit(s) de dégradation si nécessaire
- Dégradabilité abiotique et devenir
- Hydrolyse, pour les nanomatériaux à surface modifiée
- Adsorption – désorption
- Adsorption dans les sols ou les sédiments
- Potentiel de bioaccumulation
- Autres informations pertinentes

Toxicologie environnementale

- Effets sur les espèces pélagiques (à court terme / à long terme)
- Effets sur les espèces sédimentaires (à court terme / à long terme)
- Effets sur les espèces pédologiques (à court terme / à long terme)
- Effets sur les espèces terrestres
- Effets sur les microorganismes
- Autres informations pertinentes

Toxicologie pour les mammifères

- Pharmacocinétique (ADME)
- Toxicité aiguë
- Toxicité à doses répétées

Dans la limite des informations disponibles :

- Toxicité chronique
- Toxicité pour la reproduction
- Toxicité pour le développement
- Toxicité génétique
- Expérience acquise concernant l'exposition humaine
- Autres données d'essai pertinentes

** Le numéro CAS est l'identifiant d'un produit chimique sur la banque de donnée Chemical Abstracts Service. La biodégradabilité « facile » est déterminée par un test où le matériau est incubé en aérobiose dans un milieu ensemencé avec différents microorganismes pendant 28 j. La dégradabilité abiotique correspond à un test d'hydrolyse en fonction du pH.*

Cette liste a l'avantage de mettre en évidence les nombreuses inconnues concernant les nanoparticules de silice que nous étudions, comme leur devenir dans l'environnement, leur toxicité chronique, l'effet d'une exposition humaine… En ce qui concerne leur manipulation, les nanomatériaux que nous avons utilisé ne sont ni inflammables, ni explosifs. Il s'agit majoritairement d'oxydes, alors que sont inflammables ou explosifs plutôt les nanoparticules métalliques. D'autre

part, les nanomatériaux sous forme de poudre sont manipulés sous hotte pour éviter une « exposition humaine » au laboratoire (voir chap. 2, §2).

2. Nanoparticules de silice

Deux types de nanoparticules ont été utilisés, afin de ne pas limiter notre analyse à un seul cas particulier. Nous avons étudié les fumées de silice, de taille 7 nm et produites par Sigma (référence S5130), et les nanoparticules de silice de 20 nm, également produites par Sigma (référence 637238). Les fumées de silice sont produites par la combustion à 1800°C du tétrachlorure de silicium. Les nanoparticules de silice de 20 nm sont synthétisées par la méthode sol-gel selon le procédé de Stöber, élaboré en 1968 et couramment employé pour la synthèse de particules de silice (*16*). La réaction est basée sur l'hydrolyse à température ambiante de tétraalkoxysilane (par exemple $Si(OCH_3)_4$ ou $Si(OC_2H_5)_4$ avec un groupement éthyle ou méthyle) réalisée dans une solution d'alcool et catalysée par l'ammoniaque. Les nanoparticules sont utilisées sans autre traitement.

Les procédés de synthèse sont différents et bien que toutes deux amorphes, les nanoparticules de silice sont hydrophiles (silanols SiOH en surface) tandis que les fumées de silice sont en principe hydrophobes (siloxane Si-O-Si en surface). Dans la suite du manuscrit, les fumées de silice seront désignées par « NP 7 nm » et les nanoparticules de 20 nm par « NP 20 nm ». Les tailles indiquées sont celles fournies par le fabricant et diffèrent légèrement des tailles mesurées, les résultats de la caractérisation sont détaillés dans la suite de ce chapitre.

2.1 Chimie de la silice colloïdale

La silice est un matériau qui a été largement étudié, aussi bien sous sa forme macroscopique que colloïdale, et de nombreuses données sont disponibles dans la littérature (*17*). Les informations qui me paraissent les plus importantes pour notre système, la cristallinité, la solubilité, la chimie de surface et la réactivité, sont résumées ci-dessous.

Cristallinité

Les nanoparticules de silice représentent simplement les plus petites particules de silice colloïdale, qui regroupe l'ensemble des particules de silice amorphe en suspension dans une solution, synthétisées dès le début du 20è siècle. Le caractère amorphe des NP de silice est lié à leur taille et aux procédés de synthèse. La silice amorphe en solution est très stable et aucune cristallisation n'a été observée à température ambiante sur des solutions au bout de 25 ans (*17*). Par ailleurs les

nanoparticules de silice étudiées ne présentent aucun plan de diffraction en microscopie électronique à transmission, elles sont donc bien amorphes.

Solubilité

La forme soluble de la silice est $Si(OH)_4$. Cependant, la silice est connue pour avoir une très faible solubilité dans l'eau. La solubilité du quartz, une des formes cristallines de la silice, est seulement de 11 ppm à 25°C (*17*). La dissolution complète d'un cristal requiert des conditions très agressives, soit par fusion alcaline à pH basique et haute température, soit par ajout d'acide fluorhydrique concentré. Toutefois, la solubilité de la silice amorphe dans l'eau est plus élevée et comprise entre 70 et 150 ppm à 25°C selon les études (*17*). D'autres critères, tels que la taille, la température et le pH de la solution peuvent également favoriser une plus grande solubilité des NP de silice (Fig. 3-1).

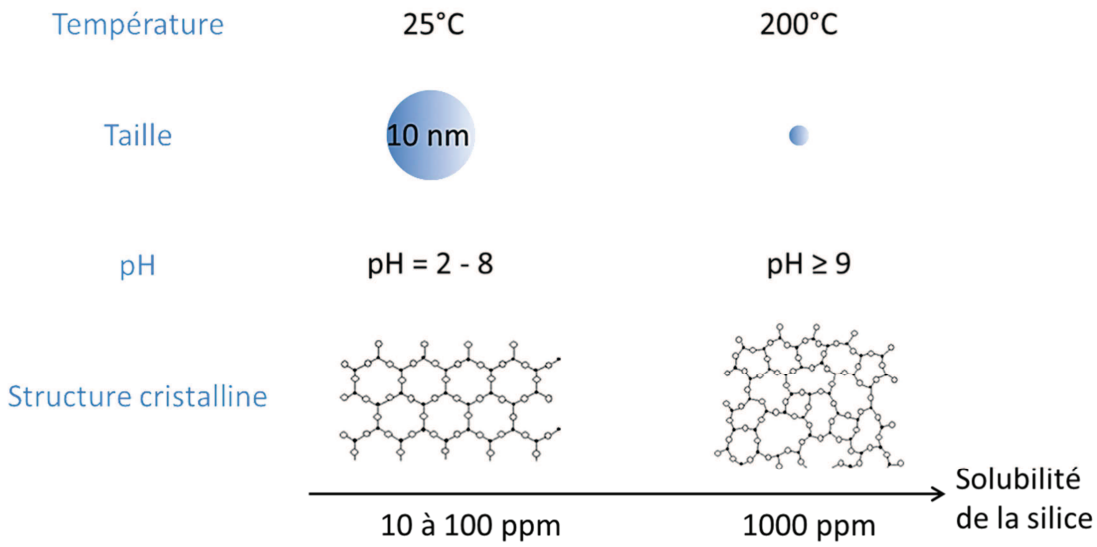


Figure 3-1. *Principaux paramètres influençant la solubilité de la silice dans l'eau*

La solubilité de la silice amorphe dépend du pH : constante de pH 2 à pH 8 autour de 100 ppm, elle augmente rapidement jusqu'à 1000 ppm à pH 11 (*17*). L'augmentation de la solubilité de la silice à pH basique s'accompagne de la déprotonation de $Si(OH)_4$ en $H_3SiO_4^-$ (pKa = 9,75) (eq. 1).

$$Si(OH)_4 + H_2O = H_3SiO_4^- + H_3O^+ \qquad \text{(eq. 1)}$$

Les NP de silice ne seront toutefois pas mises en solution à un pH supérieur à 9, ce qui devrait limiter l'augmentation de solubilité liée au pH.

La solubilité de la silice augmente également avec la température : elle est de 1000 ppm à 200°C à pH 7 (voir l'équation proposée par (*18*)). La température des solutions est comprise entre 4°C (stockage) et 37°C (mesure) pour notre étude, donc peu sensibles à la dissolution, à l'exception des

mesures de dénaturation en température de la myoglobine (T > 80°C) qui sont effectuées sur une durée plus courte (<3h).

La solubilité de la silice dépend de la taille des particules : plus les particules sont petites, plus la surface exposée est grande, ce qui favorise leur dissolution. Après dissolution, la silice peut reprécipiter au point de contact entre particules et créer une jonction entre deux particules agrégées (*17*). Ce processus favorise la dissolution des plus petites particules (< 5 nm) au profit de la croissance des plus grandes. La solubilité des NP de 3 nm de diamètre est ainsi 3 fois plus grande que celle des NP de 10 nm (*17*). De plus, lorsque la surface accessible est faible, $Si(OH)_4$ s'adsorbe sur les silanols ce qui ralentie nettement la réaction de dissolution (*16*), alors que ce mécanisme est peu efficace lorsque la surface développée est de plusieurs centaines de m^2/g.

La présence d'autres espèces en solutions, cations ou anions, peut également influencer la solubilité de la silice. L'acide phosphorique peut par exemple s'adsorber sur la surface de la silice et ralentir sa dissolution (*17*).

Dans nos conditions d'expériences, la solubilité de la silice est favorisée par le caractère amorphe et la petite taille des nanoparticules, mais est limitée par la température, le pH des solutions et un tampon concentré. D'autre part, le taux de dissolution de la silice amorphe dans l'eau à 25°C est de6.10^{-5} $\mu g.m^{-2}.s^{-1}$ (*19*). Pour une surface spécifique de 333 m^2/g (NP 7 nm) et de 168 m^2/g (NP 20 nm) et une solubilité moyenne de 100 ppm, l'équilibre de la solution sera atteint respectivement en 13h et 27h. La préparation préalable des suspensions de NP est donc suffisante pour travailler avec un système à l'équilibre. De plus, les contrôles négatifs réalisés en présence de NP mais sans adsorption des protéines (voir chap. 2, §5) ont montré que la silice dissoute n'avait pas d'influence sur notre système.

Chimie de surface

Au cœur du solide, la silice s'organise sous forme de tétraèdres - un atome de silicium est lié à 4 atomes d'oxygène - en créant un réseau plus ou moins structuré pour la silice cristalline ou amorphe. En surface, la silice forme des ponts siloxane Si-O-Si qui réagissent avec l'eau pour former des silanols SiOH. Différents types de silanols peuvent se former : silanols isolés, pontants (liés entre eux par une liaison hydrogène) et géminés (un atome de silicium porte deux fonctions OH) (Fig. 3-2).

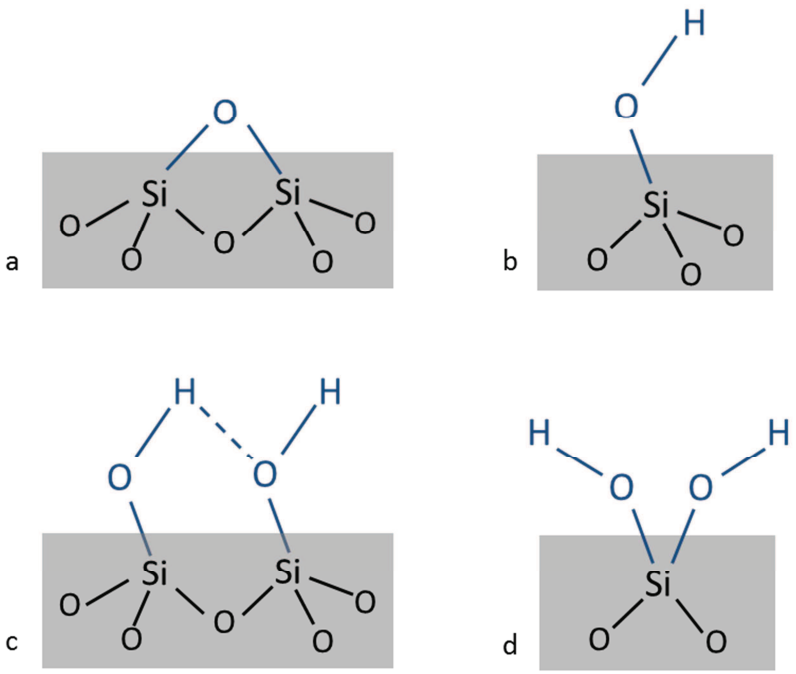


Figure 3-2. *Groupements réactifs à la surface de la silice : (a) pont siloxane, (b) silanol isolé, (c) silanol pontant, (d) silanol géminé.*

En milieu aqueux, les ponts siloxane s'hydrolysent en silanols : la surface est totalement hydroxylée et devient hydrophile. Pour identifier les groupements présents à la surface des NP de silice, les NP hydratées puis séchées à 150°C ont été analysées par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Fig. 3-3) (voir chap.2, §2.5).

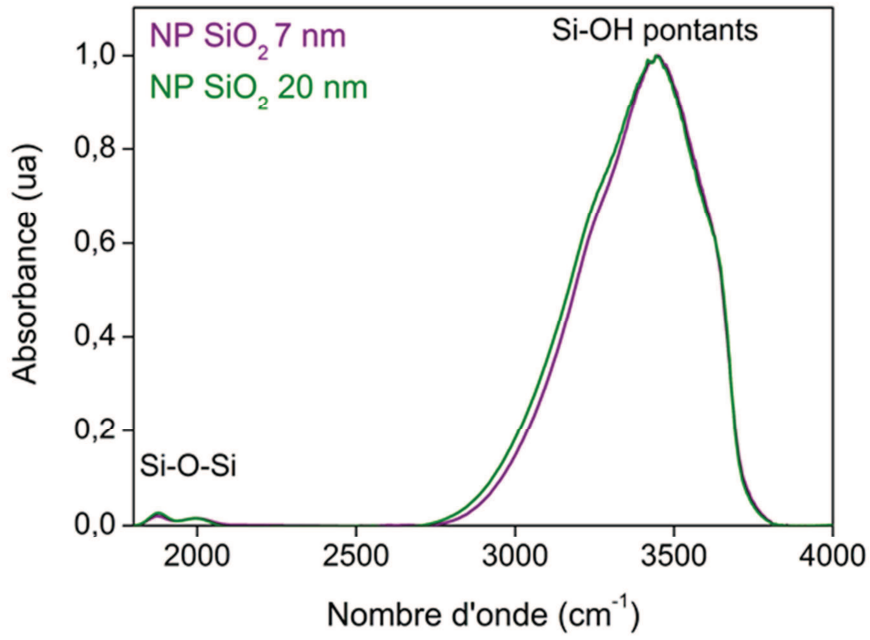


Figure 3-3*. Spectres infrarouge des nanoparticules de silice 7 nm (violet) et 20 nm (vert) après hydratation et séchage à 150°C*

La bande de vibration la plus intense de 2800 à 3800 cm^{-1} est associée à l'élongation de la liaison OH des silanols pontants(pic centré à 3545 cm^{-1}) et de l'eau physisorbée sur les silanols (3400 - 3500 cm^{-1}), tandis que les deux bandes de vibration les moins intenses à 1870 et 1990 cm^{-1} sont associées aux ponts siloxane Si-O-Si au cœur du matériau(*20*). Les bandes de vibration des silanols isolés et géminés situées entre 3600 cm^{-1}et 3700 cm^{-1}qui forment généralement un pic étroit bien visible ne sont pas présentes(*21*). Les silanols et l'eau adsorbée sont donc prédominants à la surface des NP de silice. La concentration moyenne en silanols est de 5 OH/nm² pour une surface totalement hydroxylée.

La méthode de synthèse des NP 7 nm (fumée de silice) conduit *a priori* à la formation d'une surface hydrophobe. L'hydrolyse quasi complète des ponts siloxane montre cependant que la surface des NP 7 nm est hydrophile après mise en solution et de chimie de surface très proche des celle des NP 20 nm. L'adsorption d'une monocouche de molécules d'eau se produit préférentiellement sur les silanols pontants, *via* la formation de nouvelles liaisons hydrogène (*22*) (Fig. 3-4).

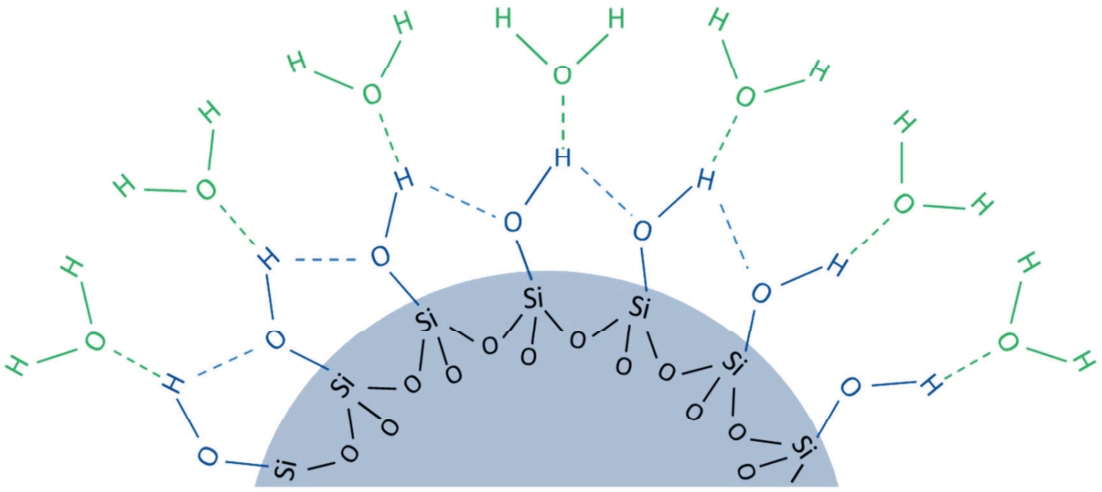


Figure 3-4. *Chimie de surface des NP de silice 7 et 20 nm : silanols pontants et eau adsorbée sur les silanols via des liaisons hydrogène*

La charge de surface de la silice est également liée aux groupements silanols, dont le pKa est de 7,0. Après déprotonation, les silanols forment des groupements SiO^- qui confèrent une charge négative à la surface de la silice (Fig. 3-5).

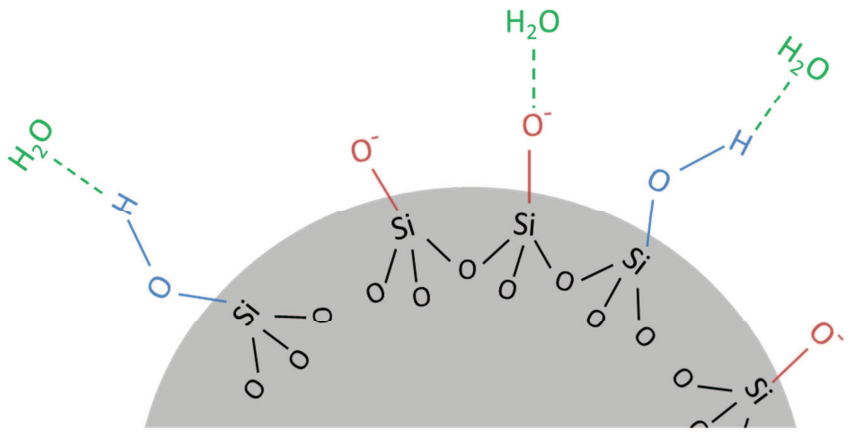

H2O
H2O
H2O
O-
O-
Si
Si
Si
Si
O
O
O

Figure 3-6. *Images en microscopie électronique à transmission des NP SiO_2 7 nm, relativement homogènes en taille (A, B) et des NP SiO_2 20 nm composées de deux populations de particules (C, D)*

Les NP de silice 7 nm forment un ensemble de particules de taille relativement homogène de 14 ± 2 nm de diamètre qui ont tendance à s'organiser en chaînes. Les NP de silice 20 nm sont par contre composées de deux populations de particules bien distinctes, l'une de taille inférieure à 10 nm de diamètre et l'autre de taille comprise entre 20 et 50 nm de diamètre, soit une distribution en taille bien plus large que les 20 nm spécifiés par le fabricant. Il est probable que les plus petites particules proviennent de la fragmentation des particules les plus grosses.

La taille des particules mesurée sur les images TEM est ensuite comparée à celle mesurée par diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) (Fig. 3-7) (voir chap. 2, §2.4).

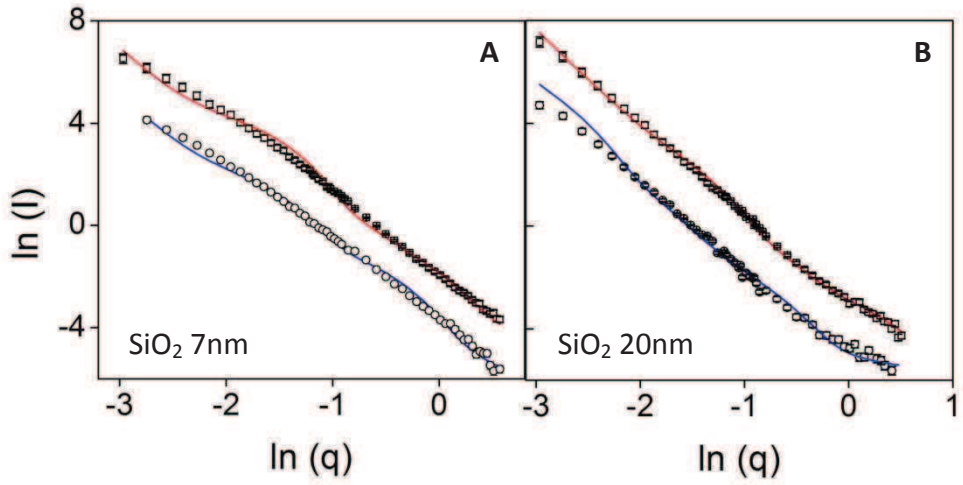


Figure 3-7*. Profils d'intensité mesurés en diffusion de neutrons aux petits angles sur NP SiO_2 7 nm (A) et sur NP SiO_2 20 nm (B) sur poudre (■) et en suspension à 30 mg/mL dans D_2O (●) ; modélisation par une distribution de particules sphériques (courbe rouge sur poudre, courbe bleue en suspension)*

Il est intéressant de comparer les résultats de deux mesures très différentes : la première méthode est basée sur les interactions entre électrons et atomes et l'échelle d'observation est un très petit échantillon de particules, tandis que la seconde méthode est basée sur les interactions entre neutrons et noyaux moyennées sur tout l'échantillon. La DNPA permet ainsi de déterminer à la fois la forme, la taille et la fraction représentée par chaque population de particules. Les mesures ont été réalisées par Marie-Hélène Mathon au Laboratoire Léon Brillouin (CEA-CNRS). Le facteur de forme qui représente au mieux les données est celui d'une sphère pour les NP 7 et 20 nm. L'ajustement de la fonction de distribution aux mesures permet d'identifier deux populations de particules pour les NP 7 nm, de diamètre 15 ± 2 nm et 4 ± 0.5 nm en proportions équivalentes. Les particules les plus grosses avaient bien été identifiées en TEM, tandis que les plus petites n'avaient

pas pu être discernées, probablement à cause de la formation d'agrégats. Deux populations de particules sont également identifiées pour les NP 20 nm, de diamètre 28 ± 4 nm pour 55% des particules et 3 ± 2 nm pour 45% des particules, ce qui correspond bien aux observations TEM.

La DNPA permet également de reproduire ces mesures sur des nanoparticules en suspension pour évaluer leur état d'agrégation en solution. La taille des objets reste inchangée pour les NP 7 nm ce qui indique qu'il n'y a pas d'agrégation de ces NP en suspension dans D_2O. Au contraire, une seule taille d'objet de 50 nm de diamètre est mesurée pour les NP 20 nm ce qui indique une agrégation des particules après mise en suspension (tableau 3-1).

	NP SiO_2 7 nm	NP SiO_2 20 nm
Taille (diamètre)	15 ± 2 nm (50%) 4 ± 2 nm (50%)	26 ± 6 nm (55%) 5 ± 2 nm (45%)
Agrégation en solution	Pas d'agrégation 16 ± 2 nm (50%) 5 ± 2 nm (50%)	Agrégation 50 ± 4 nm (100%)

Tableau 3-1. *Taille des nanoparticules de silice mesurée par TEM et par DNPA sur poudre et en solution (la fraction représentée par chaque population est indiquée)*

Toutefois, le domaine de mesure de la DNPA étant compris dans notre cas entre 0,5 et 50 nm il est possible que des agrégats ou des agglomérats de plus grande taille se soient formés mais ne soient pas détectés. La diffusion de lumière, a été utilisée pour vérifier la présence ou non d'objets de plus grande taille (voir chap.2, §2.3). Nous n'avons pas détecté d'agrégats de taille comprise entre 100 nm et 1 µm. Pour les NP 7 et 20 nm, la taille des agrégats reste donc bien inférieure à la limite de 100 nm, autrement dit les agrégats restent définis comme des nanomatériaux. Les mesures de diffusion de la lumière, non présentées ici, n'ont pas montré d'agrégation plus importante des NP de silice en tampon Phosphate.

Pour comparaison, les protéines étudiées, la myoglobine et l'hémoglobine, et les nanoparticules de silice 7 et 20 nm sont représentées à la même échelle (Fig. 3-8).

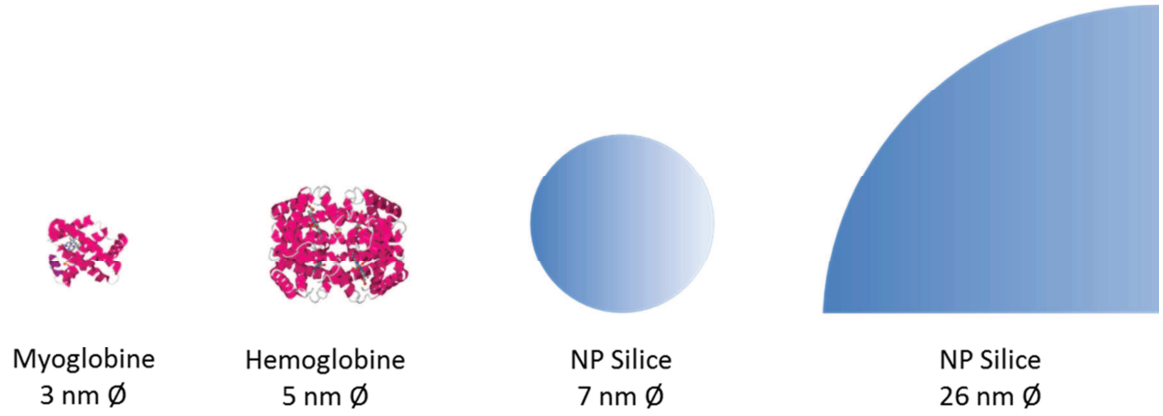


***Figure 3-8**. Représentation à la même échelle de la myoglobine (1A6N.pdb), de l'hémoglobine (1HHO.pdb) et des nanoparticules de silice 7 et 20 nm.Le diamètre moyen des protéines est calculé à partir du rayon de giration de la myoglobine (1,5 ± 0,1 nm (23)) et de l'hémoglobine (2,4 ± 0,1 nm (24)).*

Les tailles des NP sont celles mesurées en TEM et en DNPA. L'hémoglobine est ainsi du même ordre de grandeur que les NP de plus petite taille.

Il est possible que la présence de protéines en solution, puis leur adsorption, favorise (ou au contraire défavorise) l'agrégation des NP en solution (Fig. 3-9).

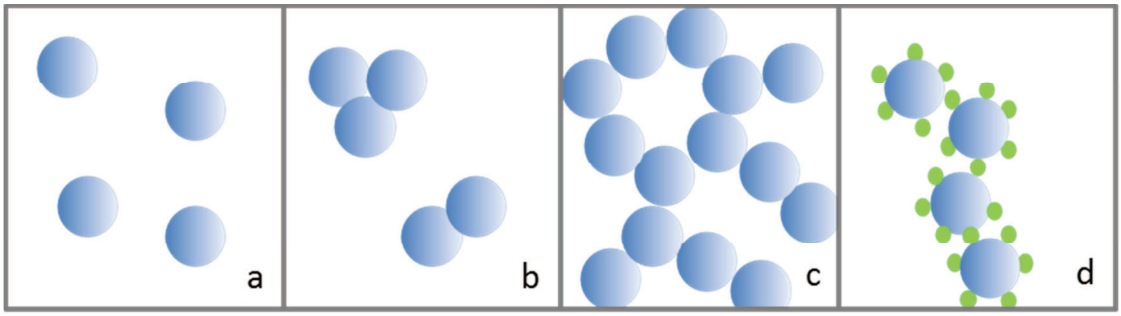


***Figure 3-9.**Interactions possibles entre nanoparticules en solution : (a) suspension, (b) agrégats, (c) gel, (d) agrégation par adsorption de protéines (en vert) d'après (25)*

En s'adsorbant sur les nanoparticules, les protéines peuvent dans certains cas créer des ponts entre particules et favoriser la formation d'un réseau de particules (*25*). L'utilisation d'argile pour « coller » les particules et les protéines présentes dans les vins lors de la clarification est une illustration de ce mécanisme (*26*). Nous n'avons pas observé d'agrégation des NP en présence des protéines.

La stabilité des suspensions a été évaluée par spectrophotométrie en mesurant la diffusion de la lumière par les NP à 200 nm. Les suspensions sont stables jusqu'à une dizaine de minutes avant décantation. Une simple agitation permet alors leur remise en suspension. Les expériences ont été

réalisées par la suite sous agitation douce ou sans agitation sur des temps courts lorsque cela était nécessaire, par exemple lors de l'acquisition de spectres UV-visible.

2.3 Surface spécifique

L'une des principales caractéristiques des nanoparticules est leur grande surface spécifique qui découle de leur petite taille, ce qui en fait un matériau de choix pour étudier des mécanismes d'adsorption. Une première estimation de la surface spécifique $S_{calculée}$ des NP de silice peut être faite à partir du diamètre d des particules mesuré en microscopie et en diffusion de neutrons (eq. 2)(*17*).

$$S_{calculée} = \frac{6.10^3}{\rho \cdot d} = \frac{2720}{d} \qquad \text{(eq. 2)}$$

La masse volumique ρ est estimée à 2,2 g/cm^3 pour la silice amorphe non poreuse. La surface spécifique calculée est S = 390 m²/g pour les NP 7nm et S = 165 m²/g pour les NP 20nm.

La surface spécifique des NP de silice a également été mesurée par sorption d'azote selon la méthode Brunauer-Emmett-Teller (BET) qui permet de relier la quantité d'azote adsorbée en monocouche à la surface spécifique du matériau (*27*) (Fig. 3-10) (voir chap. 2, §2.2). Les mesures ont été réalisées par Romain Dagnelie au L3MR (CEA).

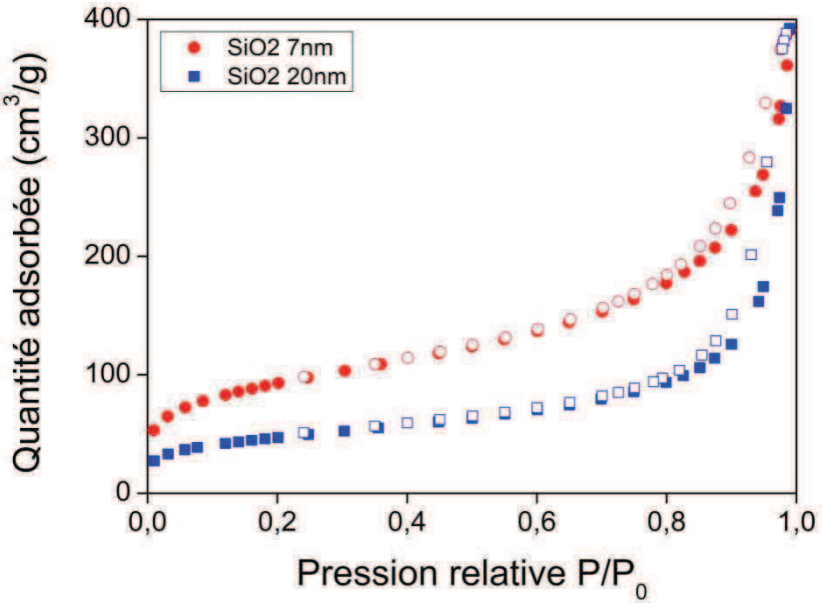


***Figure 3-10**. Isothermes de sorption d'azote pour les NP de silice 7 et 20 nm, composée d'une première phase d'adsorption (●, ■) et d'une seconde phase de désorption (o,□). La quantité d'azote adsorbée est exprimée en conditions STP, soit 273 K et 1 atm. P_0 est la pression saturante de N_2 (g) à 77 K.*

Les isothermes de sorption des NP de silice 7 et 20 nm sont de type II selon la classification IUPAC et présentent peu de différence entre la phase d'adsorption et de désorption (hystérésis) ; elles sont caractéristiques d'un matériau très peu poreux. La surface développée correspond donc à la surface externe. La surface spécifique calculée en appliquant le modèle BET est S_{BET} = 333 ± 17 m²/g pour NP 7 nm et S_{BET} = 168 ± 8 m²/g pour NP 20 nm (tableau 3-2).

Surface spécifique	NP SiO_2 7 nm	NP SiO_2 20 nm
S_{BET}	333 ± 17 m²/g	168 ± 8 m²/g
$S_{calculée}$	390 m²/g	165 m²/g

Tableau 3-2. *Comparaison de la surface spécifique des NP de silice calculée (eq. 2) et mesurée par sorption d'azote à l'aide du modèle BET*

La surface estimée à partir de la taille des particules est en bon accord avec les mesures BET, ce qui montre que la masse volumique estimée en l'absence de porosité et la taille des nanoparticules sont toutes deux cohérentes avec la surface spécifique mesurée.

2.4 Charge de surface

La charge de surface d'une particule n'est pas une grandeur mesurable, mais elle peut être estimée par le potentiel ζ généré par le déplacement des particules chargées dans un champ électrique (voir chap. 2, §2.3). Il dépend du pH, des espèces en solution et de la force ionique du milieu. Le potentiel ζ des NP de silice 7 et 20 nm dans les différents tampons utilisés est reporté dans le tableau 3-3.

Milieu	pH	Force ionique (mM)	Potentiel ζ (mV) NP SiO_2 7 nm	Potentiel ζ (mV) NP SiO_2 20 nm
BisTris-HCl	6	78	-4,2	-3,3
Phosphate	6	120	-14,4	-9,7
Phosphate	7,4	262	-20,4	-19,1
Tris-HCl	9	11	-35,4	-29,9

Tableau 3-3*. Potentiel ζ des NP de silice 7 et 20nm en fonction du pH et du tampon, à une concentration en tampon de 100mM*

Les nanoparticules de silice ont une charge de surface négative de pH 6 à pH 9, d'autant plus négative que le pH est élevé, ce qui est attendu puisque le point isoélectrique de la silice colloïdale (point de charge nulle) est à pH 2 (*8*). La charge des NP 7 nm est légèrement supérieure à celle des NP 20 nm. Dans les conditions proches des conditions physiologiques, c'est-à-dire en tampon

Phosphate à pH 7,4, les NP de silice 7 et 20 nm portent une charge de surface négative importante (SiO^-). La charge de surface a des conséquences sur la stabilité des nanoparticules en suspension et sur l'adsorption des protéines (voir chap. 4, §3.3).

En terme de stabilité, la théorie DLVO (du nom de leurs auteurs Derjaguin, Landau, Verway et Overbeek) prédit que plus une surface est chargée, plus la couche de contre-ions qui se forme sera importante, ce qui augmente la répulsion entre particules et limite leur agrégation (*28, 29*). Lorsque les NP de silice sont en suspension dans un tampon Phosphate par exemple, les ions Na^+ présents pourraient former une couche de contre-ions en interaction formée avec les groupements SiO^- de surface et augmenter la stabilité de la suspension en limitant l'agrégation des NP entre elles. Cependant, appliquée à la silice, la théorie DLVO n'est pas toujours vérifiée car la formation de la double couche dépend de la nature des cations en solution et de leur capacité à s'adsorber sur la silice et à former des complexes stables (*30*).

En termes d'interaction avec les protéines, plus la surface est chargée négativement plus les interactions électrostatiques avec les charges positives portées par les protéines devraient être favorisées. Les interactions électrostatiques sont en effet une composante importante des forces d'interactions entre protéines et surfaces hydrophiles (*31, 32*). Certaines protéines chargées négativement dans leur ensemble peuvent toutefois s'adsorber sur des surfaces négatives (*33*). Nous avons par exemple observé et mesuré l'adsorption de la sérum albumine bovine chargée globalement négativement à pH 7,4 sur les NP de silice 20 nm (voir chap. 4, §3).

3. Verres de silice nanoporeux

L'adsorption des protéines a également été étudiée sur des verres de silice de porosité contrôlée (CPG). Deux types de verres ont été utilisés, de porosité 8 et 50 nm en diamètre, appelés dans la suite de la thèse CPG 8 nm et CPG 50 nm. La taille de la porosité est du même ordre de grandeur que la taille des NP de silice étudiées, mais la géométrie du matériau est totalement inversée. D'autres effets, par exemple d'obstruction de la porosité, pourraient ainsi être observés lors de l'adsorption des protéines sur la silice nanostructurée.

Les CPG sont des verres borosilicatés de type Vycor® synthétisés à haute température (*34*), initialement développés par Haller comme support de chromatographie (*35*) et commercialisés par la société *CPG, Inc.*. Après traitement thermique, les CPG sont enrichis en silice (SiO_2 96%, B_2O_3 3%, Al_2O_3, ZrO_2 et Na_2O <1%) et présentent une grande porosité ouverte et interconnectée (Fig. 3-11).

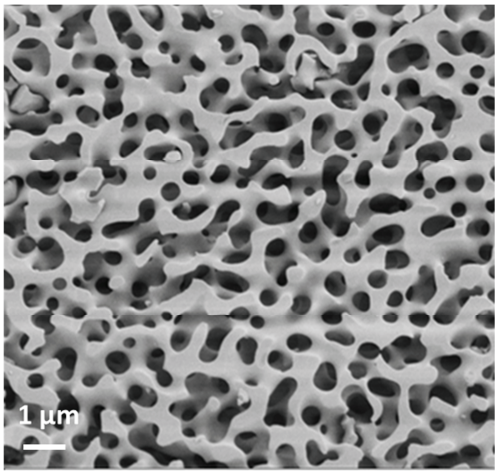


***Figure 3-11**. Image en microscopie électronique à balayage du verre de silice CPG de porosité 300 nm (36)*

Les CPG 8 et 50 nm ont été caractérisés par Patricia Rotureau, lors de sa thèse au Laboratoire de Radiolyse en 2004, par porosimétrie mercure, par adsorption d'azote et par microscopie électronique (*36*). Les principales caractéristiques des CPG sont simplement résumées dans le tableau ci-dessous (tableau 3-4) et complétées par l'analyse des groupements de surface après hydratation des CPG par spectroscopie infrarouge.

	CPG 8 nm	CPG 50 nm
Taille des particules	37 à 74 µm	37 à 74 µm
Porosité	8 nm	50 nm
Volume poreux	0,49 cm^3/g	1,09 cm^3/g
Surface spécifique	197 m^2/g	50 m^2/g
Domaine de stabilité	pH 4,5 à pH 8	pH 4,5 à pH 8

***Tableau 3-4**. Caractéristiques des verres de silice CPG 8 nm et CPG 50 nm (20, 36). Le domaine de stabilité indique la zone de pH sans augmentation de la solubilité des CPG.*

Le domaine de stabilité des CPG est bien adapté à notre étude. La porosité est bien homogène en taille et représente une surface développée supérieure à la surface externe des NP de silice 20 nm pour les CPG 8 nm, tandis que la surface spécifique des CPG 50 nm est nettement inférieure.

Les CPG 8 nm et 50 nm ont été analysés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier après mise en solution et séchage à 150°C pour identifier le type de groupements silanols en surface du matériau (Fig. 3-12).

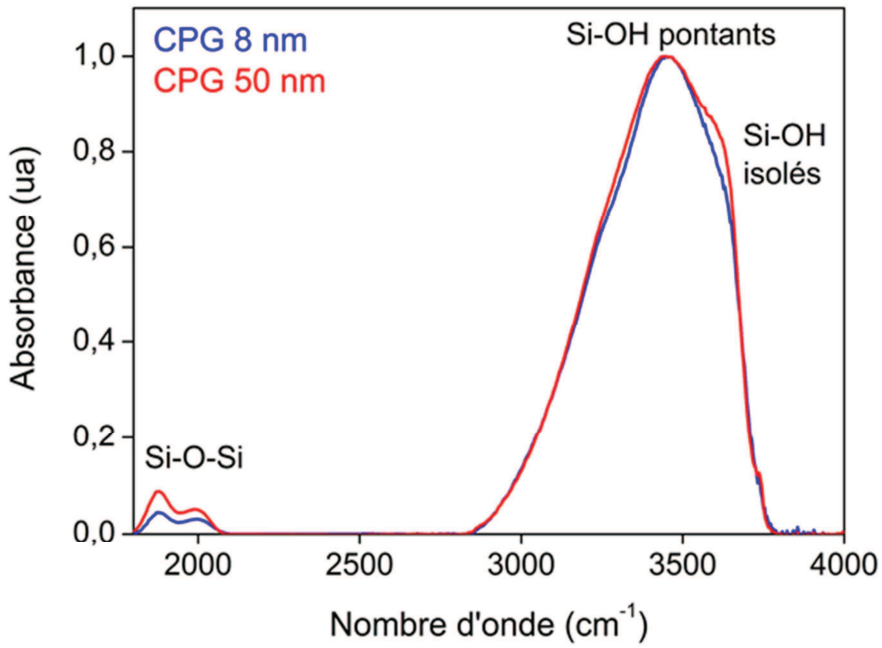


***Figure 3-12**. Spectres infrarouge des verres de silice CPG 8 nm (bleu) et CPG 50 nm (rouge) après mise en solution et séchage à 150°C*

Les deux bandes de vibration des ponts siloxane à 1870 et 1990 cm^{-1} sont celles de la structure interne de la silice. La bande de vibration dominante (2800-3800 cm^{-1}) est celle des silanols pontants et de l'eau physisorbée centrée à 3545 cm^{-1}, à la fois pour les CPG 8 nm et les CPG 50 nm. Un épaulement apparait à 3600 cm^{-1}, uniquement pour les CPG 50 nm. Il peut être associé à la bande de vibration des silanols isolés (*20*), qui seraient présents en faible quantité dans les CPG 50 nm et absents des CPG 8 nm. Une étude par RMN du proton sur les CPG 8 nm a montré que les silanols étaient relativement « espacés » entre eux, soit une distance moyenne entre deux silanols pontants de 2,9 à 3 Å, ce qui correspond à une liaison hydrogène relativement faible entre les silanols (*37*).

Plus la porosité est petite, plus les silanols sont proches, ce qui peut favoriser la formation de liaisons hydrogène entre silanols et pourrait expliquer que seuls les CPG 50 nm ont des silanols isolés dans leur porosité. La concentration moyenne en silanols de surface déterminée sur les CPG séchés à 400°C est de 3,8 OH/nm² pour les CPG 8 nm et 2 OH/nm² pour les CPG 50 nm (*20*). La surface interne des CPG 8 nm est donc quasiment deux fois plus riche en silanols que celle des CPG 50 nm, ce seul effet de concentration pouvant expliquer la présence de silanols isolés uniquement dans les CPG 50 nm.

La différence de taille de porosité entre CPG 8 nm et CPG et 50 nm conduit à des différences en termes de chimie de surface, une plus faible concentration en silanols des CPG 50 nm et la présence

de silanols isolés, qui pourraient également avoir un impact sur les interactions entre CPG et protéines (voir chap. 4, §3.1).

La charge de surface des CPG n'a pas pu être déterminée par zétamétrie en raison de la taille des particules (supérieure au µm). Cependant, les silanols étant dominants dans la surface interne des CPG, on peut en déduire que les CPG ont une charge de surface négative, tout comme les NP de silice, de pH 6 à pH 9, qui est la gamme de pH étudiée par la suite.

Les points clés

Les caractéristiques des nanoparticules de silice et des verres de silice nanoporeux étudiés sont résumées ci-dessous.

	NP SiO_2 7 nm	NP SiO_2 20 nm
Chimie de surface	hydrophile SiOH pontants eau adsorbée	hydrophile SiOH pontants eau adsorbée
Taille (diamètre)	15 ± 2 nm (50%) 4 ± 2 nm (50%)	26 ± 6 nm (55%) 5 ± 2 nm (45%)
Agrégation en solution	Pas d'agrégation 16 ± 2 nm (50%) 5 ± 2 nm (50%)	Agrégation 50 ± 4 nm (100%)
Surface spécifique	333 ± 17 m^2/g	168 ± 8 m^2/g
Porosité	aucune	aucune
Charge de surface (de pH 6 à pH 9)	Négative ζ = -20,4 mV à pH 7,4	Négative ζ = -19,1 mV à pH 7,4

	CPG 8 nm	CPG 50 nm
Chimie de surface	hydrophile SiOH pontants eau adsorbée	hydrophile SiOH pontants et isolés eau adsorbée
Taille (diamètre)	37 à 74 µm	37 à 74 µm
Porosité	8 nm	50 nm
Volume poreux	0,49 cm^3/g	1,09 cm^3/g
Surface spécifique	197 m^2/g	50 m^2/g

Nous avons utilisé l'ensemble de ces nanomatériaux pour étudier l'adsorption de différentes protéines modèles (voir chap. 4), puis nous avons choisi les nanoparticules de silice pour une étude plus approfondie de la structure, de la dynamique et de l'activité de l'hémoglobine et de la myoglobine adsorbées.

Bibliographie

1. Gupta M. N., Kaloti M., Kapoor M., Solanki K. (2011) Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization, *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol. 39*, 98-109.
2. Warheit D. B., Webb T. R., Colvin V. L., Reed K. L., Sayes C. M. (2007) Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics, *Toxicological Sciences 95*, 270-280.
3. Napierska D., Thomassen L. C. J., Lison D., Martens J. A., Hoet P. H. (2010) The nanosilica hazard: another variable entity, *Part. Fibre Toxicol. 7*.
4. Hussain S., Boland S., Baeza-Squiban A., Hamel R., Thomassen L. C. J., Martens J. A., Billon-Galland M. A., Fleury-Feith J., Moisan F., Pairon J.-C., Marano F. (2009) Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount, *Toxicology 260*, 142-149.
5. Brown D. M., Wilson M. R., MacNee W., Stone V., Donaldson K. (2001) Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines, *Toxicol. Appl. Pharmacol. 175*, 191-199.
6. Lundqvist M., Stigler J., Elia G., Lynch I., Cedervall T., Dawson K. A. (2008) Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105*, 14265-14270.
7. Auffan M., Rose J., Bottero J. Y., Lowry G. V., Jolivet J. P., Wiesner M. R. (2009) Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective, *Nat. Nanotechnol. 4*, 634-641.
8. Orts-Gil G., Natte K., Drescher D., Bresch H., Mantion A., Kneipp J., Osterle W. (2011) Characterisation of silica nanoparticles prior to in vitro studies: from primary particles to agglomerates, *J. Nanopart. Res. 13*, 1593-1604.
9. Thomassen L. C. J., Aerts A., Rabolli V., Lison D., Gonzalez L., Kirsch-Volders M., Napierska D., Hoet P. H., Kirschhock C. E. A., Martens J. A. (2010) Synthesis and characterization of stable monodisperse silica nanoparticle sols for in vitro cytotoxicity testing, *Langmuir 26*, 328-335.
10. Rivera Gil P., Oberdoerster G., Elder A., Puntes V., Parak W. J. (2010) Correlating physico-chemical with toxicological properties of nanoparticles: the present and the future, *Acs Nano 4*, 5527-5531.
11. Lundqvist M., Sethson I., Jonsson B. H. (2004) Protein adsorption onto silica nanoparticles: conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability, *Langmuir 20*, 10639-10647.
12. Vertegel A. A., Siegel R. W., Dordick J. S. (2004) Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme, *Langmuir 20*, 6800-6807.
13. Oberdorster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., Olin S., Monteiro-Riviere N., Warheit D., Yang H. (2005) Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy, *Part. Fibre Toxicol. 2*, 8-8.
14. OECD. (2008) List of manufactured nanomaterials and list od endpoints for phrase one of the OECD testing programme - ENV/JM/MONO(2008)13/REV, *Series on the safety of manufactured nanomaterials 6*.
15. AFSSET. (2008) Evaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement.
16. Stober W. (1967) Formation of silicic acid in aqueous suspensions of different silica modifications, *Advances in Chemistry Series*, 161-182.
17. Iler R. K. (1979) *The Chemistry of Silica*, John Wiley & Sons, New York.
18. Gunnarsson I., Arnorsson S. (2000) Amorphous silica solubility and the thermodynamic properties of H4SiO4 degrees in the range of 0 degrees to 350 degrees C at Psat, *Geochimica Et Cosmochimica Acta 64*, 2295-2307.
19. Seidel A., Lobbus M., Vogelsberger W., Sonnefeld J. (1997) The kinetics of dissolution of silica 'Monospher' into water at different concentrations of background electrolyte, *Solid State Ionics 101*, 713-719.
20. Le Caër S., Rotureau P., Brunet F., Charpentier T., Blain G., Renault J. P., Mialocq J.-C. (2005) Radiolysis of confined water: hydrogen production at a high dose rate, *ChemPhysChem 6*, 2585-2596.

21. Brodie-Linder N., Le Caer S., Alam M. S., Renault J. P., Alba-Simionesco C. (2010) H2 formation by electron irradiation of SBA-15 materials and the effect of CuII grafting, *Physical Chemistry Chemical Physics 12*, 14188-14195.
22. Iler R. K., Dalton R. L. (1956) Degree of hydration of particles of colloidal silica in aqueous solution, *Journal of Physical Chemistry 60*, 955-957.
23. Glandieres J. M., Calmettes P., Martel P., Zentz C., Massat A., Ramstein J., Alpert B. (1995) Solvent-induce structural distorsions of horse metmyoglobin, *Eur. J. Biochem. 227*, 241-248.
24. Antonini E. (1971) *Hemoglobin and myoglobin in their interactions with ligands*, Vol. 21, New York.
25. Bharti B., Meissner J., Findenegg G. H. (2011) Aggregation of silica nanoparticles directed by adsorption of lysozyme, *Langmuir 27*, 9823-9833.
26. Gougeon R. D., Soulard M., Miehé-Brendlé J., Chézeau J.-M., Le Dred R., Jeandet P., Marchal R. (2003) Analysis of two bentonites of enological interest before and after commercial activation by solid Na2CO3, *Journal of Agricultural and Food Chemistry 51*, 4096-4100.
27. Brunauer S., Emmett P. H., Teller E. (1938) Adsorption of gases in multimolecular layers, *Journal of the American Chemical Society 60*, 309-319.
28. Derjaguin B. V. (1941) *Acta Physicochim. USSR 14*, 633.
29. Verwey E. J. W. (1948) *Theory of stability of lyophobic colloids*, Amsterdam.
30. Matijevi.E. (1973) Colloid stability and complex chemistry, *Journal of Colloid and Interface Science 43*, 217-245.
31. Norde W., Lyklema J. (1978) Adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surfaces. 1. Adsorption isotherms. Effects of charge, ionic strength and temperature, *Journal of Colloid and Interface Science 66*, 257-265.
32. Andrade J. D., Hlady V. (1986) Protein adsorption and materials biocompatibility - a tutoralial review and suggested hypotheses, *Advances in Polymer Science 79*, 1-63.
33. Norde W. (2008) My voyage of discovery to proteins in flatland ... and beyond, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 61*, 1-9.
34. Elmer T. H. (1992) Porous and reconstruced glasses, In *Engineered Materials Handbook*, pp 427-432.
35. Haller W. (1965) Chromatography on glass of controlled pore size, *Nature 206*, 693-696.
36. Rotureau P. (2004) Etude de la radiolyse de l'eau en milieu poreux, Université d'Evry-Val d'Essonne.
37. Brunet F., Charpentier T., Le Caër S., Renault J. P. (2008) Solid-state NMR characterization of a controlled-pore glass and of the effects of electron irradiation, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance 33*, 1-11.

CHAPITRE 4
Mécanismes d'adsorption des protéines

Ce chapitre présente l'étude de l'adsorption des protéines sur la silice nanostructurée. Deux approches complémentaires ont été développées pour caractériser l'adsorption des protéines et comprendre les mécanismes d'interactions entre protéines et surface de silice : nous avons tout d'abord étudié les caractéristiques physico-chimiques de l'adsorption de protéines modèles sur la silice nanostructurée, puis nous avons étudié l'adsorption des protéines sur la silice à partir d'un extrait cellulaire de levure, contenant plusieurs milliers de protéines susceptibles d'interagir avec la surface.

D'après le modèle de Norde, l'adsorption des protéines sur une surface hydrophile est déterminée par la charge globale de la protéine et la charge de surface ainsi que par la stabilité interne des protéines, qui sont classées soit comme protéines « molles » et s'adsorbent dans toutes les conditions, soit comme protéines « dures » et ne s'adsorbent que lorsque les charges de la protéine et de la surface sont de signe opposé (*1*). Dans ce chapitre, nous présenterons notre étude de l'influence des paramètres de ce modèle, charge de la protéine et stabilité interne, sur l'adsorption de protéines modèles sur la silice. Nous avons également pris en compte un paramètre qui n'apparaît dans aucun modèle d'adsorption : le caractère monomérique ou oligomérique des protéines adsorbées. L'adsorption pourrait par exemple être facilitée par les mouvements des sous-unités les unes par rapport aux autres.

Les protéines modèles que nous avons étudiées sont la myoglobine, l'apomyoglobine, l'hémoglobine et la sérum albumine, protéines globulaires, monomériques ou oligomériques, de charge et de stabilité différente.

D'après Czeslik (voir chap. 1), la stabilité interne des protéines lors de l'adsorption est définie par leur température de dénaturation (*2*): la myoglobine (T_d = 74°C) et l'hémoglobine (T_d = 69°C) sont définies comme des protéines « dures » tandis que la sérum albumine (T_d = 57°C (*3*)) est définie comme une protéine « molle ». De plus, pour étudier l'effet de la stabilité des protéine lors de l'adsorption, sans modifier la structure de la protéine, la myoglobine a été modifiée afin de diminuer sa stabilité interne en enlevant l'hème : l'apomyoglobine est une protéine très « molle » ($T_d \approx$ 30°C (*4*)) de structure identique à celle de la myoglobine (*5*).

Myoglobine et sérum albumine se distinguent également par leur point isoélectrique : dans nos conditions d'étude de pH 6 à pH 9, la sérum albumine est globalement chargée négativement (pI = 4,7 (*3*)) tandis que la myoglobine est chargée positivement ou négativement en fonction du pH (pI = 7,2 (*6*)). L'adsorption de l'hémoglobine et de la myoglobine sur la silice est comparée pour déterminer si l'organisation en tétramère de la molécule modifie l'adsorption de la protéine sur la surface.

Pour prendre en compte l'effet du matériau (nature, courbure, taille, géométrie), l'adsorption des protéines modèles a été étudiée sur différentes silices nanostructurées : silices nanoporeuses (pores de 8 nm et 50 nm de diamètre) et nanoparticules de silice (de 7 nm et 20 nm de diamètre). La silice présente une surface hydrophile chargée négativement dans toutes nos conditions de mesure (voir chap.3, §2.4). Dans le cadre de cette étude, nous ne nous sommes pas intéressés aux interactions entre protéines et surfaces hydrophobes qui présentent des spécificités différentes (*7*).

La quantité de protéine adsorbée et la constante d'adsorption, qui caractérisent l'adsorption des protéines sur la silice, sont déterminées à partir des isothermes d'adsorption, à l'aide d'un modèle d'adsorption dont l'utilisation est discutée. Pour aller plus loin et étudier les mécanismes d'adsorption, d'autres informations sont nécessaires. Les paramètres thermodynamiques de l'adsorption de la myoglobine sur les nanoparticules de silice ont été déterminés par titration calorimétrique isotherme (ITC). Ils permettent de proposer différents mécanismes d'adsorption de la myoglobine sur la surface de silice.

Il est bien sur possible de déterminer une échelle d'affinité sur des protéines isolées : à partir des résultats de la première partie, deux protéines d'affinité différentes pour les nanoparticules de silice, la sérum albumine et l'hémoglobine, ont été mises en compétition lors de l'adsorption. Cependant, ce type d'étude se limite à quelques protéines modèles. Pour étudier un plus grand nombre de protéines sans *a priori* et identifier « à l'aveugle » les paramètres structuraux pertinents, une nouvelle approche est nécessaire. La seconde partie de ce chapitre est consacrée aux différences d'affinité entre protéines pour une même surface. A partir d'un extrait cellulaire de levure, les protéines adsorbées et non adsorbées sur les nanoparticules de silice 20 nm ont été identifiées, parmi une population de protéines, par électrophorèse bidimensionnelle. Le grand nombre de protéines impliquées a permis une analyse statistique comparative entre protéines adsorbées et non adsorbées. Les critères structuraux à l'origine de l'affinité et donc de l'adsorption des protéines sur une surface de silice peuvent être proposés. Ces résultats pourraient être utilisés dans un modèle de prédiction de l'adsorption de protéines sur une surface à partir d'un milieu biologique. Les critères identifiés sur l'extrait cellulaire de levure sont comparés aux observations réalisées sur les protéines

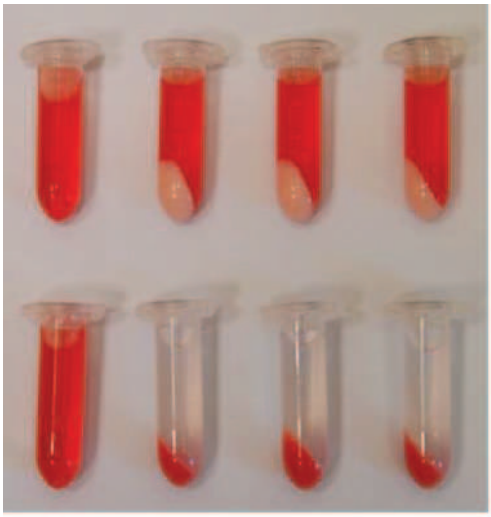
modèles. Enfin ces résultats sont discutés en regard des modèles actuels d'adsorption des protéines sur les surfaces.

A la différence des chapitres suivants, nous avons ouvert à un grand nombre de système notre étude de l'adsorption des protéines (myoglobine, apomyoglobine, hémoglobine, sérum albumine, protéines de levure) sur la silice nanostructurée (silice nanoporeuse et nanoparticules de silice). Pour l'étude plus spécifique de la structure (chap. 5), de la dynamique (chap. 6) et de l'activité (chap. 7) des protéines adsorbées, plus délicate à mettre en œuvre, nous avons choisi deux systèmes modèles d'intérêt : la myoglobine adsorbée sur les NP de silice 7 nm et l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice 20 nm.

1. Isothermes d'adsorption

L'étude expérimentale de l'adsorption des protéines sur la silice nanostructurée est présentée dans ce paragraphe à partir de trois exemples : adsorption de l'hémoglobine et de la myoglobine sur les NP de silice et adsorption de la sérum albumine sur la silice nanoporeuse.

Avant toute approche quantitative, nous pouvons noter que l'adsorption des hémoprotéines est un phénomène facilement observable à l'œil nu. L'hémoglobine est mise en contact avec les NP de silice dans deux solutions tamponnées à pH 6 et à pH 9. Après agitation et centrifugation, le surnageant est coloré s'il y a des protéines libre en solution et le culot n'est coloré que s'il y a des protéines adsorbées aux NP (Fig. 4-1).



	Concentration NP SiO2 20nm (mg/mL)			
Tampon Tris-HCl pH 9	0	30	34	36
Tampon BisTris-HCl pH 6	0	30	34	36

***Figure 4-1**. Photographie de solutions contenant hémoglobine (50 µM) et nanoparticules de silice 20 nm en tampon Tris-HCl 100 mM à pH 9 (en haut) et BisTris-HCl 100 mM à pH 6 (en bas) après centrifugation*

Cette première observation montre très clairement que l'hémoglobine ne s'adsorbe pas ou peu sur les NP de silice 20 nm à pH 9 en tampon Tris-HCl et au contraire s'adsorbe totalement ou presque sur les NP à pH 6 en tampon BisTris-HCl puisque la solution devient incolore après centrifugation.

De la même façon, l'adsorption de la myoglobine sur la silice nanoporeuse CPG 8 nm peut être facilement observée après décantation des particules (Fig. 4-2).

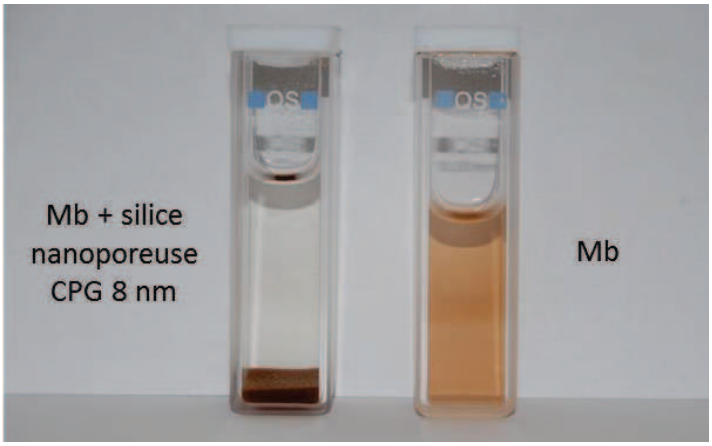


Figure 4-2. *Photographie d'une solution de myoglobine libre (C_{Mb} = 40 µM) (à droite) et en présence de silice nanoporeuse CPG 8 nm (m = 150 mg) (à gauche) en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 après décantation des particules*

Pour quantifier l'adsorption des protéines sur la silice, les isothermes d'adsorption de la myoglobine, de l'hémoglobine et de la sérum albumine sur la silice nanostructurée ont été mesurées à l'équilibre. Pour déterminer le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre, la quantité d'hémoglobine et de myoglobine adsorbée sur les NP de silice 7 et 20 nm a été mesurée pour des temps de contact de 1h, 4h et 16h en fonction de la concentration en NP. Les résultats sont présentés pour l'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice 7 nm en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 (Fig. 4-3). La quantité d'hémoglobine adsorbée est exprimée en pourcentage par rapport à la quantité en solution.

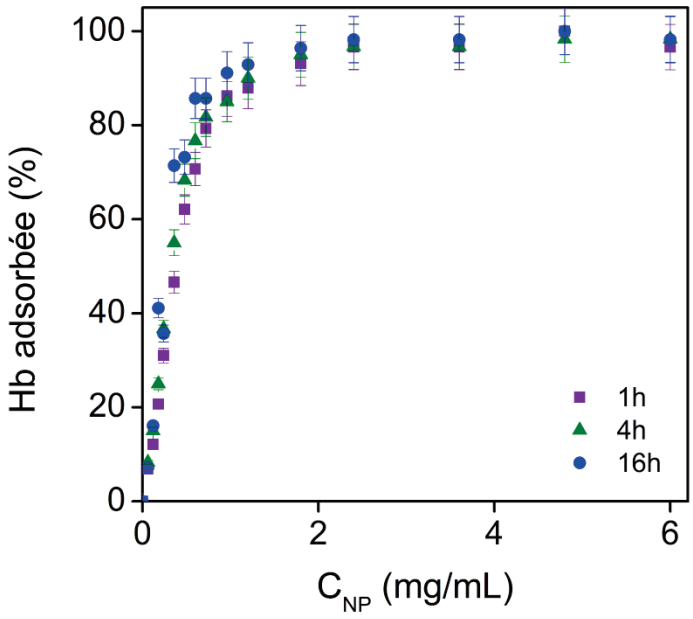


Figure 4-3. *Pourcentage d'hémoglobine adsorbée (C_{Hb} = 3,8 µM) sur les nanoparticules de silice 7 nm en fonction de la concentration en NP et du temps de contact : 1h (■), 4h (▲), 16h (●), en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4*

Aucune différence d'adsorption de l'hémoglobine n'est visible entre un temps de contact de 1h à 16h, quelle que soit la concentration en NP. Une adsorption plus faible (d'environ 10%) a toutefois été observée pour la myoglobine entre 1h et 4h. Même s'il est possible que l'équilibre soit atteint plus rapidement pour certains systèmes, nous avons choisi un temps de 4h avant la mesure des isothermes pour assurer l'équilibre des différents systèmes étudiés.

Les isothermes d'adsorption représentent la quantité de protéine adsorbée en fonction de la concentration en protéine libre en solution. Un exemple typique est présenté pour l'hémoglobine (Fig. 4-4), la myoglobine (Fig. 4-5) et la sérum albumine (Fig. 4-6).

La quantité de protéine adsorbée est exprimée en mg/m² plutôt que par gramme de silice, car la surface spécifique est le paramètre le plus significatif pour les nanomatériaux puisque leur réactivité est liée à leur grande surface spécifique. Cela permet également de comparer directement l'adsorption sur différents types de nanomatériaux (*8, 9*).

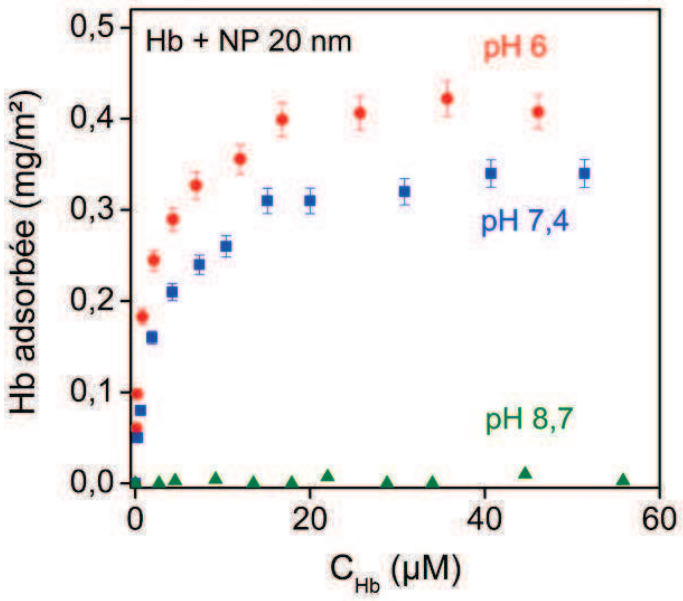


Figure 4-4. *Isothermes d'adsorption de l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice 20 nm (C_{NP} = 4,5 mg/mL) à 25°C en tampon 100 mM BisTris-HCl à pH 6 (●), à Phosphate à pH 7,4 (■) et Tris-HCl à pH 8,7 (▲)*

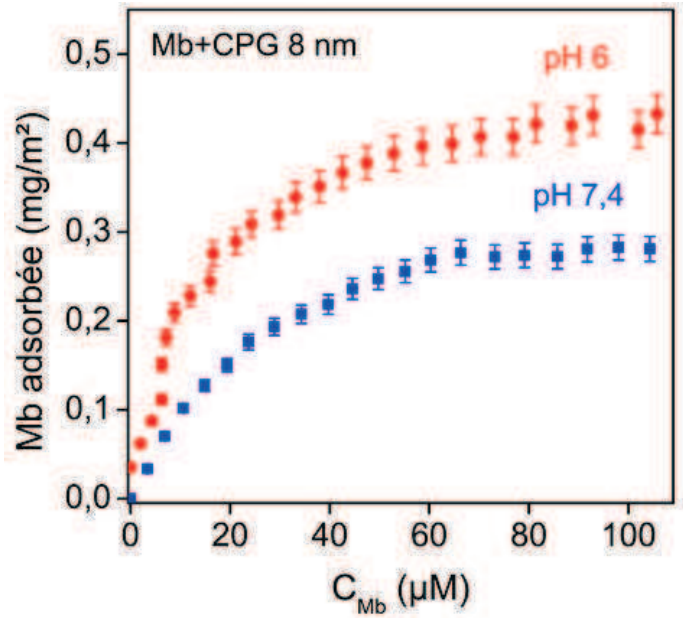


Figure 4-5. *Isothermes d'adsorption de la myoglobine sur la silice nanoporeuse CPG 8 nm en tampon 100 mM BisTris-HCl à pH 6 (●) et Phosphate à pH 7,4 (■)*

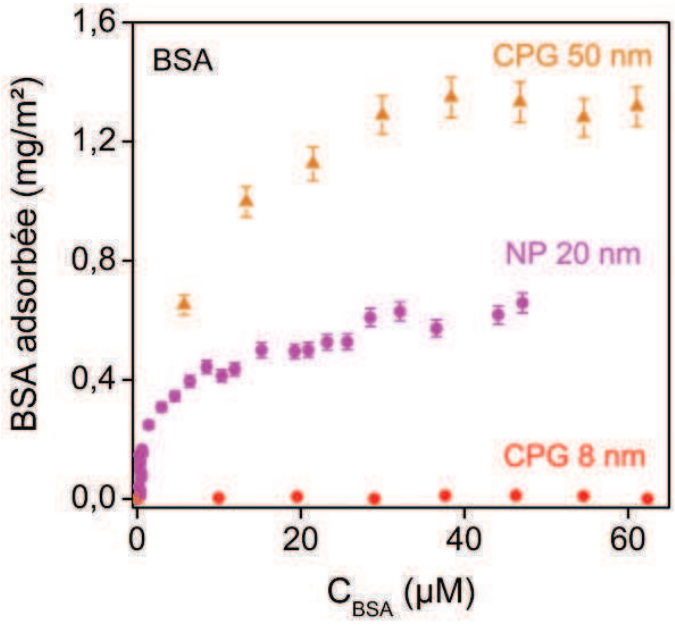


Figure 4-6. *Isothermes d'adsorption de la BSA sur la silice nanoporeuse CPG 8 nm (●), CPG 50 nm (▲) et nanoparticules de silice 20 nm (●) en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6*

La quantité de protéine adsorbée à saturation peut être lue directement sur l'isotherme au niveau du plateau. De grandes différences sont observées entre protéines : la sérum albumine s'adsorbe en quantité plus importante que l'hémoglobine sur les NP de silice 20 nm à pH 6 par exemple, mais aussi pour une même protéine en fonction du type de silice : la sérum albumine s'adsorbe fortement sur les CPG 50 nm et ne s'adsorbe pas sur les CPG 8 nm, et en fonction du pH de la solution : l'hémoglobine ne s'adsorbe par sur les NP de silice 20 nm en tampon Tris-HCl 100 mM à pH 8,7.

Les isothermes présentées ci-dessus ne sont que quelques exemples. Une étude systématique de l'influence des conditions (silice, protéine, pH, tampon) sur l'adsorption a été réalisée pour permettre leur comparaison. Les résultats sont présentés dans le paragraphe 3.

Un second paramètre, la constante d'adsorption de la protéine sur la surface, peut être déduit des isothermes d'adsorption, mais il faut pour cela appliquer un modèle d'adsorption aux données. Plusieurs modèles décrivent l'adsorption d'une molécule sur une surface mais ne s'appliquent pas nécessairement à l'adsorption d'une protéine sur une surface. Les modèles les plus couramment utilisés sont présentés dans le paragraphe suivant, puis le modèle le plus adapté sera utilisé pour analyser les isothermes d'adsorption mesurées.

2. Modèles d'isothermes appliqués à l'adsorption des protéines

L'adsorption des protéines sur les nanoparticules peut être étudiée dans le cadre plus général de l'adsorption de molécules sur une surface. L'utilisation de modèles pour reproduire les isothermes d'adsorption mesurées permet d'une part de déterminer un nouveau paramètres de l'adsorption, la constante d'adsorption, et d'autre part d'étudier l'adéquation entre l'adsorption représentée par le modèle, par exemple monocouche ou multicouche, et la mesure. Des modèles à deux paramètres permettent de reproduire les isothermes d'adsorption mesurées expérimentalement.

L'adsorption des protéines sur une surface est le plus souvent représentée par le modèle de Langmuir (*10-14*), développé initialement pour l'adsorption de molécules de gaz, bien que toutes les hypothèses du modèle initial ne soient pas toujours vérifiées : l'adsorption est irréversible dans de nombreux cas et les interactions latérales entre protéines ne peuvent pas être exclues. D'autres modèles d'adsorption sont rarement testés.

Les modèles d'isothermes à deux paramètres utilisés dans la littérature et que nous avons choisis de tester sont l'isotherme de Freundlich (1906) (*15*), de Langmuir (1918) (*16*), de Temkin-Pyzhev (1939) (*17*), de Dubinin-Radushkevic (1947) (*18, 19*), de Halsey (1948) (*20*) et de Jovanovic (1969) (*21*). D'autres isothermes qui s'appliquent préférentiellement aux gaz, comme l'isotherme BET (*22*), ne seront pas discutées ici. Les modèles testés se répartissent en trois grandes catégories : modèle d'adsorption en monocouche (isothermes de Langmuir et de Jovanovic), modèle d'adsorption en multicouche (isothermes de Freundlich et de Halsey) et modèle d'adsorption basé sur l'échange d'énergie entre molécule et surface (isothermes de Temkin-Pyzhev et de Dubinin-Radushkevic). Une distinction est faite également entre adsorption sur une surface homogène (isothermes de Langmuir, de Jovanovic et de Halsey) et sur une surface hétérogène (isothermes de Freundlich, Temkin-Pyzhev et Dubinin-Radushkevic). Par ailleurs tous ces modèles supposent qu'il n'y a pas d'interactions latérales entre les molécules adsorbées.

Les modèles utilisés le plus couramment pour décrire l'adsorption des protéines sur une surface sont le modèle de Langmuir qui peut être appliqué à l'adsorption de molécules à partir d'une solution diluée (*23*) et l'isotherme de Freundlich qui décrit de façon empirique l'adsorption de molécules lorsque différents sites de fixation sont impliqués. Le modèle de Temkin-Pyzhev semble également bien s'ajuster aux isothermes d'adsorption des protéines sur une surface (*24*).

Il existe également des modèles d'isotherme d'adsorption à trois paramètres. Cependant, si les modèles d'adsorption à deux paramètres permettent d'obtenir un bon ajustement entre modèle et données expérimentales, il ne paraît pas nécessaire d'ajouter un paramètre. Cela diminue également

le sens physique donné aux paramètres calculés : par exemple, dans le modèle à trois paramètres de Langmuir-Freundlich, une constante supplémentaire est ajoutée pour permettre un meilleur ajustement aux données sans que cela corresponde à une donnée physique.

Le modèle de Langmuir représente le cas idéal de l'adsorption réversible d'une monocouche de molécules sans interactions entre elles sur des sites de fixation identiques (Fig. 4-7).

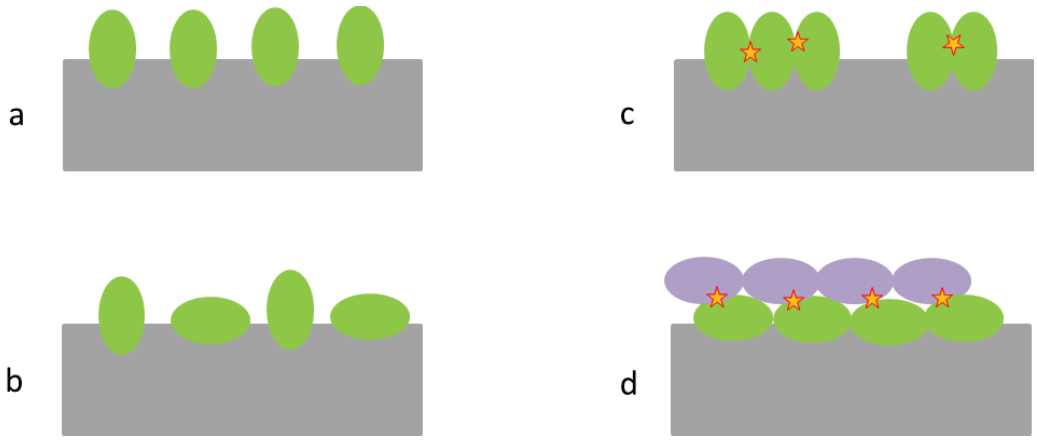


Figure 4-7. *Schéma de l'adsorption de molécules sur une surface plane : (a) cas idéal d'une adsorption monocouche sur une surface homogène (isothermes de Langmuir et de Jovanovic), (b) adsorption monocouche sur une surface hétérogène (isothermes de Freundlich, de Temkin-Pyzhev et de Dubinin-Radushkevic), (c) adsorption avec interactions latérales et regroupement des molécules sur la surface, (d) adsorption multicouche (isotherme de Halsey)*

L'expression mathématique du modèle de Langmuir est donnée par l'équation 2. Elle décrit l'équilibre entre molécules adsorbées et molécules libres, par exemple pour une protéine (notée P) en interaction avec les nanoparticules de silice (eq. 1). Les quantités adsorbées sont exprimées par gramme de solide. Une relation équivalente est obtenue en fonction de la masse de protéine adsorbée et les concentrations massiques.

$$P_{libre} + SiO_2 = P_{adsorbée} \qquad \text{(eq. 1)}$$

$$n_{ads} = \frac{n_{\infty} * K_{ads} * C}{1 + K_{ads} * C} \qquad \text{(eq. 2)}$$

avec C la concentration en protéine libre à l'équilibre (mol/L), n_{ads} la quantité de protéine adsorbée par gramme de solide (mol/g_{NP}), n_{∞} la quantité maximale de protéine adsorbée par gramme de solide et K_{ads} la constante d'adsorption du modèle (L/mol). K_{ads} n'est donc pas formellement une constante d'équilibre, car l'adsorption de la myoglobine n'est pas le seul processus à l'œuvre. En effet, elle implique une désolvatation simultanée de la surface : les molécules d'eau initialement

adsorbées sur la surface sont déplacées vers la solution (eq. 3). K_{ads} est alors le rapport entre la constante d'équilibre de cette réaction et l'activité de l'eau (eq. 4) (*23*). Pour des solutions diluées, la valeur numérique de la constante d'équilibre est donc assimilable à celle de K_{ads}, seule l'unité change.

$$P_{solution} + H_2O_{adsorbée} = P_{adsorbée} + H_2O_{solution} \quad \text{(eq. 3)}$$

$$K_{ads} = \frac{K}{a_{H_2O}} \quad \text{(eq. 4)}$$

Les relations associées à chaque modèle d'isotherme sous leur forme massique sont présentées ci-dessous (tableau 4-1).

Isothermes	Expression
Langmuir (*16*)	$m_{ads} = \frac{m_\infty * K_{ads} * C}{1 + K_{ads} * C}$
Freundlich (*15*)	$m_{ads} = a \cdot C^{1/n}$
Jovanovic (*21*)	$m_{ads} = m_\infty(1 - e^{-K_J * C})$
Temkin-Pyzhev (*17*)	$m_{ads} = \frac{RT}{b_T}\ln(K_T C)$
Dubinin-Radushkevic (*19*)	$m_{ads} = m_D \cdot exp\left[-b_D \cdot \left(RT * \ln(1 + 1/C)\right)^2\right]$
Halsey (*20*)	$m_{ads} = \left(\frac{K_H}{C}\right)^{1/n}$

Tableau 4-1. *Modèles d'isothermes à deux paramètres étudiés et expression mathématique pour une concentration massique en molécule adsorbée*

Les isothermes de Temkin-Pyzhev et de Dubinin-Radushkevic sont toutes deux basées sur la variation d'énergie lors de l'adsorption de molécules sur une surface et dépendent de la température T. Alors que les autres modèles dépendent de la quantité de molécules adsorbées et de la constante d'adsorption, les isothermes de Temkin-Pyzhev et de Dubinin-Radushkevic dépendent de la constante d'adsorption, de l'énergie d'adsorption et de la température. Dans l'isotherme de Temkin-Pyzhev, le paramètre b_T de l'équation représente une variation d'énergie en J/mol. D'après ce modèle, si ce paramètre est positif, alors l'adsorption est exothermique. Dans l'isotherme de Dubinin-Radushkevic, le paramètre b_D (J/mol) est directement relié à l'énergie libre d'adsorption (eq. 5) (*25*):

$$E = \frac{1}{\sqrt{2b_D}} \quad \text{(eq. 5)}$$

Les différents modèles ont été appliqués aux isothermes d'adsorption de la myoglobine sur les nanoparticules de silice 7 nm et de l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice 20 nm, afin de vérifier l'ajustement des modèles à deux systèmes différents. Ces deux systèmes ont été choisis car ils présentent un comportement différent lors de l'adsorption et les données sont de bonne qualité pour tester les modèles.

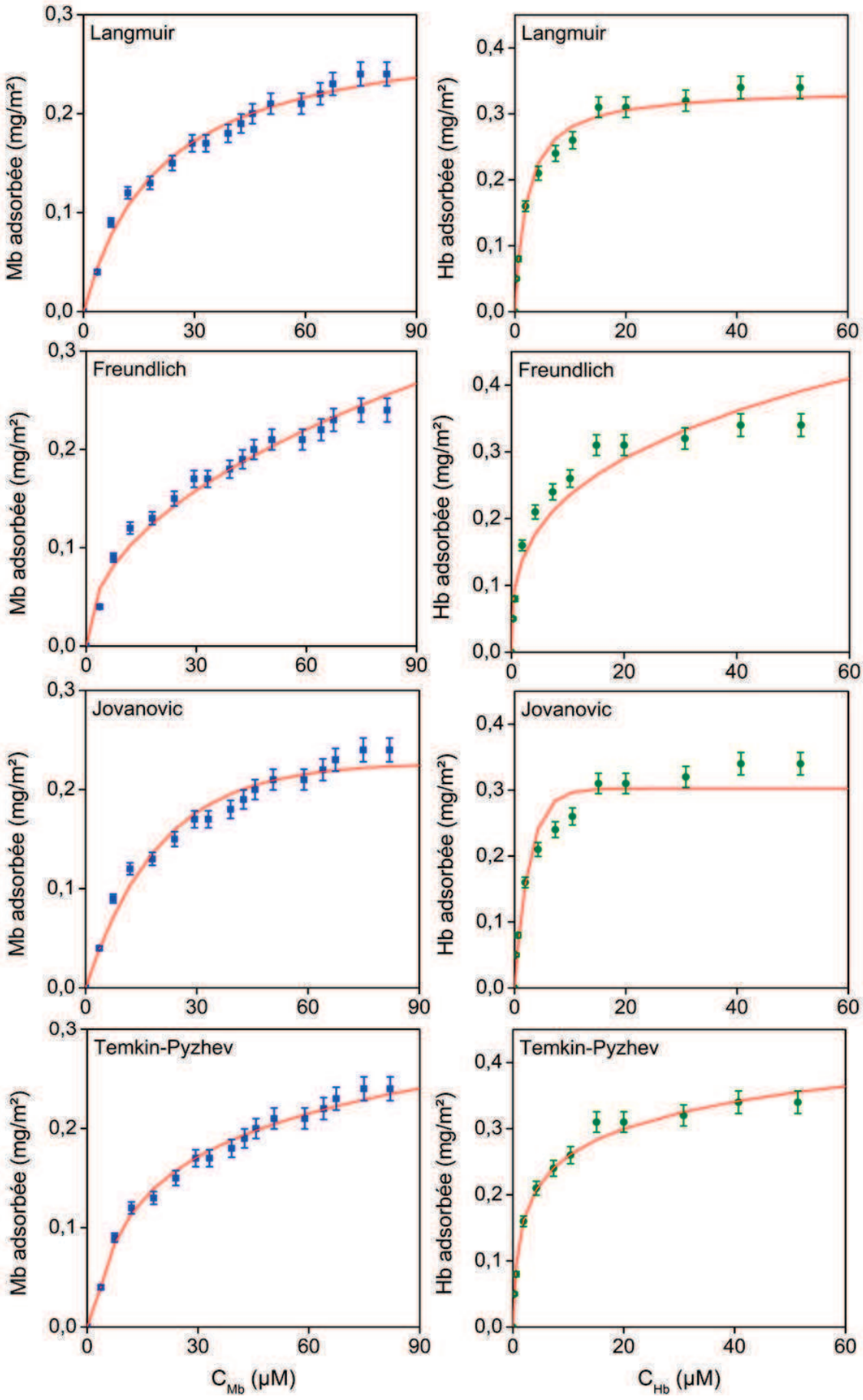
L'ajustement des modèles aux données expérimentales peut être réalisé selon trois méthodes : par régression linéaire avec un coefficient de régression linéaire R^2 le plus proche de 1 en adaptant l'expression de chaque modèle (par exemple pour le modèle de Langmuir (eq. 6)), par régression non linéaire en minimisant la somme du carré des erreurs SCE (eq. 7) ou en minimisant la somme du carré des erreurs relatives SCER (eq. 8) (*26*).

$$\frac{C}{n_{ads}} = \frac{C}{n_{\infty}} + \frac{1}{n_{\infty} \cdot K_{ads}} \quad \text{(eq. 6)}$$

$$SCE = \sum_{i=1}^{p} \left(m_{ads} - m_{ads}^{calc}\right)^2 \quad \text{(eq. 7)}$$

$$SCER = \sum_{i=1}^{p} \left[\frac{\left(m_{ads} - m_{ads}^{calc}\right)^2}{m_{ads}}\right] \quad \text{(eq. 8)}$$

La régression linéaire donne un bon ajustement avec l'isotherme de Langmuir, mais pour les autres modèles la régression non linéaire par minimisation du SCER semble permettre un meilleur ajustement, comme cela a déjà été observé pour d'autres systèmes (*26*). La représentation des isothermes de la myoglobine et de l'hémoglobine sur la silice par les différents modèles a été réalisée suivant cette méthode (Fig. 4-8).


Langmuir
Freundlich
Jovanovic
Temkin-Pyzhev
Mb adsorbée (mg/m²)
Hb adsorbée (mg/m²)
C_Mb (µM)
C_Hb (µM)

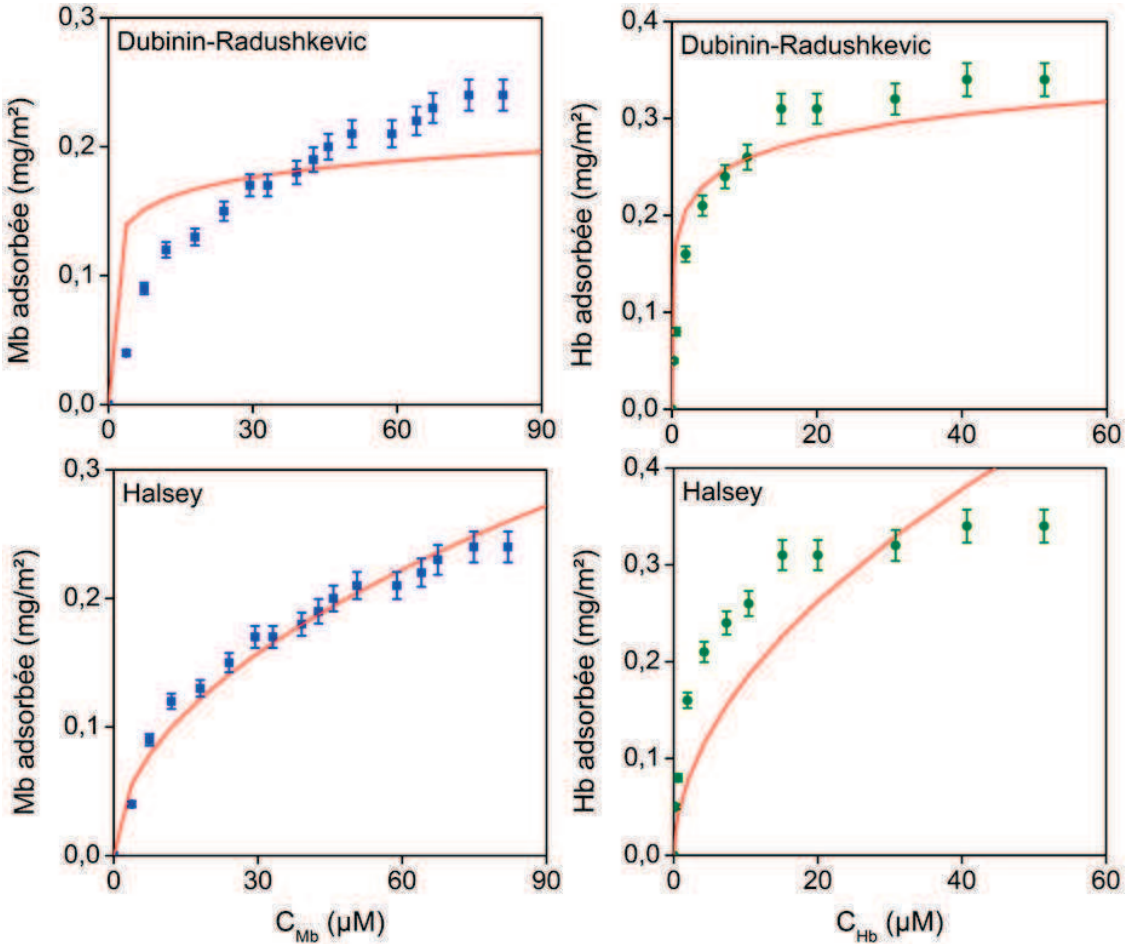


Figure 4-8. *Représentation des isothermes d'adsorption de la myoglobine sur les nanoparticules de silice 7 nm (■) et de l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice 20 nm (●) en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 25°C par les modèles de Langmuir, Freundlich, Jovanovic, Temkin-Pyzhev, Dubinin-Radushkevic et Halsey (en rouge). Ajustement par régression non linéaire et minimisation de la somme du carré des erreurs (SCER)*

La répartition des points de mesure n'est pas équivalente pour la myoglobine sur NP 7 nm et pour l'hémoglobine sur NP 20 nm : ils sont centrés sur le début de l'isotherme pour la myoglobine, avec seulement deux points de mesure au plateau, tandis qu'ils sont répartis sur l'ensemble de l'isotherme, plateau compris, pour l'hémoglobine. Cette répartition influence le plus ou moins bon ajustement de chaque modèle.

Les paramètres de chaque modèle et la valeur du SCER correspondante, indiquant un bon ajustement ou non du modèle aux données expérimentales, sont indiqués dans le tableau 4-2. Pour une comparaison plus facile avec les isothermes, la quantité maximale de protéine adsorbée calculée en mg par gramme de solide dans les modèles est réexprimée en mg par m² de surface. La surface spécifique des NP de silice 7 nm et 20 nm est respectivement de 333 et 168 m²/g (voir chap. 3, §2.3).

Isothermes	Paramètres Mb + NP SiO_2 7nm	Paramètres Hb + NP SiO_2 20nm
Langmuir	m_∞ = 0,29 mg/m² $K_{ads} = 4{,}9.10^4\ M^{-1}$ *SCER = 2,3*	m_∞ = 0,34 mg/m² $K_{ads} = 4{,}8.10^5\ M^{-1}$ *SCER = 1,8*
Freundlich	$a = 7{,}5.10^4\ mg^{1-1/n}.L^{1/n}.g^{-1}$ n = 0,48 *SCER = 5,3*	$a = 1{,}5.10^4\ mg^{1-1/n}.L^{1/n}.g^{-1}$ n = 0,32 *SCER = 7,7*
Jovanovic	m_∞ = 0,23 mg/m² $K_J = 5{,}1.10^4\ M^{-1}$ *SCER = 4,6*	m_∞ = 0,30 mg/m² $K_J = 3{,}8.10^5\ M^{-1}$ *SCER = 6,9*
Temkin-Pyzhev	b_T = 118 J/mol $K_T = 5{,}1.10^5\ M^{-1}$ *SCER = 1,2*	b_T = 250 J/mol $K_T = 8{,}1.10^6\ M^{-1}$ *SCER = 1,0*
Dubinin-Radushkevich	non applicable *SCER = 117*	non applicable *SCER = 57*
Halsey	n = 2 $K_H = 1{,}8.10^{-8}$ *SCER =5,6*	non applicable *SCER =38*

Tableau 4-2. *Paramètres des modèles d'isothermes appliqués à l'adsorption de la myoglobine sur les nanoparticules de silice 7 nm et de l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice 20 nm en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 25°C. SCER : somme des carrés des erreurs relatives*

Les isothermes de Freundlich et de Halsey peuvent être exclues car elles ne s'ajustent qu'au début de l'isotherme et ne permettent pas de représenter le plateau d'adsorption de la myoglobine et de l'hémoglobine sur les NP. Une adsorption multicouche peut donc être écartée. Au contraire, les données sont bien représentées par le modèle de Langmuir, qui fait l'hypothèse d'une adsorption en monocouche de la myoglobine et de l'hémoglobine sur les NP de silice.

Les isothermes de Jovanovic et de Dubinin-Radushkevic peuvent être exclues car si elles peuvent représenter le plateau des isothermes, la pente lors de la première partie de l'adsorption est trop importante comparée aux mesures ce qui se traduit par un mois bon ajustement du modèle aux données (SECR > 4).

Les isothermes de Temkin-Pyzhev (SECR = 1,0-1,2) et de Langmuir (SECR = 1,8-2,3) s'ajustent bien à la forme des isothermes d'adsorption de la myoglobine et de l'hémoglobine sur les NP de silice. Il semble que deux approches différentes, par sites de fixation dans le modèle de Langmuir et par énergie d'adsorption dans le modèle de Temkin-Pyzhev, permettent de représenter correctement l'adsorption de la myoglobine et de l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice. Pourtant ces deux

modèles ne donnent pas du tout la même représentation de l'adsorption, hormis l'adsorption en monocouche : le modèle de Langmuir dessine une surface homogène où les protéines s'adsorbent de façon réversible tandis que le modèle de Temkin-Pyzhev dépeint une surface hétérogène où l'adsorption des protéines est différente en fonction du site de fixation.

La constante d'adsorption calculée est cependant un ordre de grandeur supérieure avec l'isotherme de Temkin-Pyzhev comparée à l'isotherme de Langmuir, alors qu'elles représentent bien la même grandeur. Une mesure directe de la constante d'adsorption par microcalorimétrie ITC peut permettre de déterminer à l'aide d'une méthode expérimentale très différente la constante d'adsorption de la protéine sur la surface (voir §5) puis de la comparer à ces deux modèles.

Isotherme de Temkin-Pyzhev

Le paramètre b_T de l'isotherme de Temkin-Pyzhev est positif aussi bien pour l'adsorption de la myoglobine que de l'hémoglobine, ce qui correspond d'après le modèle à une adsorption exothermique sur les nanoparticules de silice, prédiction qui est bien vérifiée par microcalorimétrie (voir §5).

Le modèle de Temkin-Pyzhev implique également une dépendance en température de l'adsorption. L'isotherme d'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice 20 nm a été mesurée à 4°C et à 25°C en tampon Phosphate 100 mM à pH 6 et à pH 7,4, puis le modèle a été ajusté aux données, en faisant l'hypothèse que les paramètres b_T et K_T dépendent aussi de la température (Fig. 4-9).

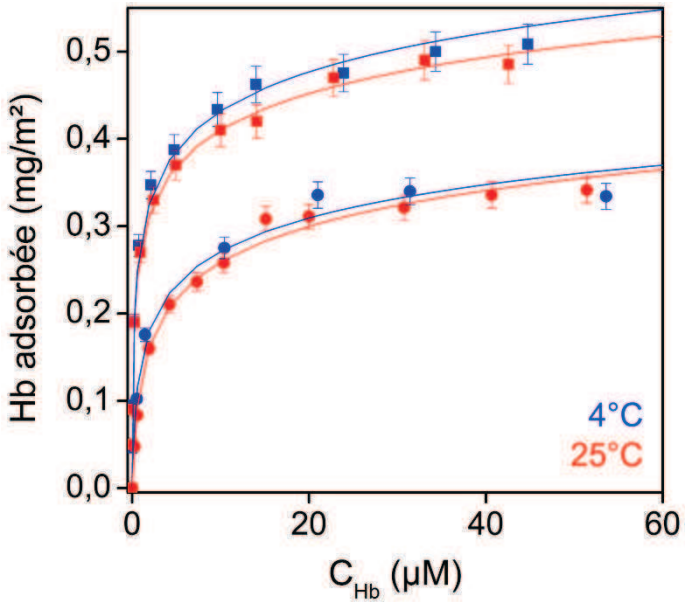


Figure 4-9. *Données expérimentales et régression non linéaire avec l'isotherme de Temkin-Pyzhev de l'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice 20 nm (C_{NP} = 4,5 mg/mL) en tampon Phosphate 100 mM à 25°C à pH 6 (■) et à pH 7,4 (●) et à 4°C à pH 6 (■) et à pH 7,4 (●)*

Contrairement à ce que prédit le modèle, les isothermes d'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice ne présentent pas de variation significative avec la température. Puisque la température varie dans l'équation du modèle, mais que les isothermes sont identiques, les paramètres b_T et K varient artificiellement (tableau 4-3).

Isotherme de Temkin-Pyzhev	Paramètres T = 4°C	Paramètres T = 25°C
Phosphate pH 6	b_T = 212 J/mol $K_T = 7{,}8.10^7$ M^{-1} *SCER = 0,9*	b_T = 246 J/mol $K_T = 9{,}4.10^7$ M^{-1} *SCER = 0,2*
Phosphate pH 7,4	b_T = 249 J/mol $K_T = 1{,}4.10^7$ M^{-1} *SCER = 0,9*	b_T = 250 J/mol $K_T = 8{,}1.10^6$ M^{-1} *SCER = 1,0*

Tableau 4-3. *Paramètres de l'isotherme de Temkin-Pyzhev appliquée à l'adsorption de l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice 20 nm en tampon Phosphate 100 mM à pH 6 et à pH 7,4 en fonction de la température*

La constante d'adsorption calculée à pH 6 diminue avec la température tandis qu'elle augmente avec la température à pH 7,4, alors qu'il n'y a pas de modification de l'adsorption entre 4°C et 25°C d'après la mesure. Bien qu'elle reproduise bien la forme des isothermes d'adsorption de l'hémoglobine et de la myoglobine sur les NP de silice, l'isotherme de Temkin-Pyzhev ne semble pas adaptée car la valeur calculée de la constante d'adsorption ne semble pas suffisamment « robuste ».

Isotherme de Langmuir

L'isotherme de Langmuir s'ajuste bien aux isothermes d'adsorption de la myoglobine et de l'hémoglobine sur les NP de silice. La quantité maximale de protéine adsorbée calculée est légèrement surestimée pour la myoglobine (0,29 mg/m² calculé pour 0,24 mg/m² mesuré) mais bien représentée pour l'hémoglobine (0,34 mg/m² calculé et mesuré). Le modèle de Langmuir parait donc bien adapté pour représenter l'adsorption de la myoglobine et de l'hémoglobine sur les NP de silice et les constantes d'adsorption calculées à l'aide de ce modèle pourront être utilisées pour comparer l'adsorption des différents systèmes de cette étude, mais également avec les données de la littérature.

Cependant, le bon ajustement du modèle aux données ne permet pas de conclure à la réversibilité de l'adsorption de la myoglobine et de l'hémoglobine ou à l'absence d'interactions latérales entre protéines (hypothèses du modèle) car il est utilisé pour représenter l'adsorption irréversible des protéines sur une surface (*10-14*).

Pour déterminer si l'adsorption de la myoglobine et de l'hémoglobine sur la silice nanostructurée est réversible/irréversible, spécifique/non spécifique, sur un seul ou plusieurs types de sites de fixation, d'autres études sont nécessaires. Pour essayer de répondre à ces questions, nous avons mesuré la désorption des protéines dans différentes conditions (voir §4) et les paramètres thermodynamiques de l'adsorption (voir §5) puis nous avons étudié la structure des protéines adsorbées et chercher à identifier les sites d'interaction entre protéine et silice (voir chap. 5).

3. Caractérisation de l'adsorption des protéines sur la silice nanostructurée

Les isothermes d'adsorption de la myoglobine, l'apomyoglobine, l'hémoglobine et la sérum albumine sur la silice nanostructurée ont été analysées à l'aide du modèle de Langmuir afin de déterminer la quantité de protéine adsorbée à saturation et la constante d'adsorption K_{ads} pour chaque système. L'adsorption des protéines dans différentes conditions est comparée sur la base de ces deux critères.

Plusieurs paramètres qui peuvent influencer l'adsorption des protéines ont été étudiés :

1) **Effet du matériau** : l'adsorption de la myoglobine sur les silices nanoporeuses (CPG 8 nm et CPG 50 nm) et sur les nanoparticules de silice (NP 7 nm et NP 20 nm) qui présentent des tailles et des géométries différentes, a été comparée.
2) **Effet de la protéine** : l'adsorption des différentes protéines modèles sur la silice nanostructurée a été comparée en fonction de la structure, de la charge et de la stabilité interne des protéines
3) **Effet du pH et du tampon** : l'adsorption des protéines sur la silice nanostructurée a été mesurée de pH 6 à pH 9 en tampon BisTris-HCl, Tris-HCl et Phosphate à une concentration de 100 mM

La quantité de protéine adsorbée à saturation et la constante d'adsorption de la myoglobine, l'apomyoglobine, l'hémoglobine et la sérum albumine sur la silice nanostructurée dans différentes conditions sont présentées ci-dessous (tableau 4-4).

Myoglobine			
Silice	**Tampon et pH**	**m_{ads} (mg/m²)**	**K_{ads} (M^{-1})**
NP 7 nm	BisTris-HCl pH 6	0,26 ± 0,02	$9,7 \pm 1,0.10^4$
	Phosphate pH 6	0,30 ± 0,02	$1,7 \pm 0,2.10^5$
	Phosphate pH 7,4	0,24 ± 0,02	$4,4 \pm 0,4.10^4$
NP 20 nm	BisTris-HCl pH 6	0,30 ± 0,02	$7,0 \pm 0,7.10^4$
	Phosphate pH 6	0,45 ± 0,02	$2,0 \pm 0,2.10^4$
	Phosphate pH 7,4	0,37 ± 0,02	$6,0 \pm 0,6.10^4$
CPG 8 nm	BisTris-HCl pH 6	0,45 ± 0,03	$5,5 \pm 0,6.10^4$
	Phosphate pH 7,4	0,28 ± 0,02	$3,6 \pm 0,4.10^4$
CPG 50 nm	BisTris-HCl pH 6	0,50 ± 0,03	$1,0 \pm 0,1.10^5$
	Phosphate pH 7,4	0,49 ± 0,03	$3,4 \pm 0,4.10^4$
Apomyoglobine*			
NP 7 nm	BisTris-HCl pH 6 (4°C)	0,81 ± 0,04	$6,5 \pm 0,7.10^5$

Hémoglobine			
Silice	**Tampon et pH**	**m_{ads} (mg/m²)**	**K_{ads} (M^{-1})**
NP 7nm	BisTris-HCl pH 6	0,52 ± 0,03	$4,6 \pm 0,5.10^5$
	Phosphate pH 6	0,68 ± 0,03	$9,1 \pm 0,9.10^5$
	Phosphate pH 7,4	0,40 ± 0,02	$2,4 \pm 0,2.10^5$
NP 20nm	BisTris-HCl pH 6	0,43 ± 0,02	$7,3 \pm 0,8.10^5$
	Phosphate pH 6	0,50 ± 0,03	$7,1 \pm 0,8.10^5$
	Phosphate pH 7,4	0,34 ± 0,02	$3,4 \pm 0,4.10^5$

Sérum albumine			
Silice	**Tampon et pH**	**m_{ads} (mg/m²)**	**K_{ads} (M^{-1})**
NP 20 nm	BisTris-HCl pH 6	0,66 ± 0,03	$3,6 \pm 0,4.10^5$
CPG 8 nm	BisTris-HCl pH 6	0	-
CPG 50 nm	BisTris-HCl pH 6	1,3 ± 0,08	$1,2 \pm 0,1.10^5$

Tableau 4-4. *Caractéristiques de l'adsorption de la myoglobine, l'apomyoglobine, l'hémoglobine et la sérum albumine sur la silice nanostructurée dans différentes conditions de pH et de tampon 100 mM à 25°C. *L'isotherme d'adsorption de l'apomyoglobine, instable à température ambiante, a été mesurée à 4°C.*

3.1 Effet du matériau

Myoglobine

La quantité de myoglobine adsorbée sur la silice nanostructurée varie du simple au double en fonction du matériau, dans les conditions d'adsorption favorables en tampon BisTris-HCl à pH 6. La myoglobine s'adsorbe en plus grande quantité sur la silice nanoporeuse (m_{ads} = 0,45-0,50 mg/m²) que sur les nanoparticules de silice (m_{ads} = 0,26-0,30 mg/m²) : une géométrie concave semble plus favorable à l'adsorption (voir chap. 3). La quantité de myoglobine adsorbée augmente légèrement avec la taille des NP : une courbure de surface plus faible pourrait être plus favorable. Cependant, ce classement n'est pas respecté lorsque les conditions de pH et de tampon changent, ce qui montre que différents paramètres peuvent influencer l'adsorption des protéines sur la silice.

L'affinité de la myoglobine pour les NP de silice 7 et 20 nm est proche. Un facteur 2 de différence est par contre observé entre CPG 50 nm (K_{ads} = 1,0 ± 0,1.10^5 M^{-1}) et CPG 8 nm (K_{ads} = 5,5 ± 0,6.10^4 M^{-1}), qui pourrait être lié à un effet de chimie de surface, les CPG 8 nm étant plus riches en silanols pontants (voir chap. 3, §3).

Hémoglobine

L'hémoglobine s'adsorbe en quantité plus importante sur les NP 7 nm (m_{ads} = 0,52 mg/m²) comparées aux NP 20 nm (m_{ads} = 0,43 mg/m²) en tampon BisTris-HCl à pH 6. Son affinité est par contre plus grande pour les NP 20 nm (K_{ads} = 7,3 ± 0,8.10^5 M^{-1}) que pour les NP 7 nm (K_{ads} = 4,6 ± 0,5.10^5 M^{-1}), deux variations qui sont de sens opposée à celles de la myoglobine. Ces observations ne sont pas non plus transposables dans d'autres conditions de pH et de tampon, ce qui met en évidence le côté multiparamétrique de l'adsorption des protéines.

Sérum albumine

L'adsorption de la sérum albumine à pH 6 est maximale sur les CPG 50 nm (m_{ads} = 1,3 mg/m²), intermédiaire sur les NP 20 nm (m_{ads} = 0,66 mg/m²) et nulle sur les CPG 8 nm. Le diamètre d'une molécule de BSA est de 6,2 nm pour un monomère (*27*) et de 12,4 nm si la protéine s'organise sous la forme d'un dimère (*28*). Puisque la BSA a une forte affinité pour les CPG 50 nm (K_{ads}=1,2 ± 0,1.10^5 M^{-1}), il est probable que la non adsorption de la protéine sur les CPG 8 nm soit due à une taille de porosité trop faible pour permettre l'entrée de la protéine et son adsorption, la surface externe étant négligeable devant la surface interne des CPG. L'adsorption en plus faible quantité sur les NP comparées aux CPG est similaire pour la BSA et la myoglobine.

La BSA présente une plus grande affinité pour les NP de silice 20 nm (K_{ads} = 3,6 ± 0,4.10^5 M^{-1}) que pour les CPG 50 nm, contrairement à la myoglobine. Il y a donc une spécificité propre à chaque protéine et les observations réalisées sur une protéine modèle ne sont pas nécessairement applicables à d'autres protéines.

La rugosité de surface, un autre effet qui peut influencer l'adsorption des protéines (*29*), est discutée dans la chapitre 5 (voir §1).

3.2 Effet de la protéine

L'adsorption des protéines sur les NP de silice 20 nm en tampon BisTris-HCl à pH 6 peut être classée selon chaque critère pour comparer leur adsorption :

- en fonction de la constante d'adsorption Hb > ApoMb > BSA > Mb
- en fonction de la quantité de protéine adsorbée ApoMb > BSA > Hb > Mb

Les différences ne sont pas négligeables puisque la quantité de protéine adsorbée varie de 0,30 à 0,81 mg/m² et la constante d'adsorption de 7.10^4 M^{-1} à 7,3.10^5 M^{-1}, ce qui montre des différences d'affinité importantes entre protéines pour une même surface.

La protéine ayant la plus faible affinité est la myoglobine, dont la quantité adsorbée est également la plus faible. La protéine qui s'adsorbe en plus grande quantité (ApoMb) n'est pas celle qui a la plus grande affinité (Hb). Cette comparaison nous indique qu'il n'y a pas nécessairement de lien ente quantité de protéine adsorbée et constante d'adsorption. Cet effet peut s'expliquer par un plus grand étalement de la protéine sur la surface lorsque son affinité est plus importante, et donc un nombre moins élevé de molécules adsorbées à saturation.

Charge

A pH 6, la BSA a une charge globale négative (pI = 4,7), tandis que la myoglobine et l'hémoglobine ont toutes deux une charge globale positive. Pourtant, la BSA s'adsorbe en plus grande quantité que l'hémoglobine et la myoglobine, qui plus est avec une plus forte affinité que la myoglobine. Cela montre clairement que le critère de charge globale de la protéine n'est pas déterminant pour l'adsorption sur la silice, mais qu'il faut peut-être regarder la répartition des charges au sein de la protéine plutôt que sa charge moyenne. Soit la répartition de charge au sein de la BSA permet d'éviter une trop forte répulsion électrostatique, soit d'autres types d'interactions permettent l'adsorption, par exemple des interactions hydrophobes suite à une modification de structure de la protéine sur la surface (*1*).

La BSA est une protéine « molle » tandis que la myoglobine est une protéine « dure ». Cet effet pourrait être prépondérant sur celui de la charge.

Stabilité interne

L'adsorption plus importante de la BSA comparée à la silice pourrait être due à la différence de stabilité interne des protéines (modèle de Norde (*1*)) mais aussi à une différence de taille, de structure, de composition ou de dynamique. Comparer l'adsorption de la myoglobine et de la BSA, deux protéines très différentes, ne permet pas de tester l'hypothèse de stabilité interne du modèle.

L'apomyoglobine, de structure proche de la myoglobine (*5*) mais de plus faible stabilité, est en première approche un bon modèle de « myoglobine molle ». L'apomyoglobine s'adsorbe trois fois plus que la myoglobine sur les NP de silice 7 nm à pH 6 et avec une affinité 6 fois plus élevée. Dans ce cas, l'hypothèse de Norde semble vérifiée, ce qui laisse supposer que l'apomyoglobine se « déforme » plus sur la surface que la myoglobine, ce qui lui permettrait de maximiser ses interactions avec la silice.

Cependant, le modèle de Norde prédit qu'une protéine « dure » de même charge que la surface ne peut pas s'adsorber sur celle-ci. Pourtant, une mesure de l'adsorption de la myoglobine chargée négativement à pH 8,7 montre une adsorption, certes plus faible qu'à pH 6 ou 7,4, mais non négligeable (de l'ordre de 10 à 20% de la quantité de myoglobine adsorbée à saturation). L'hémoglobine, de stabilité et de charge proche de celles de la myoglobine, ne s'adsorbe pas à pH 8,7. Les seuls critères de charge et de stabilité interne ne sont donc pas suffisants pour décrire l'adsorption des protéines sur une surface, le modèle de Norde s'avère insuffisant. A travers l'étude d'un plus grand nombre de protéines, il est possible de proposer de nouveaux paramètres d'adsorption des protéines sur une surface (voir §6).

Monomère/Oligomère

L'hémoglobine s'adsorbe en plus grande quantité et avec une plus forte affinité que la myoglobine sur les NP de silice 7 et 20 nm, quelles que soient les conditions de pH et de tampon. La différence la plus importante est celle de l'affinité, avec une constante d'adsorption un ordre de grandeur supérieure pour l'hémoglobine comparée à la myoglobine. La structure tétramérique de l'hémoglobine peut expliquer une quantité de protéine adsorbée plus importante, car un ou plusieurs monomères peuvent ne pas être en interaction directe avec la surface : il y a donc un « effet oligomère ».

La très nette augmentation de l'affinité pourrait être liée soit aux différences fines de composition et de structure entre les deux protéines, soit à une plus grande interaction avec la surface, que l'on pourrait voir comme un plus grand nombre de points d'ancrages, pour un oligomère comparé à un monomère. Lors de l'étude de la structure des protéines adsorbées, nous nous intéresserons tout particulièrement à l'hémoglobine afin de déterminer si la protéine conserve sa structure tétramérique lors de l'adsorption ou si elle se dissocie à la surface de la silice (voir chap. 5).

3.3 Effet du pH et du tampon

Une grande influence des conditions de pH et de tampon sur l'adsorption est observée pour la myoglobine et l'hémoglobine sur les différents types de silice. D'une façon générale, la quantité de protéine adsorbée est plus importante à pH 6 qu'à pH 7,4, et plus importante en tampon Phosphate plutôt qu'en tampon BisTris-HCl. Les variations d'affinité suivent également cette tendance pour l'adsorption de la myoglobine et de l'hémoglobine sur les NP de silice 7 nm, mais ne montrent pas de tendance claire pour l'adsorption sur les NP de silice 20 nm.

Le pH et le tampon jouent sur la charge de la protéine, la charge de la surface, la force ionique du milieu et la nature des espèces en solution.

- La silice ne présente pas d'interaction spécifique avec les tampons BisTris-HCl et Phosphate (*30*).
- La charge de la myoglobine et de l'hémoglobine est positive à pH 6 et neutre ou faiblement chargée à pH 7,4.
- La force ionique est plus grande en tampon Phosphate qu'en tampon BisTris-HCl, et plus grande en tampon Phosphate à pH 7,4 plutôt qu'à pH 6.
- Le potentiel ζ des NP de silice nous indique que la charge de surface des NP de silice 7 et 20 nm est plus fortement négative en tampon Phosphate qu'en tampon BisTris-HCl à pH 6, et en tampon Phosphate à pH 7,4 qu'à pH 6 (voir chap. 3, §2.4).

D'après ces critères, les interactions électrostatiques entre myoglobine, hémoglobine et NP de silice seraient favorisées en tampon Phosphate à pH 6, même s'il est difficile de dire quel critère est prédominant : augmentation de la charge de la protéine et de la surface, diminution de la force ionique et d'un possible écrantage des charges de surface par les contre-ions présents. Si les interactions électrostatiques interviennent dans le mécanisme d'adsorption de la myoglobine et de l'hémoglobine sur la silice, alors une adsorption plus faible devrait être observée à pH basique, lorsque les résidus basiques de la protéine sont déprotonés.

Adsorption de l'hémoglobine à pH basique

Une première observation de l'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice 20 nm avait mis en évidence une adsorption maximale en tampon BisTris-HCl à pH 6 et nulle en tampon Tris-HCl à pH 8,7 (voir §1). Pour mieux comprendre ce phénomène, les isothermes d'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice ont été mesurées de pH 6 à pH 9 dans les différents tampons ; les isothermes mesurées en tampon Tris-HCl sont présentées en exemple (Fig. 4-10).

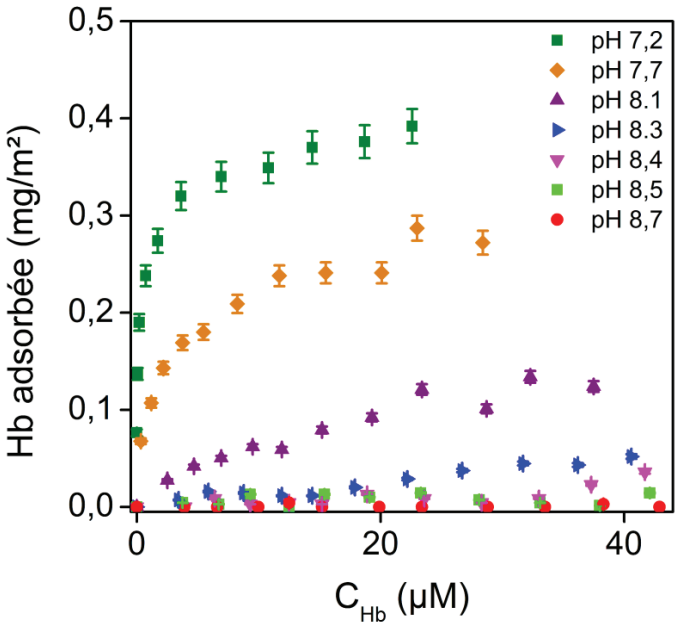


Figure 4-10. *Isothermes d'adsorption de l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice 20 nm en tampon Tris-HCl 100 mM en fonction du pH*

La quantité d'hémoglobine adsorbée à saturation est ensuite représentée en fonction du pH (toutes les isothermes ne sont pas représentées sur la première figure) (Fig. 4-11). La quantité d'hémoglobine adsorbée est maximale et constante de pH 6 à pH 7,2 puis diminue rapidement de pH 7,2 à pH 8,6 et devient nulle pour un pH > 8,6. L'effet majeur est celui du pH, plutôt que celui du tampon, et détermine la capacité de l'hémoglobine à s'adsorber ou non sur la silice, depuis 100 % d'adsorption à 0 % en moins de 2 unités pH.

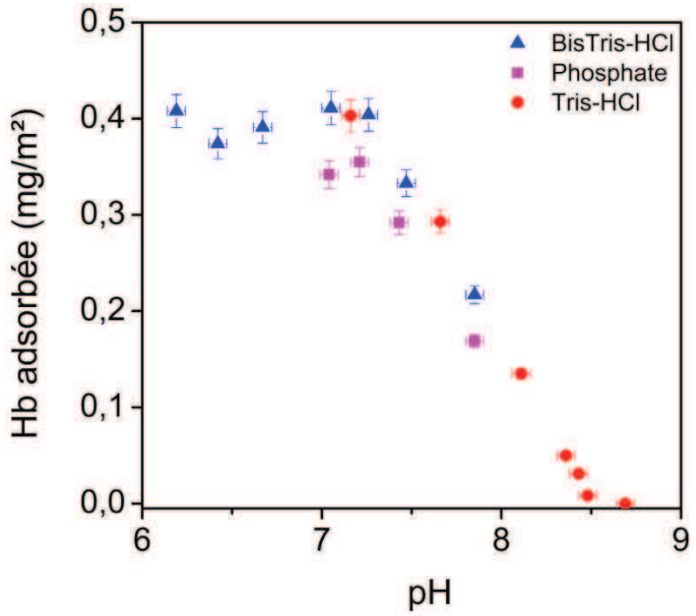


***Figure 4-11**. Quantité d'hémoglobine adsorbée à saturation sur les nanoparticules de silice 20 nm en fonction du pH en tampon BisTris-HCl (▲), Phosphate (■) et Tris-HCl (●)*

La constante d'adsorption est calculée en fonction du pH à l'aide du modèle de Langmuir (Fig. 4-12).

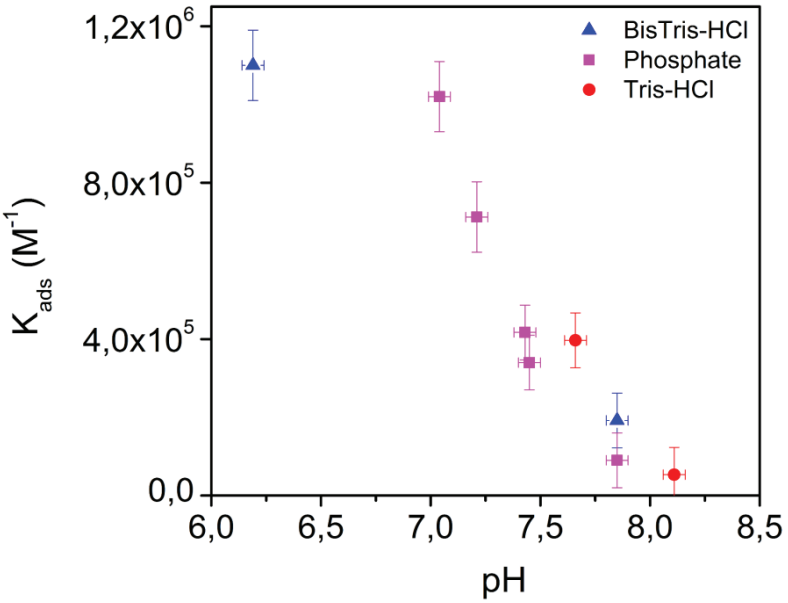


***Figure 4-12.** Constante d'adsorption K_{ads} de l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice 20 nm calculée à l'aide du modèle de Langmuir, en fonction du pH et du tampon : BisTris-HCl (▲), Phosphate (■) et Tris-HCl (●)*

K_{ads} diminue lorsque le pH augmente, de façon similaire à la quantité de protéine adsorbée. L'affinité de l'hémoglobine pour la silice est donc d'autant plus faible que le pH est élevé, ce qui explique la forte diminution de son adsorption.

La surface de la silice (pI = 2 (*31*)) est chargée d'autant plus négativement que le pH augmente. L'hémoglobine (pI = 7,4 (*6*)) est globalement chargée positivement à pH acide et négativement à pH basique. Or le changement de comportement vis-à-vis de l'adsorption débute à pH 7,2 (Fig. 4-13).

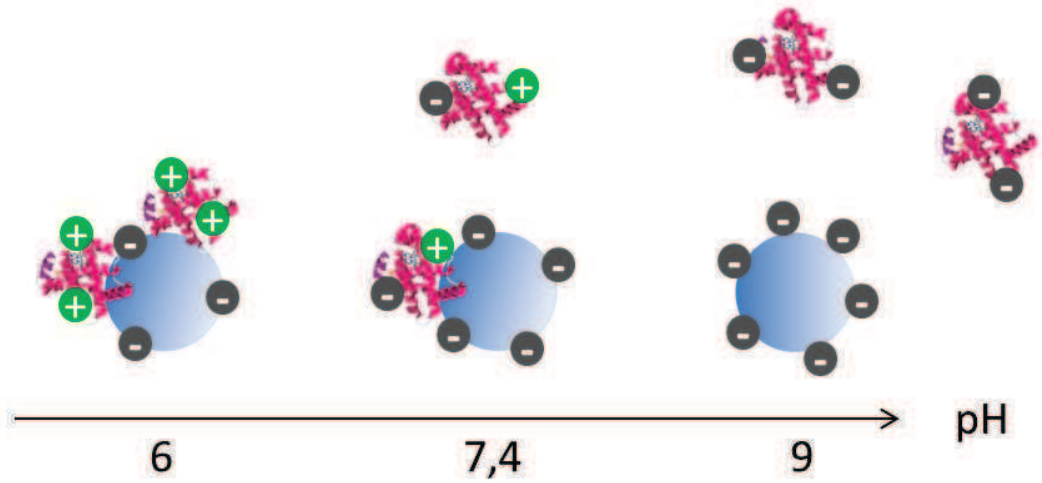


***Figure 4-13**. Schéma de l'adsorption et de la non adsorption de l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice 20 nm en fonction du pH et hypothèse de changement de charge global de l'hémoglobine et répulsion électrostatique entre hémoglobine et silice à pH 9*

L'interprétation la plus simple est que les forces électrostatiques entre protéine chargée positivement et silice chargée négativement favorisent l'adsorption de la protéine à pH < 7,2, puis la charge de la protéine diminuant jusqu'à s'inverser, les interactions électrostatiques entre protéine et silice deviennent défavorables à pH > 7,2 ce qui diminue la quantité de protéine adsorbée et la force d'interaction entre protéine et surface, jusqu'à empêcher totalement l'interaction à pH > 8,6 lorsque protéine et silice sont toutes deux fortement chargées négativement (Fig. 4-13).

Un résultat similaire est obtenu pour la myoglobine (pI = 7,2 (*6*)), sur les NP de silice 7 nm avec une diminution importante de la quantité de protéine adsorbée à pH > 9.

3.4 Comparaison à d'autres systèmes de la littérature

L'adsorption de la myoglobine, de l'hémoglobine et de la sérum albumine sur la silice nanostructurée a été comparée aux données de la littérature pour des systèmes proches : même protéine ou même surface (tableau 4-5). Malheureusement, les données sont parfois incomplètes ou non comparables, notamment lorsque la quantité de protéine adsorbée n'est pas exprimée par unité de surface.

Protéine	Surface	m_{ads} (mg/m²)	K_{ads} (M^{-1})	Référence
Myoglobine	NP ZrO_2	2,1	-	(*32*)
	NP SiO_2	1,9	-	(*33*)
Hémoglobine	TiO_2 nanoporeux	-	$1,8.10^5$	(*10*)
Sérum albumine BSA	**NP SiO_2**	1,1	-	(*34*)
		1,5	-	(*35*)
	NP $Al(OH)_2$	-	$2,1.10^5$	(*11*)
HSA	NP Hydroxyapatite	1,4	-	(*36*)
Lysozyme	**NP SiO_2**	1,1	$1,1.10^4$	(*13*)
		1,8	-	(*35*)
		1,1	$0,9.10^3$	(*14*)

Tableau 4-5. *Données de la littérature pour l'adsorption de protéines sur des nanomatériaux proches de notre système d'étude*

Dans leur ensemble, les constantes d'adsorption et quantités de protéine adsorbée à saturation sont du même ordre de grandeur que celles mesurées pour nos systèmes. Une assez grande similitude d'affinité des protéines pour différentes surfaces est observée : affinité de l'hémoglobine pour les NP de silice 20 nm (K_{ads} = $3,4.10^5$ M^{-1}) et pour TiO_2 nanoporeux (K_{ads} = $1,8.10^5$ M^{-1}) (*10*), affinité de la BSA pour les NP de silice 20 nm (K_{ads} = $3,6.10^5$ M^{-1}) et pour les NP d'hydroxyde d'aluminium (K_{ads} = $2,1.10^5$ M^{-1}) (*11*). La myoglobine et le lysozyme ont également une affinité proche lors de l'adsorption sur les NP de silice (K_{ads} = $4,4.10^4$ M^{-1} et $1,1.10^4$ M^{-1}) (*14*).

La quantité de protéine adsorbée est comprise entre 0,2 et 2 mg/m² environ pour les différentes protéines et surfaces. La quantité de BSA adsorbée à saturation sur les NP de silice est similaire aux valeurs de la littérature (*34, 35*). Par contre une grande différence est observée entre la quantité de myoglobine adsorbées sur les NP de silice 7 nm (m_{ads} = 0,24 mg/m² à pH 7,4) et les NP de silice de 11 nm (m_{ads} = 1,9 mg/m²) (*33*). Les deux systèmes sont toutefois différents : protéine (myoglobine de cœur de cheval et myoglobine de mouton), taille des NP et surtout tampon (Phosphate 100 mM à pH 7,4 et HEPES 5 mM à pH 6,5).

Les caractéristiques de l'adsorption des protéines sur les surfaces sont relativement homogènes lorsqu'il s'agit de surfaces d'oxydes non fonctionnalisées. Des variations beaucoup plus importantes de la quantité de protéines adsorbées et de la constante d'adsorption sont observées pour des surfaces métalliques, hydrophobes ou fonctionnalisées (*37, 38*), qui impliquent d'autres types d'interactions que celles observées entre protéine et surfaces d'oxydes hydrophiles. A la manière des

études de toxicologie, il serait utile de définir des « conditions standards » pour évaluer l'adsorption des protéines sur différents types de surfaces (*39*).

4. Réversibilité de l'adsorption

Pour déterminer si l'adsorption de l'hémoglobine et de la myoglobine sur les NP de silice est réversible, la désorption des protéines a été mesurée dans différentes conditions.

Tout d'abord, la désorption a été testée par dilution : une fois la protéine adsorbée à saturation, la solution contenant la myoglobine libre à l'équilibre (nécessaire pour atteindre le plateau de l'isotherme, puisque l'adsorption suit un équilibre) est éliminée et remplacée par la solution tampon. Aucune désorption de la myoglobine ou de l'hémoglobine adsorbée n'a été observée (la concentration en protéine du surnageant est nulle). L'adsorption de l'hémoglobine et de la myoglobine sur les NP de silice est donc irréversible par dilution (Fig. 4-14).

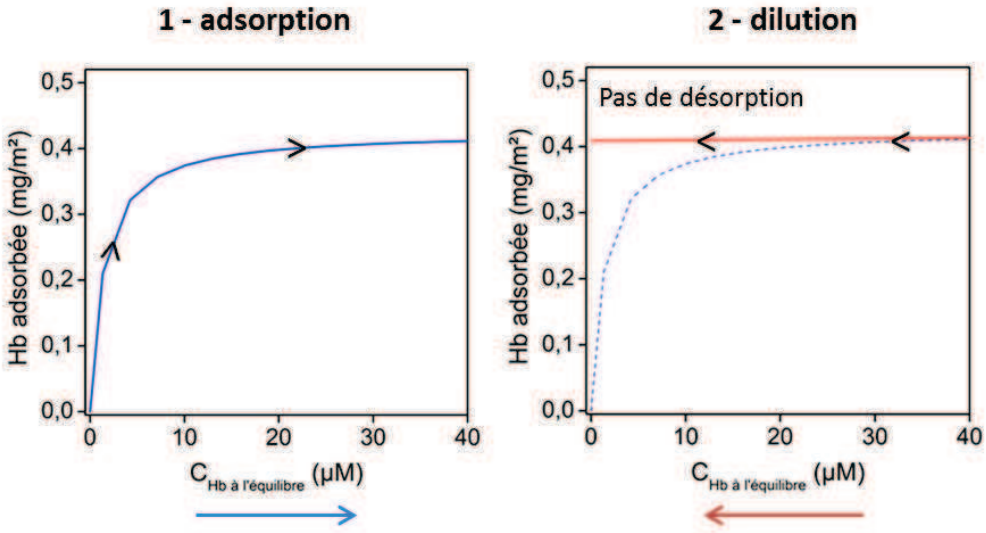


Figure 4-14. *Représentation schématique de l'adsorption irréversible par dilution de la myoglobine et de l'hémoglobine des NP de silice*

Si la dilution n'est pas efficace pour désorber l'hémoglobine et la myoglobine des NP de silice, d'autres conditions peuvent être testées : lavage à l'eau distillée, lavage par une solution tampon, modification du pH de la solution et modification de la force ionique par ajout de cations monovalents et divalents (tableau 4-6) (le lavage revient ici à faire une dilution dans un autre milieu).

Toutes les conditions testées sont non dénaturantes pour les protéines. La désorption des protéines des surfaces est couramment obtenue à l'aide de surfactants (*40*) (SDS, morpholine par exemple (*41,*

42)) qui présentent assez peu d'intérêt pour notre étude si la désorption s'accompagne de la dénaturation de la protéine désorbée.

Conditions initiales / Conditions finales	Eau	BisTris-HCl pH 6	BisTris-HCl pH 7	Phosphate pH 7,4
Eau	3	0	1	3
BisTris-HCl pH 6	0	0	0	0
BisTris-HCl pH 7	0	0	0	0
Phosphate pH 7,4	1	1	1	1
NaCl 1M	0	1	1	0
$CaCl_2$ 1M	1	0	1	1
Tris-HCl pH 8,7 (22h)	**88**	**81**	**85**	**90**
Tris-HCl pH 8,7 (1h)	**91**	**85**	**91**	**90**

Tableau 4-6. *Pourcentage d'hémoglobine désorbée des nanoparticules de silice 20 nm en fonction des conditions initiales d'adsorption (tampons 10 mM, C_{Hb} = 50 µM, C_{NP} = 34 mg/mL)) et des conditions de désorption (tampons 100 mM) après 22 h d'agitation. Mesure répétée après 1h d'agitation en tampon Tris-HCl. La désorption en tampon Tris-HCl est réalisée par dialyse.*

L'absence de désorption par dilution et lavage par l'eau ou par le même tampon confirme que l'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice 20 nm est irréversible par dilution, quelles que soient les conditions initiales d'adsorption (eau, tampon BisTris-HCl pH 6 et pH 7, tampon Phosphate pH 7,4).

De façon plus surprenante, aucune désorption n'est observée par ajout de cation mono et divalent à une concentration de 1M. La désorption par échange d'ions ne fonctionne pas, malgré les indices de la formation d'interactions électrostatiques entre hémoglobine et silice lors de l'adsorption. Si la protéine a plusieurs points de fixation sur la surface, cet effet peut se comprendre : supprimer un point d'ancrage ne suffit pas pour désorber l'ensemble de la protéine.

Au contraire, le changement de pH en tampon Tris-HCl à pH 8,7 conduit à une désorption quasi-totale de l'hémoglobine, quelles que soient les conditions initiales d'adsorption. Ces conditions permettent donc non seulement d'empêcher l'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice mais provoquent également sa désorption. Les résidus basiques arginine et lysine ont un pKa libre en solution de 10,4 et 12,0 respectivement (*43*). Bien que le pKa d'un acide aminé puisse être déplacé au sein de la protéine par rapport à son pKa libre en solution, il est probable qu'un nombre important d'arginine et de lysine soient chargées positivement au sein de l'hémoglobine à pH 6 et

soient en partie déprotonées à pH 8,7. La désorption de l'hémoglobine n'est donc possible que si les charges positives de la protéine en interaction avec la silice disparaissent, l'échange d'ions n'étant pas efficace. Les interactions électrostatiques entre hémoglobine et silice jouent donc un rôle très important dans l'adsorption de la protéine et peuvent piloter sa désorption.

Le temps de contact pour la désorption peut être réduit à 1h et permet de désorber 85 à 90% de l'hémoglobine. Pour éviter tout choc de pH lors du changement de conditions entre adsorption et désorption, une mesure complémentaire de désorption a été réalisée non pas par ajout direct du tampon Tris-HCl mais par dialyse, ce qui permet un changement de pH beaucoup plus progressif. Un changement progressif du pH de la solution jusqu'à pH 8,7 est donc suffisant pour permettre la désorption de 82% de l'hémoglobine adsorbée. La désorption de la myoglobine des NP de silice 7 nm est obtenue dans les mêmes conditions.

Désorber l'hémoglobine et la myoglobine des NP de silice dans des conditions douces permet d'étudier la structure et l'activité des protéines désorbées (voir chap. 5 et chap. 7). Les analyses réalisées sur la protéine adsorbée peuvent être complétées par celles sur la protéine désorbée, directement à pH 9 ou après dialyse en tampon Phosphate à pH 7,4 pour revenir à des conditions identiques.

Dans cette étude, le facteur temps n'apparaît pas car nous travaillons sur un système à l'équilibre (voir §1) : le temps de contact initial entre protéines et nanoparticules puis le temps d'agitation dans les conditions de désorption sont suffisamment longs pour permettre au système d'atteindre un état d'équilibre. Cependant, plusieurs études ont analysé la désorption de protéines d'une surface à des temps intermédiaires et montrent que la quantité de protéine désorbée dépend du temps de contact initial entre protéine et surface : plus ce temps de contact est long (quelques minutes à quelques heures), plus la quantité de protéine désorbée est faible (*44, 45*), jusqu'à rejoindre un système où l'adsorption est irréversible par dilution, comme nous l'avons observé avec l'hémoglobine et la myoglobine à des temps longs. Ces observations font apparaître la notion de dynamique de l'adsorption, autrement dit l'état de la protéine adsorbée évolue au cours du temps, ce qui diminue d'autant sa capacité à se désorber de la surface (*45*). Un des modèles proposés est celui d'une adsorption initiale rapide et réversible de la protéine, suivie par une phase plus lente de changements conformationnels de la protéine adsorbée qui conduit à une adsorption irréversible (il s'agit ici d'un modèle qualitatif) (*46-48*).

Thermodynamiquement, cela représente une optimisation des interactions entre protéine et surface par une relaxation de la protéine sur la surface. Cette évolution de la structure de la protéine et la modification de l'état énergétique du système conduit à une adsorption irréversible. Le processus d'adsorption des protéines sur une surface a été étudié pour de nombreux systèmes et semble bien représenter les cas où l'adsorption des protéines sur une surface est irréversible. La structure de la myoglobine et de l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice est étudiée dans le chapitre 5, afin de déterminer si l'adsorption irréversible de la protéine s'accompagne d'une modification de structure et quelle est la structure de la protéine après désorption.

L'adsorption de la myoglobine et de l'hémoglobine sur la silice montre d'une part que les interactions électrostatiques jouent un rôle important lors de l'adsorption et agissent probablement dans une étape précoce de l'adsorption des protéines, et d'autre part que l'adsorption est irréversible par dilution aux temps longs. Pour étudier directement les mécanismes d'adsorption, l'approche thermodynamique peut être informative car les variations d'énergie mesurées au cours de l'adsorption reflètent les processus à l'œuvre.

5. Energie d'adsorption de la myoglobine sur les nanoparticules de silice

Pour élucider les mécanismes d'adsorption des protéines sur les nanoparticules, il est nécessaire de connaître les paramètres thermodynamiques de l'adsorption, c'est-à-dire la variation d'énergie de Gibbs ΔG_{ads}, la contribution enthalpique ΔH_{ads}, la contribution entropique $-T.\ \Delta S_{ads}$ et la constante d'équilibre associée K (eq. 10).

Il est utile d'exprimer la réaction d'adsorption sous une forme qui fait apparaître les molécules d'eau initialement adsorbées sur la surface (eq. 9) car la désolvatation de la surface par la protéine peut contribuer à la variation d'enthalpie et d'entropie du système (eq. 11, 12).

$$Mb_{solution} + H_2O_{adsorbée} = Mb_{adsorbée} + H_2O_{solution} \quad \text{(eq. 9)}$$

$$\Delta G_{ads} = \Delta H_{ads} - T \cdot \Delta S_{ads} \quad \text{(eq. 10)}$$

$$\Delta H_{ads} = \Delta H_{protéine} + \Delta H_{eau} \quad \text{(eq. 11)}$$

$$\Delta S_{ads} = \Delta S_{protéine} + \Delta S_{eau} \quad \text{(eq. 12)}$$

Sans être exhaustif, les principales contributions enthalpiques et entropiques associées à l'adsorption peuvent être décrites ainsi (*37, 46, 49*) :

i) Réaction exothermique = contribution enthalpique favorable ($\Delta H_{ads} < 0$) : par formation de nouvelles liaisons, liaisons hydrogène ou interactions coulombiennes entre protéine et surface, par interaction spécifique

ii) Réaction endothermique = contribution enthalpique défavorable ($\Delta H_{ads} > 0$) : par rupture de liaisons hydrogène intramoléculaires si la protéine adsorbée perd une partie de sa structure

iii) Gain d'entropie = contribution entropique favorable ($-T.\Delta S_{ads} < 0$) : par déstructuration de la protéine, par libération de molécules d'eau (interaction hydrophobe)

iv) Perte d'entropie = contribution entropique défavorable ($-T.\Delta S_{ads} > 0$) : par formation de complexes, par immobilisation des chaînes latérales des résidus, par immobilisation de molécules d'eau

De plus, une compensation peut avoir lieu entre variation d'entropie et variation d'enthalpie (eq. 10) : un gain d'entropie peut par exemple compenser une réaction d'adsorption endothermique (*37*).

Pour déterminer les paramètres thermodynamiques de l'adsorption sur les NP de silice, la variation de chaleur lors de l'adsorption de la myoglobine sur les NP a été mesurée par ITC. Le système myoglobine-NP de silice 7 nm a été choisi comme modèle pour cette étude. La représentation habituelle des données ITC est celle de la variation de chaleur normalisée à la quantité de protéine en fonction du rapport des concentrations molaires protéine-ligand. Le traitement des données a donc été adapté à l'adsorption d'une protéine sur une surface et la variation de chaleur est exprimée en fonction du rapport entre concentration en myoglobine totale et masse de nanoparticules (voir chap. 2, §4.2).

La mesure est réalisée en ajoutant une quantité croissante de myoglobine à une solution contenant une quantité fixe de nanoparticules, de façon à adsorber la myoglobine jusqu'à saturation de la surface (voir chap. 2, Fig. 2-3). Les effets de dilution de la myoglobine et des nanoparticules dans une solution tampon ont préalablement été mesurés et soustraits : les variations de chaleur sont donc bien celles du système Mb-NP (Fig. 4-15a).

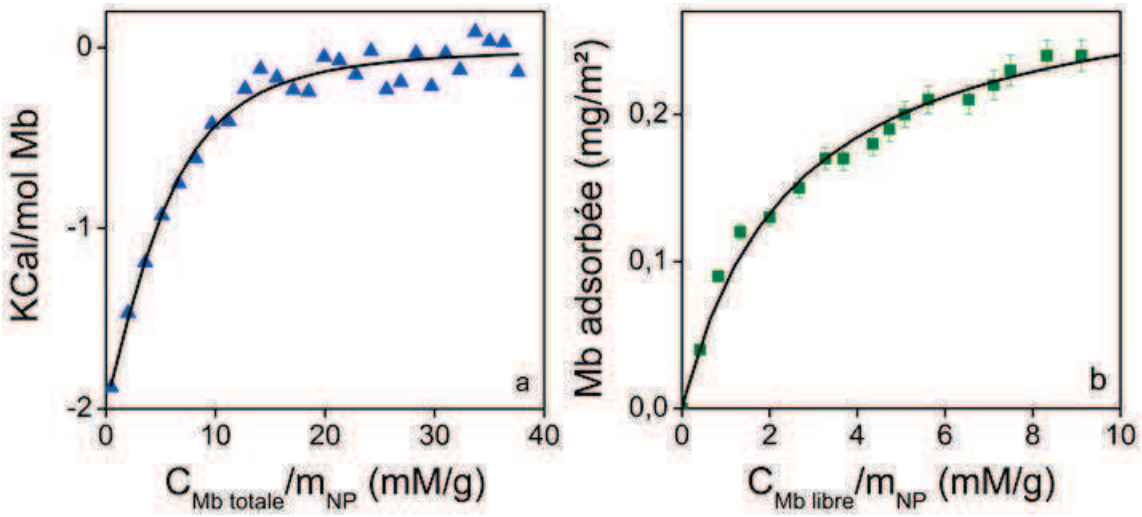


Figure 4-15. *Adsorption de la myoglobine sur les nanoparticules de silice 7 nm en tampon Phosphate à pH 7,4 : (a) variation de chaleur du système mesurée par ITC (▲) et modèle de fixation SSIS, (b) isotherme d'adsorption (■) et modèle de Langmuir.*

Un dégagement de chaleur est mesuré pour une quantité croissante de myoglobine adsorbée jusqu'à $C_{Mb}/m_{NP} \approx 20$ mM/g, puis le système reste stable sans variation de chaleur quelle que soit la quantité de myoglobine ajoutée. L'adsorption de la myoglobine sur les NP de silice 7 nm est donc exothermique et s'accompagne d'un dégagement de chaleur jusqu'à saturation de la surface. La mesure ne montre pas de variation de chaleur après saturation, qui aurait pu être mesurée si une seconde couche de myoglobine s'adsorbait sur la première.

Il est intéressant de remarquer que la mesure en microcalorimétrie et l'isotherme d'adsorption, lorsqu'elles sont mises en parallèle, dessinent la même évolution correspondant à l'adsorption d'une monocouche de la myoglobine sur la silice (Fig. 4-15b).

Pour déterminer les paramètres thermodynamiques de l'adsorption à partir de la variation de chaleur mesurée, il est nécessaire d'appliquer un modèle de fixation. Le modèle de fixation SSIS pour un seul type de sites (Single Set of Identical Sites, voir chap. 2, §4.2, eq. 6 et 7) a été appliqué aux données et montre un bon accord avec les données (Fig. 4-15a). Il permet de calculer la variation d'enthalpie ΔH_{ads}, le nombre de sites de fixation n et la constante d'association K_a (tableau 4-7).

Le nombre de sites de fixation correspond à la quantité de myoglobine adsorbée à saturation, soit 0,29 mg/m² calculé par microcalorimétrie, ce qui est très proche de la valeur de 0,30 mg/m² déterminée par le modèle de Langmuir. Les variations d'énergie de Gibbs et d'entropie sont calculées suivant la relation de Gibbs-Helmholtz (eq. 10).

Paramètres thermodynamiques		Signification
ΔG_{ads} (kJ/mol)	-27,1	Adsorption favorable
ΔH_{ads} (kJ/mol)	-16,1	Adsorption exothermique Contribution enthalpique favorable (60%)
$T.\Delta S_{ads}$ (kJ/mol)	11,0	Gain d'entropie Contribution entropique favorable (40%)
K_a (M^{-1})	$5,7.10^4$	

Tableau 4-7. *Paramètres thermodynamiques de l'adsorption de la myoglobine sur les nanoparticules de silice 7 nm en tampon Phosphate à pH 7,4 calculés en appliquant le modèle de fixation SSIS aux données de microcalorimétrie*

Les contributions enthalpique et entropique sont de -16,1 kJ/mol et de -11,0 kJ/mol respectivement, soit une contribution enthalpique et entropique favorables à l'adsorption de la myoglobine sur les NP de silice et d'importance équivalente. Ces résultats sont comparés à certaines valeurs publiées dans la littérature pour d'autres systèmes protéine/nanoparticule (Fig. 4-16).

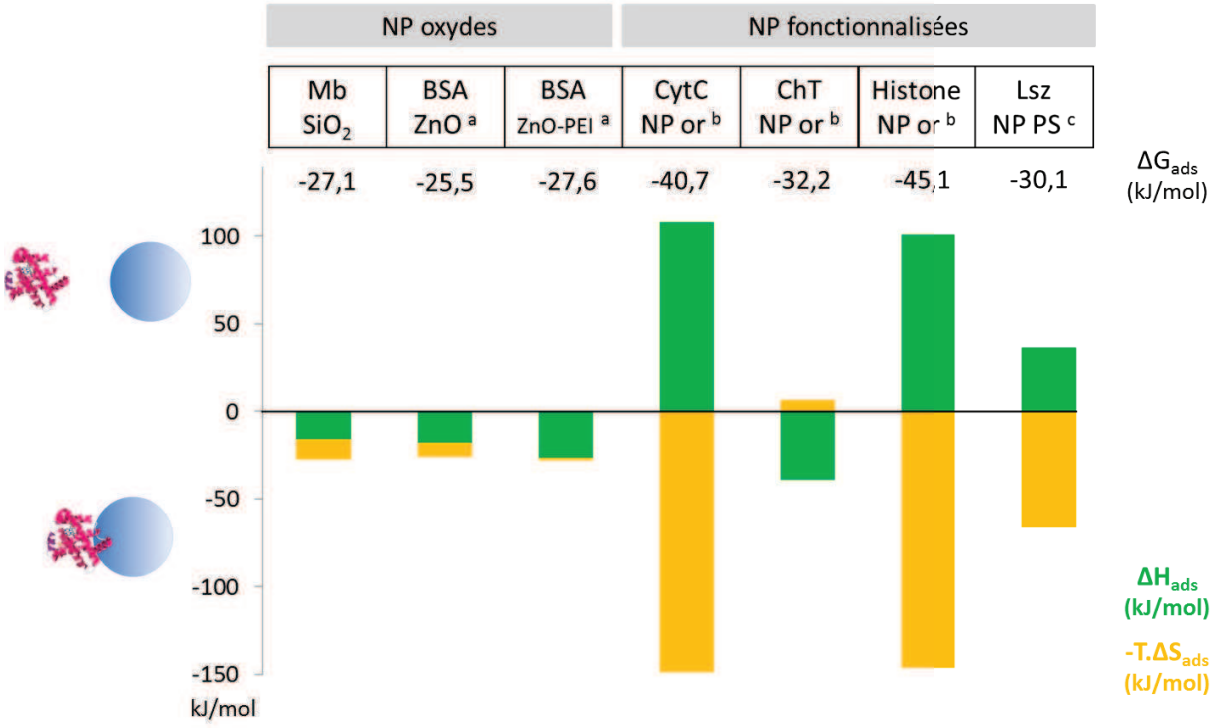


Figure 4-16*. Contributions enthalpique ΔH_{ads} (en vert) et entropique $-T.\Delta S_{ads}$ (en jaune) à l'adsorption des protéines sur les nanoparticules et valeurs de ΔG_{ads} pour chaque système. Les contributions positives sont défavorables à l'adsorption, les contributions négatives sont favorables à l'adsorption. (a : sérum albumine sur NP ZnO avec polyethyleneimine (38), b : cytochrome c, chymotrypsine et histone sur NP d'or avec chaînes carbonées et glycine (37), c : lysozyme sur NP polystyrène (50))*

L'adsorption de la myoglobine sur les NP de silice est comparable du point de vue thermodynamique à celle d'autres oxydes, par exemple l'adsorption de la sérum albumine sur les NP d'oxyde de zinc (*38*). La valeur de ΔG_{ads} est similaire et les contributions enthalpique et entropique sont toutes deux favorables à l'adsorption et d'importance équivalente. D'autres systèmes ont au contraire un comportement très différent du point de vue thermodynamique avec des variations d'enthalpie et d'entropie lors de l'adsorption bien plus importantes. C'est le cas de l'adsorption du cytochrome c et des histones sur les NP d'or fonctionnalisées (*37*) et du lysozyme sur les NP de polystyrène (*50*). De plus, ils présentent une variation d'enthalpie défavorable à l'adsorption, compensée par une forte augmentation de l'entropie du système. Un phénomène opposé est observé pour l'adsorption de la chymotrypsine sur les NP d'or fonctionnalisées (*37*), où seule la contribution enthalpique permet l'adsorption.

Il semble qu'on puisse séparer d'une part l'adsorption des protéines sur les oxydes (SiO_2, ZnO) qui présentent des caractéristiques thermodynamiques communes, et d'autre part l'adsorption des protéines sur les surfaces hydrophobes ou fonctionnalisées (polymère par exemple) qui ont leurs propres spécificités. Une hypothèse peut être une adsorption non spécifique des protéines sur les surfaces d'oxydes qui met en jeu des variations thermodynamiques relativement modérées, et une adsorption plus spécifique sur les nanoparticules fonctionnalisées avec de plus grandes variations des paramètres thermodynamiques de l'adsorption qui dépend de chaque système.

Pour donner un sens aux valeurs de ΔH_{ads} et ΔS_{ads} d'adsorption de la myoglobine sur les NP de silice, il est possible de les comparer aux paramètres thermodynamiques de dénaturation de la myoglobine en solution : ΔH_d(62°C) = 409 kJ/mol et $-T.\Delta S_d$(62°C) = -409 kJ/mol (*51*).

	25°C	62°C
ΔH_d (kJ/mol)	131	409
$-T.\Delta S_d$ (kJ/mol)*	-143	-409

Tableau 4-8. *Paramètres thermodynamiques de dénaturation mesurés à 62°C et calculés à 25°C pour comparaison, d'après* (*51*)

Des différences importantes sont observées entre adsorption et dénaturation : la dénaturation est endothermique tandis que l'adsorption est exothermique, et les variations d'enthalpie et d'entropie sont un ordre de grandeur supérieures pour la dénaturation comparée à l'adsorption. Les deux processus sont donc très différents, que ce soit en termes d'interactions (ΔH) ou de perte de structure (ΔS), et il n'est pas possible de faire une analogie entre adsorption et dénaturation.

Les données de microcalorimétrie permettent également de calculer la constante d'adsorption K_{ads} de la myoglobine sur les NP de silice (ou constante d'association K_a si l'on se réfère à un schéma protéine-ligand). Deux mesures très différentes, la microcalorimétrie ITC et les isothermes d'adsorption mesurée par spectroscopie UV-visible, associées au modèle SSIS d'une part et au modèle de Langmuir d'autre part, permettent donc de calculer le même paramètre K_{ads} (tableau 4-9). La constante de dissociation $K_d = 1/K_a$ est également indiquée car couramment employée pour exprimer l'affinité d'une protéine pour un ligand, même s'il s'agit ici d'une surface.

Constante	Modèle SSIS	Modèle de Langmuir
K_{ads} (M^{-1})	$5{,}7.10^4$	$4{,}4.10^4$
K_d (µM)	18 µM	23 µM
m (mg/m^2)	0,29	0,30

Tableau 4-9. *Comparaison de la quantité de myoglobine adsorbée m, des constantes d'adsorption K_{ads} et de dissociation K_d calculées à l'aide du modèle de fixation SSIS en microcalorimétrie et du modèle de Langmuir pour les isothermes*

Les deux approches, par mesure du dégagement de chaleur et par mesure de la quantité de protéine adsorbée, donnent donc un résultat similaire à la fois pour la constante d'adsorption (à l'incertitude près) et pour la quantité de protéine adsorbée. La concordance entre le modèle de Langmuir et le modèle SSIS montre que chacun de ces deux modèles représente bien l'adsorption de la myoglobine sur les NP de silice.

La constante d'adsorption de la myoglobine qui est de l'ordre de 5.10^4 M^{-1} est moyenne comparée à celle d'autres systèmes protéine-NP (*37, 38*). De grandes différences sont également rapportées dans la littérature en fonction du système : la constante d'adsorption varie de $2{,}6.10^4$ M^{-1} pour la BSA sur les NP d'oxyde de zinc (*38*) à $6{,}0.10^7$ M^{-1} pour les histones sur les NP d'or (*37*). Par comparaison, la constante d'association de l'hème à la myoglobine est de 3.10^{14} M^{-1} (*52*). Les valeurs de K_{ads} sont également cohérentes avec un schéma d'adsorption plutôt non spécifique des protéines sur les NP d'oxydes et plus spécifique pour l'adsorption des protéines sur les NP fonctionnalisées et souligne les différences qui peuvent exister entre différents systèmes protéine-NP.

Les valeurs des constantes d'adsorption ne sont pas très élevées, or l'adsorption des protéines est irréversible par dilution. L'adsorption irréversible des protéines peut être expliquée par la formation de plusieurs points d'ancrage de la protéine avec la surface. Le processus de désorption peut alors être vu comme un phénomène cinétique : il faut une succession d'évènements de désorption qui sont individuellement possibles (un point d'ancrage peut disparaître) mais qui ont une très faible probabilité de se produire simultanément.

6. Echelle d'affinité des protéines pour les nanoparticules de silice

L'étude de l'adsorption des protéines réalisée jusqu'ici s'appliquait à une protéine purifiée mise en contact avec les nanoparticules de silice dans une solution tampon. Ces mesures permettent une étude approfondie des mécanismes d'adsorption d'une protéine et ont montré qu'il existait des différences d'affinité entre myoglobine, hémoglobine, apomyoglobine et sérum albumine pour une surface de silice. Certaines protéines bactériennes ont également été identifiées comme ayant une plus forte affinité pour des surfaces de silice (*53*). Cependant, l'adsorption à partir d'une solution contenant différentes protéines et la mise en compétition pour l'adsorption de protéines ayant des affinités différentes n'a pas été étudiée. Or en situation réelle d'exposition, lorsque les nanoparticules sont en contact avec le milieu biologique, de nombreuses protéines s'adsorbent à la surface des nanoparticules. La composition de la couronne de protéine adsorbée est de plus différente de celle du milieu environnant (*54*) : certaines protéines sont enrichies et d'autres appauvries à la surface des nanoparticules, sans que les déterminants à l'origine de la différence d'affinité des protéines pour la surface ne soient clairement identifiés. Pour étudier les différences d'affinité entre protéine et surtout en comprendre les déterminants, un nombre plus important de protéines dont on pourra comparer les caractéristiques est nécessaire.

Pour mieux comprendre les mécanismes d'adsorption des protéines à partir d'un milieu complexe, les effets d'affinité et de compétition ont été séparés. Nous avons vu à partir de 4 protéines modèles que des différences d'affinité pour la surface de silice pouvaient être observées. Un effet de compétition entre deux protéines modèles d'affinité différente pour les NP de silice, l'hémoglobine et la BSA, a été testé. D'après la théorie de Vroman, la différence d'affinité devrait conduire à la désorption de la protéine de plus faible affinité (la BSA) par la protéine de plus forte affinité (l'hémoglobine) (*55*). La sérum albumine est adsorbée seule sur les NP puis l'hémoglobine est ajoutée à la solution. Le déplacement de la sérum albumine par l'hémoglobine est ensuite mesuré.

Un système totalement différent contenant plusieurs centaines de protéines analysables a ensuite été utilisé : il s'agit d'un extrait cellulaire de levure. Les NP de silice ont été directement mises en contact avec l'extrait cellulaire et les compositions en protéines de la couronne de protéines adsorbée et du surnageant ont été mesurées par électrophorèse bidimensionnelle et comparées à celle de l'extrait total. Pour nous affranchir des effets de compétition, la concentration en NP a été ajustée pour se trouver « à mi-chemin » de l'isotherme d'adsorption : la surface n'est donc pas saturée par les protéines. Les différences de composition entre protéines adsorbées et surnageant nous permettront d'identifier quelles protéines sont enrichies ou appauvries à la surface des NP et donc de déterminer l'affinité d'un grand nombre de protéines pour une surface de silice.

6.1 Compétition entre hémoglobine et sérum albumine

Nous avons étudié le cas simple d'une compétition entre une protéine initialement adsorbée, la sérum albumine bovine, qui est couramment utilisée pour passiver des surfaces, et une seconde protéine susceptible de s'adsorber à son tour et de plus grande affinité, l'hémoglobine. L'isotherme d'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice a été mesurée pour différentes concentrations initiales en BSA jusqu'à une concentration identique en BSA et en hémoglobine de 50 µM (Fig. 4-17).

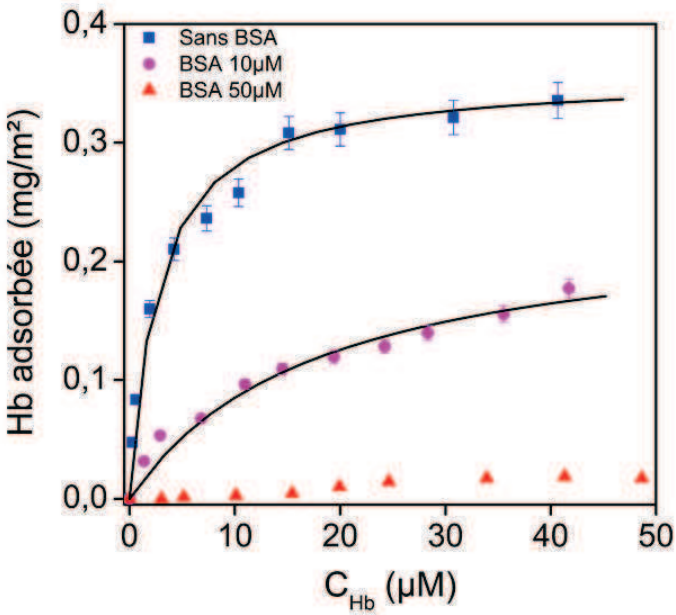


Figure 4-17. *Isothermes d'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice 20 nm en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 pour différentes concentrations initiales en BSA : 0 (■), 10 µM (●) et 50 µM (▲) ; modèle de Langmuir (en noir). Les NP sont mises en contact avec la BSA puis l'hémoglobine est ajoutée à la solution contenant BSA et NP (C_{NP} = 4,5 mg/mL)*

La quantité d'hémoglobine adsorbée diminue fortement lorsque la BSA est initialement adsorbée sur les NP de silice. Lorsque la surface est saturée par la BSA (C_{BSA} = 50 µM), la quantité d'hémoglobine adsorbée est divisée par 20 et devient quasi nulle (m_{ads} = 0,02 mg/m²). Ces résultats montrent d'une part que l'hémoglobine ne peut pas déplacer la BSA initialement adsorbée par effet Vroman, bien que son affinité soit supérieure, d'autre part que l'hémoglobine ne peut pas s'adsorber en seconde couronne sur la BSA *via* des interactions protéine-protéine.

De plus, la quantité totale de protéine adsorbée est légèrement supérieure en présence de BSA (m_{ads} = 0,42 mg/m²) et indépendante des proportions respectives de BSA et d'hémoglobine adsorbées (Fig. 4-18). Cela confirme l'absence d'adsorption en seconde couronne et montre que l'occupation de la

surface est identique pour les deux protéines, sans que l'on puisse trancher entre une adsorption non spécifique ou un même site d'adsorption.

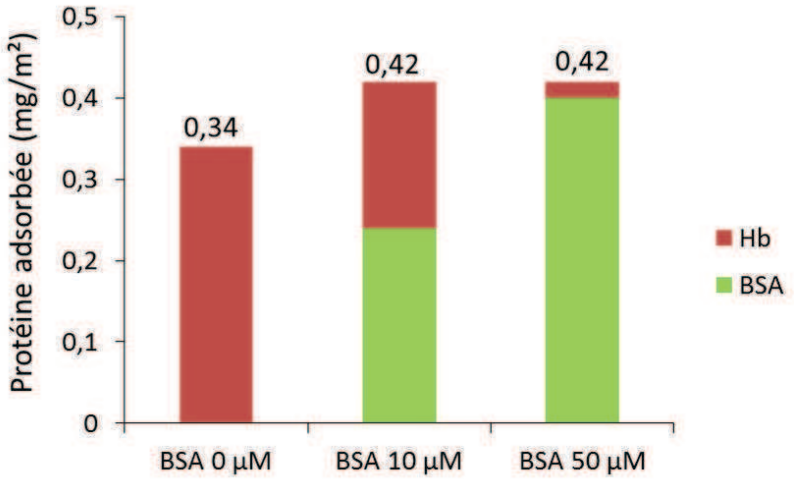


Figure 4-18. *Quantités d'hémoglobine (en rouge) et de BSA (en vert) adsorbées sur les NP de silice 20 nm en fonction de la concentration initiale en BSA. La quantité totale de protéine adsorbée (Hb+BSA) est indiquée pour chaque concentration.*

Lorsque les nanoparticules sont mises en contact avec un milieu biologique contenant une grande variété de protéines, une distinction est souvent faite dans la littérature entre couronne de protéine « dure » et « molle » (hard corona, soft corona) (*56, 57*). La première couronne de protéines est adsorbée de façon irréversible tandis qu'une couche de protéines plus faiblement adsorbées à la surface est le siège d'un plus grand nombre d'échanges et d'interactions avec le milieu environnant. Dans notre expérience, seule une couche de BSA adsorbée de façon irréversible est identifiée et l'hémoglobine ne forme pas de seconde couronne. Il est possible que seules les protéines qui développent des interactions spécifiques avec les protéines adsorbées en première couronne puissent s'adsorber en seconde couronne. L'étude d'un système comportant une plus grande variété de protéines est proposée pour mieux comprendre ce type d'organisation.

6.2 Adsorption de protéines à partir d'un extrait cellulaire de levure

Les nanoparticules de silice 20 nm sont mises en contact avec un extrait cellulaire de levure. L'adsorption des protéines sur les NP est suivie tout d'abord pour l'ensemble des protéines de l'extrait par la mesure de l'isotherme d'adsorption des protéines marquées au ^{35}S sur les NP, puis les protéines présentes dans la corona et dans le surnageant sont identifiées et leur abondance quantifiée par électrophorèse à 2 dimensions et autoradiographie en collaboration avec le Laboratoire de Biologie Intégrative au CEA (voir chap. 2, §4.4). J'ai analysé les caractéristiques des protéines enrichies à la surface des NP et dans le surnageant à l'aide d'outils statistiques, Christelle

Mathé a réalisé les études de protéomique lors de son postdoctorat et les développements en analyse structurale et en dynamique moléculaire ont été réalisés par Jean-Christophe Aude et Yves Boulard.

L'isotherme d'adsorption des protéines de levure sur les nanoparticules de silice a été mesurée en tampon PBS à pH 7,4 (Fig. 4-19).

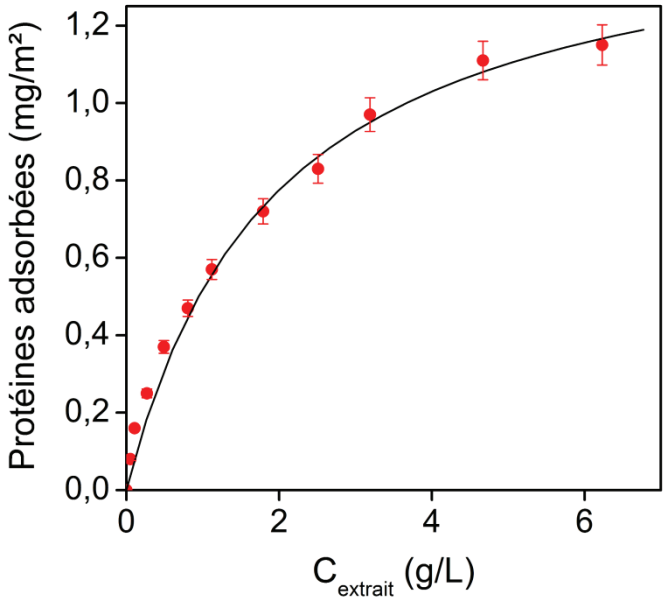


***Figure 4-19**. Isotherme d'adsorption des protéines de levure sur les nanoparticules de silice 20 nm en tampon PBS à pH 7,4 à partir d'un extrait cellulaire de levure (C_{NP} = 5 mg/mL)*

Le principe de la mesure est identique à celui des isothermes d'adsorption réalisées sur les protéines modèle isolées, seul le mode de détection change : pour mesurer la concentration en protéine adsorbée et libre, les protéines de levure ont été marquées au ^{35}S et leur concentration est mesurée par scintillation liquide (voir chap. 2, §4.4). L'isotherme d'adsorption des protéines de levure sur les NP de silice a une forme très semblable à celles des protéines isolées (par exemple, fig. 4-17). De plus, le modèle de Langmuir s'ajuste bien aux données, ce qui est surprenant car avec un très grand nombre de protéines différentes présentes susceptibles d'interagir entre elles, le système s'écarte d'autant plus du cas idéal de l'adsorption de molécules de gaz sur une surface représenté par le modèle (voir §2).

La quantité de protéine adsorbée à saturation est de 1,2 mg/m², ce qui est deux fois plus élevé que la quantité de BSA adsorbée dans les mêmes conditions (tampon PBS à pH 7,4) et trois fois plus élevé que la quantité de myoglobine ou d'hémoglobine adsorbée dans des conditions proches (tampon Phosphate à pH 7,4).

Pour expliquer cette différence, plusieurs hypothèses peuvent être proposées :

- l'agencement des protéines adsorbées sur la surface peut être plus compact que lors de l'adsorption d'une seule protéine, grâce aux différences de taille entre protéines, et peut-être grâce à des interactions latérales entre protéines adsorbées ;
- l'occupation d'un plus grand nombre de sites de fixation qui ne seraient pas propice à l'adsorption de la BSA ou de la myoglobine, dans ce cas plus de la moitié de la surface des NP serait de fait inoccupée lors de l'adsorption de la BSA, de la myoglobine et de l'hémoglobine, et le serait aussi lors de l'adsorption conjointe de la BSA et de l'hémoglobine, ce qui parait peu probable, du moins à une telle échelle ;
- l'adsorption de nombreuses protéines oligomériques ou l'adsorption multicouche des protéines de levure, avec une première couronne de protéines adsorbées directement sur la surface et une seconde couronne de protéines liées aux premières par des interactions protéine-protéine. Limiter l'adsorption à une à deux couches de protéines pourrait expliquer que le modèle de Langmuir puisse tout de même s'appliquer.

Cette dernière hypothèse rejoindrait l'image d'une couronne « dure » et « molle » lors de l'adsorption de protéines sur des NP à partir d'un milieu biologique développée dans la littérature (*56, 57*). Identifier les protéines adsorbées pourra permettre d'identifier des partenaires privilégiés pour des interactions protéine-protéine qui s'ajouteraient aux interactions protéine-surface.

6.3 Identification des protéines de levure adsorbées et non adsorbées

Le génome de la levure est composé d'environ 6000 gènes, ce qui correspond à 3000 à 4000 protéines exprimées en fonction des conditions. Plusieurs milliers de protéines sont ainsi présentes dans l'extrait cellulaire. Lorsque les nanoparticules de silice sont mises en contact avec l'extrait cellulaire, plusieurs milliers de protéines peuvent s'adsorber sur les NP. Il est donc nécessaire de disposer d'une technique adéquate pour identifier les protéines qui interagissent avec les nanoparticules. Par électrophorèse à 2 dimensions, 100 à 300 protéines de l'extrait peuvent être visualisées sur un gel. Les 100 protéines les plus abondantes ont été préalablement identifiées par différentes techniques, comme la spectrométrie de masse, et peuvent être analysées de façon quantitative. C'est donc cette carte d'une centaine protéines qui servira de base de travail pour identifier les protéines adsorbées et non adsorbées sur les NP de silice (Fig. 4-22A).

La principale limitation de cette méthode est l'exclusion des protéines non solubles. Au final, seule une fraction du protéome est identifiée sur la carte 2D. La spectrométrie de masse peut permettre d'analyser un plus grand nombre de protéines, mais cela reste encore limité comparé à la taille du

protéome. Cette analyse exclut les protéines les plus grandes, les plus petites et les plus basiques, ainsi que les protéines membranaires, qui pourraient être des cibles privilégiées d'interaction lors d'un contact avec les NP à l'extérieur de la cellule.

Pour s'affranchir d'un effet de compétition entre protéines de l'extrait et identifier les seuls effets d'affinité des protéines sur la surface, le rapport de concentration entre protéines de l'extrait (1 mg/mL) et NP (5 mg/mL) ne permet pas la saturation de la surface des NP (voir chap. 2, §4.4). Dans ces conditions, 37 % de protéines de l'extrait sont adsorbées et 63 % sont non adsorbées.

Les cartes 2D présentées sont celles : 1) de l'extrait total, 2) des protéines adsorbées, 3) des protéines non adsorbées et 4) la superposition des cartes 2D des protéines adsorbées et non adsorbées, qui doivent reproduire la carte de l'extrait total si aucune perte de matériel ne s'est produite au cours de l'expérience (Fig. 4-20). Pour plus de clarté, seule une région de la carte 2D est représentée en encart pour les protéines adsorbées, non adsorbées et la superposition. L'attribution de l'ensemble des protéines adsorbées et non adsorbées est reportée sur la carte de l'extrait total, en gras pour les protéines adsorbées et en caractère normal pour les protéines non adsorbées.

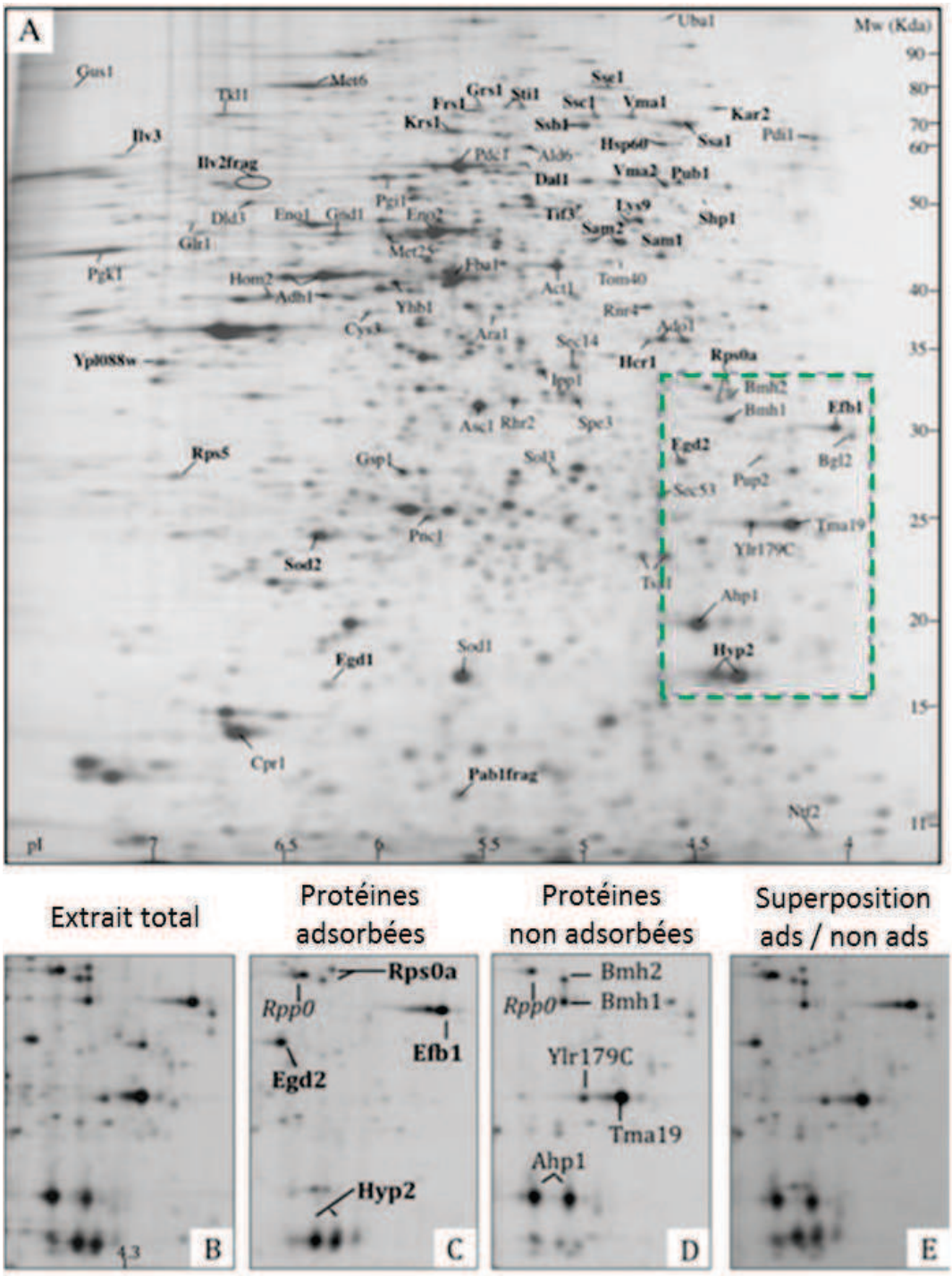


***Figure 4-20**. Autoradiographie des électrophorèses à 2 dimensions des protéines de levure marquées au ^{35}S. A, carte de référence de l'extrait - les protéines adsorbées sont identifiées en gras et les non adsorbées en caractère standard. Zoom sur l'encadré : B, extrait total, C, protéines adsorbées, D, protéines non adsorbées, E, superposition des cartes des protéines adsorbées et non adsorbées.*

La première observation est une signature très différente entre protéines adsorbées et non adsorbées par rapport à l'extrait total : la composition de la couronne et par différence de la solution diffèrent de la composition initiale de l'extrait, certaines protéines sont présentes uniquement dans

la couronne tandis que d'autres sont présentes uniquement dans la solution. Par exemple, sur la région encadrée de la carte 2D, la sous-unité ribosomique 40S (Rps0a) n'est visible que sur la carte des protéines adsorbées, tandis que la peroxyredoxine (Ahp1) n'apparaît que sur celle des protéines non adsorbées. D'autres protéines ont un comportement intermédiaire et apparaissent sur les deux cartes avec une intensité équivalente : elles sont donc présentes en quantités équivalentes dans la couronne et libres en solution. Enfin, la superposition des cartes 2D des protéines adsorbées et non adsorbées reproduit bien la carte de l'extrait total, il n'y a donc pas d'artefact lié à la perte de protéines au cours des manipulations.

Il y a donc un net effet de sélection des protéines lors de leur adsorption par enrichissement ou par appauvrissement à la surface de la silice par rapport à l'extrait initial. Les différences d'affinité entre protéines pour la surface de silice sont donc importantes et ne se limitent pas à quelques cas particuliers, telle que la protéine bactérienne identifiée dans une autre étude (*53*). De plus, si certaines protéines ont une plus grande affinité pour la surface de silice, d'autres semblent ne montrer aucune affinité pour la surface, voire une résistance à l'adsorption puisqu'elles ne sont pas ou très peu présentes dans la couronne alors qu'il n'y a pas d'effet de compétition dans cette expérience. La non adsorption de certaines protéines ouvre des perspectives intéressantes : non seulement certaines caractéristiques des protéines doivent favoriser leur adsorption mais peuvent également fortement défavoriser leur adsorption sur la surface de silice.

Pour classer et quantifier l'affinité des protéines pour la surface de silice, nous avons quantifié leur enrichissement ou leur appauvrissement dans la couronne par rapport à l'extrait total (voir chap. 2, §4.4). Un seuil d'enrichissement ou d'appauvrissement de 1,5 a été choisi pour séparer les protéines en trois groupes : protéines adsorbées (enrichies dans la couronne), protéines non adsorbées (appauvries dans la couronne) et protéines intermédiaires (présentes dans la couronne et dans la solution en quantité équivalente) (tableau 4-10). Cette distinction est nécessaire pour analyser ensuite les caractéristiques des protéines les plus fortement enrichies d'une part et appauvries d'autre part et identifier les critères qui peuvent expliquer les différences d'affinité entre protéines pour la surface de silice.

Au total, sur 101 protéines analysées quantitativement, 31 protéines sont enrichies à la surface de la silice lors de l'adsorption, 46 protéines sont plutôt résistantes à l'adsorption et 24 protéines ont un comportement intermédiaire (tableau 4-10). Ces groupes sont suffisamment importants pour permettre une analyse statistique comparative des caractéristiques physico-chimiques des protéines.

31 protéines adsorbées		
Nom	**ORF**	**Ratio**
GRS1	YBR121C	11.11
EGD2	YHR193C	8.33
ILV2 (f)	YMR108W	7.69
SSB1	YBL229W	5.00
PAB1 (f)	YER165W	5.00
STI1	YOR027W	4.35
KAR2	YJL034W	4.00
RPS5	YJR123W	3.70
EFB1	YAL003W	3.57
RPS0A	YGR214W	3.33
SAM2	YDR502C	3.23
FRS1	YLR060W	3.23
SSE1	YPL106C	3.13
SSC1	YJR045C	3.03
EGD1	YPL037C	3.03
HYP2	YEL034W	2.94
SHP1	YBL058W	2.78
SAM1	YLR180W	2.63
ILV3	YJR016C	2.63
SOD2	YHR008C	2.50
VMA1	YDL185W	2.33
HSP60	YLR259C	2.33
YPL088W	YPL088W	2.17
SSA1	YAL005C	2.17
LYS9	YNR050C	2.17
DAL1	YIR027C	2.00
TIF3	YPR163C	1.89
KRS1	YDR037W	1.72
HCR1	YLR192C	1.67
PUB1	YNL016W	1.64
VMA2	YBR128C	1.59

24 Protéines intermédiaires

Adk1, Arg1, Cdc48, Cys4, Gdh1, Gln1, Gua1, Hsc82, Hxk2, Ilv5, Pdb1, Psa1, Pyk1, Rbk1, Rpa2, Rp145, Rpp0, Sgt2, Ssa2, Tdh3, Tif45, Trr1, Vma4, Zwf1

46 protéines non adsorbées		
Name	**ORF**	**Ratio**
BGL2	YGR282C	0.63
DLD3	YEL071W	0.63
TSA1	YML028W	0.63
GSP1	YLR293C	0.62
ACT1	YFL039C	0.61
FBA1	YKL060C	0.61
GUS1	YGL245W	0.61
ARA1	YBR149W	0.58
CPR1	YDR155C	0.58
GLR1	YPL091W	0.58
RHR2	YIL053W	0.58
ADH1	YOL086C	0.55
PUP2	YGR253C	0.55
SEC14	YMR079W	0.55
YHB1	YGR234W	0.55
PDC1	YLR044C	0.54
RNR4	YGR180C	0.53
SEC53	YFL045C	0.53
PGK1	YCR012W	0.50
UBA1	YKL210W	0.50
SPE3	YPR069C	0.48
PNC1	YGL037C	0.47
ADE6	YGR061C	0.46
SOL3	YHR163W	0.46
TKL1	YPR074C	0.46
GND1	YHR183W	0.44
MET25	YLR303W	0.44
YLR179C	YLR179C	0.43
AHP1	YLR109W	0.39
IPP1	YBR011C	0.38
ADO1	YJR105W	0.36
PGI1	YGR196C	0.36
ENO2	YHR174W	0.35
CYS3	YAL012W	0.34
ENO1	YGR254W	0.33
HOM2	YDR158W	0.32
MET6	YER091C	0.32
BMH1	YER177W	0.29
BMH2	YDR099W	0.29
ALD6	YPL061W	0.28
PDI1	YCL043C	0.28
SOD1	YJR104C	0.22
TMA19	YKL056C	0.22
TOM40	YMR203W	0.22
ASC1	YMR116C	0.21
NTF2	YER009W	0.11

***Tableau 4-10**. Identification des protéines de levure préférentiellement adsorbées et non adsorbées sur les nanoparticules de silice 20 nm en tampon PBS à pH 7,4. Le ratio est le facteur d'enrichissement entre protéines adsorbées et protéines non adsorbées (ORF = Open Reading Frame number, f = fragment)*

L'enrichissement le plus important est observé pour la glycine-ARNt ligase (Grs1) avec un facteur 11 entre protéine adsorbée et non adsorbée, et le plus faible pour la protéine 14 impliquée dans

l'autophagie (Vma2) avec un facteur de 1,5. Il existe donc une certaine disparité au sein même du groupe des protéines adsorbées où certaines protéines ont une plus grande affinité que d'autres pour la surface des NP de silice. L'appauvrissement le plus important est celui de la superoxide dismutase à Cu-Zn (Sod1) avec un facteur d'appauvrissement de 5 et le plus faible est celui de la β-glucanase (Bgl2) avec un facteur d'appauvrissement de 1,5.

L'identification des protéines adsorbées est aussi riche en informations : elle permet de cibler les protéines qui s'adsorbent sur les nanoparticules de silice en conditions « réelles » d'exposition à partir d'un milieu biologique complexe contenant des milliers de protéines et autres molécules. Les protéines identifiées peuvent alors être analysées plus spécifiquement, par exemple à l'aide des outils développés pour l'étude de l'adsorption de l'hémoglobine et de la myoglobine.

Parmi les 31 protéines adsorbées identifiées, les protéines impliquées dans le cycle de vie des protéines sont largement surreprésentées (22 protéines) avec 14 protéines impliquées dans la traduction, 6 protéines chaperonnes (HSP) et 2 protéines impliquées dans la dégradation des protéines. Les autres protéines adsorbées ont des fonctions variées : 3 oxydoréductases, 3 transférases, 2 hydrolases et une lyase (Fig. 4-21).

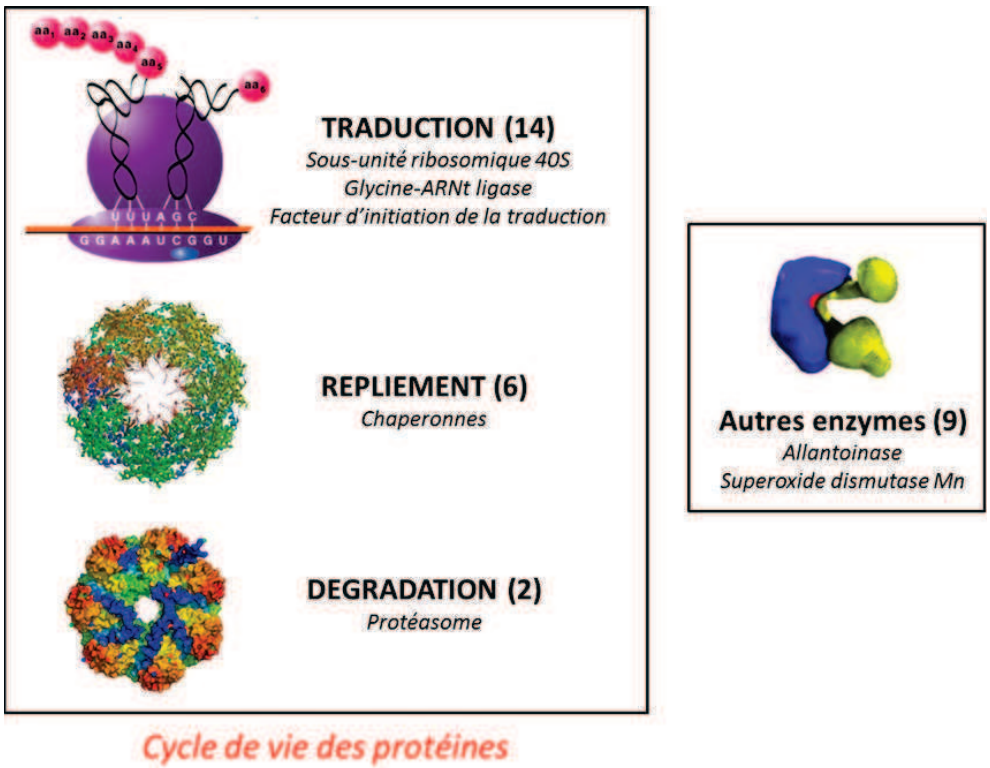


***Figure 4-21**. Principales fonctions des protéines de levure adsorbées sur les NP de silice 20 nm (le nombre de protéines est indiqué pour chaque fonction) : les protéines impliquées dans le cycle de vie des protéines, et notamment dans la traduction, sont largement surreprésentées.*

Les enzymes adsorbées constituent une cible de choix pour étudier les modifications d'activité des protéines adsorbées sur les NP. La plupart des études d'activité de protéines adsorbées sur les NP sont basées sur un système modèle choisi arbitrairement, par exemple l'hémoglobine dans notre étude ou le lysozyme et la chymotrypsine qui sont parmi les enzymes les plus étudiées dans la littérature (*50, 58-62*). Identifier les protéines qui seraient probablement adsorbées en conditions réelles d'exposition et tester leur activité est beaucoup plus pertinent du point de vue toxicologique. Cela ouvre également la voie à des tests d'activité enzymatique réalisés en milieu complexe en présence d'une couronne complète de protéines adsorbées.

Parmi les enzymes adsorbées sur les NP de silice, l'allantoinase (Dal1) qui est impliquée dans le métabolisme de l'azote chez de très nombreux organismes (bactérie, levure, plantes, mammifères) et dont l'activité enzymatique pourrait être relativement facile à mesurer avec un seul substrat (l'allantoine) et un seul produit (l'allantoate) pourrait être un bon candidat. La superoxide dismutase constitue un cas particulier car la forme Mn est adsorbée tandis que la forme Cu-Zn n'est pas adsorbée, un changement de comportement en fonction de la nature du métal qui est parfaitement visible sur les cartes 2D, sans qu'on puisse pour l'instant l'expliquer.

Plusieurs protéines chaperonnes ont été identifiées parmi les protéines adsorbées. Ce sont toutes des HSP (Heat Shock Protein), protéines de stress impliquées dans le repliement des protéines dénaturées. Or les protéines adsorbées sur une surface sont susceptibles de subir différentes modifications et peuvent perdre une partie de leur structure (*40, 63-65*), et la quantité de protéines adsorbées sur les NP de silice nous indiquerait aussi une adsorption de certaines protéines de levure en seconde couronne. Il est possible qu'une première couronne de protéine soit adsorbée avec une forte affinité et que les chaperonnes reconnaissent les protéines adsorbées dont la structure est modifiée. Les protéines partiellement dépliées sur la surface joueraient alors le rôle « d'hameçons » pour les chaperonnes. Une étude est en cours au laboratoire pour étudier les relations entre NP de silice, protéine dénaturée et protéines chaperonnes. Elle permettra notamment de tester l'hypothèse de reconnaissance des protéines adsorbées partiellement dénaturées par les chaperonnes.

7. Critères structuraux d'adsorption des protéines de levure sur les nanoparticules de silice

Identifier un grand nombre de protéines de levure adsorbées et non adsorbées sur les NP de silice permet de comparer leurs caractéristiques - composition en acides aminés, structure et dynamique -

pour identifier les déterminants physico-chimiques de l'affinité et donc de l'adsorption des protéines sur une surface de silice. Le premier critère de comparaison et le plus simple à observer est la masse et la charge globale par migration en électrophorèse 2D des protéines adsorbées et non adsorbées. Les cartes 2D obtenues, dans les limites connues de la méthode où les protéines qui ont les masses et les points isoélectriques les plus extrêmes ne sont pas représentées, sont relativement homogènes aussi bien pour les protéines adsorbées que non adsorbées et ne montrent pas de tendance particulière en terme de masse ou de point isoélectrique (Fig. 4-22).

7.1 Analyse statistique de la séquence primaire

Une première analyse à partir de la séquence primaire des protéines adsorbées et non adsorbées a été réalisée à l'aide du programme Profeat (*66*) : 432 critères (ou descripteurs) sont calculés pour chaque protéine, puis moyennés pour l'ensemble des protéines adsorbées d'une part, non adsorbées d'autre part. Chaque critère est ensuite analysé pour déterminer s'il présente une différence significative entre protéines adsorbées et non adsorbées. Une première analyse qualitative peut être réalisée en comparant directement la différence mesurée pour chaque critère (Fig. 4-22).

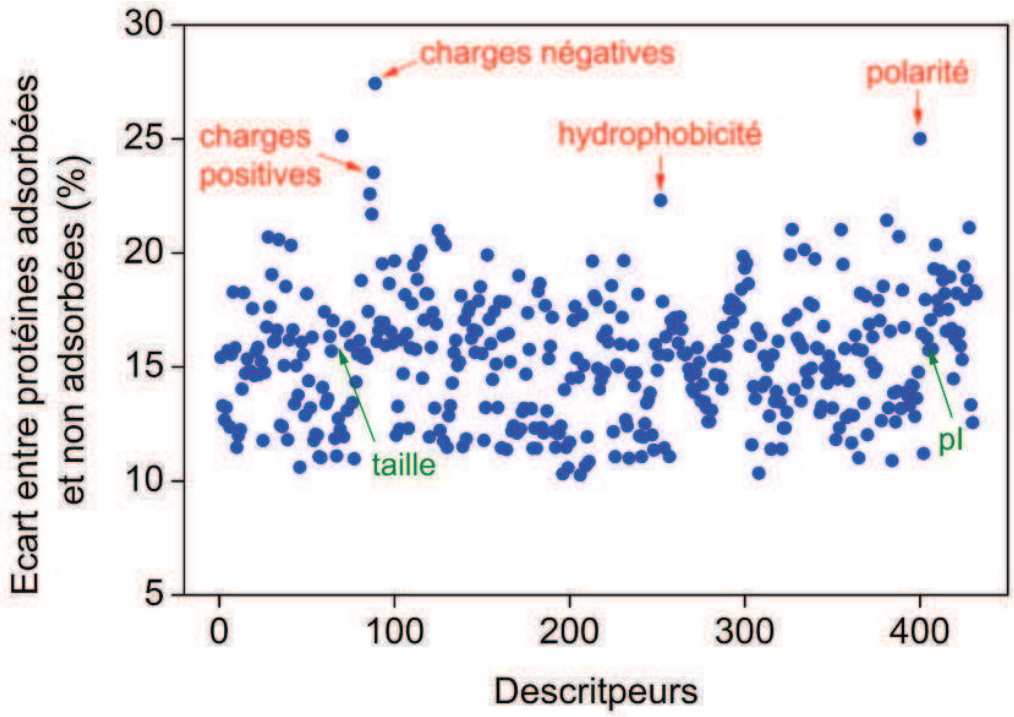


***Figure 4-22**. Ecart entre la valeur moyenne de chacun des 432 critères testés par le programme Profeat (66) entre protéines de levure adsorbées et non adsorbées (%). La différence est exprimée en valeur absolue et reflète aussi bien un enrichissement qu'un appauvrissement dans les protéines adsorbées par rapport aux non adsorbées. Quelques exemples de critères différents (en rouge) et semblables (en vert) entre les deux groupes sont donnés.*

Les critères qui sortent du « bruit de fond », c'est-à-dire de la différence moyenne de l'ensemble des critères, indiquent une différence importante sur un critère donné entre protéines adsorbées et non adsorbées. Par exemple, le nombre de charges positives, mais aussi le nombre de charges négatives, la polarité et l'hydrophobicité pourraient être représentatifs de caractéristiques différentes entre protéines adsorbées et non adsorbées, ce qui n'est pas le cas de la charge globale de la protéine (pI estimé) ni de sa masse. La même analyse a été réalisée à partir des protéines réparties aléatoirement en deux groupes : les critères identifiés ne réapparaissent pas pour des groupes aléatoires. De plus, pour ne pas biaiser l'analyse, lorsque plusieurs protéines de la même famille étaient représentées dans un même groupe (par exemple, deux protéines chaperonnes très proches), une seule était prise en compte dans l'analyse.

Parmi les 432 critères analysés par Profeat, de nombreux critères sont redondants ou interdépendants, le même critère peut également être calculé à l'aide de différentes méthodes : le critère hydrophobicité « ressort » ainsi deux fois sur la figure 4-22, pour deux calculs différents.

Une analyse statistique plus approfondie des différences entre les deux populations a été réalisée à partir d'un nombre plus restreint de critères les plus importants (et sans redondance) : 45 critères sont calculés à partir de la séquence primaire des protéines, tels que la composition en acides aminés, l'hydrophobicité, la taille ou la polarité (*67*). Les acides aminés aromatiques sont définis selon la règle de Hückel et comprennent la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane et l'histidine. Les critères « hélices-α » et « feuillets-β » correspondent à la classification des acides aminés les plus couramment présents dans les deux types de structure secondaire, sans que cela ne présage nécessairement de l'organisation finale de la structure secondaire des protéines. Ce critère est plutôt utilisé comme un indicateur en complément des analyses structurales réalisées par la suite sur les deux groupes de protéines.

Le test de Brunner-Munzel (qui ne fait pas d'hypothèse sur la forme des distributions, car celles-ci ne sont pas nécessairement gaussiennes) est appliqué aux analyses pour déterminer si la différence calculée sur un critère donné est significative ou non (*68*). Pour chaque critère analysé, la valeur de p est donnée (*69*) : elle représente la probabilité d'obtenir une valeur au moins aussi extrême que celle mesurée entre les deux groupes de protéines adsorbées et non adsorbées, à partir d'une permutation aléatoire des protéines dans les deux groupes. Un critère est significatif si $p < 5.10^{-2}$ (voir chap. 2, §4.4). Plus cette valeur est petite, plus la différence entre protéine adsorbées et non adsorbées est significative. Sur les 45 critères testés, seuls 14 présentent une différence significative (tableau 4-11).

Critère	Acides aminés correspondants	Protéines adsorbées / Protéines non adsorbées	Test statistique *p*
Aromatiques	Phe, Trp, Tyr, His	**appauvries**	$2{,}1.10^{-8}$
Polaires	Arg, Lys, Glu, Asp, Gln, Asn	**enrichies**	$4{,}7.10^{-6}$
Feuillets-β	Val, Ile, Tyr, Cys, Trp, Phe, Thr	**appauvries**	$1{,}4.10^{-5}$
Hélices-α	Glu, Ala, Leu, Met, Gln, Lys, Arg, His	**enrichies**	$4{,}2.10^{-5}$
Hydrophobes	Cys, Leu, Val, Ile, Met, Phe, Trp	**appauvries**	$8{,}0.10^{-5}$
Neutres	tous sauf Lys, Arg, Glu, Asp	**appauvries**	$9{,}7.10^{-5}$
Basiques	Arg, Lys	**enrichies**	$1{,}1.10^{-4}$
Arginine	Arg	**enrichies**	$4{,}3.10^{-4}$
Tyrosine	Tyr	**appauvries**	$1{,}1.10^{-3}$
Acides	Glu, Asp	**enrichies**	$3{,}1.10^{-3}$
Histidine	His	**appauvries**	$3{,}5.10^{-3}$
Glutamate	Glu	**enrichies**	$5{,}2.10^{-3}$
Tryptophane	Trp	**appauvries**	$6{,}3.10^{-3}$
Phénylalanine	Phe	**appauvries**	$9{,}3.10^{-3}$

***Tableau 4-11**. Critères calculés à partir de la séquence primaire des protéines et présentant une différence significative ($p < 5.10^{-2}$ avec le test de Brunner-Munzel) entre protéines adsorbées et non adsorbées*

Différentes caractéristiques des protéines apparaissent parmi les critères identifiés : charge et polarité des acides aminés, aromaticité, hydrophobicité et tendance à une organisation en un type de structure secondaire.

7.2 Interprétation des critères identifiés

Enrichissement en résidus polaires/chargés

Les protéines adsorbées sont clairement enrichies en acides aminés polaires ($p = 4{,}7.10^{-6}$), chargés positivement ($p = 1{,}1.10^{-4}$) et négativement ($p = 3{,}1.10^{-3}$), tandis que les protéines non adsorbées sont enrichies en acides aminés hydrophobes ($p = 8{,}0.10^{-5}$) et non chargés ($p = 9{,}7.10^{-5}$).

1) Les polaires

La surface de silice, qui présente de nombreux silanols SiOH, est hydrophile, polaire et chargée à pH 7,4 (voir chap. 3, §2). L'enrichissement des protéines adsorbées en résidus polaires et l'appauvrissement en résidus hydrophobes sont attendus pour ce type de surface, où les interactions électrostatiques ou la formation de liaisons hydrogène sont supposées jouer un rôle important lors de l'adsorption (*46*).

2) Les basiques

L'histidine n'a pas été prise en compte dans les résidus basiques car son pKa libre en solution est de 6,3 (*43*). Seules l'arginine et la lysine (pKa libre en solution de 10,4 et 12,0 respectivement (*43*)) ont été prises en compte car il est probable qu'un nombre important de résidus arginine et lysine mais que peu de résidus histidine soient chargés positivement au sein des protéines à pH 7,4.

L'enrichissement en arginine est plus significatif que l'enrichissement en lysine. L'enrichissement en résidus basiques peut être corrélé à la formation d'interactions électrostatiques entre arginine, lysine et groupements SiO^- à la surface de la silice, qui favorise l'adsorption de la protéine. Une étude par mutagenèse dirigée de l'adsorption du lysozyme sur l'hydroxyapatite a ainsi montré que le remplacement d'un des résidus basiques de surface par un résidu hydrophobe, l'alanine, diminuait l'affinité de la protéine pour la surface (*71*). La formation d'interactions électrostatiques serait alors un mécanisme d'adsorption commun à différentes protéines lors de l'adsorption sur différentes surfaces d'oxydes.

3) Les acides

Seul l'enrichissement en glutamate est discuté, car les résidus aspartate ne sont pas assez nombreux dans les protéines étudiées pour permettre une comparaison statistique. S'il est facile de comprendre un enrichissement en résidus basiques, il paraît moins évident d'expliquer l'enrichissement en glutamate, *a priori* défavorable à l'adsorption car de charge identique à la surface de silice à pH 7,4. L'enrichissement en glutamate peut être vu sous deux angles très différents : le glutamate n'interagit pas directement avec la surface de la silice et n'est enrichi que par compensation de charge au sein de la protéine lié à l'excès d'arginine, et/ou le glutamate interagit en certains endroits avec la silice grâce à une couche de contre-ions, comme les ions Na^+ contenus à forte concentration dans le tampon PBS.

Une façon de résoudre ce problème serait de déterminer quels sont les résidus qui interagissent directement avec la surface lors de l'adsorption. Pour cela, une technique de cartographie de surface par irradiation a été appliquée à la myoglobine adsorbée sur les NP de silice (voir chap. 5, §6). Ce type d'expérience pourrait permettre d'identifier directement les acides aminés impliqués dans l'adsorption, et par exemple d'inclure ou d'exclure le glutamate de ce groupe.

4) Les clusters de charge

Les interactions électrostatiques jouent un rôle important lors de l'adsorption, comme le montre l'enrichissement en acides aminés polaires et basiques. Pourtant, aucune différence de point isoélectrique entre protéines adsorbées et non adsorbées n'est observée. Pour lever cette ambiguïté,

la répartition des charges au sein des protéines a été analysée. Une fenêtre glissante de 12 acides aminés (soit trois tours d'hélice) est déplacée sur la séquence primaire de chaque protéine : dès que trois résidus successifs basiques ou acides ou plus sont identifiés, un cluster de charge positive ou négative est défini (Fig. 4-23).

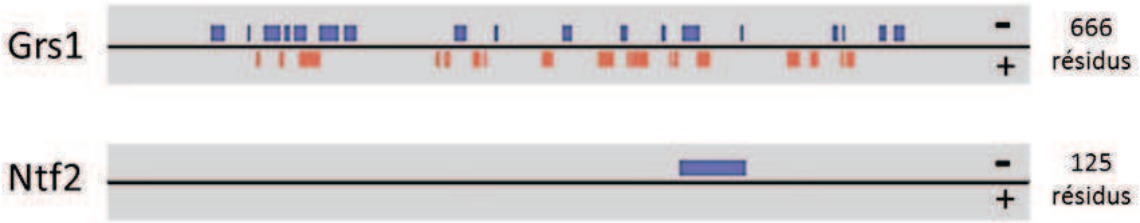


***Figure 4-23**. Profils de charge des protéines de levure GrS1 adsorbée et Ntf2 non adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm. Les clusters de charges positives (en rouge) et négatives (en bleu) sont indiquées le long de la séquence, ainsi que le nombre total d'acides aminés de la protéine.*

Les profils de charge font apparaître de nombreux clusters de charges positives et négatives pour la protéine adsorbée (Grs1), contre un seul cluster pour la protéine non adsorbée (Ntf2). Cette analyse nous a conduits à définir les clusters de charges positives et négatives comme deux nouveaux critères et à analyser leur distribution entre nos deux populations, protéines adsorbées et protéines non adsorbées. Un net enrichissement des protéines adsorbées en clusters de charges positives ($p = 3{,}1.10^{-6}$) mais aussi en clusters de charges négatives ($p = 1{,}5.10^{-3}$) est ainsi mis en évidence.

Les clusters de charges positives sont très favorables à l'adsorption et permettent la formation d'interactions électrostatiques fortes avec la surface, la présence des clusters de charges négatives expliquent l'enrichissement en glutamate (en regard de l'enrichissement en arginine et en lysine) et l'absence de biais du point isoélectrique des protéines adsorbées.

Appauvrissement en résidus aromatiques

Une deuxième caractéristique très marquée entre protéines de levure adsorbées et non adsorbées sur les NP de silice est le fort appauvrissement en acides aminés aromatiques ($p = 2{,}1.10^{-8}$) des protéines adsorbées, que l'on retrouve pour chaque résidu aromatique (Phe, Trp, Tyr, His) analysé séparément (tableau 4-14). Si le critère de polarité des protéines adsorbées était relativement attendu, celui de l'enrichissement en résidus aromatiques des protéines non adsorbées est plus surprenant. Une seule étude rapporte un biais en acides aminés aromatiques de certaines protéines bactériennes sélectionnées pour leur forte affinité pour la silice, associé à un enrichissement en arginine (*53*). Puisque les acides aminés polaires et chargés sont impliqués dans les interactions électrostatiques, qui sont un facteur important de l'adsorption, alors l'enrichissement en acides

aminés aromatiques des protéines non adsorbées doit être particulièrement défavorable à l'adsorption sur les NP de silice.

D'une façon générale, les acides aminés aromatiques peuvent avoir des rôles variés au sein des protéines, comme le repliement, les interactions entre protéines, l'association avec un ligand, une activité catalytique ou encore la stabilisation de la structure de la protéine (*72-75*). Enfouis dans le cœur hydrophobe des protéines, les résidus aromatiques peuvent interagir entre eux *via* des interactions π-π entre cycles aromatiques, par paires mais aussi par trimères ou par tétramères, et stabilisent ainsi la structure de la protéine (*75-77*) (Fig. 4-24).

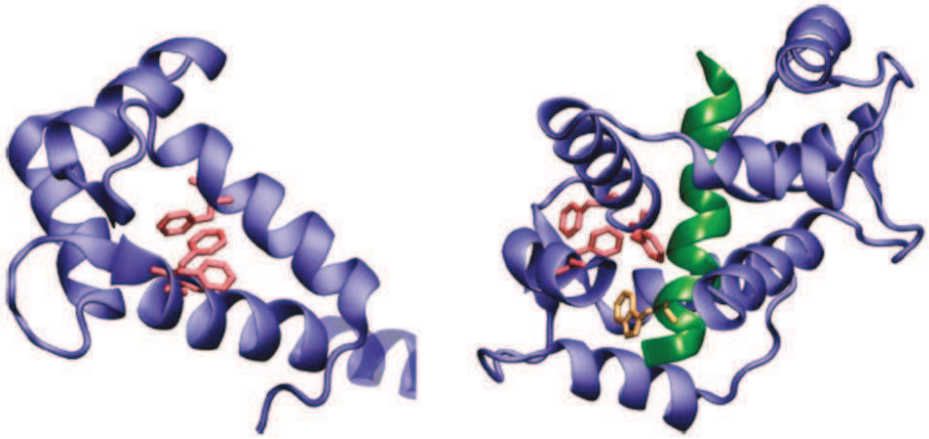


***Figure 4-24**. Interactions π-π entre trois acides aminés aromatiques de la calmoduline (à gauche) et avec un résidu aromatique supplémentaire lors de la fixation d'un peptide (à droite), d'après (75)*

Les acides aminés aromatiques peuvent également interagir avec les acides aminés chargés positivement *via* des interactions cation-π qui participent à l'organisation et à la stabilisation de la structure des protéines (*78*). Si les acides aminés aromatiques présents en plus grand nombre dans les protéines non adsorbées sont également impliqués dans des interactions π-π et cation-π au sein de la protéine, alors leur structure serait probablement plus compacte et plus rigide que celle des protéines adsorbées et pourrait être défavorable à une adsorption sur la surface de silice.

7.3 Flexibilité des protéines adsorbées et non adsorbées

Pour tester cette hypothèse, les différents types d'interactions possibles au sein des protéines adsorbées et non adsorbées : hydrophobes, ioniques, π-π et cation-π, ont été quantifiées à partir des structures connues (soit 10 protéines adsorbées et 10 protéines non adsorbées) (*67*) (tableau 4-12).

Interactions	Protéines non adsorbées / Protéines adsorbées (%)
Hydrophobes	+ 18%
Ioniques	+ 13%
π-π	**+ 130 %**
Cation-π	+ 33 %

Tableau 4-12. *Pourcentages d'augmentation des interactions des protéines non adsorbées par rapport aux protéines adsorbées calculés à partir des structures 3D de 10 protéines adsorbées et 10 protéines non adsorbées (67)*

L'augmentation très importante des interactions π-π dans les protéines non adsorbées confirme l'hypothèse du rôle stabilisateur et de renforcement de la structure des protéines par les acides aminés aromatiques. Cette augmentation est également nettement plus importante que celle des interactions hydrophobes, qui semblent d'importance moindre lors de l'adsorption des protéines sur une surface de silice hydrophile et ne participeraient qu'à la cohésion du cœur hydrophobe des protéines plus résistantes à l'adsorption.

Une augmentation des interactions cation-π est aussi observée, alors que les protéines non adsorbées sont appauvries en acides aminés chargés positivement. Cela signifie que les acides aminés chargés positivement sont à la fois moins nombreux et plus souvent impliqués dans des interactions avec des résidus aromatiques : ils deviennent alors moins disponibles pour des interactions électrostatiques avec la surface de silice. Ces résultats dessinent l'image de protéines non adsorbées bien structurées et plus compactes que les protéines adsorbées plus désordonnées.

Enfin, pour évaluer la flexibilité des protéines adsorbées et non adsorbées (avant adsorption), le déplacement carré moyen (RMSD) des protéines, qui représente l'évolution de la structure de la protéine au cours du temps, a été calculé par dynamique moléculaire sur une durée de 5 ns à 300 K sur 5 protéines adsorbées et 5 protéines non adsorbées (Y. Boulard). Le facteur B moyen, qui est un indicateur de la plus ou moins grande flexibilité des différentes régions de la protéine, a également été calculé (tableau 4-13) (*67*).

Simulation	Protéines adsorbées	Protéines non adsorbées
RMSD	4,44 Å	2,34 Å
Facteur B	95	33

Tableau 4-13. *Comparaison de la flexibilité des protéines de levure adsorbées et non adsorbées (avant adsorption) à partir du calcul du RMSD par dynamique*

moléculaire après 5 ns et du facteur B moyen par résidu pour 5 protéines adsorbées et 5 protéines non adsorbées de structure connue (*67*)

Les protéines adsorbées présentent à la fois une plus faible stabilité structurale avec un RMSD moyen presque deux fois plus important que pour les protéines non adsorbées, et une plus grande flexibilité, avec un facteur B moyen trois fois supérieur. La plus grande compacité et structuration des protéines non adsorbées, associée au contenu en résidus aromatiques et aux interactions π-π et cations-π, est donc associée à une plus grande rigidité de leur structure. Elles ne pourraient alors pas adopter un comportement « plastique » qui favorise l'adsorption des protéines plus flexibles.

Les critères physico-chimiques caractéristiques des protéines de levure adsorbées et non adsorbées sur les nanoparticules de silice 20 nm peuvent être résumés sous la forme d'un diagramme (Fig. 4-25).

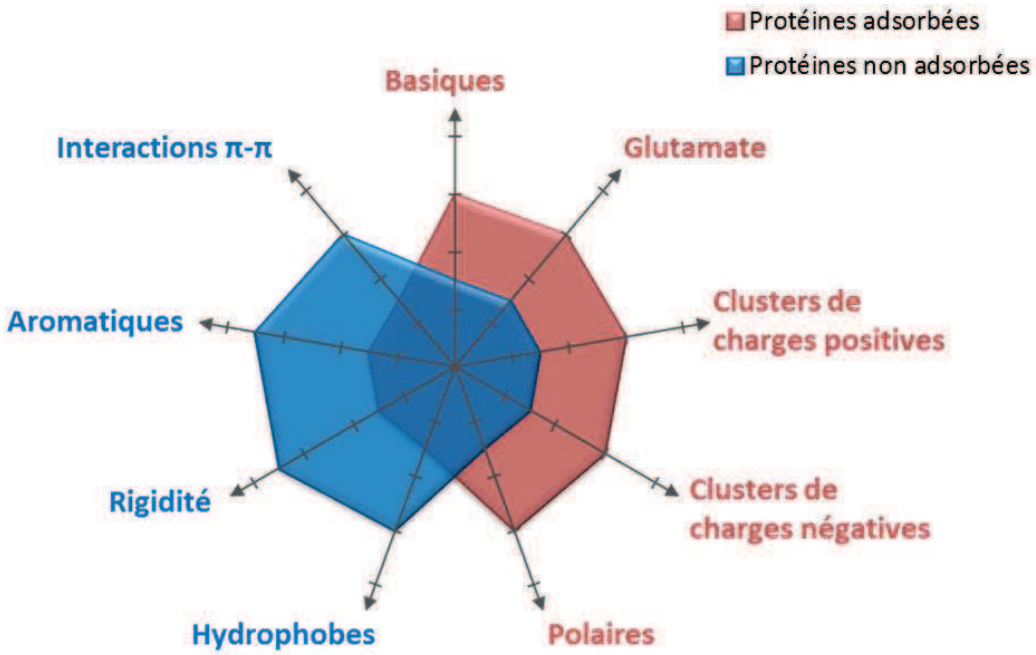


Figure 4-25*.Déterminants physico-chimiques de l'adsorption (en rouge) et de la non adsorption (en bleu) des protéines de levure sur les nanoparticules de silice 20 nm. La valeur attribuée à chaque critère est indicative d'un enrichissement ou d'un appauvrissement pour chaque groupe de protéine*

Ces critères pourraient être utilisés pour prédire l'affinité et donc la tendance à l'adsorption d'autres protéines pour une surface de silice. L'enrichissement en résidus basiques, en clusters de charges positives et négatives, et l'appauvrissement en résidus aromatiques sont des critères facilement analysables pour évaluer la capacité d'adsorption d'une protéine, beaucoup plus pertinents que le point isoélectrique par exemple.

Nous allons maintenant comparer ces critères avec l'adsorption de la myoglobine et de la sérum albumine sur les NP de silice. L'adsorption de l'hémoglobine, plus complexe du fait de son caractère oligomérique, n'est pas détaillée.

8. Comparaison de l'adsorption des protéines de levure et des protéines modèles

La discussion qui clôt ce chapitre s'articule autour de deux questions :

- Les critères structuraux d'adsorption des protéines de levure sur les nanoparticules de silice sont-ils applicables à l'adsorption de la myoglobine et de la sérum albumine sur la silice ?
- Quel modèle d'adsorption des protéines sur une surface de silice peut-on proposé à partir de ces résultats et quelles sont les nouvelles informations par rapport aux modèles existants ?

8.1 Discussion des critères structuraux d'adsorption des protéines

Les principaux critères structuraux d'adsorption des protéines de levure ont été comparés entre la myoglobine, la sérum albumine, la protéine de levure adsorbée la plus enrichie à la surface de la silice, la glycine-ARNt ligase Grs1 (facteur d'enrichissement de 11,1) et la protéine de levure non adsorbée la plus appauvrie à la surface, le facteur de transport nucléaire Ntf2 (facteur d'appauvrissement de 9,1) (tableau 4-14).

Critères d'adsorption	BSA	Mb	Glycine-ARNt ligase (Grs1)	Facteur de transport (Ntf2)
Basiques	14,1	13,7	14,4	6,4
Glutamate	10,1	8,5	9,2	4,0
Chargés	31,0	27,5	30,9	18,4
Polaires	36,9	32,7	36,8	36,0
Hydrophobes	30,7	28,8	30,2	32,0
Aromatiques	11,3	14,4	10,7	14,4

***Tableau 4-14**. Comparaison des critères d'adsorption des protéines de levure, exprimés en pourcentage de résidus, appliqués à la myoglobine, la sérum albumine, une protéine de levure adsorbée, la glycine-ARNt ligase (Grs1) et une protéine de levure non adsorbée, le facteur de transport nucléaire (Ntf2). Pour Mb et BSA, les critères qui se rapprochent de ceux de la protéine de levure adsorbée sont indiqués en vert, et de la protéine de levure non adsorbée en rouge. Les critères non significatifs sont en gris.*

La plupart des critères structuraux favorables à l'adsorption identifiés sur les protéines de levure se retrouvent chez la BSA et la myoglobine, à l'exception pour la myoglobine du critère d'aromaticité. Les critères de polarité et d'hydrophobicité sont peu significatifs pour les deux protéines de levure choisis.

Les résidus polaires

Le critère de polarité est peu informatif sur l'exemple choisi, car il n'y a que très peu de différence entre les deux protéines de levures adsorbée et non adsorbée, tout comme l'appauvrissement en résidus hydrophobes. Ces deux critères sont relativement peu significatifs pour les protéines étudiées.

Les résidus chargés

La myoglobine et la BSA sont toutes deux enrichies en résidus chargés, en résidus basiques et en glutamate, comparées à la protéine de levure non adsorbée Ntf2. Si la protéine de levure adsorbée Grs1 est bien enrichie en résidus arginine (5,4%) comparée à la protéine non adsorbée Ntf2 (4,0%), la BSA et la myoglobine sont elles très fortement enrichies en lysine (10,1% et 12,4% respectivement). Alors que pour les protéines de levure, les interactions électrostatiques sont portées par les résidus arginine et lysine, dans le cas de la myoglobine et de la BSA, ce sont principalement les résidus lysine qui contribuent à l'adsorption, *via* l'établissement de ces interactions fortes entre protéine et surface.

La myoglobine et la BSA sont enrichies en glutamate par rapport à la protéine de levure non adsorbée. L'hème contient en plus deux propionate dont les charges négatives sont peu favorables à une interaction avec la silice décorée de groupements silanols. Cela n'est pas étonnant pour la BSA qui est globalement chargée négativement à pH 7,4, par contre la myoglobine étant neutre à ce pH, cela indique un enrichissement conjoint en résidus basiques, majoritairement les résidus lysine (tableau 4-14).

De plus, l'enrichissement en lysine de la BSA montre que des interactions électrostatiques favorables sont possibles entre la protéine et la surface, malgré la charge négative globale de la protéine au pH de l'adsorption. Cette analyse est confirmée par l'étude des clusters de charges de la protéine (Fig. 4-26).

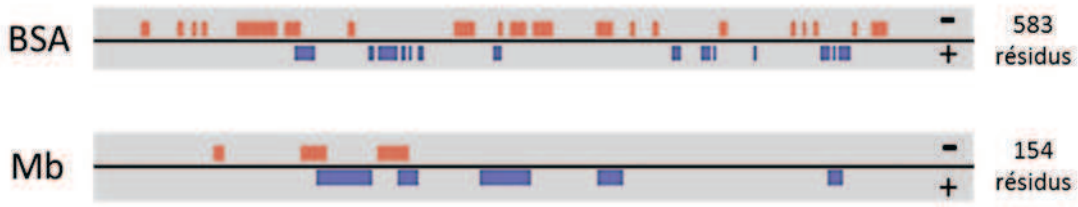


***Figure 4-26**. Profils de charge de la myoglobine et de la BSA. Les clusters de charges positives (en bleu) et négatives (en rouge) sont indiqués le long de la séquence, ainsi que le nombre total d'acides aminés de la protéine.*

Tout comme la protéine de levure adsorbée Grs1 (voir Fig. 4-23, §7.2), la myoglobine et la BSA présentent un nombre plus important de clusters de charges positives et de charges négatives. Les clusters de charges positives sont autant de régions susceptibles d'interagir avec la silice et de se « coller » sur la surface *via* des interactions électrostatiques.

Les enrichissements en résidus chargés et en clusters de charges sont donc bien des critères d'adsorption partagés par les protéines de levure, la myoglobine et la BSA.

Les résidus aromatiques

La BSA est appauvrie en résidus aromatiques par rapport à la protéine de levure non adsorbée Ntf2, ce qui est cohérent avec son caractère de protéine « molle » et sa grande affinité pour la silice.

Au contraire, la myoglobine est aussi riche en résidus aromatiques que la protéine non adsorbée, ce qui est surprenant car l'enrichissement des protéines de levure en résidus aromatiques est caractéristique des protéines non adsorbées plus rigides et plus stables, donc peu aptes à adopter un comportement « plastique » qui favoriserait l'adsorption de la protéine sur la surface. De plus, l'hème rigidifie considérablement la structure de la myoglobine, qui est une protéine « dure » comparée à l'apomyoglobine (*4, 79*). Il faut noter que parmi les résidus liés ou proches de l'hème se trouvent plusieurs résidus aromatiques: Phe 43, His 64 et His 93 sont liés à la porphyrine et His 97 se trouve à moins de 4 Å de l'hème (*80*). La région de l'hème est donc particulièrement rigide, structurée, et peu propice à l'adsorption.

D'après les critères structuraux d'adsorption des levures, il serait donc difficile de prévoir le comportement de la myoglobine en présence de NP de silice : l'enrichissement en résidus basiques et chargés est favorable à l'adsorption, mais la présence d'un cœur très rigide et structuré est dans le même temps très défavorable. Cet exemple met en évidence une limite à l'analyse de critères généraux pour l'adsorption des protéines sur une surface, qui ne permettent pas de prendre en compte toute la complexité et variété des protéines.

Dans le cas de la myoglobine, il est possible que la protéine puisse « s'ancrer » sur la surface *via* ses nombreux résidus basiques. On observe toutefois une adsorption bien plus importante de l'apomyoglobine au comportement plus « plastique ». Il est probable que les interactions entre myoglobine et silice se développent en dehors du cœur structuré par l'hème, qui peut être assimilé à un cluster aromatique.

L'étude de l'adsorption des protéines isolées pose également plusieurs questions quant à l'adsorption des protéines de levure, par exemple :

- Quelle serait la réversibilité de l'adsorption de protéines adsorbées aux caractéristiques différentes ?
- La composition de la couronne de protéines adsorbée dépend-elle du pH, tout comme l'adsorption des protéines isolées est très dépendante des conditions du milieu ?
- Quelle est l'importance de « l'effet oligomère » lors de l'adsorption et comment inclure les interactions protéine-protéine dans un modèle d'adsorption ?

L'adsorption des protéines chaperonnes, que l'on suspecte s'adsorber en seconde couronne, pourrait être testée à partir de l'adsorption de protéines isolées dénaturées sur les NP. Il serait alors très intéressant d'étudier la capacité de ces chaperonnes à restructurer les protéines adsorbées.

8.2 Modèle d'adsorption des protéines sur une surface de silice

L'analyse de l'adsorption de protéines modèles, myoglobine, hémoglobine et sérum albumine sur les nanoparticules de silice, puis l'identification des critères structuraux d'adsorption des protéines à partir d'un extrait cellulaire permettent de mieux comprendre l'adsorption des protéines sur une surface de silice et de proposer des mécanismes d'interactions entre protéines et surface qui permettent ou réfrènent l'adsorption des protéines (Fig. 4-27).

Bien que les deux déterminants clés de l'adsorption, qui sont la formation d'interactions électrostatiques et la flexibilité de la protéine adsorbée, correspondent à ceux proposés par Norde (*1*), notre étude montre que l'utilisation de critères très généraux, tel que celui du point isoélectrique, ne sont pas pertinents pour décrire l'adsorption des protéines sur la silice, et permet de proposer de nouveaux critères basés sur les mécanismes moléculaires impliqués respectivement dans la formation des interactions électrostatiques et dans la flexibilité/rigidité de la structure des protéines.

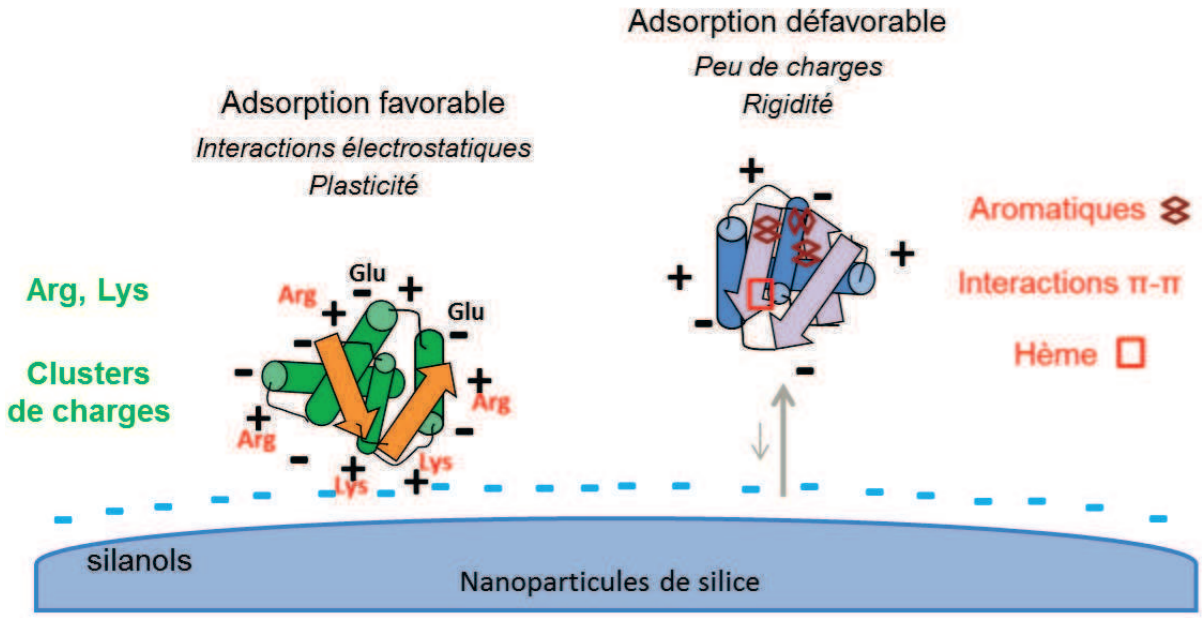


***Figure 4-27**. Représentation schématique des critères favorables (à gauche) et défavorables (à droite) à l'adsorption des protéines sur les nanoparticules de silice*

Les mécanismes identifiés et les critères associés sont :

i) **le rôle clé des résidus basiques, lysine et arginine, en particulier lorsque ceux-ci sont regroupés en clusters de charges positives, pour la formation des interactions électrostatiques avec les silanols de surface**

ii) **la nécessaire plasticité des protéines, dont la réciproque est l'absence ou la faible adsorption des protéines compactes et rigides, structurées par des interactions π-π entre résidus aromatiques, ou par un groupement prosthétique tel que l'hème**

iii) **l'absence de lien entre point isoélectrique et adsorption des protéines sur la silice**

Ce modèle, ainsi que l'adsorption irréversible de l'hémoglobine et de la myoglobine par dilution, implique une modification de la structure des protéines adsorbées qui permet de maximiser les interactions entre protéine et surface. Dans le chapitre suivant, les structures de l'hémoglobine et de la myoglobine adsorbées sur les NP de silice seront étudiées.

Les points clés

Les principaux résultats de ce chapitre peuvent être résumés :

- Les isothermes d'adsorption des protéines purifiées, myoglobine, hémoglobine, apomyoglobine et sérum albumine, sur la silice nanostructurée, sont bien décrites par le modèle de Langmuir. L'affinité et la quantité de protéine adsorbée dépendent du type de matériau (taille, géométrie, chimie de surface), de la nature de la protéine (monomère/oligomère, flexibilité) et des conditions de pH et de tampon de la solution (effet de charge).

- L'adsorption de l'hémoglobine et de la myoglobine sur les nanoparticules de silice est irréversible par dilution et réversible en conditions douces à pH 8,7.

- L'adsorption de la myoglobine sur les nanoparticules de silice est exothermique et associée à un gain d'entropie. Un très bon accord est obtenu entre la constante d'adsorption calculée à l'aide du modèle de Langmuir (mesure par spectroscopie UV-visible) et à partir des données microcalorimétriques et du modèle associé (SSIS).

- L'isotherme d'adsorption des protéines de levure sur les nanoparticules de silice à partir d'un extrait cellulaire est également bien décrite par le modèle de Langmuir. L'identification des protéines adsorbées et non adsorbées par électrophorèse 2D fait apparaître un fort effet d'enrichissement ou d'appauvrissement des protéines à la surface de la silice, une surreprésentation des protéines impliquées dans le cycle de vie des protéines et des protéines chaperonnes parmi les protéines adsorbées.

- L'adsorption en seconde couronne pourrait être expliqué par un « effet oligomère » et par l'interaction entre protéines chaperonnes et protéines adsorbées partiellement dépliées

- L'analyse statistique des séquences primaires des protéines de levure adsorbées et non adsorbées a permis de mettre en évidence des critères clés pour l'adsorption : l'enrichissement en résidus basiques, arginine et lysine, regroupés en clusters de charges positives, des protéines adsorbées permettant la formation d'interactions électrostatiques avec les silanols ; l'enrichissement en résidus aromatiques et l'augmentation de la rigidité des protéines non adsorbées à cause de la formation d'interactions π-π.

Bibliographie

1. Norde W. (2008) My voyage of discovery to proteins in flatland ... and beyond, *Colloid Surf. B-Biointerfaces 61*, 1-9.
2. Czeslik C. (2004) Factors ruling protein adsorption, *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-International Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics 218*, 771-801.
3. Norde W., Giacomelli C. E. (2000) BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states, *Journal of Biotechnology 79*, 259-268.
4. Griko Y. V., Privalov P. L., Venyaminov S. Y., Kutyshenko V. P. (1988) Thermodynamic study of the apomyoglobin structure, *Journal of Molecular Biology 202*, 127-138.
5. Colonna G., Balestrieri C., Bismuto E., Servillo L., Irace G. (1982) Heme and cystein micro-environments of tuna apomyoglobin - Evidence of 2 independent unfolding regions, *Biochemistry 21*, 212-215.
6. Antonini E. (1971) *Hemoglobin and myoglobin in their interactions with ligands*, Vol. 21, New York.
7. Zoungrana T., Findenegg G. H., Norde W. (1997) Structure, stability, and activity of adsorbed enzymes, *Journal of Colloid and Interface Science 190*, 437-448.
8. Oberdorster G. (1996) Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles, *Inhalation toxicology 8 Suppl*, 73-89.
9. Brown D. M., Wilson M. R., MacNee W., Stone V., Donaldson K. (2001) Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: A role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines, *Toxicol. Appl. Pharmacol. 175*, 191-199.
10. Topoglidis E., Campbell C. J., Cass A. E. G., Durrant J. R. (2001) Factors that affect protein adsorption on nanostructured titania films. A novel spectroelectrochemical application to sensing, *Langmuir 17*, 7899-7906.
11. Jones L. S., Peek L. J., Power J., Markham A., Yazzie B., Middaugh C. R. (2005) Effects of adsorption to aluminum salt adjuvants on the structure and stability of model protein antigens, *J. Biol. Chem. 280*, 13406-13414.
12. Norde W., Favier J. P. (1992) Structure of adsorbed and desorbed proteins, *Colloids and Surfaces 64*, 87-93.
13. Bharti B., Meissner J., Findenegg G. H. (2011) Aggregation of silica nanoparticles directed by adsorption of lysozyme, *Langmuir 27*, 9823-9833.
14. Felsovalyi F., Mangiagalli P., Bureau C., Kumar S. K., Banta S. (2011) Reversibility of the adsorption of lysozyme on silica, *Langmuir 27*, 11873-11882.
15. Freundlich H. Z. (1906) Over the adsorption in solution, *J. Phys. Chem. 57A*, 385-470.
16. Langmuir I. (1918) The adosrption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum, *J. Am. Chem. Soc. 40*, 1361-1403.
17. Temkin M., Pyzhev V. (1939) Kinetics of the synthesis of ammonia on promoted iron catalysts, *J. Phys. Chem. 13*, 851.
18. Dubinin M. M., Zaverina E. D., Radushkevich L. V. (1947) Zhur. Fiz. Khim., *21*, 1351.
19. Dubinin M. M. (1960) The potential theory of adsorption of gases and vapors for adsorbents with energetically nonuniform surfaces, *Chemical Reviews 60*, 235-241.
20. Halsey G. (1948) Physical adsorption on non-uniform surfaces, *Journal of Chemical Physics 16*, 931-937.
21. Jovanovic D. S. (1969) Physical adsorption of gases. I. Isotherms for monolayer and mutlilayer adsorption, *Kolloid-Zeitschrift and Zeitschrift Fur Polymere 235*, 1203-1213.
22. Brunauer S., Emmett P. H., Teller E. (1938) Adsorption of gases in multimolecular layers, *Journal of the American Chemical Society 60*, 309-319.
23. Adamson A. W. (1990) *Physical chemistry of surfaces, 5th edition*, Wiley, New York.
24. Johnson R. D., Arnold F. H. (1995) The Temkin isotherm describes heterogeneous protein adsorption, *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology 1247*, 293-297.
25. Hasany S. M., Chaudhary M. H. (1996) Sorption potential of Hare river sand for the removal of antimony from acidic aqueous solution, *Applied Radiation and Isotopes 47*, 467-471.
26. Ho Y. S., Porter J. F., McKay G. (2002) Equilibrium isotherm studies for the sorption of divalent metal ions onto peat: Copper, nickel and lead single component systems, *Water Air and Soil Pollution 141*, 1-33.
27. Valstar A., Almgren M., Brown W., Vasilescu M. (2000) The interaction of bovine serum albumin with surfactants studied by light scattering, *Langmuir 16*, 922-927.

28. Okubo M., Azume I., Yamamoto Y. (1990) Preferential adsorption of bovine serum albumin dimer onto polymer microspheres having a heterogeneous surface consisting of hydrophobic and hydrophilic parts, *Colloid and Polymer Science 268*, 598-603.
29. Scopelliti P. E., Borgonovo A., Indrieri M., Giorgetti L., Bongiorno G., Carbone R., Podestà A., Milani P. (2010) The effect of surface nanometre-scale morphology on protein adsorption, *Plos One 5*, e11862.
30. Iler R. K. (1979) *The Chemistry of Silica*, John Wiley & Sons, New York.
31. Orts-Gil G., Natte K., Drescher D., Bresch H., Mantion A., Kneipp J., Osterle W. (2011) Characterisation of silica nanoparticles prior to in vitro studies: from primary particles to agglomerates, *J. Nanopart. Res. 13*, 1593-1604.
32. Bellezza F., Cipiciani A., Quotadarno M. A., Cinelli S., Onori G., Tacchi S. (2007) Structure, stability, and activity of myoglobin adsorbed onto phosphate-grafted zirconia nanoparticles, *Langmuir 23*, 13007-13012.
33. Buijs J., Ramström M., Danfelter M., Larsericsdotter H., Håkansson P., Oscarsson S. (2003) Localized changes in the structural stability of myoglobin upon adsorption onto silica particles, as studied with hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Journal of Colloid and Interface Science 263*, 441-448.
34. Giacomelli C. E., Norde W. (2001) The adsorption-desorption cycle. Reversibility of the BSA-silica system, *Journal of Colloid and Interface Science 233*, 234-240.
35. Norde W., Anusiem A. C. I. (1992) Adsorption, desorption and readsorption of proteins on solid surfaces, *Colloids and Surfaces 66*, 73-80.
36. Muragalelli M. J., Voegel J. C., Behr S., Bres E. F., Schaaf P. (1991) Adsorption desorption of human serum albumin on hydroxyapatite - a critical analyses of the Langmuir model, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88*, 5557-5561.
37. De M., You C. C., Srivastava S., Rotello V. M. (2007) Biomimetic interactions of proteins with functionalized nanoparticles: A thermodynamic study, *J. Am. Chem. Soc. 129*, 10747-10753.
38. Chakraborti S., Joshi P., Chakravarty D., Shanker V., Ansari Z. A., Singh S. P., Chakrabarti P. (2012) Interaction of polyethyleneimine-functionalized ZnO nanoparticles with bovine serum albumin, *Langmuir 28*, 11142-11152.
39. Schrurs F., Lison D. (2012) Focusing the research effort, *Nature Nanotechnology 7*, 546-548.
40. Fischer N. O., Verma A., Goodman C. M., Simard J. M., Rotello V. M. (2003) Reversible "irreversible" inhibition of chymotrypsin using nanoparticle receptors, *Journal of the American Chemical Society 125*, 13387-13391.
41. Norde W., Favier J. P. (1992) Structure od adsorbed and desorbed proteins, *Colloids and Surfaces 64*, 87-93.
42. Kondo A., Oku S., Higashitani K. (1991) Structural changes in protein molecules adsorbed on ultrafine silica particles, *Journal of Colloid and Interface Science 143*, 214-221.
43. Cocco M. J., Kao Y. H., Phillips A. T., Lecomte J. T. J. (1992) Structural comparison of apomyoglobin and metaquometmyoglobin - pH titration of histidine by NMR spectroscopy, *Biochemistry 31*, 6481-6491.
44. Soderquist M. E., Walton A. G. (1980) Structural changes in proteins adsorbed on polymer surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science 75*, 386-397.
45. van der Veen M., Stuart M. C., Norde W. (2007) Spreading of proteins and its effect on adsorption and desorption kinetics, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 54*, 136-142.
46. Andrade J. D., Hlady V. (1986) Protein adsorption and materials biocompatibility - a tutoralial review and suggested hypotheses, *Advances in Polymer Science 79*, 1-63.
47. Calonder C., Tie Y., Van Tassel P. R. (2001) History dependence of protein adsorption kinetics, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98*, 10664-10669.
48. Kim D. T., Blanch H. W., Radke C. J. (2002) Direct imaging of lysozyme adsorption onto mica by atomic force microscopy, *Langmuir 18*, 5841-5850.
49. Lyklema J. (1984) Proteins at soli liquide interfaces - A colloid chemical review, *Colloids and Surfaces 10*, 33-42.
50. Welsch N., Becker A. L., Dzubiella J., Ballauff M. (2012) Core-shell microgels as "smart" carriers for enzymes, *Soft Matter 8*, 1428-1436.
51. Robertson A. D., Murphy K. P. (1997) Protein structure and the energetics of protein stability, *Chemical Reviews 97*, 1251-1267.
52. Hargrove M. S., Krzywda S., Wilkinson A. J., Dou Y., Ikedasaito M., Olson J. S. (1994) Stability of myoglobin - A model for the folding of heme-proteins, *Biochemistry 33*, 11767-11775.

53. Taniguchi K., Nomura K., Hata Y., Nishimura T., Ksami Y., Kuroda A. (2007) The Si-Tag for immobilizing proteins on a silica surface, *Biotechnol. Bioeng. 96*, 1023-1029.
54. Tenzer S., Docter D., Rosfa S., Wlodarski A., Kuharev J., Rekik A., Knauer S. K., Bantz C., Nawroth T., Bier C., Sirirattanapan J., Mann W., Treuel L., Zellner R., Maskos M., Schild H., Stauber R. H. (2011) Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis, *Acs Nano 5*, 7155-7167.
55. Vroman L., Adams A. L. (1969) Findings with recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces, *Surface Science 16*, 438.
56. Milani S., Baldelli Bombelli F., Pitek A. S., Dawson K. A., Rädler J. (2012) Reversible versus irreversible binding of transferrin to polystyrene nanoparticles: soft and hard corona, *Acs Nano*, 2532-2541.
57. Lynch I., Dawson K. A. (2008) Protein-nanoparticle interactions, *Nano Today 3*, 40-47.
58. Fischer N. O., McIntosh C. M., Simard J. M., Rotello V. M. (2002) Inhibition of chymotrypsin through surface binding using nanoparticle-based receptors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99*, 5018-5023.
59. Koutsopoulos S., Patzsch K., Bosker W. T. E., Norde W. (2007) Adsorption of trypsin on hydrophilic and hydrophobic surfaces, *Langmuir 23*, 2000-2006.
60. Karajanagi S. S., Vertegel A. A., Kane R. S., Dordick J. S. (2004) Structure and function of enzymes adsorbed onto single-walled carbon nanotubes, *Langmuir 20*, 11594-11599.
61. Vertegel A. A., Siegel R. W., Dordick J. S. (2004) Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme, *Langmuir 20*, 6800-6807.
62. Zhang B., Xing Y. H., Li Z. W., Zhou H. Y., Mu Q. X., Yan B. (2009) Functionalized carbon nanotubes specifically bind to alpha-chymotrypsin's catalytic site and regulate its enzymatic function, *Nano Lett. 9*, 2280-2284.
63. Billsten P., Wahlgren M., Arnebrant T., McGuire J., Elwing H. (1995) Structural changes of T4 lysozyme upon adsorption to silica nanoparticles measured by circular dichroism, *Journal of Colloid and Interface Science 175*, 77-82.
64. Cukalevski R., Lundqvist M., Oslakovic C., Dahlback B., Linse S., Cedervall T. (2011) Structural changes in apolipoproteins bound to nanoparticles, *Langmuir 27*, 14360-14369.
65. Jacobsen K., Hubbell W. L., Ernst O. P., Risse T. (2006) Details of the partial unfolding of T4 lysozyme on quartz using site-directed spin labeling, *Angewandte Chemie-International Edition 45*, 3874-3877.
66. Profeat. http://jing.cz3.nus.edu.sg/cgi-bin/prof/prof.cgi.
67. Mathé C., Devineau S., Aude J.-C., Lagniel G., Chédin S., Legros V., Mathon M. H., Renault J. P., Pin S., Boulard Y., Labarre J. (2013) Structural determinants for protein adsorption/non-adsorption to silica surface, *Submitted*.
68. Brunner E., Munzel U. (2000) The nonparametric Behrens-Fisher problem: asymptotic theory and a small-sample approximation, *Biometrical Journal 42*, 17-25.
69. Knijnenburg T. A., Wessels L. F. A., Reinders M. J. T., Shmulevich I. (2009) Fewer permutations, more accurate P-values, *Bioinformatics 25*, I161-I168.
70. Kao Y. H., Fitch C. A., Bhattacharya S., Sarkisian C. J., Lecomte J. T. J., Garcia-Moreno B. (2000) Salt effects on ionization equilibria of histidine in myoglobin, *Biophysical Journal 79*, 1637-1654.
71. Aizawa T., Koganesawa N., Kamakura A., Masaki K., Matsuura A., Nagadome H., Terada Y., Kawano K., Nitta K. (1998) Adsorption of human lysozyme onto hydroxyapatite: Identification of its adsorbing site using site-directed mutagenesis, *FEBS Letters 422*, 175-178.
72. Burley S. K., Petsko G. A. (1985) Aromatic-aromatic interaction - a mechanism of protein structure stabilization, *Science 229*, 23-28.
73. Serrano L., Bycroft M., Fersht A. R. (1991) Aromatic-aromatic interactions and protein stability - Investigation by double-mutant cycles, *Journal of Molecular Biology 218*, 465-475.
74. Kannan N., Vishveshwara S. (2000) Aromatic clusters: a determinant of thermal stability of thermophilic proteins, *Protein Engineering 13*, 753-761.
75. Lanzarotti E., Biekofsky R. R., Estrin D. A., Marti M. A., Turjanski A. G. (2011) Aromatic-aromatic interactions in proteins: beyond the dimer, *Journal of Chemical Information and Modeling 51*, 1623-1633.
76. Gloaguen E., Valdes H., Pagliarulo F., Pollet R., Tardivel B., Hobza P., Piuzzi F., Mons M. (2010) Experimental and Theoretical Investigation of the Aromatic-Aromatic Interaction in Isolated Capped Dipeptides, *Journal of Physical Chemistry A 114*, 2973-2982.
77. Burley S. K., Petsko G. A. (1985) Aromatic-aromatic interaction - A mechanism of protein structure stabilization, *Science 229*, 23-28.

78. Gallivan J. P., Dougherty D. A. (1999) Cation-pi interactions in structural biology, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96*, 9459-9464.
79. Postnikova G. B., Yumakova E. M. (1991) Fluorescence study of the conformational properties of myoglobin structure. 3- pH dependent changes in porphyrin and tryptophan fluorescence of hte complex of sperm whale apomyoglobin with protoprophyrin IX - The role of the prophyrin macrocycle and iron in formation of native myoglobin structure, *Eur. J. Biochem. 198*, 241-246.
80. Liong E. C., Dou Y., Scott E. E., Olson J. S., Phillips G. N. (2001) Waterproofing the heme pocket - Role of proximal amino acid side chains in preventing hemin loss from myoglobin, *Journal of Biological Chemistry 276*, 9093-9100.

CHAPITRE 5
Structure des protéines adsorbées

Lorsque les protéines sont adsorbées sur une surface, leur structure, leur dynamique mais aussi leur activité peuvent être modifiés par cette interaction. Ces trois caractéristiques sont interdépendantes. Pour comprendre la variation d'un de ces trois paramètres il devient alors nécessaire de connaître les deux autres. Les trois chapitres suivants présentent l'étude de la structure et de l'activité des molécules de myoglobine et d'hémoglobine adsorbées sur les nanoparticules de silice et l'étude de la dynamique de la myoglobine adsorbée. Le chapitre précédant s'intéressait au processus d'adsorption et aux mécanismes conduisant à un état stable de protéine adsorbée. Plusieurs indices laissaient penser que les structures de la myoglobine et de l'hémoglobine pouvaient être « réorganisées » lors de l'adsorption, ce qui pourrait expliquer l'irréversibilité de l'adsorption selon l'image « d'étalement » de la protéine adsorbée. L'étude de la structure des protéines adsorbées peut permettre de confirmer ou d'infirmer ce modèle d'adsorption.

De nombreux outils permettent de sonder la structure des protéines en fonction des informations recherchées. Nous avons tout d'abord cherché à déterminer s'il y avait une modification de la structure secondaire de l'hémoglobine et de la myoglobine lors de leur adsorption sur les nanoparticules de silice (*1*). L'approche classique de l'étude de la structure des protéines en solution par dichroïsme circulaire et spectroscopie infrarouge a été utilisée pour l'analyse des structures secondaires. La stabilité en température de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice a été étudiée par microcalorimétrie afin de déterminer si la protéine est plus ou moins stable en température après adsorption. La fluorescence a été utilisée ponctuellement pour sonder localement l'exposition des résidus tryptophane au solvant.

Nous nous sommes aussi intéressés à la structure du site actif de la myoglobine et de l'hémoglobine adsorbées sur les nanoparticules de silice. Grâce au fer de l'hème, il est possible de le sonder directement par spectroscopie visible et par spectroscopie d'absorption X au seuil du fer - cette dernière technique permet de s'affranchir du signal de tous les autres éléments présents, aussi bien ceux de la protéine que ceux de la silice.

De plus, puisque la désorption de l'hémoglobine et de la myoglobine est possible en conditions douces à pH 9, la structure de l'hémoglobine et de la myoglobine après désorption des

nanoparticules de silice a été étudiée à l'aide des mêmes outils pour déterminer si les modifications de structure observées sont réversibles ou non après désorption.

L'ensemble de ces mesures permet de mieux comprendre quelle est la structure de la myoglobine et de l'hémoglobine adsorbées sur les nanoparticules de silice en évaluant les modifications au niveau de la globine (structure globale) et du fer de l'hème (site actif). Cependant, elles ne permettent pas de déterminer quelles parties de la protéine peuvent être directement en contact avec la surface ou au contraire exposées librement au solvant. L'interaction avec la surface est-elle non spécifique ou spécifique sur un ou plusieurs sites d'interaction ? Pour essayer de répondre à ces questions, une technique de marquage par irradiation a été développée afin d'identifier des zones privilégiées d'interaction entre myoglobine et surface de silice lors de l'adsorption.

Tout au long de ce chapitre, nous nous sommes focalisés sur deux systèmes : notre premier modèle, l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice 20 nm, nous a servi de base pour l'étude de l'activité de la protéine adsorbée (voir chap. 7). La metmyoglobine adsorbée sur les NP de silice 7 nm, a été utilisé pour étudier la dynamique de la protéine adsorbée par diffusion incohérente de neutrons (voir chap. 6). Nous avons choisi une taille de NP plus petite car nous avions besoin d'une plus grande surface disponible (et donc d'une plus grande quantité de protéine adsorbée) pour ce type d'expérience. Si certaines mesures ont été croisées et montrent une assez grande similarité, les structures des protéines adsorbées ont été étudiées indépendamment pour chacun de ces systèmes.

1. Surface occupée par la myoglobine et l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice

On peut supposer que la surface occupée par une protéine à une interface est un premier indice de la forme de la protéine (*2*). La surface occupée par une protéine peut être calculée à partir de la quantité maximale de protéine adsorbée par unité de surface. Pour la myoglobine et l'hémoglobine, cela correspond à leur adsorption sur les NP de silice 20 nm en tampon Phosphate à pH 6, soit 0,45 mg/m² de myoglobine et 0,50 mg/m² d'hémoglobine adsorbées à saturation. Cela correspond à une surface occupée d'environ 63 nm² pour une molécule de myoglobine et 55 nm² par monomère d'hémoglobine, si l'on fait l'hypothèse que toute la surface est occupée par les protéines. Cela représente 34 molécules de myoglobine ou 9 tétramères d'hémoglobine adsorbés sur une NP de silice dont le diamètre réel mesuré est d'environ 26 nm (voir chap. 3, §2.2). Quelques nanoparticules de silice suffisent alors pour transporter ou lier une centaine de protéines. Connaissant le rayon de giration de la myoglobine et de l'hémoglobine, la surface théorique qu'occuperait une protéine peut être calculée, soit par projection d'une sphère sur la surface ($A = \pi R^2$ avec R le rayon de giration de la

protéine), soit par projection de la maille cristallographique sur la surface (17), représentée par un carré pour une protéine globulaire ($A = 4R^2$). Même s'il s'agit avant tout d'une estimation, la différence est peu importante, nos calculs représentent donc des « carrés ». Le rayon de giration de la myoglobine en solution déterminé par diffusion de neutrons est de 1,5 ± 0,1 nm (*3*) et celui de l'hémoglobine de 2,4 ± 0,1 nm (*4*). La surface correspondante est approximativement de 9 nm² pour une molécule de myoglobine ou pour un monomère d'hémoglobine. Il apparaît une différence très importante entre la surface théorique de 9 nm² occupée par une protéine et la surface de 60 nm² calculée à partir de la quantité de protéine adsorbée. Cependant, deux paramètres importants ne sont pas pris en compte : l'hétérogénéité de la surface d'une part (*5*), la modification de la structure de la protéine adsorbée d'autre part (Fig. 5-1).

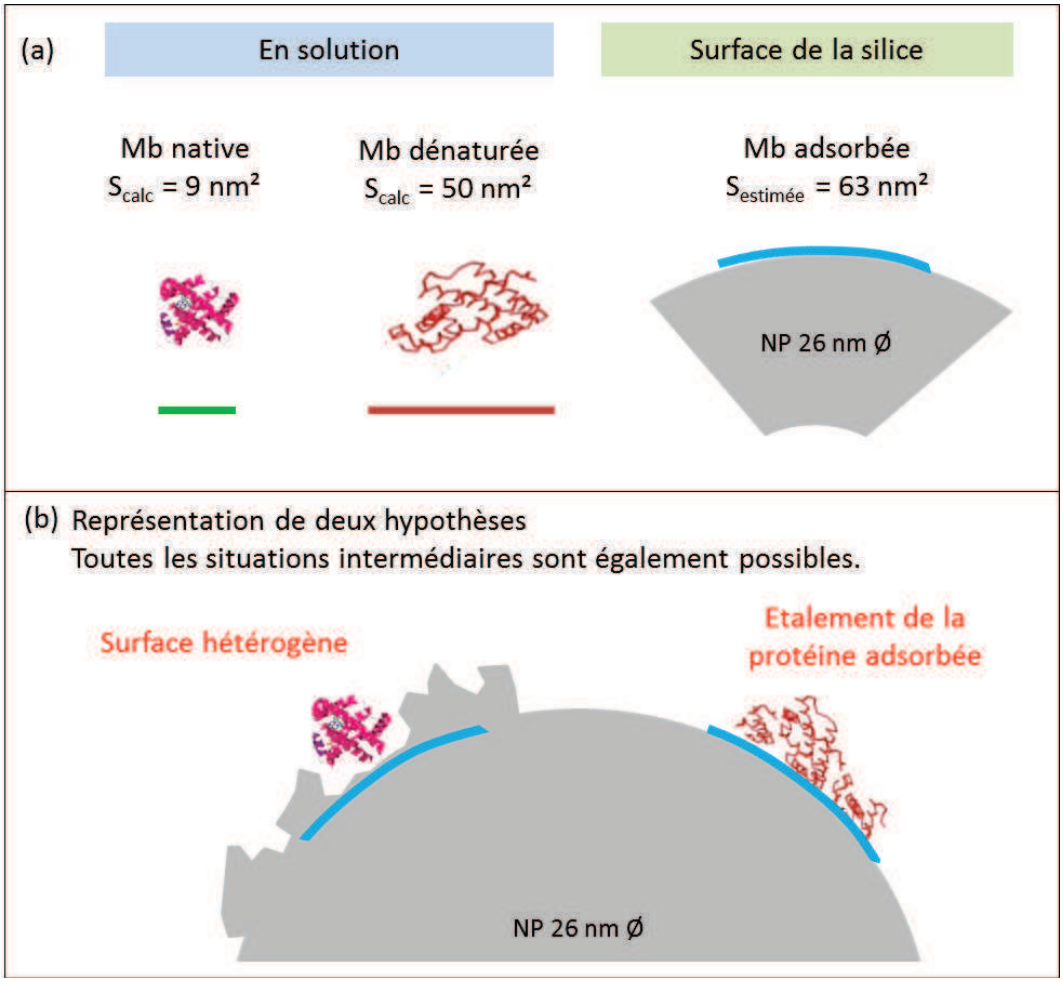


Figure 5-1. *Surface occupée par la myoglobine sur les nanoparticules de silice 20 nm à pH 6 : (a) surface théorique occupée par une molécule de myoglobine native et dénaturée en solution (S_{calc}) comparée à la surface estimée à partir des isothermes d'adsorption si la surface est homogène et entièrement recouverte par la myoglobine ($S_{estimée}$), (b) hypothèses d'hétérogénéité de la surface et/ou d'étalement de la protéine adsorbée permettant d'expliquer la grande surface estimée*

L'hétérogénéité de la surface peut représenter deux situations assez différentes : si on assimile l'hétérogénéité de surface à une rugosité, cette rugosité peut être du même ordre de grandeur que les protéines et donc empêcher leur adsorption dans certaines régions. La surface est alors effectivement hétérogène à l'échelle des protéines, mais la rugosité peut aussi être bien plus petite que les protéines et de même ordre de grandeur que les molécules d'azote qui servent à mesurer la surface spécifique des NP par BET. Dans ce cas, la rugosité n'affecte pas l'adsorption des protéines pour lesquelles la surface apparaît homogène mais augmente par contre la surface accessible aux molécules d'azote. La surface mesurée par adsorption d'azote peut alors être largement surestimée par rapport à la surface réellement accessible aux protéines. D'autre part, si la protéine peut « s'étaler » sur la surface comme le suggèrent les modèles d'adsorption, alors la surface qu'elle occuperait serait plus grande que celle représentée par une protéine de structure native, en particulier pour des protéines globulaires relativement compactes comme la myoglobine et l'hémoglobine.

Pour évaluer ce dernier paramètre, il est possible de faire un parallèle avec la dénaturation de la myoglobine en solution. Lorsqu'elle est dénaturée, la myoglobine a un rayon de giration bien plus important que la protéine native qui peut atteindre 3,5 nm en solution (*6*). La surface représentée par une myoglobine dénaturée est alors de 50 nm², soit plus de 5 fois la surface calculée pour une myoglobine native. Cette valeur peut servir de limite supérieure : il est peu probable qu'une protéine puisse être plus déstructurée que ne l'est une protéine dénaturée. Pourtant, la surface occupée par une myoglobine à l'interface air-solution a été mesurée et les valeurs rapportées dans la littérature peuvent atteindre 74 nm² (*2*). Les auteurs interprètent la surface occupée qui est plus de 8 fois supérieure à la taille d'une molécule de myoglobine par une déformation de la protéine à l'interface (effet tensioactif). Les surfaces considérées sont cependant très élevées comparées à la taille de la molécule de myoglobine. Puisque la surface mesurée de 60 nm² est légèrement supérieure à celle d'une dénaturation de la protéine, il est probable qu'un effet d'hétérogénéité de surface à l'échelle de la protéine ou de rugosité à l'échelle de la molécule d'azote s'ajoute à un possible effet de structure. Seule la mesure directe de la structure de la myoglobine adsorbée pourra donc nous renseigner sur le remaniement ou « l'étalement » de la protéine lors de l'adsorption. Pour évaluer la dénaturation de la protéine adsorbée, nous avons analysé la structure secondaire de la myoglobine adsorbée sur les nanoparticules de silice, afin de déterminer si la surface estimée correspond à la surface occupée par une protéine entièrement dénaturée ou à un effet de rugosité et d'hétérogénéité de la surface.

2. Structure secondaire des protéines adsorbées sur la silice

La structure secondaire des protéines en solution peut être déterminée à l'aide de deux techniques, le dichroïsme circulaire et la spectroscopie infrarouge, dont les incertitudes sont dues à la combinaison des incertitudes expérimentales puis de la déconvolution des spectres à partir de structures de protéines connues (*7, 8*). De fait, les structures secondaires identifiées pour l'hémoglobine (tableau 5-1) et la myoglobine (tableau 5-2) varient en fonction de l'étude et de la méthode utilisée.

Technique (Hb)	Hélice	Feuillet	Coude	Désordonnée	Références
Infrarouge	78	12	10	< 5	(*9*)
Dichroïsme	68-75	1-4	15-20	9-16	(*10, 11*)
Cristallographie	87	0	7	6	(*12*)

Tableau 5-1. *Comparaison à partir de la littérature de la structure secondaire de l'hémoglobine (% de structure) déterminées par spectroscopie infrarouge, dichroïsme circulaire et cristallographie des rayons X*

Technique (Mb)	Hélice	Feuillet	Coude	Désordonnée	Références
Infrarouge	85	7	8	< 5	(*9*)
Dichroïsme	67-86	0-13	0-6	11-30	(*7, 8, 10, 11, 13, 14*)
Cristallographie	85	0	8	7	(*12*)

Tableau 5-2. *Comparaison à partir de la littérature de la structure secondaire de la myoglobine (% de structure) déterminées par spectroscopie infrarouge, dichroïsme circulaire et cristallographie des rayons X*

Plusieurs études par spectroscopie infrarouge et par dichroïsme circulaire font apparaître une structure en feuillet, pourtant absente dans ces deux protéines (*12*). Les pourcentages d'hélicité, de coudes et de structure désordonnée déterminée par dichroïsme circulaire sur l'hémoglobine et la myoglobine en solution sont proches des valeurs déterminées par cristallographie, mais entachés d'une assez grande incertitude (*10, 11*).

Dans notre étude, nous cherchons simplement à comparer la structure secondaire d'une protéine libre et adsorbée sur les NP de silice. La quantification relative des structures secondaires est donc suffisante. Lors de la thèse, une première étude de la structure secondaire de la myoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice a été réalisée par spectroscopie infrarouge, après mise en solution de la protéine dans D_2O (voir chap. 2, §5.1), puis ces données ont été complétées par l'analyse par

dichroïsme circulaire des structures secondaires de la myoglobine et de l'hémoglobine adsorbées sur les NP de silice. Nous présenterons tout d'abord l'analyse de la structure de l'hémoglobine adsorbée par dichroïsme circulaire, puis celle de la myoglobine adsorbée.

2.1 Hémoglobine et nanoparticules de silice 20 nm

Les spectres en dichroïsme circulaire de l'hémoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice 20 nm ont été mesurés en tampon BisTris-HCl 10 mM à pH 6, en tampon Phosphate 10 mM à pH 7,4 et en tampon Tris-HCl 10 mM à pH 8,7 (Fig. 5-2, page suivante). Les données ont été enregistrées sous la forme de la différence de coefficient d'extinction molaire Δε ($M^{-1}.cm^{-1}$) (voir chap. 2, §5.2).

Le spectre de l'hémoglobine libre est caractéristique d'une protéine structurée majoritairement en hélices avec un maximum à 192 nm et deux minima à 208 et 222 nm. Comme il a déjà été rapporté, la structure secondaire de l'hémoglobine est identique à pH 6, pH 7,4 et pH 8,7 dans les trois tampons utilisés (*4*).

La concentration en hémoglobine adaptée aux mesures par dichroïsme circulaire est de 10 µM dans une solution tampon 10 mM pour limiter l'absorption dans l'UV. La quantité d'hémoglobine adsorbée a été mesurée dans ces conditions pour différentes concentrations massiques en NP (tableau 5-3).

C_{NP} (mg/mL)	Hb adsorbée (%)		
	pH 6	pH 7,4	pH 8,7
2,0	76 %	44 %	<1 %
4,0	96 %	72 %	<1 %
6,0	99 %	86 %	<1 %
6,8	99 %	90 %	<1 %

Tableau 5-3. *Pourcentage d'hémoglobine adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm en fonction de la concentration en NP et du pH de la solution en tampon 10 mM BisTris-HCl à pH 6, Phosphate à pH 7,4 et Tris-HCl à pH 8,7 pour une concentration en hémoglobine de 10 µM*

A une concentration en NP de 2 mg/mL, l'hémoglobine n'est adsorbée que partiellement à pH 6 (76%) et à pH 7,4 (44%) tandis qu'à une concentration de 6 mg/mL, la contribution de l'hémoglobine libre est largement réduite avec 99% d'hémoglobine adsorbée à pH 6 et 86% d'hémoglobine adsorbée à pH 7,4. A pH 8,7 la quantité d'hémoglobine adsorbée reste inférieure à 1%, ce qui permet bien d'utiliser cette condition comme contrôle négatif.

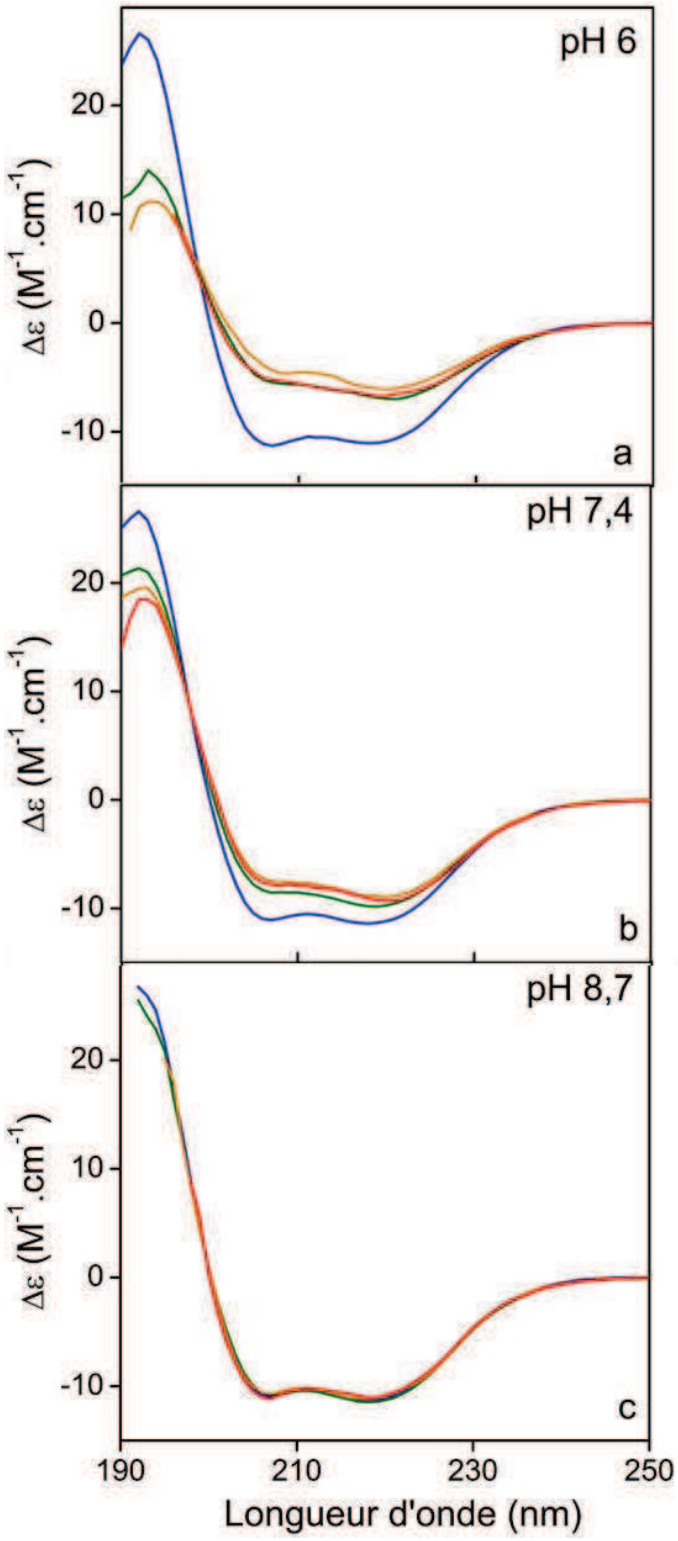


Figure 5-2. *Spectres de dichroïsme circulaire de l'hémoglobine (C_{Hb} = 10 µM) en tampons 10 mM BisTris-HCl à pH 6 (a), Phosphate à pH 7,4 (b) et Tris-HCl à pH 8,7 (c) : Hb sans NP (en bleu) et en présence de NP de silice 20 nm à une concentration de 2 mg/mL (en vert), 4 mg/mL (en orange) et 6 mg/mL (en rouge). L'hémoglobine est partiellement à totalement adsorbée à pH 6 et pH 7,4 et non adsorbée à pH 8,7*

Lorsque des techniques de spectroscopie sont utilisées, la diffusion de la lumière par les NP présentes en solution peut altérer la mesure. Pour s'assurer qu'aucun effet de ce type n'affecte la mesure par dichroïsme circulaire, la solution contenant hémoglobine et NP de silice à pH 8,7 a été analysée en tant que contrôle, puisque dans ces conditions l'hémoglobine ne s'adsorbe pas sur les NP de silice. Toute différence entre le spectre de l'hémoglobine en solution et de l'hémoglobine en solution en présence de NP serait alors due à la diffusion de la lumière par les NP. Aucune modification des spectres n'est observée à pH 8,7 en présence de NP et sans adsorption de l'hémoglobine. Cela montre que la présence des NP en solution n'induit pas de diminution de l'intensité du signal ni de la valeur de Δε mesurée.

Les spectres en dichroïsme circulaire de l'hémoglobine adsorbée à pH 6 et à pH 7,4 sur les NP de silice 20 nm présentent une diminution de $|\Delta\varepsilon|$ par rapport à la protéine libre en solution, ce qui montre une modification importante de la structure de l'hémoglobine adsorbée (Fig. 5-2). Ils conservent une forme relativement similaire à celle de l'hémoglobine libre et l'intensité relative des deux minima varie peu. Cela suggère qu'une partie de la structure en hélices de l'hémoglobine est désorganisée lors de l'adsorption, sans apparition d'un nouveau type de structure secondaire, par opposition à l'étude de Mahato qui conclut à la formation de feuillets-β au sein de l'hémoglobine lors de l'adsorption sur des NP d'argent (*15*).

La variation la plus importante de Δε est mesurée pour la concentration la plus élevée en NP, sans qu'une relation linéaire entre perte d'hélicité et concentration en NP se dessine. L'incertitude sur les spectres, qui augmente lorsque la concentration en NP augmente, ne permet cependant pas de conclure. La plus grande variation de Δε à pH 6 qu'à pH 7,4 peut être simplement due à une plus grande fraction de l'hémoglobine adsorbée à pH 6.

Pour mieux comprendre ces changements, la structure secondaire de l'hémoglobine libre et adsorbée a été calculée selon deux méthodes : une estimation de l'hélicité f_h à partir de la valeur de Δε à 222 nm (eq. 1) (*16, 17*) et par déconvolution des spectres à l'aide du logiciel CDNN (*18*).

$$f_h = \Delta\varepsilon(222nm) \cdot \frac{2340}{30300} \qquad \text{(eq. 1)}$$

Les spectres analysés sont ceux de l'hémoglobine libre et adsorbée à une concentration en NP de 6 mg/mL pour laquelle l'hémoglobine est adsorbée à 99% à pH 6 et à 86% à pH 7,4 (tableau 5-4).

	Hélices
Hb libre pH 6 et 7,4	80-82 %
Hb adsorbée pH 6	49 %
Hb adsorbée pH 7,4	65 %

Tableau 5-4. *Pourcentage d'hélices de l'hémoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice 20 nm en tampon BisTris-HCl à pH 6 (C=6 mg/mL) calculée selon* (*16, 17*)

La déconvolution des spectres de l'hémoglobine libre par CDNN fait apparaître des feuillets-β (>10%) dans la structure de l'hémoglobine. Cette déconvolution n'a donc pas été utilisée car elle n'est pas représentative de la structure de l'hémoglobine. A partir de la mesure de Δε à 222 nm, l'hélicité de l'hémoglobine libre est estimée à 80% et 82% à pH 6 et 7,4, ce qui est conforme aux valeurs attendues pour l'hémoglobine (*10-12*). L'hélicité de l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice est bien plus faible et n'est plus que de 49% à pH 6 et 65% à pH 7,4.

La diminution moins importante de l'hélicité à pH 7,4 peut être liée à la plus faible quantité d'hémoglobine adsorbée (86% à pH 7,4 contre 99% à pH 6). Cela signifie qu'il y a une contribution de 14% de l'hémoglobine libre au signal mesuré à pH 7,4. Après correction, l'hélicité de l'hémoglobine adsorbée à pH 7,4 peut être estimée à 62%, ce qui reste supérieure à l'hélicité de l'hémoglobine adsorbée à pH 6. L'adsorption de l'hémoglobine étant moins importante à pH 7,4, il est possible que les forces d'interaction entre protéine et surface, par exemple *via* les interactions électrostatiques entre résidus basiques et groupements chargés à la surface de la silice, soient plus faibles à un pH plus élevé. Le nombre ou la force des contraintes subies par l'hémoglobine adsorbée seraient alors plus faibles, ce qui pourrait expliquer la perte de structure moins importante de l'hémoglobine.

La perte d'hélicité lors de l'adsorption reste néanmoins moindre comparée à celle observée lors de la dénaturation irréversible en température ou en milieu acide de la protéine (*19*).

Une partie des liaisons hydrogène qui permettent la formation des hélices de l'hémoglobine est donc déstabilisée lors de l'adsorption. Cependant, la mesure globale par dichroïsme circulaire ne nous permet pas de savoir si la perte de structure est due uniquement à une interaction directe avec la surface (interactions électrostatiques avec SiO^-, liaisons hydrogène) ou si un effet de déstabilisation « à distance » peut être impliqué (*20*). En effet, si l'hémoglobine est « ancrée » sur la surface *via* des interactions fortes entre résidus basiques et charges négatives de surface, alors une contrainte mécanique peut être générée sur des domaines de la protéine qui ne sont pas en interaction directe avec la surface en « étirant » ou en distordant la structure de la protéine.

Cela signifie que les parties déstructurées de l'hémoglobine adsorbée ne correspondent pas nécessairement aux seules zones d'interaction de la protéine avec la surface de silice.

Une sous-unité d'hémoglobine de porc est formée de 141 acides aminés pour les sous-unités α (structure P01965.pdb) et 147 pour les sous-unités β (structure P02067.pdb) (*21*). Si chaque monomère est constitué de 80% d'hélices, alors 113 et 118 acides aminés de chacun des monomères se trouvent au sein d'une hélice. Si l'on suppose qu'il suffit qu'un résidu par tour d'hélice soit en interaction avec la surface pour déstructurer une hélice (ici par effet direct), une perte d'hélicité de 40% de l'hémoglobine adsorbée correspondrait à l'interaction de 12 résidus au minimum avec la surface et correspondrait à une interaction très localisée. Il est probable que les deux effets, par interaction directe et « à distance », soient impliqués dans la perte de structure de l'hémoglobine adsorbée.

L'hémoglobine perd ainsi une partie de sa structure secondaire lorsqu'elle est adsorbée sur les NP de silice, mais également sur les NP CdS (quantum dots) (*22*) et sur les NP d'argent (*15*). Pour ces trois types de nanoparticules, une diminution de l'hélicité de la protéine et une augmentation du pourcentage de la structure désordonnée est observée, bien que l'apparition de feuillets-β soit également proposée lors de l'adsorption de l'hémoglobine sur les NP d'argent (*23*).

Structure secondaire de l'hémoglobine désorbée

La structure secondaire de l'hémoglobine désorbée en tampon Tris-HCl 100 mM à pH 8,7 (voir chap. 4, §4) a été analysée par dichroïsme circulaire et comparée à celle de l'hémoglobine en solution au même pH (Fig. 5-3).

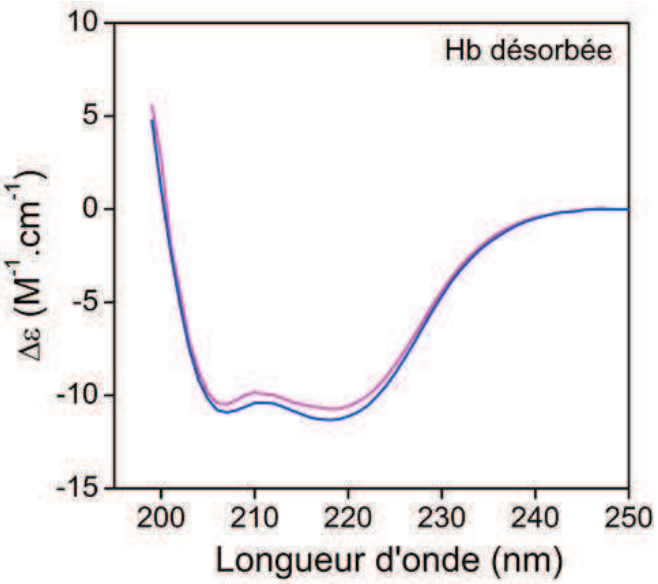


Figure 5-3. *Spectre de dichroïsme circulaire de l'hémoglobine libre (en bleu) et désorbée des nanoparticules de silice 20 nm (en rose) en tampon Tris-HCl 10 mM à pH 8,7 (C_{Hb} = 10 µM). Désorption en tampon Tris-HCl 100 mM puis analyse en tampon Tris-HCl 10 mM. Les spectres sont coupés à 200 nm en raison de la forte absorbance du tampon.*

Le spectre de l'hémoglobine désorbée est identique à celui de l'hémoglobine libre. La perte partielle d'hélicité de l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice est donc réversible après désorption. L'adsorption permet de stabiliser l'hémoglobine dans un nouvel état structural et la protéine peut passer d'un état à l'autre de façon réversible (eq. 2).

$$Hb_{libre} \rightleftharpoons Hb_{adsorbée} \qquad \text{(eq. 2)}$$

L'adsorption peut également être vue comme un nouveau « stress » pour la protéine avec résilience, tout au moins du point de vue structural. La prochaine étape de cette étude est de déterminer si la déstructuration de s'accompagne d'une dénaturation, c'est-à-dire d'une perte d'activité de l'hémoglobine adsorbée (voir chap. 7). Seule une activité totalement native de la protéine désorbée peut indiquer une totale réversibilité des modifications provoquées par l'adsorption.

2.2 Myoglobine et nanoparticules de silice 7 nm

Une première étude de la structure secondaire de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice 7 nm a été réalisée par spectroscopie infrarouge à 25°C (Fig. 5-4).

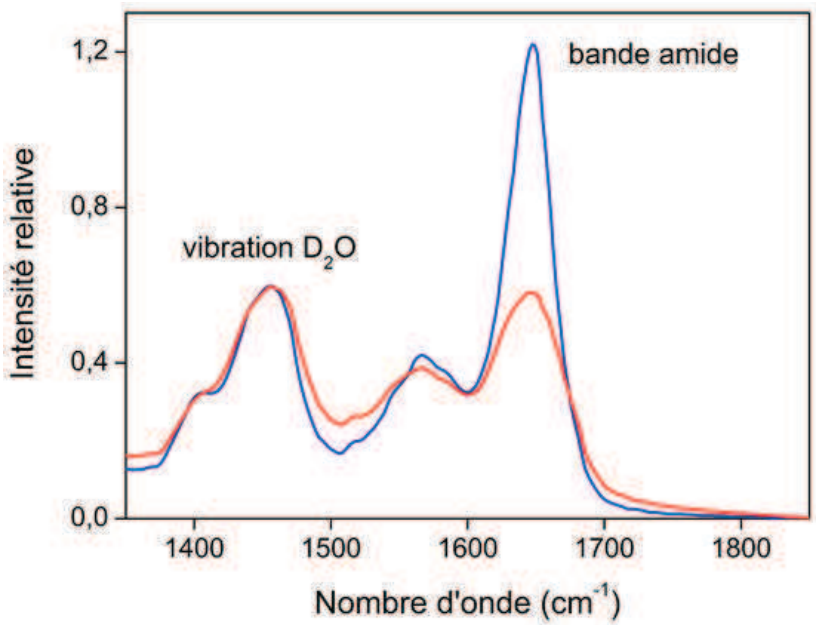


***Figure 5-4**. Spectres infrarouge de la myoglobine libre (bleu) et adsorbée (rouge) sur les nanoparticules de silice 7 nm, dans une solution de D_2O, après soustraction du spectre du tampon et des nanoparticules en solution. Les spectres sont normalisés à 1456 cm^{-1}, dont la composante principale est la vibration de D_2O. La myoglobine est adsorbée à 95% sur les NP de silice.*

Les solutions ont été préparées dans D_2O pour s'affranchir du signal de l'eau légère, situé dans la même région que celle de la bande amide I caractéristique de la structure secondaire de la protéine

située entre 1600 et 1700 cm^{-1}. Les solutions très concentrées en protéine (C_{Mb} = 5 mM) sont analysées dans D_2O, contrairement aux solutions diluées analysées par dichroïsme circulaire (C_{Mb} = 10 µM). Cependant, les constantes d'adsorption de la myoglobine sur les NP de silice en tampon Phosphate et dans l'eau sont similaires : le système étudié est donc équivalent en première approximation.

Les solutions de myoglobine, avec et sans NP, ont la même concentration en protéine dans l'eau, mais le trajet optique de la suspension de NP n'est pas connu. Pour permettre la comparaison des spectres, ceux-ci ont été normalisés à la bande de vibration de D_2O à 1456 cm^{-1}.

Le spectre infrarouge de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice présente une diminution d'intensité et un élargissement de la bande amide I' entre 1600 et 1700 cm^{-1}. Les différentes composantes de la bande amide peuvent être identifiées à partir de la dérivée seconde de l'absorbance (Fig. 5-5) (*9*).

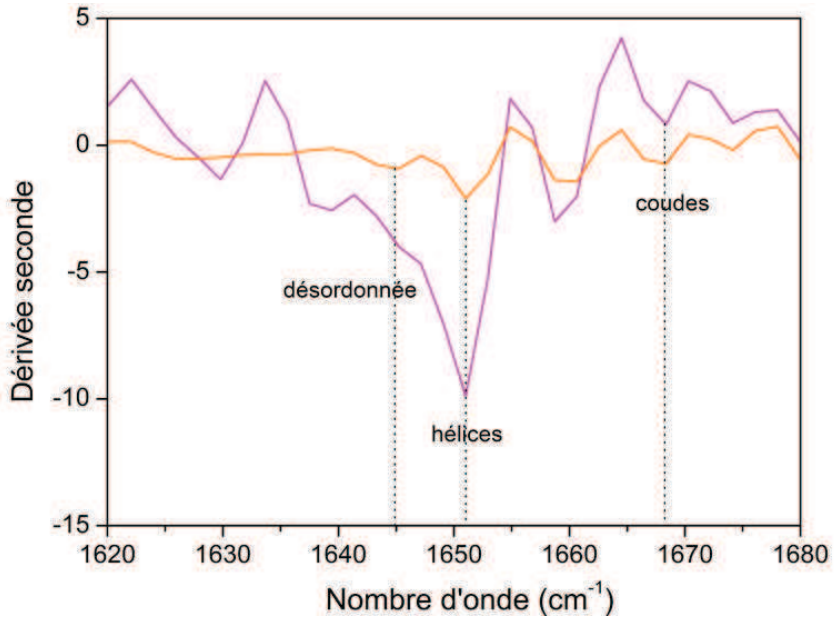


***Figure 5-5**. Dérivée seconde de la bande amide I' de la myoglobine libre (rose) et adsorbée sur les nanoparticules de silice 7 nm (orange). Le type de structure secondaire associé aux composantes principales est indiqué d'après* (*24*)

La composante principale de la bande amide I' de la myoglobine libre se situe à 1651 cm^{-1}, ce qui est cohérent pour une protéine dont la structure secondaire est composée de 7 hélices-α dont la position moyenne se trouve à 1653 cm^{-1} (la contribution de l'hélice 3_{10} de l'hémoglobine se situe quant à elle à 1641 cm^{-1}) (*24*). La composante secondaire située à 1668 cm^{-1} peut être attribuée aux coudes. La composante située à 1658 cm^{-1} est probablement aussi liée à la structure en hélices, car la composante associée aux hélices dépend de la longueur et de la courbure de celles-ci et peut s'étendre jusqu'à 1660 cm^{-1} (*25*).

Les composantes principale et secondaire de la bande amide I' de la myoglobine adsorbée se situent aux mêmes positions à 1651 cm^{-1} et à 1668 cm^{-1}, ce qui indique que la structure de la myoglobine adsorbée est également composée d'hélices et de coudes. Une nouvelle composante secondaire apparaît cependant à 1645 cm^{-1} et peut être attribuée à la structure désordonnée (*24*) au sein de la protéine adsorbée. D'autre part, l'aire relative des différentes composantes montre une diminution de la structure en hélices et une apparition de la structure désordonnée pour la myoglobine adsorbée.

Il est toutefois difficile de quantifier la perte de structure avec cette approche car la normalisation n'est pas parfaite. De plus, la mise en place d'une suspension de NP de silice entre deux fenêtres très fragiles de CaF_2 est délicate. La longueur des trajets optiques est donc peu reproductible.

Pour valider ces premières données, nous avons analysé la structure secondaire de la myoglobine adsorbée par dichroïsme circulaire. Les mesures ont été réalisées sur la myoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice 7 nm en tampon BisTris-HCl 10 mM à pH 6 et en tampon Phosphate 10 mM à pH 7,4 (Fig. 5-6, page suivante).

Dans les conditions de mesure du dichroïsme, à une concentration en myoglobine de 10 µM et une concentration en NP de 6 mg/mL, la quantité de myoglobine adsorbée est de 97% à pH 6 et de 69% à pH 7,4 (tableau 5-5).

C_{NP} (mg/mL)	Mb adsorbée (%)		
	pH 6	pH 7,4	pH 8,7
2,0	77 %	36 %	3 %
4,0	91 %	56 %	9 %
6,0	97 %	69 %	12 %

Tableau 5-5. *Pourcentage de myoglobine adsorbée sur les nanoparticules de silice 7 nm en fonction de la concentration en NP et du pH de la solution en tampon 10 mM BisTris-HCl à pH 6, Phosphate à pH 7,4 et Tris-HCl à pH 8,7 pour une concentration en myoglobine de 10 µM*

L'analyse à pH 6 permet une mesure directe du spectre de la myoglobine adsorbée, tandis que le spectre mesuré à pH 7,4 est la somme de deux contributions, celle de la myoglobine libre en solution et celle de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice. En tampon Tris-HCl 10 mM à pH 8,7, la quantité de myoglobine non adsorbée reste très majoritaire (88%). Cette solution reste un témoin négatif correct pour notre système.

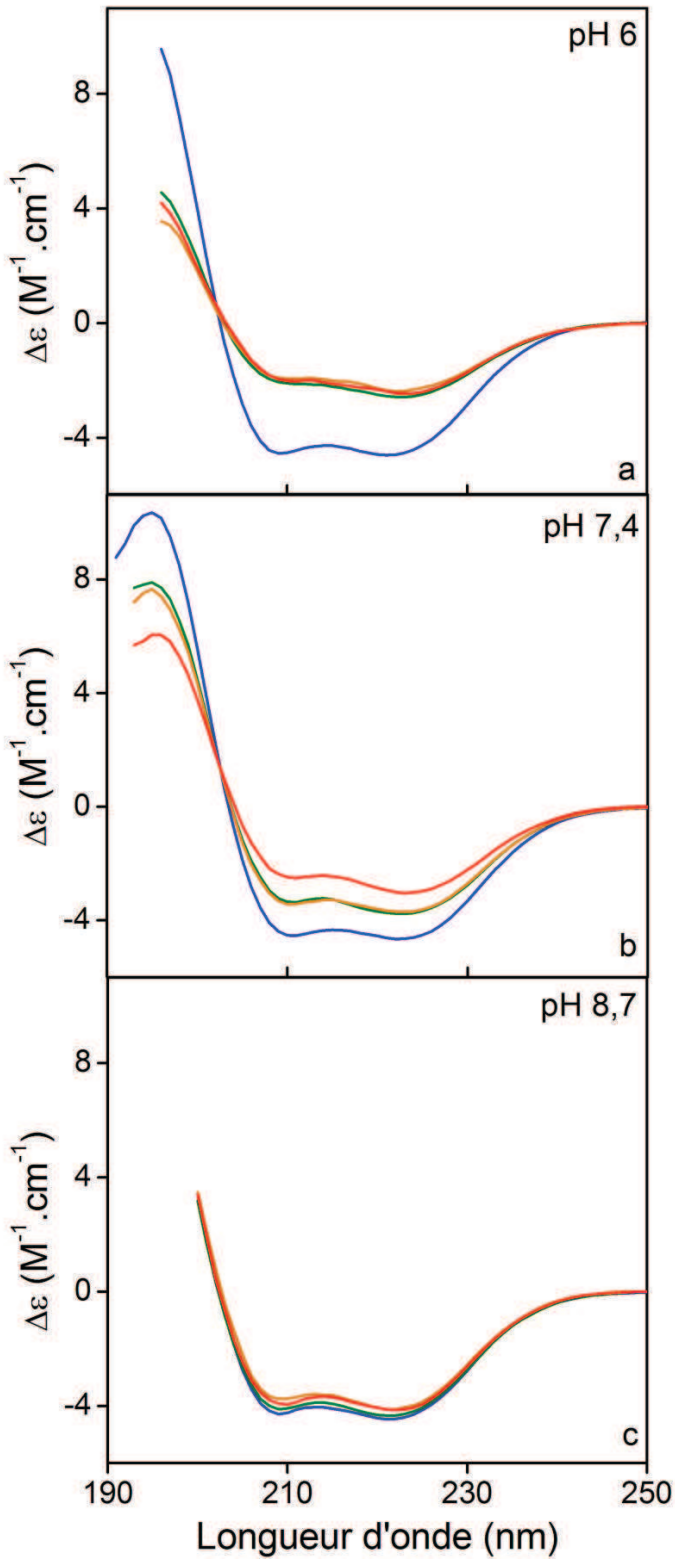


Figure 5-6. *Spectres de dichroïsme circulaire de la myoglobine à 10 µM en tampon 10 mM BisTris-HCl à pH 6 (a), Phosphate à pH 7,4 (b) et Tris-HCl à pH 8,7 (c) : seule (en bleu) et en présence des nanoparticules de silice 7 nm à une concentration de 2 mg/mL (en vert), 4 mg/mL (en orange) et 6 mg/mL (en rouge). Le spectre de la myoglobine à pH 8,7 est tronqué de 190 à 200 nm en raison de la plus forte absorption du tampon Tris-HCl dans l'UV.*

Le spectre de la myoglobine libre, tout comme celui de l'hémoglobine, est caractéristique d'une protéine structurée en hélices. Les spectres de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice à pH 6 et 7,4 présentent une variation très importante de Δε sans modification de la forme du spectre, ce qui indique une diminution de l'hélicité de la myoglobine adsorbée sur la surface de silice, cohérente avec l'observation réalisée en spectroscopie infrarouge. L'évolution de Δε avec la concentration en NP n'est pas linéaire : cela pourrait indiquer que la perte de structure dépend de la couverture en myoglobine de la surface (*26*).

L'hélicité calculée à partir de la mesure à 222 nm est reportée ci-dessous (*17*) (tableau 5-6). La déconvolution des spectres par le logiciel CDSSTR (*27*) n'est pas présentée car l'hélicité calculée pour la myoglobine libre n'est pas cohérente avec la structure connue de la protéine.

	pH	Hélices	% Mb adsorbée	Hélices * Mb adsorbée
Mb libre pH 6	pH 6	85 %	-	-
Mb + NP SiO_2 7 nm	pH 6	46 %	97 %	45 %
	pH 7,4	54 %	69 %	40 %
	pH 8,7	80 %	12 %	43 %

Tableau 5-6. *Pourcentage d'hélices de la myoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice 7 nm (C_{NP} = 6 mg/mL) en tampon 100 mM BisTris-HCl à pH 6, Phosphate à pH 7,4 et Tris-HCl à pH 8,7 calculée selon (16, 17). L'hélicité (*) est calculée pour la myoglobine 100% adsorbée en fonction de la quantité de myoglobine adsorbée.*

L'hélicité mesurée pour la myoglobine libre en solution est conforme à la structure de la myoglobine (*28*), dans la limite des incertitudes liées à la mesure (*7, 8, 10, 11, 13, 14*). La légère diminution de l'hélicité mesurée à pH 8,7 est parfaitement compensée par une contribution de 12% au signal de la myoglobine adsorbée, égale à la quantité de myoglobine adsorbée dans ces conditions. Après soustraction du signal de la myoglobine adsorbée, le spectre de la myoglobine libre en présence des NP n'est donc pas altéré lors de la mesure.

L'hélicité mesurée est pondérée par la quantité de myoglobine adsorbée pour permettre la comparaison de la structure secondaire de la myoglobine adsorbée seule, sans contribution de la protéine libre en solution : l'hélicité calculée est comprise entre 40 et 45% quelles que soient les conditions de pH et de tampon. Si la quantité de myoglobine adsorbée et la constante d'adsorption varient en fonction du pH (voir chap. 4, §3), la structure secondaire de la myoglobine adsorbée semble identique quelles que soient les conditions et est caractérisée par une diminution de l'ordre

de 50% de l'hélicité de la myoglobine. Une diminution de l'hélicité de la myoglobine a également été observée lors de l'adsorption sur des NP d'oxyde de zirconium (*29*).

La perte d'hélicité de la myoglobine adsorbée est comparée à la perte de structure de la myoglobine dénaturée rapporté dans la littérature : la perte d'hélicité est de 71% à 70°C et de 85% à pH 2 (*30*). La perte d'hélicité lors de l'adsorption est moindre que celle observée lors de la dénaturation irréversible de la myoglobine, ce qui rejoint les résultats obtenus sur l'hémoglobine (voir §2.1). Cependant, un surfactant, le SDS, occasionne une perte d'hélicité de 50% de la myoglobine lors de la dénaturation (*31*). L'adsorption de la myoglobine sur les NP de silice a donc, en moyenne, un impact équivalent au SDS en termes de déstructuration. La perte partielle de structure de la myoglobine adsorbée rejoint l'hypothèse d'un « étalement » de la myoglobine sur la surface de silice lors de l'adsorption, ce qui conduit à une plus grande surface occupée que celle estimée pour une protéine native (voir §1). Toutefois, la myoglobine n'étant pas totalement déstructurée, cela suggère qu'une certaine hétérogénéité de la surface prévaut également lors de l'adsorption, la NP n'étant pas totalement couverte par les protéines (voir §1, Fig. 1-1).

Dans la myoglobine native, 112 des 153 acides aminés de la protéine se trouvent impliqués dans une des huit hélices. Lors de l'adsorption, il y a donc de l'ordre de 56 acides aminés qui ne forment plus d'hélices.

Du point de vue thermodynamique, l'enthalpie de formation d'une hélice est en moyenne de 2,8 $kJ.mol^{-1}$ par acide aminé (pour la myoglobine) (*32*). La formation des hélices de la myoglobine est ainsi favorisée par la diminution de l'enthalpie globale de la protéine d'environ 315 $kJ.mol^{-1}$ lors du repliement. La perte de 50% des hélices correspondrait à une augmentation défavorable de l'enthalpie de la protéine adsorbée d'environ 160 $kJ.mol^{-1}$. Or l'adsorption de la myoglobine sur les NP est caractérisée par une contribution enthalpique globalement favorable (réaction exothermique) (voir chap. 4, §5), ce qui signifie que d'autres contributions favorables à l'adsorption contrebalancent l'augmentation de l'enthalpie liée à la perte de structure, par exemple par formation d'interactions électrostatiques entre myoglobine (Arg, Lys) et silice (SiO^-).

Structure secondaire de la myoglobine désorbée

Afin de déterminer si la myoglobine, comme l'hémoglobine, peut retrouver une structure native après désorption, la solution de myoglobine adsorbée sur les NP de silice 7 nm en tampon BisTris-HCl à pH 6 a été dialysée contre un tampon Tris-HCl à pH 8,7 pour permettre sa désorption et l'étude de sa structure.

Contrairement à l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice 20 nm, la désorption de la myoglobine des NP de silice 7 nm est partielle et dépend de la concentration du tampon. La myoglobine est désorbée à 69% en tampon Tris-HCl 10 mM et à 87% en tampon 100 mM à pH 8,7. La myoglobine désorbée dans ces deux conditions a été analysée par dichroïsme circulaire après centrifugation des NP et dilution des solutions en tampon Tris-HCl 10 mM pour l'analyse (Fig. 5-7).

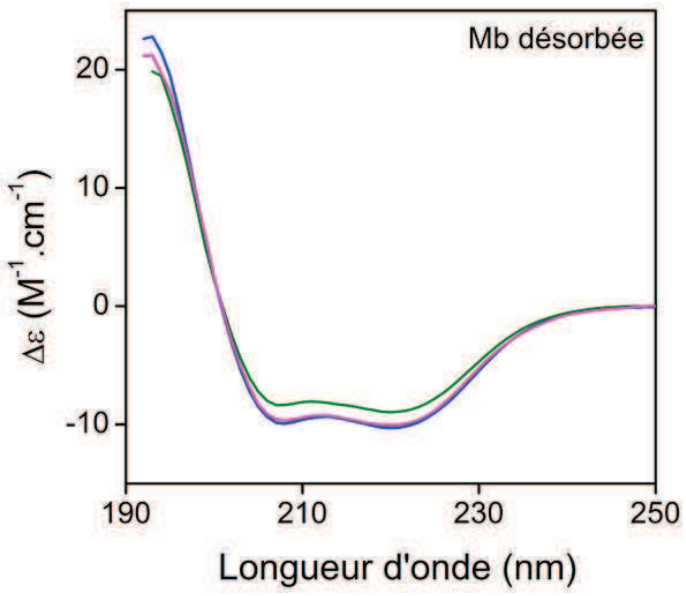


***Figure 5-7**. Spectres de dichroïsme circulaire de la myoglobine libre (bleu) et désorbée des nanoparticules de silice 7 nm en tampon Tris-HCl 10 mM (vert) et Tris-HCl 100 mM (rose) à pH 8,7 (C_{Mb} = 10 µM)*

La myoglobine désorbée en tampon Tris-HCl 100 mM retrouve une structure native, son spectre est identique à celui de la myoglobine de référence. Au contraire, la myoglobine désorbée en tampon Tris-HCl 10 mM présente une diminution de 12% de son hélicité après désorption : la protéine n'est donc pas totalement restructurée après désorption. Le même effet a été observé après adsorption et désorption de la myoglobine des NP de silice 20 nm dans ces deux conditions de tampon (perte d'hélicité de 9% après désorption en tampon 10 mM). Il semble qu'une désorption de la myoglobine dans des conditions moins efficaces, ici une force ionique plus faible, ne permette pas une restructuration complète de la protéine.

Les spectres UV-visible de la myoglobine désorbée ont également été comparés (voir §4.2). Cette observation ayant été faite en fin de thèse, nous n'avons pas eu le temps de poursuivre cette étude à l'aide d'autres techniques pour identifier si différentes populations de myoglobine plus ou moins déstructurées étaient présentes (électrophorèse en conditions non dénaturantes, centrifugation pour séparer les agrégats des protéines peu dénaturées) et quelles sont les régions de la myoglobine désorbée qui restent déstructurées (par cartographie de surface ou par échange H/D par exemple).

L'analyse de la structure secondaire de la myoglobine adsorbée par dichroïsme circulaire ne permet pas d'aller plus loin dans l'analyse de la structure de la protéine adsorbée, c'est-à-dire de déterminer quels sont les résidus qui ne participent plus à la structure en hélice. Pour identifier les résidus en interaction directe avec la surface et ceux qui ne forment plus d'hélice après adsorption, d'autres techniques d'analyse sont nécessaires afin de passer d'une analyse globale de la protéine adsorbée à une analyse par acide aminé, telles que la RMN à deux dimensions (*33*), la mesure des échanges H/D (*34, 35*), la digestion enzymatique (*36*) ou le marquage des surfaces d'interaction entre protéines au sein d'un complexe par irradiation (*37*). C'est cette dernière méthode que nous avons développée pour identifier les zones d'interactions de la myoglobine avec la surface de silice (voir §6).

2.3 Comparaison avec d'autres systèmes d'adsorption protéine-silice

L'évolution de la structure secondaire de l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice 20 nm et de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice 7 nm est similaire et caractérisée par une diminution importante de l'hélicité de la protéine adsorbée de 40% pour l'hémoglobine et de 50% pour la myoglobine. Les mécanismes d'adsorption des deux protéines semblent proches, en termes de modifications de la structure secondaire de la protéine adsorbée. Ces observations sont en accord avec un modèle d'étalement de la protéine sur la surface lors de l'adsorption, à l'origine d'une perte partielle de sa structure, même si cela n'implique pas nécessairement que toutes les régions déstructurées de la protéine soient en interaction directe avec la surface.

Une perte partielle de la structure des protéines lors de l'adsorption sur la silice a également été observée pour d'autres protéines, par exemple le lysozyme (*16, 38*), l'anhydrase carbonique (*39*), la BSA (*40, 41*) ou l'immunoglobuline G (*42*). Or la structure secondaire de ces protéines est très différente : si la myoglobine, l'hémoglobine, la BSA et le lysozyme sont des protéines globulaires structurés principalement en hélices, l'immunoglobuline G et l'anhydrase sont quant à elles structurées principalement en feuillets-β. Pourtant dans les deux cas, la structure secondaire de la protéine est altérée après adsorption sur la silice. L'organisation d'une protéine en hélices ou en feuillets n'est donc pas un frein à l'adsorption sur une surface de silice.

Toutefois, un phénomène exactement opposé peut être observé lors de l'adsorption d'un peptide synthétique (YARQQRAEARQQRAHARQKRAEARQQRA) dont la séquence a été élaborée de façon à conduire à la formation d'hélice lors de l'adsorption, grâce aux interactions entre arginine et silice (*43*). Cette étude montre que les résidus arginine peuvent être de véritables points d'ancrage du peptide sur la silice, ici à l'origine de sa structuration.

Pour expliquer la perte de structure observée ici, on peut rappeler que l'étude de l'adsorption des protéines de levure sur les NP de silice (voir chap. 4, §7.2) a montré que les résidus basiques jouaient un rôle important lors de l'adsorption en permettant la formation d'interactions électrostatiques entre la charge positive des résidus et la charge négative des silanols de la surface. Les interactions électrostatiques entre acides aminés basiques et silice pourraient également expliquer l'absence d'adsorption et la désorption à pH 9 (les résidus basiques sont en partie déprotonés et la protéine se « décroche » plus facilement de la surface) et la réversibilité des modifications observées avec le repliement en structure native de la protéine après désorption. Il est donc probable que les résidus basiques de la myoglobine jouent le même rôle de point d'ancrage sur les NP de silice, ce qui peut générer des forces de tension sur la structure secondaire et une distorsion de celle-ci lors de l'adsorption.

2.4 Quel lien entre résidus basiques, adsorption et perte d'hélicité ?

Dans cette discussion, nous faisons l'hypothèse qu'il existe un lien entre adsorption sur la silice par les résidus basiques et déstructuration d'une partie de la myoglobine adsorbée.

La myoglobine compte 19 résidus lysine et 2 résidus arginine. La répartition de ces résidus dans la myoglobine est présentée ci-dessous (tableau 5-7).

Structure	Lysine	Arginine
Hélice-α A	K16	
Hélice-α B		R31
Hélice-3_{10} C	K42	
Coude 3_{10} CD	K45, K47, K50	
Hélice-α D	K56	
Hélice-α E	K62, K63	
Coude β EF	K77, K78, K79	
Hélice-α F	K87, K96	
Hélice-α G	K102, K118	
Coude β GH		
Hélice-α H	K133, K145, K147	R139
Désordonnée	K98	

***Tableau 5-7**. Répartition des acides aminés basiques, lysine et arginine, au sein de la structure secondaire de la myoglobine (28, 44). L'histidine qui n'est par chargée à pH 6 et 7,4 n'est pas prise en compte dans les acides aminés basiques.*

Lors de l'adsorption sur les NP de silice 7 nm, la myoglobine perd 50% de sa structure en hélice, sans que l'on puisse dire si l'ensemble des hélices est partiellement déstabilisée ou si quelques hélices sont plus affectées que d'autres. Si l'on se base sur les interactions électrostatiques entre résidus basiques et silice, il est logique de penser que les hélices les plus riches en résidus basiques sont celles qui interagissent le plus avec la surface, telles que les hélices E, G et H (Fig. 5-8).

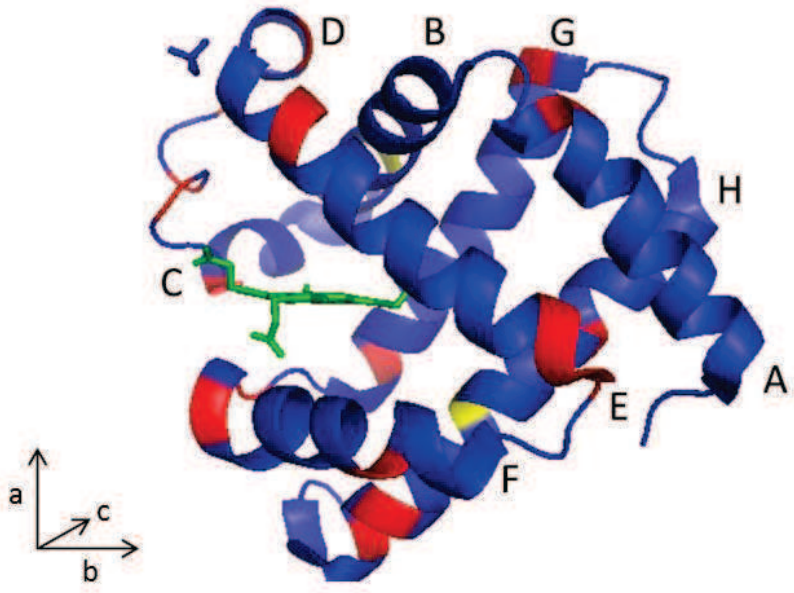


***Figure 5-8**. Représentation des 19 résidus lysine (rouge) et des 2 résidus arginine (jaune) au sein de la structure de la metmyoglobine de cœur de cheval, d'après 1YMB.pdb (28). L'hème est représenté en vert (Pymol).*

Un autre site favorable à l'adsorption est composé des résidus lysine K77, K78 et K79 (coude EF) qui forment un groupe de trois résidus chargés positivement et pourraient interagir fortement avec la silice du fait de cette concentration de charge. Lundqvist a montré que lors de l'adsorption de l'anhydrase carbonique sur des NP de silice, une région contenant trois lysine successives était directement impliquée dans l'adsorption de la protéine sur la surface (la protéine adsorbée est digérée par une enzyme et les fragments manquants sont supposés être en interaction avec la surface) (*36*). D'autre part, lors de l'adsorption du lysozyme sur l'hydroxyapatite, un site de fixation comprenant deux arginine et deux lysine a été identifié, ces acides aminés jouant un rôle important au cours de l'adsorption de la protéine sur la surface (*33*). Enfin, les protéines de levure préférentiellement adsorbées sur les NP de silice sont plus riches en clusters de charges que les protéines non adsorbées (voir chap. 4, §7.2). De même, au sein de l'hélice H les quatre résidus basiques sont séparés seulement par un à cinq autres résidus. Si plusieurs de ces résidus interagissent avec la surface, alors l'hélice les contenant pourrait être déstabilisée.

Les résultats de protéomique (voir chap. 4, §7.3) suggèrent que les sites hydrophobes bien structurés sont peu favorables à l'adsorption. On peut se demander si la cavité hydrophobe contenant l'hème serait moins déformable et moins sensible à l'adsorption sur la silice que d'autres régions de la myoglobine.

La poche hydrophobe de l'hème est formée par les hélices B, C, G et ses parois sont formées par les hélices E et F (*45*). Certains résidus de l'hélice C et des coudes CD et FG sont liés à l'hème *via* leurs chaînes latérales (*4*). Les hélices A, G et H forment de façon plus générale le cœur hydrophobe compact de la myoglobine (*46*). L'hème contient également deux groupements propionate chargés négativement : le premier est tourné vers l'extérieur et forme un pont salin avec le résidu lysine K45 situé sur le coude CD, tandis que le second forme des liaisons hydrogène avec les résidus sérine S92 et histidine H97 situés sur l'hélice F. Les hélices entourant l'hème sont-elles désorganisées lors de l'adsorption ou au contraire préservées ? Buijs a montré par échange H/D que la structure de la myoglobine autour de l'hème n'était pas ou peu déstabilisée lors de l'adsorption sur les NP de silice (fumée de silice de 11 nm), contrairement aux hélices A et H, et à une partie des hélices B et G, qui perdent en stabilité structurale (*47*). Cependant, leurs résultats indiquent également qu'une zone plus large, comprenant les hélices C, D et une partie de l'hélice E (l'étude ne permet pas d'étudier individuellement les hélices), qui forment bel et bien une partie de la cavité hydrophobe de l'hème, présentent une forte augmentation de l'hétérogénéité de structure lors de l'adsorption. Or le coude CD et le coude EF sont particulièrement riches en acides aminés basiques : une adsorption non spécifique et multisite, où plusieurs régions riches en résidus basiques peuvent interagir avec la surface de silice, pourrait expliquer la plus grande hétérogénéité de conformation de cette région après adsorption.

On peut noter que nous n'avons pas observé de relargage de l'hème lors de l'adsorption de la myoglobine et de l'hémoglobine sur les NP de silice, ce qui montre que l'intégrité des protéines est conservée.

3. Stabilité de la myoglobine adsorbée sur la silice

3.1 Température et enthalpie de dénaturation

La stabilité en température de la myoglobine adsorbée sur la silice a été comparée à celle de la myoglobine libre en solution. La température et l'enthalpie de dénaturation de la myoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice 7 nm ont été mesurées par microcalorimétrie DSC au laboratoire PAPC de l'Université de Bourgogne. La microcalorimétrie requiert une concentration élevée en protéine

(plusieurs mM) ce qui nécessiterait des concentrations très élevées en tampon et perturberait notre système. Nous avons choisi de travailler sans tampon pour ne pas perturber la mesure.

Ces mesures sont complémentaires de l'analyse de la dynamique de la myoglobine adsorbée, réalisée par diffusion incohérente de neutrons (voir chap. 6) sur une solution concentrée en myoglobine et préparée dans D_2O. Par soucis d'homogénéité, les mesures par microcalorimétrie DSC et par diffusion de neutrons ont été réalisées sur les mêmes échantillons : myoglobine libre et myoglobine adsorbée sur les NP de silice 7 nm en solution dans D_2O. L'adsorption de la myoglobine n'est par ailleurs pas modifiée dans D_2O.

Les thermogrammes de dénaturation en température de la myoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice 7 nm dans D_2O ont été mesurés de 20 à 100°C (Fig. 5-9).

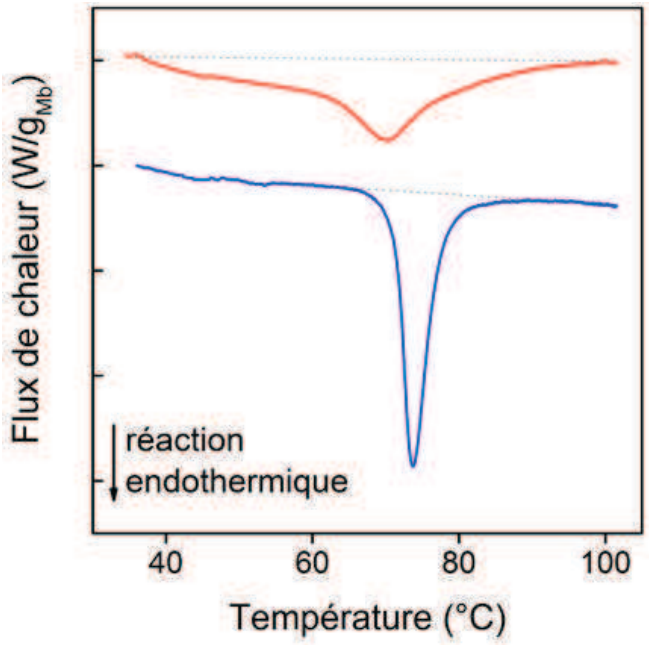


Figure 5-9. *Thermogrammes de la myoglobine libre (bleu) et adsorbée sur les nanoparticules de silice 7 nm (rouge) dans une solution de D_2O. Les lignes de base utilisées pour l'intégration des thermogrammes et le calcul de l'enthalpie de dénaturation sont représentées en pointillés.*

La dénaturation de la myoglobine libre s'accompagne d'un pic étroit de transition de 66 à 82 °C avec une température de dénaturation T_d = 73,6 ± 0,2 °C, tandis que la dénaturation de la myoglobine adsorbée sur la silice s'accompagne d'une transition beaucoup plus large de 35 à 100°C avec un pic de dénaturation peu marqué à T_d = 70,1 ± 1,0 °C. Les transitions observées sont irréversibles dans les deux cas. Interpréter des données thermodynamiques hors équilibre est possible si l'on fait l'hypothèse que la variation de chaleur mesurée est due principalement aux effets de dénaturation

de la protéine, c'est-à-dire que les variations de chaleur liées aux modifications irréversibles de la protéine dénaturée, tels que l'agrégation, sont mineures comparées à la dénaturation (*48*).

La température de dénaturation de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice est en moyenne plus faible de 3,5°C par rapport à celle de la myoglobine libre, ce qui montre une diminution de la stabilité de la myoglobine adsorbée, et s'accompagne d'un étalement important de la zone de transition. Pour évaluer la différence d'énergie nécessaire pour dénaturer la myoglobine libre et adsorbée, la variation d'enthalpie associée à la dénaturation est calculée à partir de l'intégration du pic de dénaturation, ce qui permet de prendre en compte l'ensemble des conformations (tableau 5-8).

	T_d (°C)	ΔH_d (kJ/mol)
Mb libre	73,6 ± 0,2	440 ± 30
Mb adsorbée	70,1 ± 1,0	290 ± 30

Tableau 5-8. *Température et enthalpie de dénaturation de la myoglobine libre et adsorbée sur les nanoparticules de silice 7 nm en solution D_2O calculées à partir de trois expériences indépendantes*

L'enthalpie de dénaturation de la myoglobine adsorbée est une fois et demie plus faible que celle de la myoglobine libre. Un apport d'énergie plus faible permet de dénaturer l'ensemble des molécules de myoglobine adsorbées sur les NP de silice. Une diminution aussi importante de l'enthalpie de dénaturation a aussi été rapportée pour le lysozyme adsorbé sur une surface de silice (*49*).

La diminution de l'enthalpie de dénaturation de la myoglobine adsorbée peut être expliquée soit par une diminution de la stabilité de l'état initial (à 25°C), soit par une augmentation de la stabilité de l'état final (à 73°C) (*50*). Ces deux hypothèses correspondent à deux mécanismes distincts : la déstabilisation de la myoglobine adsorbée à 25°C comparée à la myoglobine libre native d'une part, l'augmentation de la stabilité de la myoglobine adsorbée dénaturée et donc une différence de structure entre myoglobine dénaturée libre et adsorbée d'autre part (Fig. 5-10).

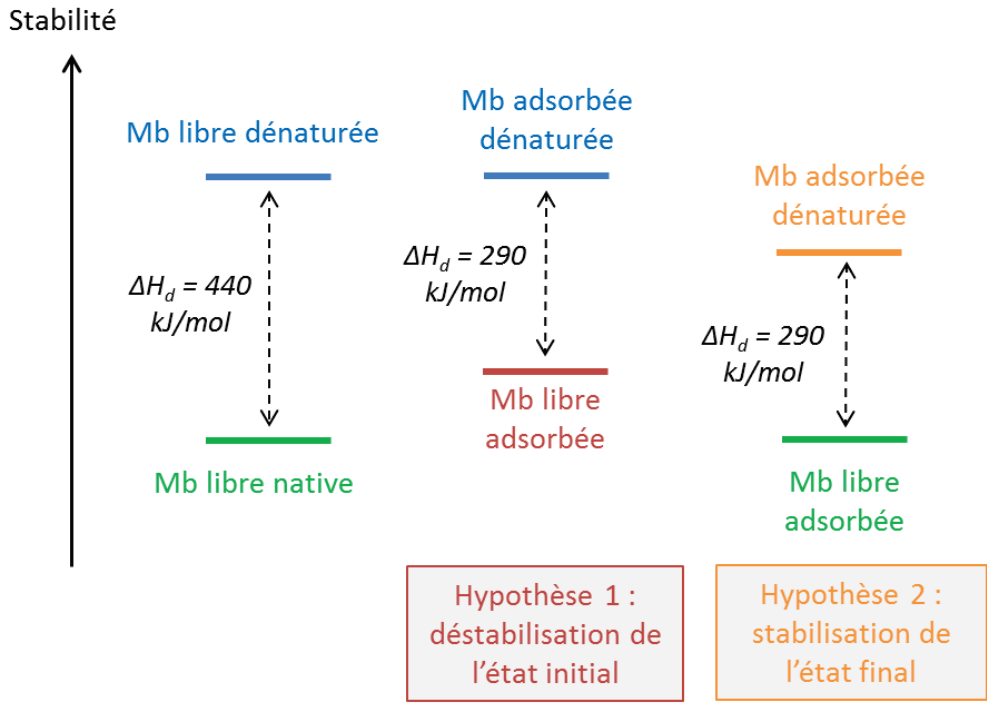


Figure 5-10. *Schéma représentant les deux mécanismes possibles pouvant expliquer la diminution de l'enthalpie de dénaturation de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice 7 nm*

La perte importante d'hélicité de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice mesurée par dichroïsme circulaire, qui correspond à une rupture de liaisons hydrogène intramoléculaires, peut expliquer la diminution de la stabilité de la myoglobine adsorbée à 25°C, confirmée par la diminution de la température de dénaturation de la myoglobine, et conduire à la diminution de l'enthalpie de dénaturation. Un comportement intermédiaire, dans lequel la myoglobine adsorbée dénaturée est stabilisée, est également possible.

Des comportements assez différents sont toutefois observés en fonction du type de protéine et de surface. La stabilité thermique de la RNase, du lysozyme, de la β-lactoglobuline, de l'α-lactalbumine, de l'α-chymotrypsine et de la cutinase diminue effectivement après adsorption sur la silice (*51, 52*) et cela peut être associé à une diminution de la structuration des protéines adsorbées (*48*). Au contraire, la stabilité thermique de la BSA adsorbée sur la silice semble nettement augmentée et aucune transition liée à la dénaturation n'est observée jusqu'à une température de 90°C (*41*). Pourtant la BSA perd également une fraction de ses hélices-α lors de l'adsorption. D'après Giacomelli et Norde, l'adsorption de la BSA sur la silice se traduit à la fois par une perturbation de sa structure (la perte d'hélicité) et par l'apparition d'interactions intermoléculaires entre molécules adsorbées sur la surface (un gain d'enthalpie), interactions qui renforceraient la stabilité de la protéine. Enfin, lors de l'adsorption de l'α-chymotrypsine sur une surface hydrophobe de Téflon, la protéine gagne en

structure (augmentation de l'hélicité) et gagne en stabilité thermique, aucune transition n'étant visible jusqu'à une température de 100°C (*48*). Cela suggère que l'augmentation des interactions intramoléculaires liée à la réorganisation de la protéine lors de l'adsorption peut également conduire à une plus grande stabilité thermique.

L'élargissement important de la zone de dénaturation en température de la myoglobine montre que plusieurs conformations coexistent (*48, 51, 52*) et sont plus ou moins stables, certaines devenant sensibles à la dénaturation dès 35°C, alors que d'autres persistent jusqu'à 80°C. Alors que les mesures par dichroïsme circulaire ou par spectroscopie donnent un spectre moyen de la protéine adsorbée, cette observation est la première à montrer une hétérogénéité de conformations de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice. Ce résultat montre également la limite des mesures moyennes de structure dans le cas des protéines adsorbées sur une surface, qui peuvent masquer une hétérogénéité de population. La structure de la myoglobine adsorbée sur la silice ne peut donc pas être représentée par une image figée, mais correspond à un ensemble de conformations de la protéine.

L'hétérogénéité des conformations pourrait laisser penser à une interaction plutôt non spécifique entre myoglobine et silice, où les sites d'interaction de la protéine avec la surface peuvent varier (par exemple *via* des clusters de résidus basiques), mais pourrait également correspondre à une adsorption spécifique sur une surface hétérogène, où les sites d'adsorption varient. Il est très difficile de travailler sur une surface parfaitement homogène pour s'affranchir de cet effet de surface, et quasi impossible dans le cas des nanoparticules, qui présentent des défauts et des inhomogénéités à leur surface.

Une diminution de la stabilité en température associée à une augmentation du nombre d'états ou de conformations de la protéine adsorbée a également été observée lors de l'adsorption de la myoglobine sur une surface de silice (*51*) et des NP d'oxyde de zirconium (*29*), de la chymotrypsine sur une surface de silice (*48*), du lysozyme et de la RNase sur des NP de silice (*52*) et de la BSA sur une surface d'hydroxyde d'aluminium (*53*).

3.2 Quelle relation entre adsorption, perte de structure et dénaturation ?

La microcalorimétrie ITC, la microcalorimétrie DSC et le dichroïsme circulaire nous ont permis d'observer indépendamment : 1) une adsorption favorisée de la myoglobine sur les NP de silice, 2) une perte partielle de structure, 3) une diminution de la stabilité en température de la myoglobine adsorbée. Quel lien peut-on faire entre perte d'hélicité et adsorption exothermique de la

myoglobine, qui correspondent à des variations d'enthalpie *a priori* opposées ? L'adsorption et la dénaturation de la myoglobine sont-elles comparables ou s'agit-il de mécanismes différents ?

Nous pouvons comparer les variations d'enthalpie d'adsorption, de dénaturation et de déstructuration de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice à partir des mesures ITC (voir chap. 4, §5), DSC (voir §3.1) et de dichroïsme circulaire (voir §2.2).

Déstructuration de la myoglobine et enthalpie d'adsorption favorable

La déstructuration de la myoglobine lors de l'adsorption s'accompagne de la rupture de liaisons hydrogène intramoléculaires et génère une contribution enthalpique défavorable à l'adsorption. Nous avons calculé précédemment que la perte d'hélicité de 50% de la myoglobine adsorbée correspondait à une contribution enthalpique défavorable de 160 $kJ.mol^{-1}$, tandis que la variation globale d'enthalpie lors de l'adsorption, mesurée par ITC, est de -16,1 $kJ.mol^{-1}$.

Pour définir quels types d'interaction entre protéine et silice peuvent contrebalancer la variation enthalpique défavorable induite par la perte d'hélicité, nous nous sommes intéressés aux enthalpies de liaison des acides aminés avec la silice estimées par Gromovoy pour tous les résidus sauf basiques (*54*). L'enthalpie de liaison de la lysine avec la silice a été estimée par simulation numérique par Latour (*55*) (tableau 5-9).

Résidu	Composition Mb (%)	Enthalpie de liaison résidu-silice ($kJ.mol^{-1}$) (*54, 55*)
Ala	9,8	-1,4
Arg	1,3	*nd*
Asn	1,3	-0,97
Asp	5,2	-4,4
Cys	0	-1,5
Gln	3,9	-2,1
Glu	8,5	-1,6
Gly	9,8	-2,2
His	7,2	*nd*
Ile	5,9	*nd*
Leu	11,1	-2,5
Lys	12,4	**-25,1**
Met	1,3	-3,2
Phe	4,6	-6,0
Pro	2,6	-5,8
Ser	3,2	-0,55
Thr	4,6	-1,5
Trp	1,3	-2,9
Tyr	1,3	-1,66
Val	4,6	-3,1
Moyenne pondérée (Mb)		**-2,5 $kJ.mol^{-1}$** par résidu (sans Arg et Lys)

Tableau 5-9. *Enthalpie de liaison des acides aminés sur une surface de silice d'après (54) pour tous les résidus sauf basiques et d'après (55) pour la lysine*

L'enthalpie de liaison des résidus basiques sur la silice est un ordre de grandeur supérieure à celle des autres résidus grâce à la formation d'interactions électrostatiques fortes. L'enthalpie de liaison de la myoglobine avec la silice peut être estimée en suivant deux hypothèses : i) une adsorption non spécifique dans laquelle de nombreux résidus de surface interagissent avec la silice, par exemple *via* des liaisons hydrogène, ii) une adsorption pilotée par les interactions entre quelques résidus basiques et silice, *via* la formation d'interactions électrostatiques fortes (*56-60*).

Dans le premier cas, la contribution moyenne pondérée par la composition de la myoglobine est de -2,5 $kJ.mol^{-1}$ par résidu. Le nombre de résidus en interaction avec la silice est estimé à 30, grâce à la

mesure de la densité d'état vibrationnelle de la myoglobine adsorbée par diffusion incohérente de neutrons, présentée dans le chapitre suivant (voir chap. 6, §3). Si 30 résidus sont impliqués, cela représente une contribution favorable à l'adsorption de l'ordre de -75 kJ.mol^{-1}. Dans le cas d'une interaction non spécifique entre myoglobine et silice, la contribution enthalpique favorable ne permet de compenser la variation défavorable de 160 kJ.mol^{-1} liée à la perte d'hélicité.

Au contraire, l'interaction de 7 lysine avec la silice sur les 19 lysine de la myoglobine, permet de rendre compte de la variation totale d'enthalpie, c'est-à-dire de compenser la variation défavorable de 160 kJ.mol^{-1} et de permettre une contribution favorable de -16,1 kJ.mol^{-1}. Cette estimation est réalisée pour la lysine car son enthalpie de liaison avec la silice est connue. L'enthalpie de liaison de l'arginine avec la silice est probablement du même ordre de grandeur par analogie, et on peut estimer que la fixation de 7 résidus basiques sur la surface de silice peut rendre compte de la variation d'enthalpie favorable de la myoglobine sur les NP de silice.

Enthalpie d'adsorption de la myoglobine dénaturée

La comparaison de l'enthalpie d'adsorption de la myoglobine native et de l'enthalpie de dénaturation de la myoglobine libre et adsorbée nous permet d'estimer l'enthalpie d'adsorption de la myoglobine dénaturée (Fig. 5-11).

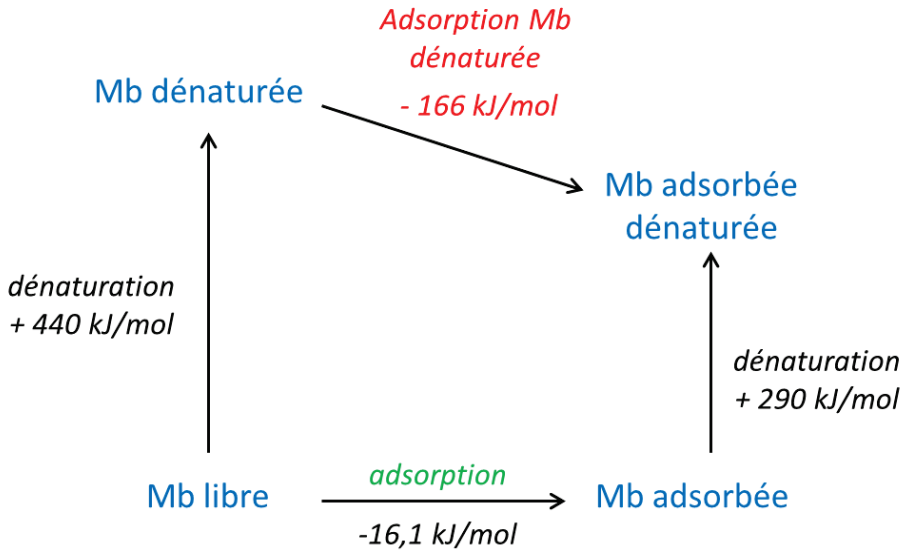


Figure 5-11. *Estimation de l'enthalpie d'adsorption à 70°C de la myoglobine dénaturée en fonction de l'enthalpie d'adsorption de la myoglobine native et de l'enthalpie de dénaturation de la myoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice 7 nm*

Alors que l'enthalpie d'adsorption de la myoglobine native est de -16,1 kJ.mol^{-1} (à 25°C), l'enthalpie d'adsorption de la myoglobine dénaturée est estimée à -166 kJ.mol^{-1} (à 74°C). L'adsorption de la

myoglobine dénaturée serait donc fortement favorisée. Une mesure de l'isotherme d'adsorption de la myoglobine dénaturée sur la silice permettrait de confirmer ou non cette hypothèse et de mesurer la constante d'adsorption K dans ces conditions. De plus, une quantité de protéine adsorbée beaucoup plus importante à 70°C qu'à 20°C a été rapportée lors de l'adsorption de la SNase et du lysozyme sur une surface de silice (*49*).

Un dernier point de discussion concerne la différence ou la ressemblance entre l'état dénaturé (en température) et l'état adsorbée de la myoglobine. Notre étude a montré que : 1) la perte d'hélicité de la myoglobine adsorbée est moins importante que celle associée à la dénaturation, 2) l'hème n'est pas affecté par l'adsorption, 3) la modification de structure est hétérogène au sein de la myoglobine adsorbée et entre molécules de myoglobine avec une plus grande distribution de populations, 4) la stabilité de la myoglobine adsorbée dénaturée pourrait différer de celle de la myoglobine libre dénaturée. Du point de vue structural, l'état adsorbé de la myoglobine montre plusieurs différences avec l'état dénaturé, auquel il est pourtant souvent assimilé.

Nous allons maintenant nous intéresser plus spécifiquement à l'hème et étudier sa structure et ses propriétés électroniques après adsorption des hémoprotéines sur les NP de silice.

4. L'hème, site actif de la myoglobine et de l'hémoglobine

L'hème, formé d'une porphyrine et d'un atome de fer, constitue le site actif des hémoprotéines (Fig. 5-12).

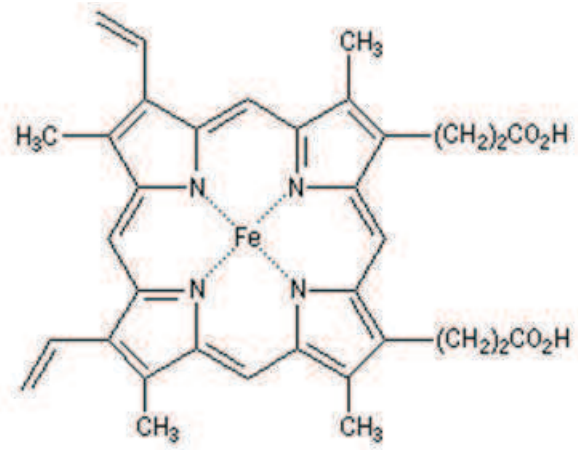


***Figure 5-12**. Structure de l'hème de la metmyoglobine, complexe entre une protoporphyrine IX et un atome de fer (61). Fe^{3+} est coordiné aux 4 atomes d'azote des noyaux pyrroles, à un azote du résidu histidine H93 et à une molécule d'eau ou un groupement hydroxyle en fonction du pH de la solution*

Une modification de la structure de l'hème ou de son environnement peut entraîner une variation de l'activité de fixation de l'oxygène de l'hémoglobine ou de ligands de la metmyoglobine. Grâce à la présence d'un atome de fer, physico-chimie et structure de l'hème peuvent être sondés spécifiquement afin de déterminer si le site actif de la myoglobine et de l'hémoglobine est modifié lors de l'adsorption de ces protéines sur les NP de silice.

4.1 Hémoglobine et nanoparticules de silice 20 nm

Les nanoparticules de silice n'absorbent pas la lumière mais la diffusent, ce qui entraîne une perte d'information spectroscopique. Les mesures par spectroscopie UV-visible de l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice deviennent ainsi de plus en plus bruitées lorsque la concentration en NP de la solution augmente. Pour améliorer la qualité des spectres, nous avons utilisé une sphère d'intégration qui permet de collecter toute la lumière diffusée par l'échantillon (voir chap. 2, §4.1). Les spectres UV-visible de l'oxyhémoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice 20 nm ont de cette façon pu être mesurés avec une bonne résolution de 250 à 700 nm (Fig. 5-13, page suivante).

Les spectres UV-visible de l'oxyhémoglobine libre et de l'oxyhémoglobine adsorbée sur les NP de silice 20 nm présentent les mêmes bandes d'absorption de la lumière : à 273 nm, 345 nm, 414 nm, 541 nm et 576 nm. Aucun décalage en longueur d'onde des pics caractéristiques d'absorption de l'oxyhémoglobine n'est observé. L'intensité des pics est identique dans la région de 520 à 700 nm et est légèrement supérieure pour l'oxyhémoglobine adsorbée comparée à l'oxyhémoglobine libre de 250 à 520 nm. La différence d'absorbance est observée sur l'ensemble du domaine et est d'autant plus importante que la longueur d'onde est proche de l'UV et que la concentration en NP est importante.

Par ailleurs, les différences d'absorbance observées sont identiques à pH 6, pH 7,4 et pH 8,7. Puisque l'hémoglobine n'est pas adsorbée sur la silice à pH 8,7, les différences d'absorbance observées sont un artefact de mesure dû aux NP en solution. Une partie de la lumière diffusée par les NP n'est pas collectée par la sphère d'intégration et est donc « perdue », ce qui explique la légère augmentation de l'absorbance mesurée, en particulier dans la région proche de l'UV où la diffusion est plus importante.

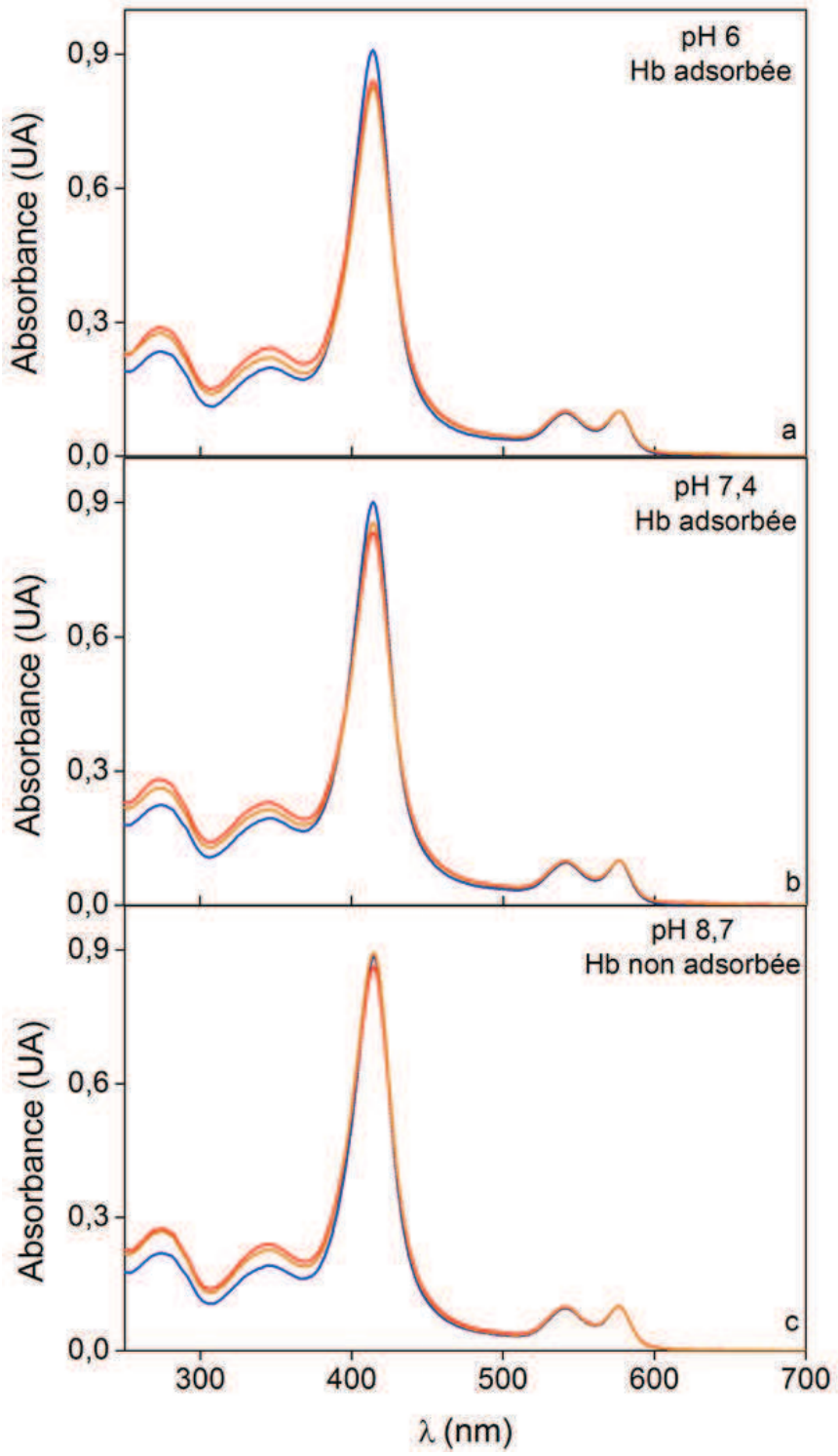


Figure 5-13. *Spectres UV-visible de l'oxyhémoglobine libre (bleu) (C_{Hb} = 10 µM) et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm à une concentration de 4 mg/mL (orange) et de 7 mg/mL (rouge) en tampon 10 mM BisTris-HCl à pH 6 (a), en tampon Phosphate à pH 7,4 (b) et en tampon Tris-HCl à pH 8,7 (c). L'oxyhémoglobine n'est adsorbée sur la silice qu'à pH 6 et à pH 7,4. Les spectres sont normalisés à 576 nm pour corriger des différences de concentration.*

La position des pics (en particulier le pic du Soret) est particulièrement sensible à la structure électronique de l'hème (*62*). Les bandes d'absorption à 414 nm, 541 nm et 576 nm sont dues aux transitions électroniques de l'hème. Aucun décalage en longueur d'onde du pic du Soret n'est observé. Le rapport d'intensité entre les bandes d'absorption à 541 et 576 nm est identique et il n'y a aucune augmentation de l'absorption à 630 nm ce qui signifie qu'il n'y a pas d'oxydation lors de l'adsorption sur la silice (*63*). Le pic d'absorption centré à 275 nm est associé aux transitions électroniques $\pi \rightarrow \pi^*$ des résidus aromatiques de la globine. Le pic d'absorption à 345 nm est associé aux liaisons hème-histidine. Dans les deux cas, aucune modification du spectre n'est associée à l'adsorption : les liaisons entre hème et globine ne semblent pas affectées par l'adsorption sur la silice.

Hémoglobine désorbée

Le spectre d'absorption UV-visible de l'oxyhémoglobine après désorption en tampon Tris-HCl 100 mM à pH 8,7 a été mesuré (Fig. 5-14).

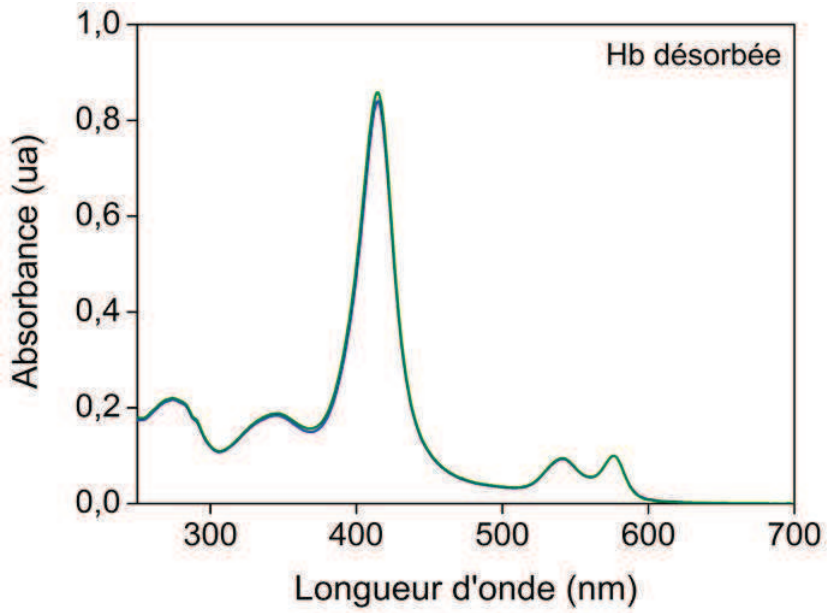


Figure 5-14. *Spectres UV-visible de l'oxyhémoglobine libre (bleu) et désorbée des nanoparticules de silice 20 nm (vert) en tampon Tris-HCl 100 mM à pH 8,7. Les spectres sont normalisés à 576 nm pour corriger de légers effets de concentration.*

Aucune différence entre oxyhémoglobine désorbée et oxyhémoglobine native n'est observée, quelles que soient les conditions initiales d'adsorption, c'est-à-dire en tampon BisTris-HCl, en tampon Phosphate ou dans l'eau. Les conditions de désorption n'induisent donc pas de modification ou d'oxydation de l'hème et préservent également la structure secondaire de l'oxyhémoglobine (voir §2.1).

La spectroscopie UV-visible ne montre pas de modification de la structure électronique de l'hème lors de l'adsorption de l'oxyhémoglobine sur les nanoparticules de silice. Nous n'avons pas non plus observé de différence entre les spectres de la déoxyhémoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice (voir chap. 2, §6.2). Cependant, cela ne signifie pas que l'activité de l'hémoglobine reste inchangée après adsorption, en particulier compte-tenu des importantes modifications de structure observées. L'étude de l'activité de l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice est présentée dans le chapitre 7.

4.2 Myoglobine et nanoparticules de silice 7 nm

Nous travaillons sur la metmyoglobine, dont l'activité sera testée par la fixation de deux ligands, azoture et imidazole (voir chap. 7, §1), car la forme native de la myoglobine purifiée est très instable et le fer est oxydé de façon irréversible pendant la purification. Le spectre visible de la metmyoglobine dépend du pH de la solution, notamment dans le domaine 450-700 nm (Fig. 5-15).

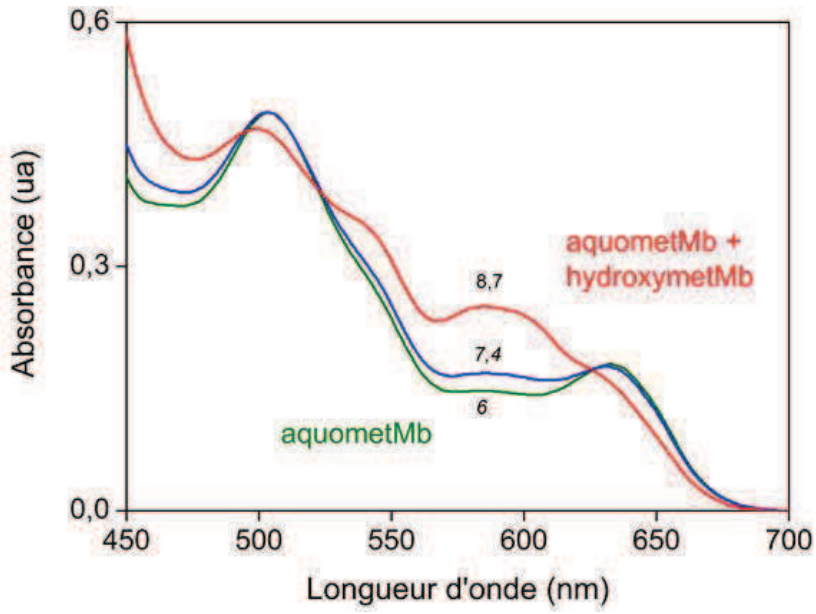


Figure 5-15. *Spectres visible de la metmyoglobine en tampon 100 mM BisTris-HCl à pH 6 (vert), Phosphate à pH 7,4 (bleu) et Tris-HCl à pH 8,7 (rouge) (C_{Mb} = 50 µM). Les formes aquometMb (ligand H_2O) et hydroxymetMb (ligand HO^-) sont en équilibre*

La metmyoglobine peut être sous forme aquometMb (ligand H_2O) ou hydroxymetMb (ligand HO^-). L'équilibre associé à un pKa de 9,04 ± 0,03 à 20°C (metmyoglobine de cœur de cheval) (*64*). A pH 6 et à pH 7,4, la metmyoglobine est majoritairement sous forme aquometMb, tandis qu'à pH 8,7 les formes aquometMb (66%) et hydroxymetMb (33%) sont toutes deux présentes (voir chap. 2, §4.1).

Les spectres UV-visibles de la metmyoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice 7 nm à pH 6 et à pH 7,4 ainsi que celui de la metmyoglobine majoritairement non adsorbée en présence des NP de silice à pH 8,7 ont été mesurés à l'aide de la sphère d'intégration (Fig. 5-16).

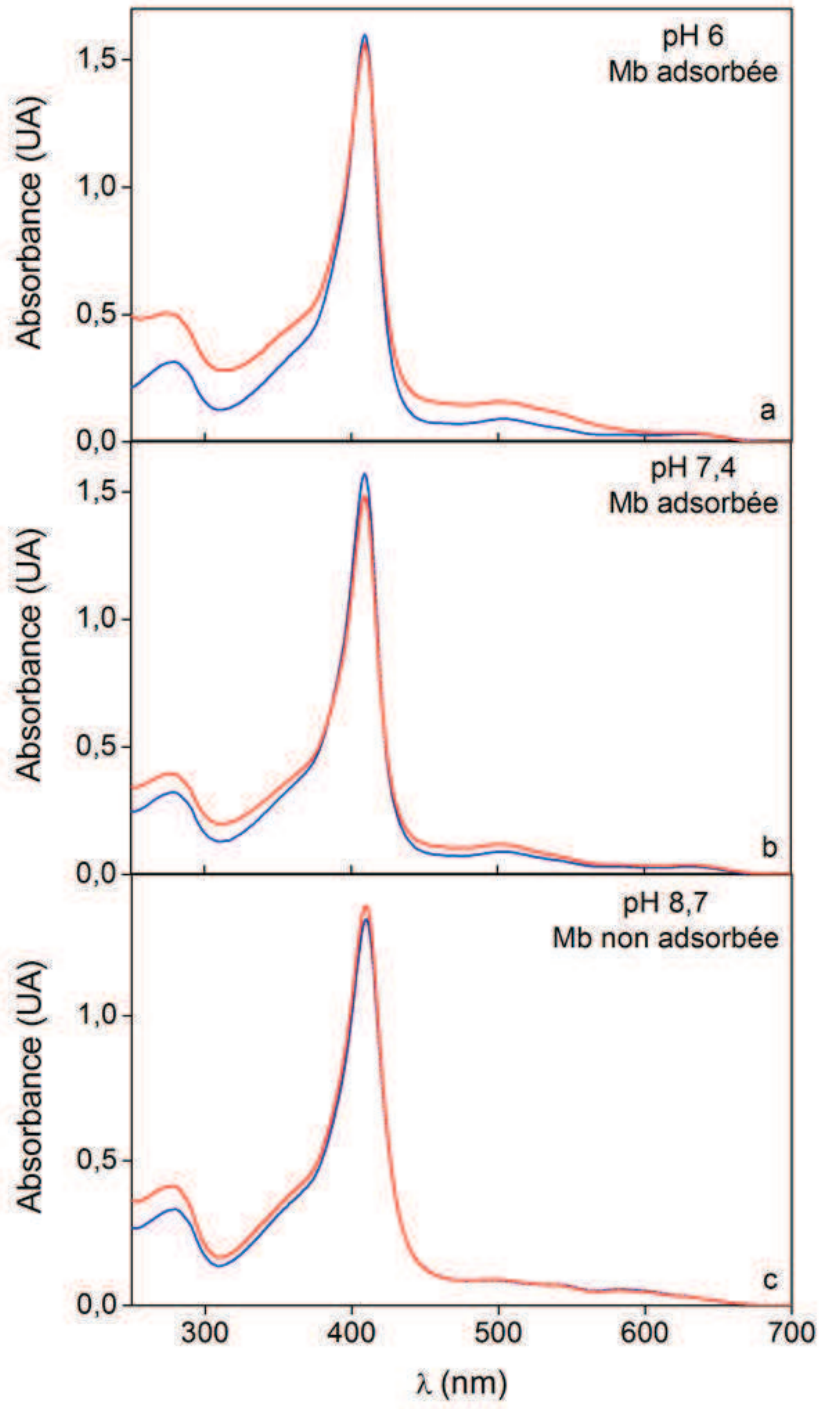


Figure 5-16. *Spectres UV-visible de la metmyoglobine libre (bleu) (C_{Mb} = 10 µM) et adsorbée sur les nanoparticules de silice 7 nm à une concentration de 7 mg/mL (rouge) en tampon 100 mM BisTris-HCl à pH 6 (a), en tampon Phosphate à pH 7,4 (b) et en tampon Tris-HCl à pH 8,7 (c). La myoglobine est adsorbée à 90% sur la silice à pH 6 et 7,4 et n'est pas adsorbée à pH 8,7.*

Les spectres de la metmyoglobine adsorbée à pH 6 et à pH 7,4 ne présentent aucun décalage en longueur d'onde des bandes d'absorption, situées à 277, 409, 503 et 630 nm. De même aucun décalage en longueur d'onde des bandes d'absorption n'est observé en présence des NP à pH 8,7. Cela montre clairement que l'équilibre entre aquometMb et hydroxymetMb n'est pas modifié lors de l'adsorption.

Une augmentation de l'absorbance dans la région proche UV est par contre visible sur l'ensemble des spectres de la myoglobine en présence de NP. Cette augmentation est identique à pH 7,4 (metmyoglobine adsorbée) et à pH 8,7 (metmyoglobine adsorbée), elle ne provient donc pas d'une modification du spectre de la metmyoglobine adsorbée. Comme pour l'hémoglobine, l'augmentation de l'absorbance dans la région proche UV est certainement liée à la diffusion de la lumière par les NP de silice en suspension (voir §3.1).

Le spectre de la metmyoglobine adsorbée à pH 6 présente toutefois une nette augmentation de l'absorbance à 277 nm, plus importante qu'à pH 7,4 ou à pH 8,7 (Fig. 5-13a). Cette absorbance peut être due soit à la diffusion de la lumière par des agrégats à pH 6, soit à une modification du spectre de la metmyoglobine adsorbée. En effet, l'absorption à 277 nm est associée aux transitions électroniques $\pi \rightarrow \pi^*$ des résidus aromatiques de la myoglobine et des modifications structurales de de la metmyoglobine peuvent s'accompagner d'une augmentation de l'absorption des résidus aromatiques (*65*). La perte d'hélicité de la metmyoglobine lors de l'adsorption pourrait ainsi se traduire par un changement de l'environnement des résidus aromatiques, de leur exposition et donc de leur absorption.

La diffusion de la lumière est caractérisée par une dépendance en longueur d'onde de type $1/\lambda^4$, tandis que l'absorbance des résidus aromatiques est centrée à 277 nm dans nos conditions. Pour déterminer quel effet est en jeu, les spectres de la metmyoglobine libre et adsorbée à pH 6 ont été soustraits : la composante principale est dépendante en longueur d'onde, ce qui indique que l'augmentation d'absorbance observée est due à la diffusion de la lumière, et probablement à une plus grande agrégation des NP en suspension en tampon BisTris-HCl à pH 6. Une agrégation de la myoglobine semble peu probable car la protéine adsorbée est toujours capable de fixer un ligand (voir chap. 7).

Comme pour l'hémoglobine, l'adsorption de la metmyoglobine sur les NP de silice ne semble pas affecter les ligands du fer et la configuration électronique de l'hème. A la vue de ces résultats, le site actif de la metmyoglobine ne semble pas altéré par l'adsorption sur les NP de silice 7 nm.

Myoglobine désorbée

Le spectre d'absorption UV-visible de la metmyoglobine a été mesuré après désorption partielle des NP de silice 7 nm à pH 8,7 en tampon Tris-HCl à une concentration de 10 mM (69% de myoglobine désorbée) et de 100 mM (87% de myoglobine désorbée) (Fig. 5-17).

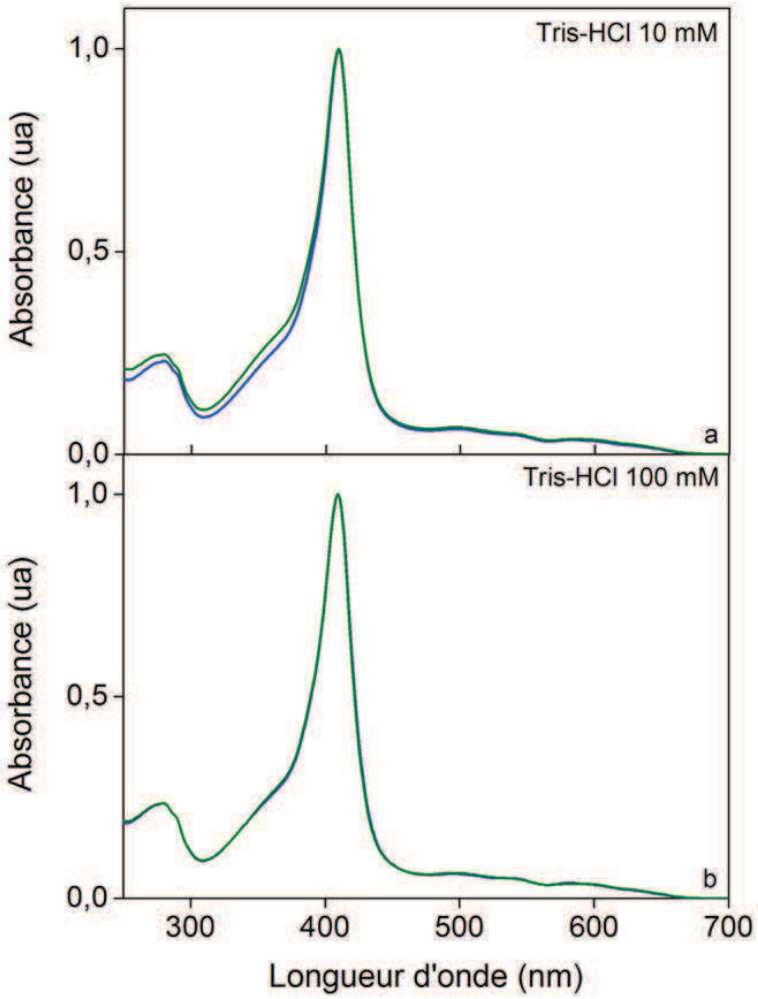


Figure 5-17. *Spectres UV-visible de la metmyoglobine libre (bleu) et désorbée des nanoparticules de silice 7 nm (vert) en tampon Tris-HCl 10 mM (a) et 100 mM (b) à pH 8,7*

Une légère diffusion, marquée par une augmentation de l'absorption vers l'UV, est observée pour la solution de myoglobine désorbée en tampon Tris-HCl 10 mM, tandis qu'aucune différence avec la myoglobine native n'est observée pour la myoglobine désorbée en tampon Tris-HCl 100 mM. Puisque les solutions ne contiennent plus de NP, la diffusion est probablement due à l'agrégation de certaines molécules de myoglobine après désorption en tampon 10 mM. Une augmentation similaire de l'absorbance de la myoglobine dans l'UV a été observée après la dénaturation de la myoglobine entre 75 et 95°C (*31*), ce qui renforce l'hypothèse d'une agrégation de certaines protéines liées à une modification irréversible de leur structure.

Cette observation est cohérente avec la mesure en dichroïsme circulaire, qui montrait une perte d'hélicité de 12% de la myoglobine désorbée en tampon 10 mM. L'observation d'une modification en partie irréversible de la myoglobine demanderait à être étudiée plus avant, ce qui n'a pas pu être réalisé pendant la thèse. De plus, une modification aussi faible peut être délicate à analyser.

Les configurations électroniques du fer de la metmyoglobine et de l'hémoglobine semblent peu affectées par l'adsorption des protéines sur les NP de silice. Cependant, certaines incertitudes demeurent, liées à la diffusion de la lumière par les solutions analysées. D'autres techniques spectroscopiques peuvent permettre de sonder les propriétés du fer, tout en s'affranchissant d'un effet optique de diffusion de la lumière, comme la spectroscopie Mössbauer du ^{57}Fe, ou la spectroscopie d'absorption X au seuil du fer qui permet de mesurer les propriétés électroniques du fer plus finement que la spectroscopie UV-visible. Nous avons testé la possibilité d'appliquer la spectroscopie XANES à l'étude des hémoprotéines adsorbées sur les NP de silice.

4.3 Application de la spectroscopie d'absorption X aux hémoprotéines adsorbées

La spectroscopie d'absorption X autour de l'énergie du seuil K d'absorption du fer (7112 eV) excite spécifiquement les électrons de la couche K du fer : seul l'environnement local du fer est sondé, et non celui des atomes de silice, de carbone, d'oxygène, d'azote et de soufre également présents.

XANES au seuil du fer

Nous avons analysé la partie XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) des spectres, qui permet de sonder les propriétés électroniques du fer des hémoprotéines (Fig. 5-18), notamment son état d'oxydation et son état de spin (*66, 67*), ainsi que la géométrie locale de son site.

Nous n'avons pas étudié la partie EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) associée aux interactions entre l'atome de fer et ses proches voisins car le signal mesuré était trop bruité pour ce type d'étude.

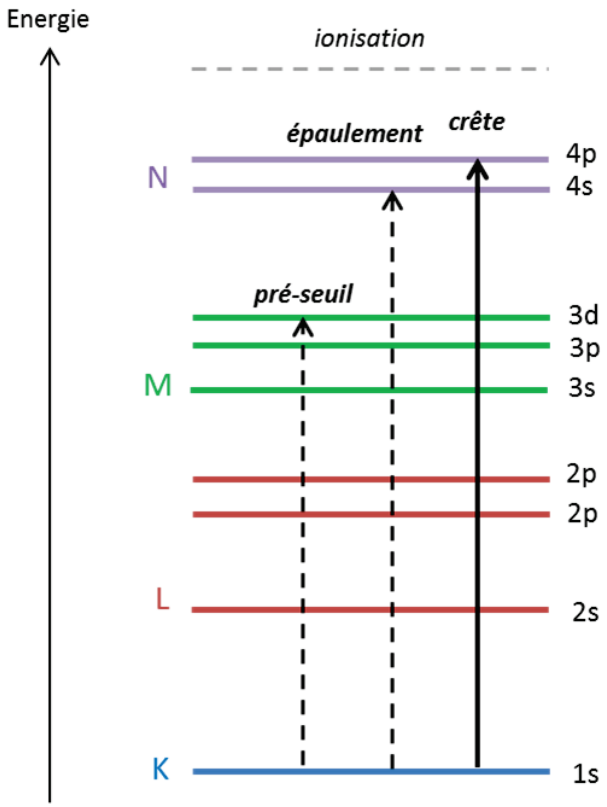


Figure 5-18. *Représentation schématique des transitions électroniques observées au seuil K d'absorption du fer. La transition 1s → 4p est la plus intense et correspond à la crête des spectres XANES. Les transitions 1s → 3d et 1s → 4s correspondent au pré-seuil et à l'épaulement de la crête respectivement.*

La structure électronique du fer dans son état fondamental est $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^6$. La transition la plus intense des spectres XANES (crête) correspond à la transition 1s → 4p d'un électron de cœur vers une couche périphérique, autorisée dans l'approximation dipolaire électrique. Deux transitions interdites pour un seuil K d'absorption, qui sont partiellement levées et visibles sur les spectres XANES, sont les transitions 1s → 3d visible au niveau du pré-pic et 1s → 4s qui peut représenter un épaulement de la raie blanche.

La technique de détection du signal d'absorption la plus sensible est la mesure par fluorescence (*68*). Lors de la désexcitation du fer, différentes émissions de fluorescence sont possibles depuis les orbitales les plus énergétiques jusqu'à l'orbitale K de cœur. Cependant, les raies d'émission les plus probables sont Kα1 (L_3→K) et Kα2 (L_2→K), très proches en énergie et qui représentent plus de la moitié de l'émission de fluorescence. Les émissions de plus faible probabilité sont, par ordre décroissant, Kβ1 (M_3→K), Kβ3 (M_2→K), Kβ5 ($M_{4,5}$→K) et Kα3 (L_1→K).

Un spectre XANES typique mesuré par fluorescence sur la metmyoglobine en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 pour deux ligands différents (H_2O et N_3^-) est présenté ci-dessous (Fig. 5-19).

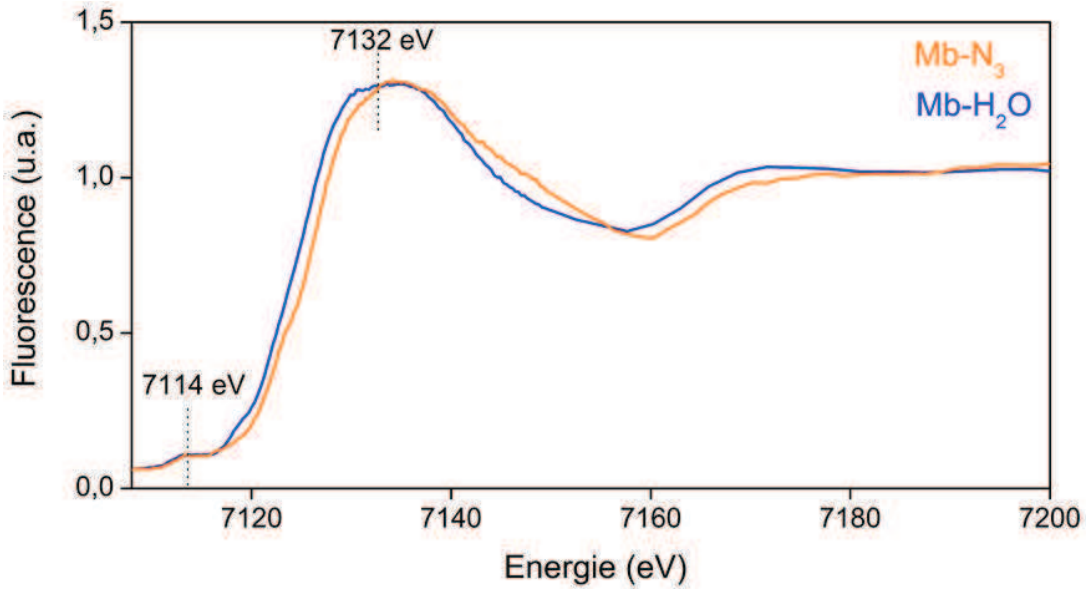


Figure 5-19. *Spectre XANES au seuil K du fer de la metmyoglobine (C_{Mb} = 2 mM) sous forme aquometMb et ligandée à l'azoture en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4. L'énergie du pré-seuil et de la crête est indiquée pour l'aquometMb.*

L'énergie du pré-seuil et de la crête du spectre de la metmyoglobine montrent bien la dépendance du spectre XANES en fonction de la nature du ligand avec un déplacement de 2 eV de la crête entre la forme aquometMb et la forme ligandée à l'azoture (*69*).

Conditions expérimentales et limites pour notre système d'étude

Les mesures ont été réalisées sur la ligne FAME à l'ESRF (voir chap. 2, §5.4). Au cours de ces expériences, plusieurs problèmes ont été identifiés lors de nos mesures. Nous avons cherché à évaluer en particulier :

i) le rapport signal sur bruit pour notre système
ii) l'évolution de la protéine sous irradiation
iii) la reproductibilité des mesures en présence des nanoparticules

i) Le rapport signal sur bruit dépend de la concentration en protéine, de l'intensité du faisceau et de la pollution en fer de l'environnement échantillon.

Concentration en protéine

Dans notre système, la quantité de protéine fixée est limitée par la surface disponible. La concentration « idéale » en protéines (10 mM, soit 170 mg/mL de myoglobine ou d'hémoglobine) est supérieure à la quantité maximale de protéine qui peut être adsorbée sur la surface, pour la quantité de NP de cet échantillon. La concentration en myoglobine et en hémoglobine des échantillons a été ramenée à 2 mM pour permettre une adsorption suffisante sur les NP de silice (C_{NP} = 90 mg/mL),

mais qui diminue l'intensité du signal mesuré. En tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6, 61% de l'hémoglobine est adsorbée sur les NP de silice 20 nm et 50% de la myoglobine sur les NP de silice 7 nm. En tampon Tris-HCl 100 mM à pH 8,7, qui nous sert de témoin négatif, 98% de l'hémoglobine et 73% de la myoglobine restent libres en présence des NP. Ces conditions sont relativement satisfaisantes et les spectres mesurés à pH 6 seront corrigés par soustraction du spectre de la protéine libre pour obtenir un spectre de la protéine « 100% adsorbée ».

Faisceau X

L'intensité du faisceau et le temps d'acquisition sont limités par la durée de l'expérience et par le mode de remplissage de l'anneau en électrons, qui était pendant nos mesures un mode 4-bunch moins intense que le mode habituel de remplissage 7/8 quasi continu de l'anneau (l'intensité du courant dans l'anneau étant respectivement de 90 mA et de 200 mA).

Pollution en fer

Le tampon ainsi que les suspensions de NP ont été analysées pour évaluer le bruit de fond, causé par une éventuelle contamination en fer des échantillons. Les spectres bruts sont représentés sous la forme du coefficient d'absorption μ(E) des rayons X par l'échantillon qui est directement proportionnel à l'intensité de fluorescence mesurée (Fig. 5-20).

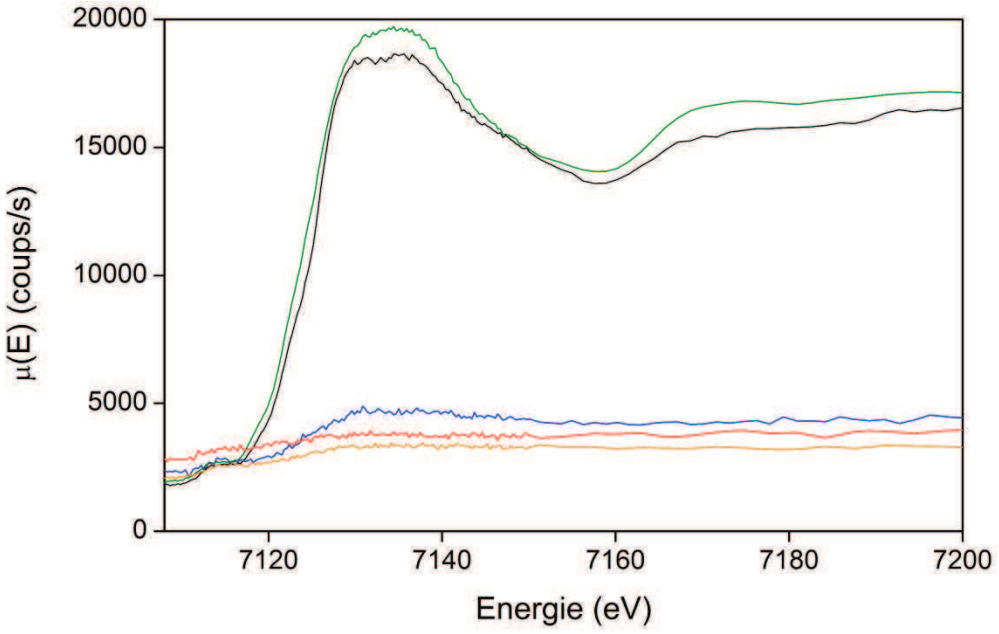


Figure 5-20. *Spectres bruts représentant le coefficient d'absorption μ des rayons X par l'échantillon en fonction de l'énergie : spectres du tampon BisTris-HCl à pH 6 (rouge), de la suspension de NP de silice 20 nm à pH 6 (bleu), de la suspension de NP de silice 7 nm à pH 6 (jaune), de l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice 20 nm (noir) et la myoglobine adsorbée sur les NP de silice 7 nm (vert)*

L'intensité de fluorescence mesurée sur le tampon BisTris-HCl et les suspensions de NP est de l'ordre de 3 000 à 5 000 coups/s à 7130 eV contre 18 000 coups/s environ pour les solutions contenant 2 mM de protéine, ce qui est surprenant car le tampon et les NP ne sont pas censés contenir de fer. Tous les autres paramètres d'acquisition étant identiques, l'amplitude relative des spectres correspond bien au rapport signal utile/signal « polluant ». En réalité, un signal de fluorescence est mesuré sans échantillon et sans support. Il ne s'agit donc pas d'une contamination de l'échantillon par du fer mais d'une pollution de l'environnement échantillon.

D'après les scientifiques travaillant sur cette ligne, la pollution en fer viendrait de la fenêtre en béryllium du détecteur de fluorescence (le béryllium contient de nombreuses impuretés métalliques) : des atomes de fer sont excités par les rayons X diffusés par l'échantillon, ce qui génère un signal de fluorescence au niveau du détecteur, traité comme une fluorescence de l'échantillon. Ce bruit de fond est habituellement négligeable lorsque la concentration en fer de l'échantillon est élevée, mais devient non négligeable pour nos échantillons car la faible concentration en protéine impose de rapprocher le détecteur de l'échantillon. Au final, ce signal parasite représente 15 à 30% du signal mesuré. Il ne peut pas être soustrait car il n'est pas lié à l'échantillon (tampon, NP) et présente des fluctuations.

De plus, le faible nombre de coups mesuré est dû à la concentration limitée en protéine de nos échantillons. C'est la raison pour laquelle les spectres apparaissent bruités avec un rapport signal sur bruit défavorable. Il faut toutefois noter que les spectres XANES présentent des éléments très caractéristiques de chaque spéciation, suffisamment nets pour être interprétés. Pour améliorer le rapport signal sur bruit, il faudrait (idéalement) travailler avec une plus grande intensité de faisceau.

ii) La durée d'acquisition d'un spectre était de 15 minutes, durée pendant laquelle la protéine est irradiée par le faisceau X. Habituellement, plusieurs spectres sont enregistrés au même point et moyennés pour une meilleure statistique. La tenue à l'irradiation de l'oxyhémoglobine (*a priori* moins stable que la metmyoglobine) a été évaluée en réalisant 5 mesures successives au même point, sur un échantillon contenant la protéine adsorbée sur les NP de silice 20 nm (car moins stable que la protéine libre en température, voir §3.1) en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6 (Fig. 5-21).

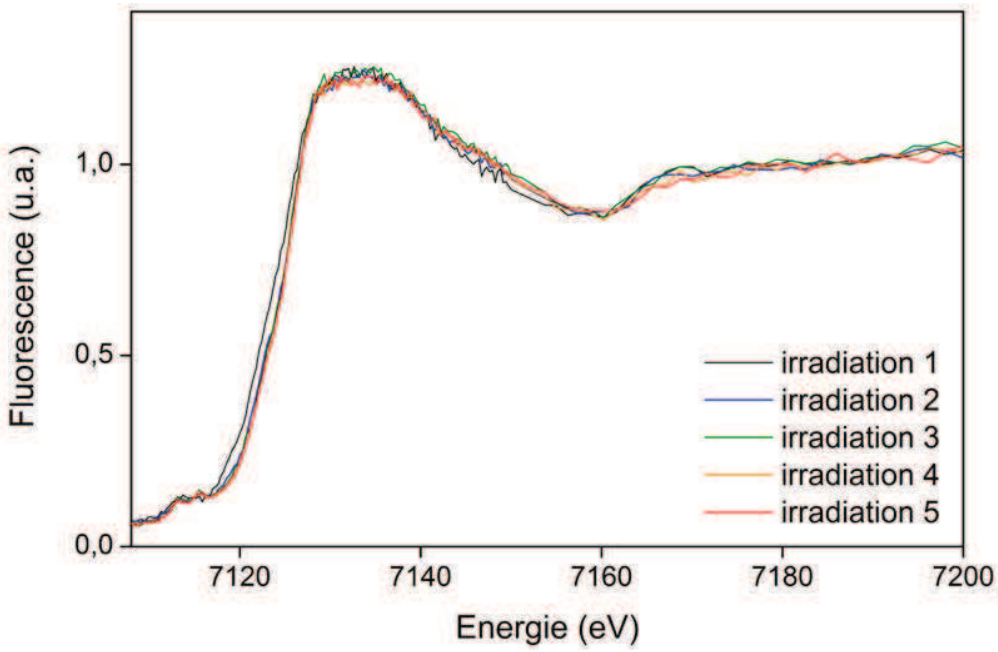


Figure 5-21. *Evolution des spectres XANES de l'hémoglobine sous irradiation en présence de NP de silice 20 nm (61% Hb adsorbée) en tampon BisTris-HCl à pH 6 lors de la mesure de 5 spectres au même point de l'échantillon, soit 5 irradiations successives de l'hémoglobine par le faisceau X. Les spectres sont normalisés.*

La crête des spectres XANES de l'hémoglobine se décale progressivement en énergie sous irradiation, avec un décalage de 1 eV après 5 mesures ce qui indique une oxydation partielle du fer (*67*). La forme du premier spectre apparaît également différente des suivants. Les spectres individuels sont trop bruités pour une analyse fine du pré-seuil, particulièrement sensible à l'état d'oxydation du fer. Nous ne pouvons donc pas étudier la distribution électronique du fer de l'oxyhémoglobine après irradiation. Ces mesures indiquent qu'il ne faut pas mesurer plusieurs spectres XANES en un même point de l'échantillon pour éviter toute altération de la protéine sous faisceau. Augmenter l'intensité du faisceau pour améliorer le rapport signal sur bruit peut se révéler dommageable pour la protéine.

iii) Nous avons choisi de mesurer chaque spectre en un point différent de l'échantillon, puis de moyenner les spectres mesurés. Pour vérifier la reproductibilité des mesures dans ces conditions, en particulier en présence de NP, les 4 spectres mesurés sont comparés après normalisation (pour s'affranchir des différences d'intensité) avant de réaliser la moyenne (Fig. 5-22).

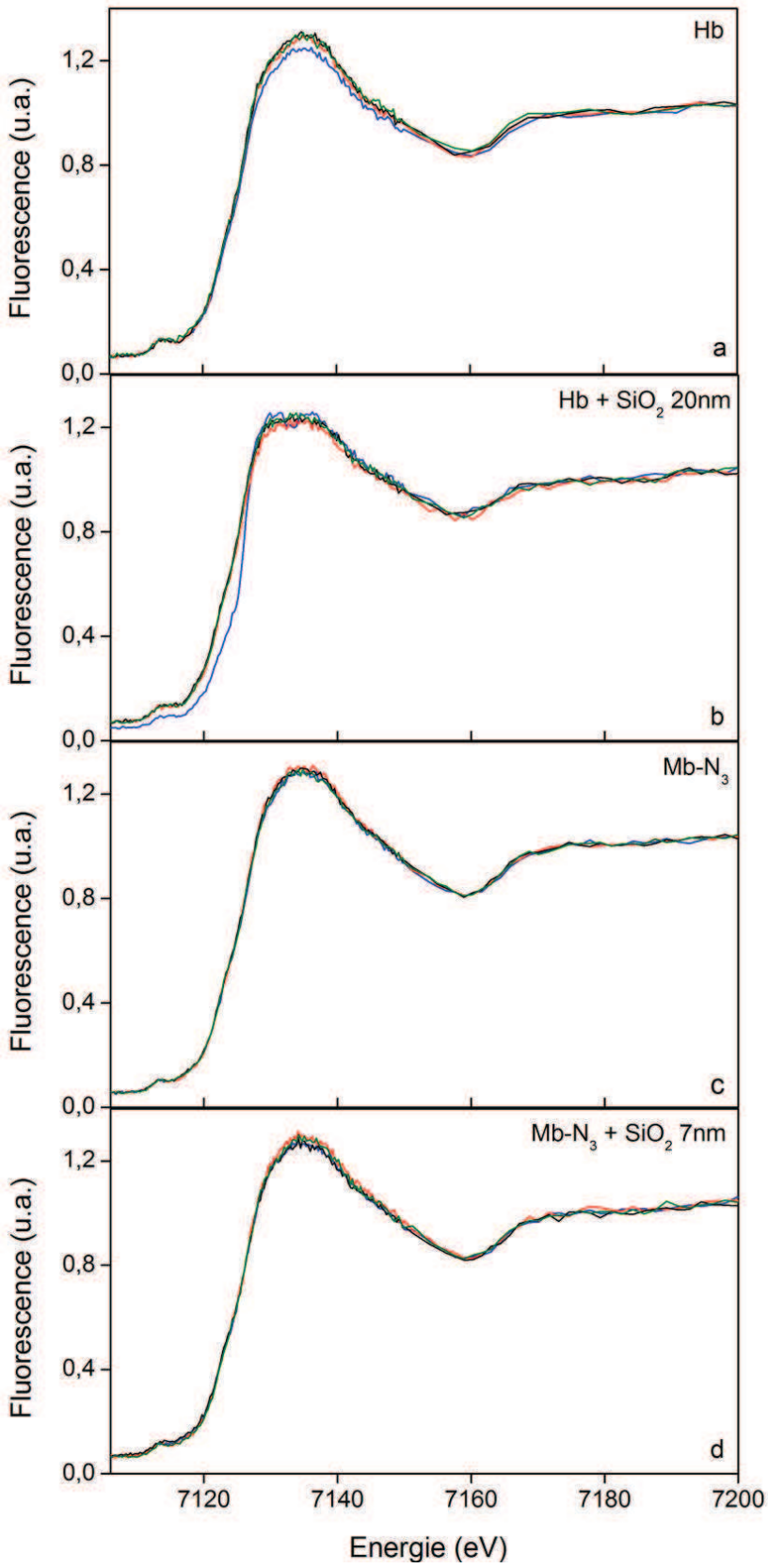


Figure 5-22. *Reproductibilité des spectres XANES mesurés en quatre points différents de l'échantillon après normalisation : hémoglobine libre (a) et adsorbée sur les NP de silice 20 nm (b), myoglobine libre sous forme Mb-N_3 (c) et adsorbée sur les NP de silice 7 nm (d) en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6*

Les quatre spectres de l'hémoglobine mesurés en quatre points de l'échantillon ne sont pas superposables, aussi bien pour l'hémoglobine libre (a) que pour l'hémoglobine adsorbée sur les NP (b). Au contraire, les spectres de la myoglobine liée à l'azoture présentent une bonne reproductibilité, que ce soit pour la myoglobine libre (c) ou adsorbée sur les NP de silice (d). Les spectres mesurés sur Mb-N_3 sont donc exploitables et peuvent être moyennés, ce qui n'est pas le cas pour l'hémoglobine (ci-dessus) et pour l'aquometmyoglobine (non présenté). Les différences observées peuvent être dues à une certaine hétérogénéité des échantillons et/ou à des effets de concentration (*70*).

Un autre effet peut venir du décalage entre le point où la mesure est effectuée et celui où le signal est optimum (c'est-à-dire au maximum de fluorescence de l'échantillon), ce qui est inévitable lorsqu'on se déplace sur l'échantillon, soit parce que le capillaire est légèrement incliné, soit parce que son épaisseur n'est pas constante. Or la fluorescence décroit très vite par réabsorption lorsqu'on se déplace vers l'intérieur de l'échantillon. Mesurer les spectres en différents points de l'échantillon augmente l'incertitude sur la mesure et ne semble pas être la méthode la plus adaptée à ce type de système.

Une autre solution pour limiter l'évolution de la protéine sous faisceau serait de réaliser les mesures en un même point de l'échantillon à très basse température dans un cryostat. Un inconvénient, outre l'étude d'un échantillon gelé plutôt que d'une solution, est l'ajout de plusieurs fenêtres sur le trajet des photons de fluorescence et donc le risque de diminuer le signal mesuré.

Résultats

Même si de nouvelles mesures s'avèrent nécessaires pour améliorer la qualité des spectres mesurés, une assez bonne reproductibilité a été obtenue sur les solutions de myoglobine ligandée à l'azoture, libre et adsorbée sur les NP de silice 7 nm. Les résultats obtenus en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6 sont présentés (Fig. 5-23, page suivante).

Les spectres XANES de la myoglobine ligandée à l'azoture, libre et adsorbée, ne présentent pas de différence dans la limite d'incertitude de nos mesures, que ce soit au niveau du pré-seuil ou du seuil, ce qui indique qu'il n'y a pas ou peu de modification de la configuration électronique du fer lors de l'adsorption de la metmyoglobine ligandée à l'azoture. Ce résultat rejoint nos observations en spectroscopie UV-visible sur l'aquometmyoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice qui ne montrent pas de modification de la distribution électronique du fer et suggèrent que l'hème est préservé lors de l'adsorption.

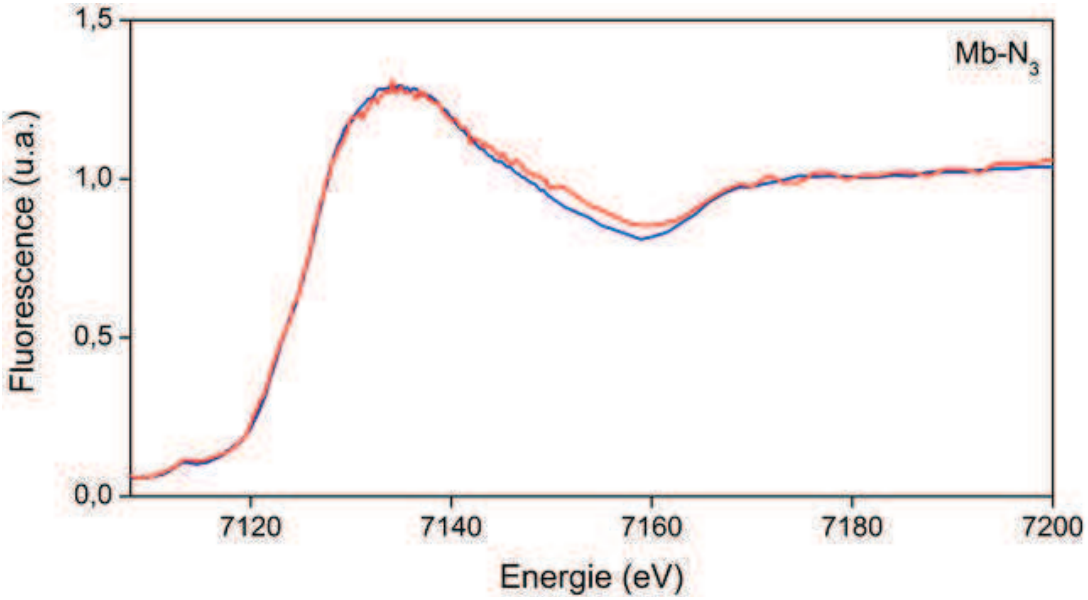


Figure 5-23. *Spectres XANES au seuil du fer de la myoglobine (C_{Mb} = 2 mM) sous forme Mb-N_3 libre (bleu) et adsorbée (rouge) sur les nanoparticules de silice 7 nm (C_{NP} = 90 mg/mL) en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6. Les spectres sont corrigés et correspondent à 100% de myoglobine adsorbée.*

L'étude par spectroscopie d'absorption X des hémoprotéines adsorbées sur une surface se révèle intéressante, et pourrait être approfondie en jouant sur les paramètres permettant d'améliorer la qualité des données. Ces mesures pourraient être couplées à une étude dynamique centrée sur le fer (^{57}Fe) par spectroscopie Mössbauer (*71*).

5. Environnement des résidus tryptophane de l'apomyoglobine adsorbée sur la silice

Pour étudier la structure des hémoprotéines adsorbées sur les NP de silice, nous avons tout d'abord réalisé une mesure globale à travers l'analyse de la structure secondaire moyenne de la protéine par dichroïsme circulaire et spectroscopie infrarouge, puis nous avons utilisé une sonde locale, le fer, pour étudier les modifications de structure et de configuration électronique de l'hème au cours de l'adsorption. Nous nous proposons maintenant d'utiliser une autre sonde locale, cette fois spécifique de la globine, les résidus tryptophane qui sont particulièrement sensibles à leur environnement (*72*). Mesurer la fluorescence des deux résidus tryptophane de la myoglobine serait un bon indicateur de la plus ou moins grande exposition au solvant de ces résidus lors de l'adsorption et nous donnerait une information locale supplémentaire dans une autre région de la protéine. Cependant, la fluorescence des tryptophane est presque totalement éteinte par l'hème par transfert d'énergie et ne peut être mesurée directement qu'en spectroscopie ultra-rapide car l'émission résiduelle de

fluorescence des tryptophane de la myoglobine est associée à des durées de vie très courtes comprises entre 20 et 110 ps (*73*).

Pour contourner cette difficulté, nous avons choisi d'analyser la fluorescence des résidus tryptophane de l'apomyoglobine, libre et adsorbée sur les NP de silice, car il est connu que les deux protéines ont une structure très proche (*74*). L'isotherme d'adsorption de l'apomyoglobine sur les NP de silice 7 nm a été mesurée (voir chap. 4, §3) : l'apomyoglobine s'adsorbe en plus grande quantité (m = 0,81 mg/m²) et avec une plus grande affinité (K_a = 6,5.10^5 M^{-1}) que la myoglobine, leur comportement lors de l'adsorption n'est donc pas identique.

Nous n'avons pas pu analyser la structure de l'apomyoglobine adsorbée par dichroïsme circulaire car la solution contenant apomyoglobine et NP de silice est plus instable et décante rapidement, probablement par un effet d'agrégation. La fluorescence parait donc une technique adaptée pour étudier localement la structure de l'apomyoglobine adsorbée sur les NP de silice.

Les deux résidus tryptophane de l'apomyoglobine se trouvent au sein de l'hélice A et sont séparés par un peu moins de deux tours d'hélice : W7 et W14 (Fig. 5-24).

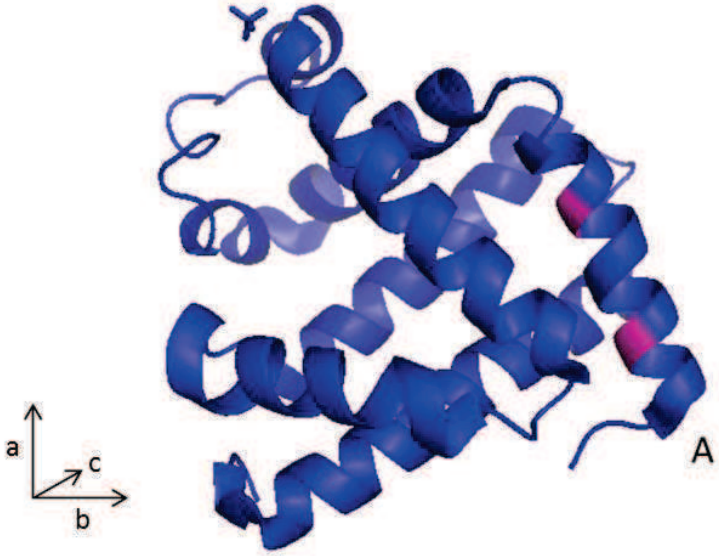


Figure 5-24. *Représentation des résidus tryptophane W7 et W14 situés sur l'hélice A de la myoglobine, d'après 1YMB.pdb. L'hème n'est pas représenté.*

Outre les deux résidus tryptophane, l'apomyoglobine compte également deux tyrosine et sept phénylalanine. Ces acides aminés aromatiques absorbent la lumière à 257 nm (Phe), 274 nm (Tyr) et 280 nm (Trp) et leurs maxima d'émission en solution à pH 7 se situent à 282 nm (Phe), 303 nm (Tyr) et 348 nm (Trp) (*75*). Le rendement quantique de fluorescence est 5 fois plus grand pour les tryptophane et tyrosine comparés aux phénylalanine : la fluorescence de la protéine est donc

dominée par la fluorescence des résidus tryptophane (W7, W14) et tyrosine (Y103, Y146). Une façon simple de séparer la fluorescence des tryptophane de celle des tyrosine est de mesurer l'émission de fluorescence après excitation à 295 nm, longueur d'onde à laquelle les résidus tyrosine ne sont quasiment plus excités, le signal mesuré provenant alors à plus de 95% des résidus tryptophane.

La fluorescence de l'apomyoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice 7 nm a été mesurée après excitation à 295 nm en tampon BisTris-HCl 10 mM à pH 6 (Fig. 5-25).

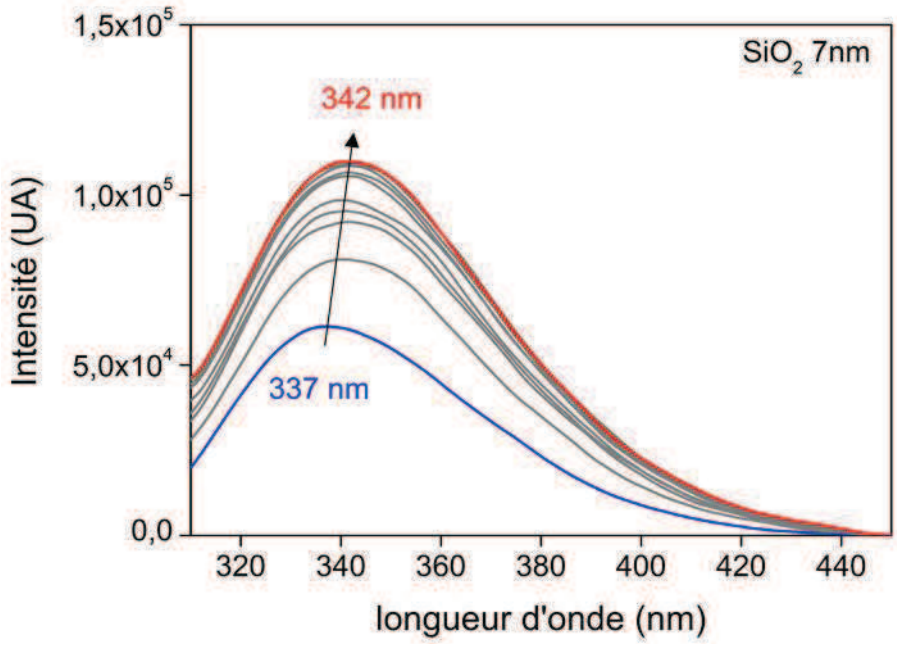


Figure 5-25. *Spectre d'émission de fluorescence après excitation à 295 nm de l'apomyoglobine libre (bleu) (C_{apoMb} = 10 µM) et adsorbée sur les NP de silice 7 nm à une concentration de 9 mg/mL (rouge) et aux concentrations intermédiaires de 1 à 8 mg/mL (gris) en tampon BisTris-HCl 10 mM à pH 6 et 20°C. La flèche indique le déplacement de la longueur d'onde du maximum d'émission lors de l'adsorption.*

Le maximum d'émission des résidus tryptophane de l'apomyoglobine libre se situe à 337 ± 1 nm, en accord avec les valeurs de la littérature (*76*).

La fluorescence de l'apomyoglobine adsorbée sur les NP de silice 20 nm a également été mesurée (Fig. 5-26).

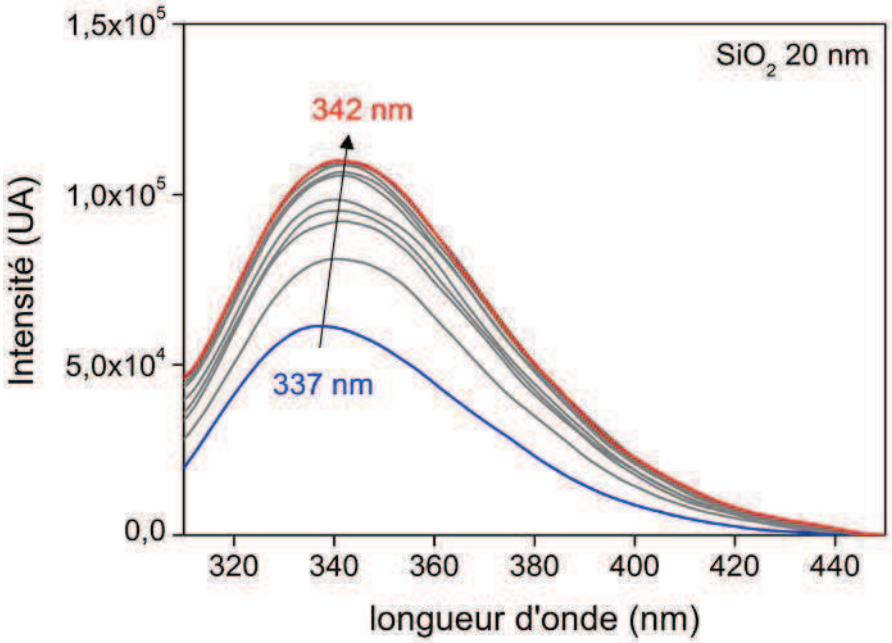


Figure 5-26. *Spectre d'émission de fluorescence après excitation à 295 nm de l'apomyoglobine libre (bleu) et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm à une concentration de 9 mg/mL (rouge) et aux concentrations intermédiaires de 1 à 8 mg/mL (gris) en tampon BisTris-HCl 10 mM à pH 6 et 20°C. La longueur d'onde du maximum d'émission de la protéine libre et adsorbée est indiquée.*

Les spectres d'émission de fluorescence de l'apomyoglobine adsorbée sur les NP de silice 7 présentent une augmentation de l'intensité de fluorescence croissante avec la concentration en NP de la solution. L'augmentation de l'intensité est probablement liée en partie à la diffusion de la lumière par les NP en solution, aussi bien lors de l'excitation que de l'émission, et ne peut pas être distinguée d'un changement du rendement quantique de fluorescence des tryptophane.

L'évolution de la fluorescence de l'apomyoglobine adsorbée sur les NP de silice est très similaire entre NP de 7 nm et NP de 20 nm. Le maximum d'émission de fluorescence se déplace de 337 à 342 ± 1 nm, soit un déplacement vers le rouge de 6 nm. Cela suggère une modification de l'environnement de l'un ou des deux résidus de l'apomyoglobine lors de l'adsorption sur les NP de silice. En effet, le maximum d'émission du tryptophane est très sensible à la polarité du milieu environnant et classé en trois catégories selon la longueur d'onde du maximum d'émission au sein d'une protéine (*77*) : la classe I est associée à un maximum d'émission vers 330-332 nm et correspond à un environnement apolaire, la classe II est associée à un maximum d'émission vers 340-342 nm et correspond à un environnement partiellement polaire, et donc à une exposition partielle des résidus à l'eau, enfin la classe III est définie pour un maximum d'émission vers 350-353 nm et correspond à un environnement polaire et une exposition des résidus à l'eau.

Les résidus tryptophane de l'apomyoglobine adsorbée semblent donc se trouver dans un environnement plus polaire (*78*), ce qui peut correspondre à une plus grande exposition au solvant des résidus W7 et/ou W14 comme à une interaction de ces résidus avec la surface de silice, celle-ci étant également polaire (voir chap. 3, §2). Dans l'hypothèse d'une exposition à la surface polaire de silice, on pourrait noter que les résidus tryptophane sont proches de trois résidus lysine K77, K78 et K79 situés sur le coude EF. Ce site pourrait alors être un site d'interaction avec la surface de silice.

Pour faire le parallèle entre apomyoglobine et myoglobine, une mesure de la fluorescence des résidus tryptophane de la myoglobine par spectroscopie de comptage de photons, appareil qui n'était pas disponible jusqu'à présent, est en cours (collaboration avec Thomas Gustavsson).

6. Cartographie des surfaces d'interaction entre myoglobine et silice par irradiation

Une des rares méthodes utilisées pour identifier les sites d'interaction entre protéine et surface est la mesure de l'échange H-D des amides (*34, 35*). Lorsque ces groupements se trouvent dans la zone d'interaction entre protéine et surface, ils sont préservés de l'échange isotopique par la surface et ne s'échangent que lors de la désorption de la protéine, ce qui correspond à la mesure d'un temps long. La cartographie de surface par irradiation (ou footprinting) est basée sur le même principe (*79*): lors de l'irradiation de la solution contenant la protéine, les radicaux formés par radiolyse de l'eau oxydent les résidus de la protéine qui leur sont accessibles. Lorsque la protéine est adsorbée sur une surface, les résidus de la zone d'adsorption sont protégés de l'irradiation.

Cette technique permet par comparaison des résidus oxydés, dans la protéine libre et dans la protéine adsorbée, d'identifier les résidus situés dans la zone d'interaction entre protéine et surface (Fig. 5-27).

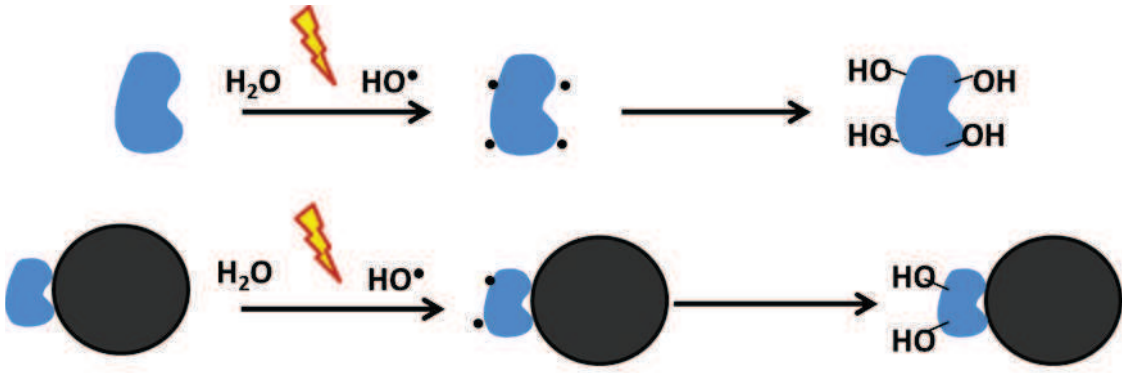


Figure 5-27. *Représentation de la cartographie de la surface d'interaction entre une protéine et une nanoparticule : l'irradiation provoque la radiolyse de l'eau et la formation de radicaux hydroxyles HO• qui créent des oxydations à la surface de la protéine, telles que l'hydroxylation de certains acides aminés. Les résidus qui se trouvent à l'interface entre la protéine et la nanoparticule sont protégés de l'attaque radicalaire et donc non oxydés, ce qui permet d'identifier la zone d'interaction du complexe.*

De plus, d'autres résidus non accessibles au sein de la protéine native pourraient également le devenir suite aux modifications de structure de la protéine adsorbée. Cela se traduirait par une augmentation de l'oxydation. A la différence des échanges H-D, nous analysons la présence ou non d'une oxydation dans la séquence de la protéine et non un degré d'échange. Cette méthode devrait théoriquement être plus facile à interpréter que celle des échanges H-D qui peut se révéler complexe (*33*).

Les solutions de myoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice 20 nm ont été irradiées par des rayons gamma (^{137}Cs) à des doses de 12 à 2200 Gy, ce qui correspond à la production de radicaux hydroxyles HO• par radiolyse de l'eau à une concentration de 3 à 600 µM (voir chap. 2, §4.3). Les dommages causés par l'irradiation directe de la protéine sont négligeables comparés à l'oxydation par les radicaux hydroxyles, compte-tenu de la faible concentration en protéine. L'oxydation par les radicaux peut affecter aussi bien la chaine principale de la protéine que les chaines latérales des résidus. Lors de l'attaque par les radicaux hydroxyles, un radical carbocentré peut être formé soit sur le carbone α de la chaîne carbonée soit sur le carbone d'une chaîne latérale aliphatique. Ce radical carbocentré peut réagir à son tour en plusieurs étapes jusqu'à former un hydroperoxide RCOOH, un hydroxyde RCHOH ou un composé carbonyle C=O, aldéhyde ou cétone. La décarboxylation et la déamination de la protéine par les radicaux peut également créer des composés de type aldéhyde. L'hydroxylation et la formation de composés carbonyles peut ainsi affecter l'ensemble des acides aminés aliphatiques (*80*).

Les radicaux hydroxyles peuvent également réagir avec les cycles aromatiques des résidus phénylalanine, tyrosine, histidine et tryptophane. L'oxydation des cycles aromatiques se traduit par une hydroxylation dont les produits sont le 2-oxohistidine, la méta et ortho-tyrosine avec la possibilité de former une dityrosine et la N-formylkynurénine et kynurénine par hydroxylation du tryptophane. Les radicaux hydroxyles peuvent également oxyder le soufre de la méthionine et de la cystéine pour former la méthionine sulfoxyde (S=O) et la cystine (S-S) par liaison de deux cystéines entre elles. Les résidus aromatiques et soufrés sont les plus sensibles à l'attaque radicalaire. Enfin, d'autres modifications telles que des coupures de chaines sont également possibles (*81*).

Chacune de ces oxydations se traduit par un changement de masse du résidu concerné, par exemple M+16 pour une hydroxylation (plus un atome d'oxygène), M+16 et M+32 pour l'oxydation et la dioxydation d'une méthionine (plus un ou deux atomes d'oxygène), M+4 pour l'hydroxylation d'un tryptophane en kynurénine (plus un atome d'oxygène, moins un atome de carbone). Elles sont pour la plupart identifiables en spectrométrie de masse. Après irradiation, la myoglobine adsorbée sur les NP de silice est désorbée, coupée en fragments par digestion trypsique puis analysée sur un spectromètre de masse tandem couplé à une colonne de chromatographie liquide, qui permet de séparer les fragments préalablement à l'analyse (LC-MS/MS) (voir chap. 2, §4.3). Nous avons réalisé les mesures au LAMBE à l'Université d'Evry. Le traitement des données, qui s'est avéré assez long sans logiciel de traitement adapté, a été effectué en grande partie par Christelle Mathé au cours de son postdoctorat.

Les solutions de myoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice ont été analysées avant et après irradiation. Quelques résidus, notamment les tryptophane W7 et W14, apparaissent comme oxydés dans les solutions de protéine non irradiées (tableau 5-10).

	Mb libre	Mb adsorbée
Auto-oxydation	W7, L11, W14, A84, L86	W7, W14

Tableau 5-10. *Acides aminés oxydés sans irradiation de la myoglobine. L'analyse par spectrométrie de masse n'est pas quantitative : l'auto-oxydation peut représenter un nombre très faible d'acides aminés effectivement oxydés. Les résidus oxydés sont situés sur l'hélice A (W7, L11, W14) et sur l'hélice F (A84, L86).*

Il s'agit donc d'une auto-oxydation de la myoglobine qui pourrait paraître surprenante dans les conditions habituelles de manipulation de la protéine au laboratoire. Cependant, l'identification des acides aminés oxydés par spectrométrie de masse est très sensible. Cela signifie qu'un nombre très faible d'acides aminés oxydés peut ainsi être détecté, jusqu'à des fractions de 1 pour 10 000. Il est probable que cette auto-oxydation, qui se produit naturellement dans les protéines à des niveaux

très bas, ne représente qu'une très faible fraction des acides aminés analysés. Par ailleurs, il faut noter que les résidus L11, A84 et L86 sont auto-oxydés sur la myoglobine libre mais ne le sont pas sur la myoglobine adsorbée. Il est possible qu'ils ne soient pas visibles lors de l'analyse, qu'il y ait un effet protecteur des NP ou au contraire qu'ils soient trop oxydés pour être identifiés (après coupure par exemple).

L'analyse des solutions de myoglobine irradiées permet d'identifier différents fragments avec un certain nombre d'oxydations dues à l'irradiation. Pour obtenir une image la plus complète possible de la séquence de la myoglobine, il est nécessaire de cumuler plusieurs analyses car tous les fragments ne sont pas toujours analysables, soit du fait de la digestion trypsique – le fragment situé entre les lysine K41 et K49, sites de coupure de la trypsine, contient également deux autres lysine en position 44 et 46 et n'est jamais analysé – soit par fragmentation de la chaîne sous irradiation ou agrégation des fragments entre eux. Si le nombre d'oxydations détectées tend à augmenter avec la dose reçue par la solution, le nombre de fragments identifiables diminue de façon identique pour la myoglobine libre ou pour la myoglobine adsorbée sur les NP. Nous avons donc choisi de combiner les résidus oxydés aux différentes doses utilisées.

Les oxydations communes à la myoglobine libre et adsorbées d'une part, et spécifiques de la protéine libre ou adsorbée d'autre part, sont recensées dans le tableau 5-11.

Structure (*28*)	Mb libre et Mb adsorbée	Mb libre uniquement	Mb adsorbée uniquement
Hélice-α A	V10, L11	A19	V13
Hélice-α B	I21, H24, V28, F33	E27, L29, I30	
Hélice-3_{10} C	L40	H36	
Coude 3_{10} CD			
Hélice-α D	M55	A53	
Hélice-α E	L61	E59	
Coude β EF			
Hélice-α F		H82, A84, L86, P88, L89	
Hélice-α G			
Coude β GH			D122
Hélice-α H	M131, F151		A130

Tableau 5-11. *Résidus oxydés de la myoglobine après irradiation de la solution de 12 à 2200 Gy par rayons γ. Oxydations communes à la protéine libre et adsorbée sur les NP de silice 20 nm, spécifiques de la myoglobine libre et spécifiques de la myoglobine adsorbée*

Au total, 23 oxydations sont identifiées sur la myoglobine libre et 14 sur la myoglobine adsorbée, dont 11 oxydations communes entre protéine libre et adsorbée. Parmi les acides aminés oxydés communs, on retrouve deux phénylalanine, deux méthionine et une histidine, qui sont connus comme particulièrement sensibles aux radicaux, ainsi que trois leucine, deux valine et une isoleucine qui sont parmi les acides aminés aliphatiques les plus réactifs après les acides aminés aromatiques et soufrés. L'oxydation de certains acides aminés moins sensibles à l'oxydation, tels que glutamate, proline et alanine, apparait cependant dans l'irradiation de la myoglobine libre.

Après irradiation à des doses importantes de la solution, seuls 23 acides aminés sur 153 sont oxydés, soit 15% des résidus. De plus, les acides aminés les plus représentés – acides aminés aromatiques et soufrés ainsi que valine, leucine et isoleucine – sont bien les plus réactifs vis-à-vis des radicaux hydroxyles. Il est intéressant de constater que parmi les acides aminés oxydés spécifiquement dans la myoglobine libre, et donc protégés de l'oxydation par l'adsorption de la myoglobine sur la silice, on retrouve à la fois des acides aminés plus sensibles à l'oxydation, tels que histidine, phénylalanine, leucine et isoleucine, et des acides aminés moins sensibles à l'oxydation, tels que alanine, proline et glutamate. De plus, le nombre d'acides aminés différents oxydés dans la myoglobine adsorbée, avant et après irradiation, est plus faible que dans la myoglobine libre : la silice ne favorise donc pas l'oxydation de la protéine *via* les réactions radicalaires.

L'étude de l'adsorption des protéines de levure puis celle de la myoglobine sur la silice a montré l'importance de deux acides aminés basiques, lysine et arginine, lors de l'adsorption des protéines sur la surface de silice. Arginine et lysine sont toutefois « invisibles » par cette technique car aucune oxydation de ces résidus n'est visible sur la myoglobine libre. De plus, les sites de coupure de la trypsine sont conservés.

Les résidus oxydés communs à la myoglobine libre et adsorbée et donc non protégés lors de l'adsorption de la myoglobine sur la silice se situent préférentiellement autour de l'hème, sur les hélices B, C, D et E. Seuls trois acides aminés situés sur les hélices A, H et sur l'extrémité C terminale de la protéine sont plus éloignés du site actif (Fig. 5-28).

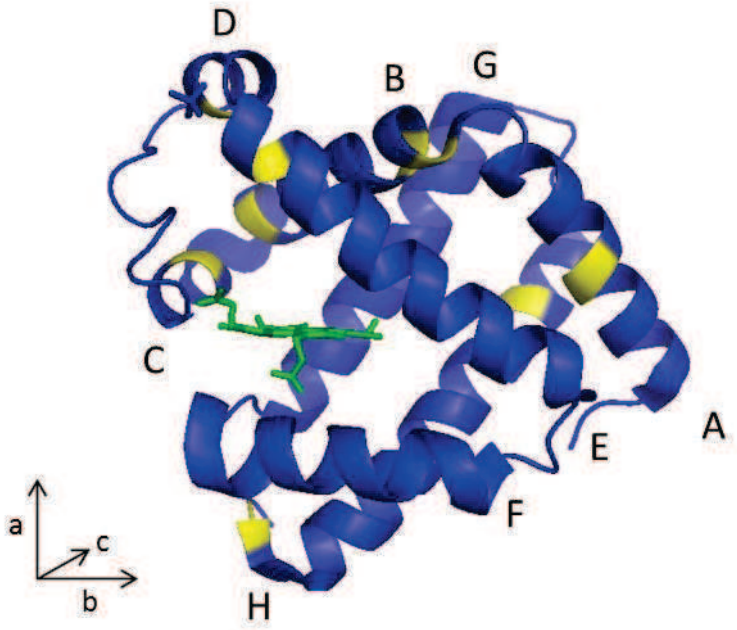


Figure 5-28. *Représentation des acides aminés oxydés dans la myoglobine adsorbée et non protégés de l'oxydation par l'adsorption sur la surface (en jaune), d'après la structure 1YMB.pdb*

Le site de l'hème semble préservé lors de l'adsorption sur les NP de silice, ce qui est cohérent avec les observations par spectroscopie UV-visible (voir §4.2) et par spectroscopie d'absorption X (voir §4.3). Il est possible que ce soit le caractère « cluster hydrophobe » qui protège la poche de l'hème de la déstructuration lors de l'adsorption.

De plus, les trois acides aminés oxydés spécifiquement dans la myoglobine adsorbée, et donc exposés à l'oxydation du fait de l'adsorption, sont situés à l'opposé du site actif, sur l'hélice A, l'hélice H et le coude GH. La désorganisation des hélices lors de l'adsorption pourrait conduire à une plus grande exposition de la valine et de l'alanine situées sur chacune des hélices. Sans interagir directement avec la surface, cette partie de la protéine pourrait être désorganisée indirectement par l'adsorption sur la silice.

Les acides aminés protégés par l'adsorption de la myoglobine sur la surface et oxydés spécifiquement sur la myoglobine libre sont représentés (Fig. 5-29).

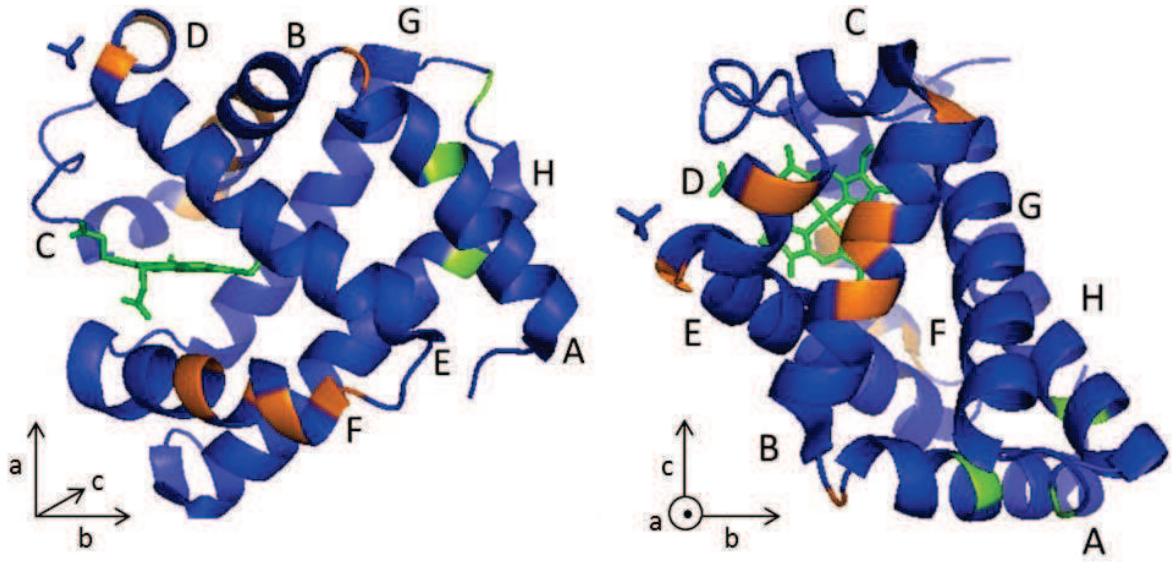


Figure 5-29. *Représentation des acides aminés protégés (orange) et exposés (vert) à l'oxydation lors de l'adsorption de la myoglobine sur les nanoparticules de silice 20 nm, dans la structure de la myoglobine d'après 1YMB.pdb. Deux sites possibles d'interaction avec la surface de silice sont dessinés par les acides aminés préservés de l'oxydation : à gauche sur l'hélice F et à droite sur les hélices B,C,D ,E*

Ces résidus qui pourraient être impliqués dans les sites d'interaction entre myoglobine et silice semblent se partager en deux pôles : le premier comprend 5 acides aminés oxydés situés sur l'hélice F et tous très proches, le second comprend 6 acides aminés oxydés situés sur une zone plus large comprenant les hélices B, C, D et E et se retrouvent proches dans la structure tertiaire de la myoglobine (Fig. 5-30).

Dans le premier site, il est intéressant de noter que l'hélice F contient deux lysine (K87, K96) et que le coude EF contient un cluster de trois lysine (K77, K78, K79). Or les résidus protégés de l'oxydation se situent en position 82 à 89, soit entre le coude EF et la lysine K96. Cette zone formée par le coude EF et l'hélice F pourrait ainsi constituer un site d'interaction entre la myoglobine et la surface de silice.

Le second site, formé par les zones proches dans la structure tertiaire des hélices B, C, D et E, comporte également plusieurs résidus basiques proches des résidus protégés de l'oxydation : une arginine sur l'hélice B (R31), une lysine sur l'hélice C (K42), D (K56) et deux lysine sur l'hélice E (K62, K63) ainsi qu'un cluster de trois lysine sur le coude CD (K45, K47, K50). Plusieurs de ces résidus basiques pourraient servir de point d'ancrage de la myoglobine sur la silice (à l'exception probable du résidu K45 qui stabilise l'hème).

L'hélice G ne présente aucune oxydation, que ce soit sur la myoglobine libre ou adsorbée ; nous ne pouvons donc pas conclure quant à l'implication de cette hélice lors de l'adsorption de la protéine puisqu'elle est « invisible » par cette technique.

Cette étude doit encore être complétée : il nous manque notamment une information supplémentaire, qui est le degré d'oxydation de chaque acide aminé identifié pour l'ensemble des protéines, autrement dit la quantification des données de spectrométrie de masse. En effet, l'interprétation est pour l'instant basée sur une image oxydé/non oxydé pour un acide aminé donné. Un degré supplémentaire de finesse pourrait être apporté aux données. Un logiciel spécifique de traitement des données de spectrométrie de masse permettant cette analyse est en cours d'acquisition dans le cadre d'une collaboration entre le LAMBE et le Laboratoire de Radiolyse (CEA).

Les points clés

Les points clés de l'étude de la structure de la myoglobine, de l'apomyoglobine et de l'hémoglobine adsorbées sur les nanoparticules de silice 7 et 20 nm peuvent être résumés :

- L'étude par dichroïsme circulaire a montré que l'adsorption sur la silice conduisait à une perte importante de la structure secondaire des hémoprotéines. La perte partielle de la structure en hélice atteint 40% pour l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice 20 nm et 50% pour la myoglobine adsorbée sur les NP de silice 7 nm. L'étude par spectroscopie infrarouge a permis de confirmer la perte partielle de structure secondaire de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice 7 nm. Toutefois, cette déstructuration n'est pas aussi importante que celle associée à une dénaturation en température et ne peut expliquer à elle seule la très grande surface calculée pour une protéine adsorbée à partir des isothermes d'adsorption. Il y a donc également un effet de la rugosité ou de l'hétérogénéité de la surface de silice lors de l'adsorption. La principale limitation de cette approche est de ne s'appliquer qu'à un niveau global, sans pouvoir discerner quelles hélices sont désorganisées au sein de la protéine adsorbée.

- L'étude de la dénaturation en température de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice 7 nm par microcalorimétrie ITC a indiqué une diminution de la stabilité en température et de l'enthalpie de dénaturation de la protéine, ce qui suggère que la déstructuration de la protéine lors de l'adsorption conduit à sa déstabilisation. Cette étude a permis d'apporter une information supplémentaire d'intérêt : l'élargissement très important de la zone de transition de la myoglobine adsorbée peut être associée à un plus grand nombre de conformations de la protéine, il n'y a donc pas une structure de myoglobine adsorbée, mais vraisemblablement un ensemble de conformations dont le niveau de déstructuration varie également.

- L'étude de la désorption des hémoprotéines des NP de silice a montré une désorption et une restructuration complète de l'hémoglobine des NP de silice 20 nm, soit une réversibilité totale des modifications de structure de l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice 20 nm. La désorption de la myoglobine des NP de silice 7 et 20 nm dans les mêmes conditions n'est que partielle et dépend de la force molaire du tampon Tris-HCl. Elle s'accompagne d'une restructuration complète de la myoglobine dans les conditions les plus fortes et d'une restructuration partielle de la myoglobine lors de la désorption dans les conditions les plus faibles.

- L'étude par spectroscopie UV-visible a montré que les propriétés électroniques du fer étaient conservées lors de l'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice 20 nm et de la myoglobine sur les NP de silice 7 nm. Le site actif de l'hémoglobine et de la metmyoglobine ne semblent donc pas directement affecté par l'adsorption, hypothèse qui dépend en grande partie des résultats de la mesure directe de l'activité de l'hémoglobine et de la metmyoglobine après adsorption. Bien qu'adaptées à la mesure sur des solutions colloïdales grâce à la sphère d'intégration, ces mesures restent toutefois sensibles à la diffusion de la lumière par les NP de silice, en particulier dans l'UV.

- La cartographie des surfaces d'interaction entre myoglobine et NP de silice 20 nm par irradiation a montré de nettes différences de position des résidus oxydés par attaque radicalaire de la myoglobine libre et de la myoglobine adsorbée. L'absence de quantification de l'oxydation est néanmoins restrictive. La protection de certains résidus de l'oxydation après adsorption et la présence de clusters de résidus basiques, impliqués dans l'adsorption des protéines sur la silice, ont permis d'identifier deux sites d'interactions possibles avec la surface de silice : le premier est formé par l'hélice F et le coude EF, le second est formé par une partie des hélices B, C, D et E. Ces deux sites d'interactions possibles sont représentés ci-dessous (Fig. 5-30).

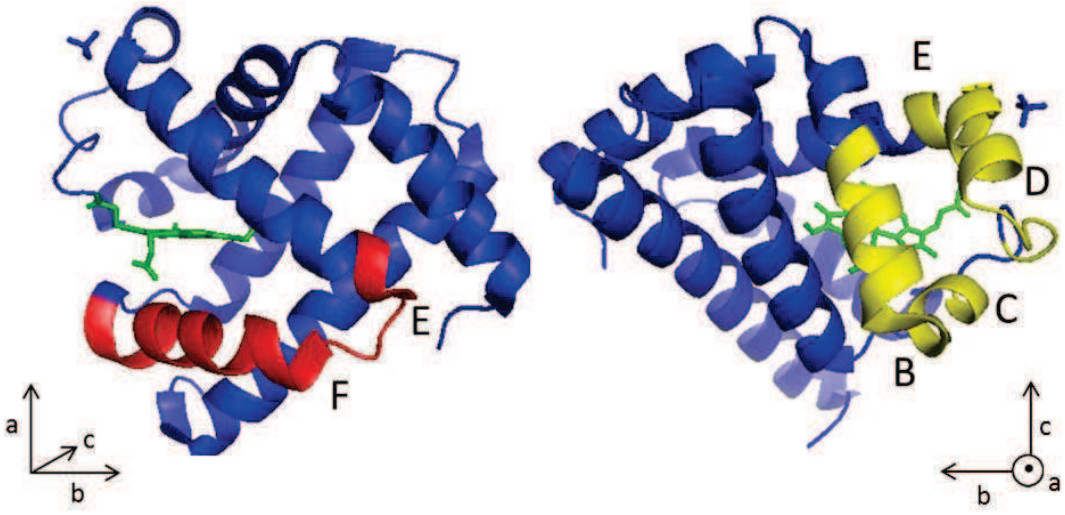


Figure 5-30. *Représentation de deux sites d'interaction possibles entre myoglobine et nanoparticules de silice. Le premier site est formé par l'hélice F et le coude EF (en rouge), le second est formé par une partie des hélices B, C, D et E (en jaune). Structure d'après 1YMB.pdb*

- L'étude de la fluorescence des résidus tryptophane a été réalisée sur l'apomyoglobine, adsorbée sur les NP de silice 7 nm, car leur fluorescence est éteinte par l'hème dans la myoglobine. L'adsorption de l'apomyoglobine s'accompagne d'un décalage vers le rouge de 5 nm de la longueur d'onde d'émission, ce qui correspond à un environnement plus polaire des résidus tryptophane après adsorption de l'apomyoglobine. Cela pourrait s'expliquer par une plus grande exposition au solvant ou par une interaction par la surface polaire de la silice.

- Une autre approche expérimentale par spectroscopie d'absorption X a été testée. Les premières mesures ont permis d'identifier les paramètres qui permettraient d'améliorer sensiblement la qualité des données obtenues sur ce type de système.

Bibliographie

1. Norde W. (2008) My voyage of discovery to proteins in flatland ... and beyond, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 61*, 1-9.
2. Holt S. A., McGillivray D. J., Poon S., White J. W. (2000) Protein deformation and surfactancy at an interface, *Journal of Physical Chemistry B 104*, 7431-7438.
3. Glandieres J. M., Calmettes P., Martel P., Zentz C., Massat A., Ramstein J., Alpert B. (1995) Solvent-induce structural distorsions of horse metmyoglobin, *Eur. J. Biochem. 227*, 241-248.
4. Antonini E. (1971) *Hemoglobin and Myoglobin in their interactions with ligands*, Vol. 21, New York.
5. Scopelliti P. E., Borgonovo A., Indrieri M., Giorgetti L., Bongiorno G., Carbone R., Podestà A., Milani P. (2010) The effect of surface nanometre-scale morphology on protein adsorption, *Plos One 5*, e11862.
6. Kataoka M., Nishii I., Fujisawa T., Ueki T., Tokunaga F., Goto Y. (1995) Structural characterization of the molter globule and native states of apomyoglobin by solution X-ray scattering, *Journal of Molecular Biology 249*, 215-228.
7. Chen Y. H., Yang J. T., Chau K. H. (1974) Determination of helix and beta-form of proteins in aqueous solution by circular dichroism, *Biochemistry 13*, 3350-3359.
8. Chang C. T., Wu C. S. C., Yang J. T. (1978) Circular dichroic analysis of protein conformation - Inclusion of beta-turns, *Analytical Biochemistry 91*, 13-31.
9. Dong A., Huang P., Caughey W. S. (1990) Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra, *Biochemistry 29*, 3303-3308.
10. Hennessey J. P., Johnson W. C. (1981) Information content in the circular dichroism of proteins, *Biochemistry 20*, 1085-1094.
11. Manavalan P., Johnson W. C. (1987) Variable selectrion methods improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra, *Analytical Biochemistry 167*, 76-85.
12. Levitt M., Greer J. (1977) Automatic identification of secondary structure in globular proteins, *Journal of Molecular Biology 114*, 181-239.
13. Greenfield N., Fasman G. D. (1969) Computed circular dichroism spectra for evaluation of protein conformation, *Biochemistry 8*, 4108-4116.
14. Provencher S. W., Glockner J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism, *Biochemistry 20*, 33-37.
15. Mahato M., Pal P., Tah B., Ghosh M., Talapatra G. B. (2011) Study of silver nanoparticle-hemoglobin interaction and composite formation, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 88*, 141-149.
16. Billsten P., Wahlgren M., Arnebrant T., McGuire J., Elwing H. (1995) Structural changes of T4 lysozyme upon adsorption to silica nanoparticles measured by circular dichroism, *Journal of Colloid and Interface Science 175*, 77-82.
17. Abdollahpour N., Asoodeh A., Saberi M. R., Chamani J. (2011) Separate and simultaneous binding effects of aspirin and amlodipine to human serum albumin based on fluorescence spectroscopic and molecular modeling characterizations: A mechanistic insight for determining usage drugs doses, *Journal of Luminescence 131*, 1885-1899.
18. Bohm G., Muhr R., Jaenicke R. (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks, *Protein Engineering 5*, 191-195.
19. Franchi D., Fronticelli C., Bucci E. (1982) Folding domains as functional tools in allosteric systems - A heme-dependent domain in hemoglobin beta-subunits, *Biochemistry 21*, 6181-6187.
20. Sire O., Zentz C., Pin S., Chinsky L., Turpin P. Y., Martel P., Wong P. T. T., Alpert B. (1997) Long-range effects in liganded hemoglobin investigated by neutron and UV Raman scattering, FTIR, and CD spectroscopies, *Journal of the American Chemical Society 119*, 12095-12099.
21. Braunitzer G., Schrank B., Stangl A., Scheithauer U. (1978) Hemoglobins, XXI: sequence analysis of porcine hemoglobin, *Hoppe Seylers Z Physiol Chem 359*, 137-146.
22. Shen X.-C., Liou X.-Y., Ye L.-P., Liang H., Wang Z.-Y. (2007) Spectroscopic studies on the interaction between human hemoglobin and US quantum dots, *Journal of Colloid and Interface Science 311*, 400-406.
23. Zolghadri S., Saboury A. A., Golestani A., Divsalar A., Rezaei-Zarchi S., Moosavi-Movahedi A. A. (2009) Interaction between silver nanoparticle and bovine hemoglobin at different temperatures, *J. Nanopart. Res. 11*, 1751-1758.
24. Susi H., Byler D. M. (1986) Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy of enzymes, In *Methods in Enzymology* (C. H. W. Hirs, S. N. T., Ed.), pp 290-311, Academic Press.

25. Barth A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1767*, 1073-1101.
26. Kim D. T., Blanch H. W., Radke C. J. (2002) Direct imaging of lysozyme adsorption onto mica by atomic force microscopy, *Langmuir 18*, 5841-5850.
27. Sreerama N., Venyaminov S. Y., Woody R. W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis, *Analytical Biochemistry 287*, 243-251.
28. Evans S. V., Brayer G. D. (1990) High resolution study of the 3 dimensional structure of horse heart metmyoglobin, *Journal of Molecular Biology 213*, 885-897.
29. Bellezza F., Cipiciani A., Quotadarno M. A., Cinelli S., Onori G., Tacchi S. (2007) Structure, stability, and activity of myoglobin adsorbed onto phosphate-grafted zirconia nanoparticles, *Langmuir 23*, 13007-13012.
30. Matsuo K., Sakurada Y., Yonehara R., Kataoka M., Gekko K. (2007) Secondary-Structure Analysis of Denatured Proteins by Vacuum-Ultraviolet Circular Dichroism Spectroscopy, *Biophysical Journal 92*, 4088-4096.
31. Moriyama Y., Takeda K. (2010) Critical temperature of secondary structural change of myoglobin in thermal denaturation up to 130 °C and effect of sodium dodecyl sulfate on the change, *The Journal of Physical Chemistry B 114*, 2430-2434.
32. Richardson J. M., Lopez M. M., Makhatadze G. I. (2005) Enthalpy of helix-coil transition: Missing link in rationalizing the thermodynamics of helix-forming propensities of the amino acid residues, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102*, 1413-1418.
33. Aizawa T., Koganesawa N., Kamakura A., Masaki K., Matsuura A., Nagadome H., Terada Y., Kawano K., Nitta K. (1998) Adsorption of human lysozyme onto hydroxyapatite: Identification of its adsorbing site using site-directed mutagenesis, *FEBS Letters 422*, 175-178.
34. Nagadome H., Kawano K., Terada Y. (1993) Identification of the adsorbing site of lysozyme onto the hydroxyapatite surface using hydrogen-exchange and H1-NMR, *Febs Letters 317*, 128-130.
35. Engel M. F. M., Visser A. J. W. G., van Mierlo C. P. M. (2004) Conformation and orientation of a protein folding intermediate trapped by adsorption, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101*, 11316-11321.
36. Lundqvist M., Andresen C., Christensson S., Johansson S., Karlsson M., Broo K., Jonsson B. H. (2005) Proteolytic cleavage reveals interaction patterns between silica nanoparticles and two variants of human carbonic anhydrase, *Langmuir 21*, 11903-11906.
37. Mousseau G., Raffy Q., Thomas O. P., Agez M., Thai R., Renault J. P., Pin S., Ochsenbein F., Cintrat J. C., Rousseau B. (2010) Footprinting of Protein Interactions by Tritium Labeling, *Biochemistry 49*, 4297-4299.
38. Vertegel A. A., Siegel R. W., Dordick J. S. (2004) Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme, *Langmuir 20*, 6800-6807.
39. Lundqvist M., Sethson I., Jonsson B. H. (2004) Protein adsorption onto silica nanoparticles: Conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability, *Langmuir 20*, 10639-10647.
40. Norde W., Favier J. P. (1992) Structure of adsorbed and desorbed proteins, *Colloids and Surfaces 64*, 87-93.
41. Giacomelli C. E., Norde W. (2001) The adsorption-desorption cycle. Reversibility of the BSA-silica system, *Journal of Colloid and Interface Science 233*, 234-240.
42. Buijs J., Norde W., Lichtenbelt J. W. T. (1996) Changes in the secondary structure of adsorbed IgG and F(ab')(2) studied by FTIR spectroscopy, *Langmuir 12*, 1605-1613.
43. Lundqvist M., Nygren P., Jonsson B. H., Broo K. (2006) Induction of structure and function in a designed peptide upon adsorption on a silica nanoparticle, *Angewandte Chemie-International Edition 45*, 8169-8173.
44. Dautrevaux M., Boulange Y., Han K., Biserte G. (1969) Covalent structure of equine myoglobin, *Eur. J. Biochem. 11*, 267.
45. Hargrove M. S., Krzywda S., Wilkinson A. J., Dou Y., Ikedasaito M., Olson J. S. (1994) Stability of myoglobin - A model for the folding of heme proteins, *Biochemistry 33*, 11767-11775.
46. Hughson F. M., Wright P. E., Baldwin R. L. (1990) Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate, *Science 249*, 1544-1548.
47. Buijs J., Ramström M., Danfelter M., Larsericsdotter H., Håkansson P., Oscarsson S. (2003) Localized changes in the structural stability of myoglobin upon adsorption onto silica particles, as studied with

hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Journal of Colloid and Interface Science 263*, 441-448.
48. Zoungrana T., Findenegg G. H., Norde W. (1997) Structure, stability, and activity of adsorbed enzymes, *Journal of Colloid and Interface Science 190*, 437-448.
49. Czeslik C. (2004) Factors ruling protein adsorption, *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-International Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics 218*, 771-801.
50. Robertson A. D., Murphy K. P. (1997) Protein structure and the energetics of protein stability, *Chemical Reviews 97*, 1251-1267.
51. Steadman B. L., Thompson K. C., Middaugh C. R., Matsuno K., Vrona S., Lawson E. Q., Lewis R. V. (1992) The effects of surface adsorption on the thermal stability of proteins, *Biotechnol. Bioeng. 40*, 8-15.
52. Larsericsdotter H., Oscarsson S., Buijs J. (2001) Thermodynamic analysis of proteins adsorbed on silica particles: Electrostatic effects, *Journal of Colloid and Interface Science 237*, 98-103.
53. Jones L. S., Peek L. J., Power J., Markham A., Yazzie B., Middaugh C. R. (2005) Effects of adsorption to aluminum salt adjuvants on the structure and stability of model protein antigens, *Journal of Biological Chemistry 280*, 13406-13414.
54. Basiuk V. A., Gromovoy T. Y. (1996) Comparative study of amino acid adsorption on bare and octadecyl silica from water using high-performance liquid chromatography, *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects 118*, 127-140.
55. Latour R. A., Hench L. L. (2002) A theoretical analysis of the thermodynamic contributions for the adsorption of individual protein residues on functionalized surfaces, *Biomaterials 23*, 4633-4648.
56. Van der Veen M., Norde W., Stuart M. C. (2004) Electrostatic interactions in protein adsorption probed by comparing lysozyme and succinylated lysozyme, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 35*, 33-40.
57. Haynes C. A., Sliwinsky E., Norde W. (1994) Structural and electrostatic properties of globular proteins at a polystyrene water interface, *Journal of Colloid and Interface Science 164*, 394-409.
58. Brewer S. H., Glomm W. R., Johnson M. C., Knag M. K., Franzen S. (2005) Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces, *Langmuir 21*, 9303-9307.
59. Mandal G., Bhattacharya S., Ganguly T. (2009) Investigations to reveal the nature of interactions between bovine hemoglobin and semiconductor zinc oxide nanoparticles by using various optical techniques, *Chemical Physics Letters 478*, 271-276.
60. Tosaka R., Yamamoto H., Ohdomari I., Watanabe T. (2010) Adsorption Mechanism of Ribosomal Protein L2 onto a Silica Surface: A Molecular Dynamics Simulation Study, *Langmuir 26*, 9950-9955.
61. Kendrew J. C., Bodo G., Dintzis H. M., Parrish R. G., Wyckoff H., Phillips D. C. (1958) 3 dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis, *Nature 181*, 662-666.
62. Ainscough E. W., Addison A. W., Dolphin D., James B. R. (1978) Iron porphyrin phenoxides - Models for some hemoglobin mutants, *Journal of the American Chemical Society 100*, 7585-7591.
63. Elantri S., Sire O., Alpert B. (1990) Relationship between protein solvent proton exchange and progressive conformation and fluctuation changes in hemoglobin, *Eur. J. Biochem. 191*, 163-168.
64. George P., Hanania G. (1952) The ionization of acidic metmyoglobin, *Biochemical Journal 52*, 517-526.
65. Hargrove M. S., Olson J. S. (1996) The stability of holomyoglobin is determined by heme affinity, *Biochemistry 35*, 11310-11318.
66. Pin S., Alpert B., Michalowicz A. (1982) An investigation by iron K-edge spectroscopy of the oxidation state of iron in hemoglobin and its subunits, *FEBS Letters 147*, 106-110.
67. Pin S., Alpert B., Congiucastellano A., Longa S. D., Bianconi A. (1994) X-ray absorption spectroscopy of hemoglobin, *Hemoglobins, Pt C 232*, 266-292.
68. Jaklevic J., Kirby J. A., Klein M. P., Robertson A. S., Brown G. S., Eisenberger P. (1977) Fluorescence detection of EXAFS - Sensitivity enhancement for dilute species and thin films, *Solid State Communications 23*, 679-682.
69. Della Longa S., Pin S., Cortès R., Soldatov A. V., Alpert B. (1998) Fe-Heme Conformations in Ferric Myoglobin, *Biophysical Journal 75*, 3154-3162.
70. Goulon J., Goulonginet C., Cortes R., Dubois J. M. (1982) On experimental attenuation factors of the amplitude of the EXAFS oscillations in absorption, reflectivity and luminescence measurements, *Journal De Physique 43*, 539-548.
71. Melchers B., Knapp E. W., Parak F., Cordone L., Cupane A., Leone M. (1996) Structural fluctuations of myoglobin from normal-modes, Mossbauer, Raman, and absorption spectroscopy, *Biophysical Journal 70*, 2092-2099.
72. Glandieres J. M. (1993) Etude du rôle du solvant sur les propriétés structurales et dynamiques de la molécule de myoglobine, Paris 7.

73. Willis K. J., Szabo A. G., Zuker M., Ridgeway J. M., Alpert B. (1990) Fluorescence decay kinetics of the tryptophyl residues of myoglobin: effect of heme ligation and evidence for discrete lifetime components, *Biochemistry 29*, 5270-5275.
74. Irace G., Bismuto E., Savy F., Colonna G. (1986) Unfolding pathway of myoglobin: Molecular properties of intermediate forms, *Archives of Biochemistry and Biophysics 244*, 459-469.
75. Teale F. W., Weber G. (1957) Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids, *Biochem. J. 65*, 476-482.
76. Haouz A., Glandieres J.-M., Zentz C., Pin S., Ramstein J., Tauc P., Brochon J.-C., Alpert B. (1998) Solvent effects on horse apomyoglobin dynamics, *Biochemistry 37*, 3013-3019.
77. Burstein E. A., Vedenkina N. S., Ivkova M. N. (1973) Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules, *Photochemistry and Photobiology 18*, 263-279.
78. Colonna G., Balestrieri C., Bismuto E., Servillo L., Irace G. (1982) Heme and cystein micro-environments of tuna apomyoglobin - Evidence of 2 independent unfolding regions, *Biochemistry 21*, 212-215.
79. Takamoto K., Chance M. R. (2006) Radiolytic protein footprinting with mass Spectrometry to probe the structure of macromolecular complexes, In *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, pp 251-276, Annual Reviews, Palo Alto.
80. Dean R. T., Fu S., Stocker R., Davies M. J. (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation, *Biochem. J. 324*, 1-18.
81. Shacter E. (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples, *Drug Metabolism Reviews 32*, 307-326.

CHAPITRE 6
Dynamique des protéines adsorbées

Alors que la structure des protéines adsorbées est beaucoup étudiée, leur dynamique reste en grande partie inconnue. Pourtant la dynamique des protéines peut être déterminante dans de nombreux processus biologiques, tels que l'activité des protéines (*1, 2*), les interactions protéine-protéine et protéine-ligand (*3*) et les processus d'agrégation (*4*). Il est également suspecté depuis longtemps que l'augmentation de la stabilité des enzymes immobilisées soit directement liée à leur plus faible flexibilité (*5*).

La dynamique des protéines regroupe des processus biologiques bien différents, caractérisés par leur échelle de temps et d'espace qui varient du dixième d'angström au micromètre et de la femtoseconde à la seconde pour les processus à l'échelle moléculaire (*6*). Il s'agit d'un paysage complexe qui regroupe des processus distincts (Fig. 6-1).

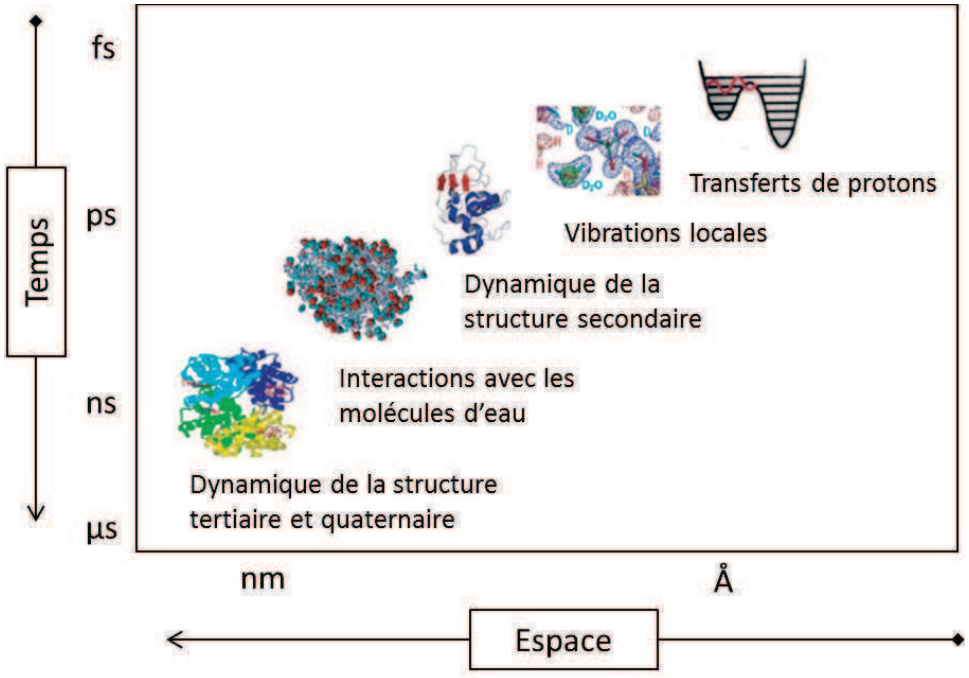


Figure 6-1. *Principales échelle de temps et d'espace de la dynamique des protéines d'après (7) modifié*

Une protéine en solution présente à température ambiante une grande dynamique interne, depuis les fluctuations atomiques locales (Å) et très rapides (ps), la dynamique de la structure secondaire, les interactions avec le solvant par collision et diffusion, jusqu'aux mouvements de plus grande amplitude de la structure tertiaire et quaternaire (*6*). Ces mouvements de domaines sont

directement impliqués dans la fonction de certaines enzymes (*8*). Or les mouvements observés à une échelle plus large, qui permettent à la protéine d'assurer sa fonction, sont dus à un ensemble de mouvements locaux plus rapides (*9, 10*) : la dynamique locale et rapide donne à la protéine sa flexibilité et lui permet d'explorer des mouvements collectifs de grande amplitude (*6*). Les mouvements observés sur des échelles de temps et d'espace très différentes sont donc liés.

Techniques d'étude de la dynamique des protéines

La dynamique des protéines peut être étudiée expérimentalement à différentes échelles de temps, localement ou globalement.

Les résidus tryptophane constituent une sonde locale qui peut être utilisée pour évaluer la dynamique globale de rotation de la protéine par anisotropie de fluorescence à l'échelle de la ns à la µs (mesure de la réorientation des cycles aromatiques des résidus) (*11*). La durée de vie de l'émission de fluorescence peut aussi être utilisée pour étudier les processus d'extinction de fluorescence de l'échelle de la fs pour les techniques de spectroscopie ultra-rapide jusqu'à la ns (*5*). Elle est sensible à la dynamique mais aussi aux modifications de structure de la protéine.

Autre sonde locale, l'atome de fer des hémoprotéines peut être sondé par spectroscopie Mössbauer pour étudier sa dynamique, ainsi que celle de l'hème et de son environnement proche, à l'échelle de la ps (mesure du déplacement carré moyen de l'atome de fer) (*12*). Un autre moyen d'étudier spécifiquement la dynamique des hémoprotéines, cette-fois ci à l'échelle de la ns à la µs, est la photodissociation du CO par laser (*13*). Après photolyse, la vitesse et le taux de recombinaison géminée du CO sur le même atome de fer dépend de la dynamique de la protéine (*14*).

La RMN est un outil d'étude plus global de la structure et de la dynamique des protéines sur des échelles de temps allant de la ps à la seconde (mesure de la relaxation du ^{13}C ou ^{15}N) (*15, 16*). La cristallographie des rayons X en température peut également être utilisée pour mesurer le facteur B indicateur de la rigidité locale de la protéine et le déplacement carré moyen de tous les atomes sauf hydrogène à l'échelle de la picoseconde (*9*).

Les cinétiques d'échange H/D des atomes d'hydrogène des amides donnent des informations à la fois sur la dynamique et sur la structure de la protéine (*17*). La cinétique d'échange des atomes d'hydrogène des amides est beaucoup plus lente lorsque ceux-ci sont impliqués dans une liaison hydrogène, par exemple dans une hélice (*18*).

Les mouvements de vibration à l'échelle de la ps peuvent être sondés par spectroscopie infrarouge, Raman (mesure des modes de vibration) (*6*) ou par diffusion incohérente de neutrons (mesure du déplacement carré moyen des atomes d'hydrogène) (*19*).

Les études de dynamique des protéines adsorbées et immobilisées

Malgré un large éventail de techniques, toutes ne sont pas applicables à des systèmes protéine/surface et il existe peu de données sur la dynamique des protéines adsorbées, que ce soit sur des surfaces planes ou sur des nanomatériaux. Le modèle de Norde fait l'hypothèse que la perte de structure des protéines adsorbées s'accompagne d'une augmentation de leur dynamique et d'un gain important d'entropie pour le système (*20*). Pourtant, quelques études récentes de la dynamique des protéines adsorbées appliquées à quelques systèmes semblent indiquer une tendance opposée. Des mesures d'anisotropie de fluorescence (*11*) et de RMN du solide (*16*) indiquent une diminution de la dynamique de la SNase et du lysozyme adsorbés sur une surface de silice (à l'échelle de la ns), et de la stathérine adsorbée sur l'hydroxyapatite (à l'échelle de la ms). D'autres études sont donc nécessaires pour conclure quant à la dynamique des protéines adsorbées.

Des systèmes proches d'enzymes immobilisées par pontage ou encapsulées dans des matrices se révèlent en effet peu comparables. L'étude de la dynamique de la glucose oxydase immobilisée par pontage par le glutaraldéhyde par fluorescence montre une plus grande rigidité de l'enzyme immobilisée, à l'échelle de la ns (*5*). Cependant, la protéine immobilisée présente à la fois une structure native et une plus grande stabilité, à la différence de la plupart des protéines adsorbées sur une surface dont la structure est modifiée par l'adsorption. Le lysozyme encapsulé dans une matrice sol-gel de silice conserve la même conformation que la protéine libre en solution et sa dynamique présente certaines différences par rapport au lysozyme adsorbé sur une surface de silice (*11, 21*).

L'étude par fluorescence de la dynamique d'une chimère de myoglobine (protoporphyrine à magnésium) encapsulée dans une matrice sol-gel de silice montre que la mobilité de la protéine est limitée dans la matrice, à l'échelle de la µs (*22*). De plus, le taux de recombinaison géminée de MbCO encapsulée est beaucoup plus grand que celui de la protéine libre en solution, ce qui indique une diminution de la dynamique de la myoglobine encapsulée, à l'échelle de la ns à la µs (*23*). Cependant, contrairement à l'adsorption, l'encapsulation d'une protéine dans une matrice sol-gel ne s'accompagne généralement pas d'une perte de structure secondaire. Les protéines encapsulées et immobilisées par lien covalent ne permettent donc pas d'étudier la relation entre modifications de structure et évolution de la dynamique des protéines adsorbées.

Notre approche expérimentale

Nous avons étudié précédemment l'influence de la flexibilité des protéines sur leur adsorption sur les NP de silice : les protéines les plus flexibles sont ainsi les plus à mène de s'adsorber (voir chap. 4, §7.3). Nous nous intéressons maintenant à la dynamique de la protéine après l'adsorption : quelles modifications de la dynamique de la protéine adsorbée et quelles conséquences pour son activité ?

Nous avons choisi la diffusion incohérente de neutrons comme technique d'étude car elle permet i) de s'affranchir totalement des importantes modifications de structure de la protéine adsorbée, à la différence de la fluorescence, ii) de sonder de façon globale la dynamique de la protéine adsorbée à l'échelle de la picoseconde et iii) ce n'est pas un technique optique et elle peut s'appliquer à n'importe quel matériau pourvu qu'il ne contienne pas d'hydrogène et que la protéine et le matériau soient en solution dans D_2O (voir chap. 2, §7). De plus, cette technique peut être appliquée à très basse température, ce qui permet d'étudier la transition dynamique de la protéine adsorbée sur les NP de silice, ce qui n'a jamais été fait jusqu'à présent. La diffusion incohérente de neutrons appliquée aux protéines est présentée brièvement en introduction de ce chapitre (voir §1).

Le système choisi pour cette étude est celui de la myoglobine, protéine modèle la plus simple, adsorbée sur les nanoparticules de silice 7 nm qui ont une surface spécifique suffisamment grande pour permettre la préparation de ce type d'expérience où la concentration en protéine est très élevée. Il s'agit par ailleurs d'une expérience sur Très Grand Instrument pour laquelle nous avons fait une demande d'expérience longtemps à l'avance. Les mesures ont été réalisées avant d'obtenir les résultats sur l'activité de l'hémoglobine adsorbée (voir chap. 7, §2), ce qui explique que nous n'ayons pas choisi ce système pour une première étude.

Deux types de mesure ont été réalisés, par diffusion incohérente élastique et inélastique de neutrons. La diffusion élastique de neutrons nous a permis de comparer la mobilité de la myoglobine libre et adsorbée *via* la mesure du déplacement carré moyen des atomes d'hydrogène de la protéine, ce qui permet de visualiser la transition dynamique de la protéine en solution, libre et adsorbée.

La diffusion inélastique de neutrons est une mesure par spectroscopie vibrationnelle, utilisée pour analyser la densité d'états vibrationnels de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice, c'est-à-dire la distribution en énergie des modes de vibration de la protéine. Cette analyse permet également d'évaluer la contribution entropique de l'adsorption et de discuter des mécanismes impliqués à l'échelle moléculaire lors de l'adsorption.

1. Introduction à la diffusion incohérente de neutrons

Nous avons analysé la dynamique de la myoglobine à l'échelle de la picoseconde et pour un déplacement de quelques Å associée aux fluctuations de la structure de la protéine. La diffusion de neutrons thermiques est adaptée à ce type d'étude car l'énergie des neutrons (E = 25 meV) permet de sonder les mouvements atomiques sur des temps caractéristiques de la dizaine picosecondes.

Les deux grandeurs caractéristiques de la diffusion des neutrons par les noyaux de l'échantillon sont l'angle de diffusion 2θ et l'énergie du neutron diffusé $E = \hbar\omega$ avec $\hbar$ la constante de Planck et ω la fréquence de vibration. La diffusion est élastique s'il n'y a pas de transfert d'énergie entre le neutron et l'échantillon ($d\omega = 0$) et inélastique s'il y a transfert d'énergie entre le neutron et l'échantillon ($d\omega > 0$, $d\omega < 0$). Lors d'une expérience de diffusion de neutrons, le nombre de neutrons diffusés par unité d'angle solide $d\Omega$ et par unité de transfert d'énergie $d\omega$ est mesuré : c'est la section efficace différentielle de diffusion. Concrètement, la mesure est celle d'un gain en énergie du neutron diffusé (perte d'énergie de l'échantillon) car la perte en énergie du neutron est limitée par sa propre énergie incidente.

Lorsque les neutrons diffusés (ondes diffusées) interfèrent entre eux, la diffusion est dite cohérente et permet d'obtenir des informations sur les propriétés d'ensemble du système, comme sa structure. Cependant, l'interaction entre un neutron et un noyau diffuseur dépend également du spin du neutron ($s = \pm ½$) et de la composition isotopique de l'échantillon. Ces deux effets créent des différences entre ondes diffusées qui ne peuvent plus interférer : la diffusion devient incohérente et permet d'obtenir des informations sur les mouvements atomiques. La diffusion incohérente permet de sonder la dynamique des polymères ou des protéines par exemple.

L'intensité diffusée, cohérente et incohérente, dépend de la section efficace de diffusion de chacun des atomes de l'échantillon. La section efficace de diffusion des atomes présents dans notre échantillon est indiquée ci-dessous pour une longueur d'onde incidente de 1,8 Å (tableau 7-1).

Noyau	$\sigma_{cohérente}$ (barn)	$\sigma_{incohérente}$ (barn)
C	5,55	0,001
N	11,01	0,50
O	4,23	0,0008
S	1,02	0,007
H	1,76	**80,27**
D	5,59	2,05
Fe	11,22	0,4
Si	2,13	0,004

Tableau 6-1. *Sections efficaces de diffusion cohérente et incohérente des différents atomes de l'échantillon pour une longueur d'onde incidente de 1,8 Å (24)*

La section efficace de diffusion incohérente de l'hydrogène ($\sigma_{incohérente}$ = 80,27 barn) est nettement supérieure aux sections efficaces de diffusion cohérente (σ < 11 barn) et incohérente (σ < 2 barn) des autres atomes présents et du deutérium (*24*). Lorsque la myoglobine est en solution dans D_2O, la diffusion incohérente des atomes d'hydrogène de la protéine est la principale contribution à l'intensité diffusée par l'échantillon, les contributions cohérente et incohérente des autres atomes devenant négligeables. La diffusion incohérente de la myoglobine en solution est donc directement liée à la dynamique des atomes d'hydrogène répartis uniformément dans la protéine et dont les mouvements sont associés à ceux des chaînes principales et latérales auxquelles ils sont liés.

Dans nos conditions expérimentales, même si la dynamique mesurée est celle des fluctuations rapides et locales des atomes d'hydrogène à une échelle de temps comprise entre 0,2 et 20 ps (voir chap. 2, §7), elles permettent d'étudier la dynamique globale de la myoglobine en solution (*9, 10*).

La myoglobine est composée de 1200 atomes d'hydrogène pour un total de 2400 atomes, soit 72 mg d'hydrogène par gramme de myoglobine. Lorsque la myoglobine est mise en solution dans D_2O, certains atomes d'hydrogène peuvent s'échanger avec le deutérium de l'eau lourde. A partir du nombre d'hydrogène échangeables par acide aminé, la fraction maximale d'hydrogène échangeables pour une molécule de myoglobine peut être évaluée à 21% (voir chap. 2, §7). Plusieurs dialyses dans D_2O sont réalisées pour échanger et éliminer tous les atomes d'hydrogène échangeables de la protéine.

Les mesures ont été réalisées sur le spectromètre à temps de vol MIBEMOL au Laboratoire Léon Brillouin (CEA-CNRS) en collaboration avec Jean-Marc Zanotti. Nos mesures ont d'ailleurs été les

dernières sur MIBEMOL qui a été démonté depuis. L'énergie des neutrons incidents est sélectionnée grâce à plusieurs hacheurs (des disques en rotation dans le faisceau continu pourvus de fentes dont la vitesse détermine le temps d'ouverture du faisceau) qui permettent de créer un faisceau pulsé, puis l'énergie des neutrons diffusée est déterminée grâce à leur temps de vol.

2. Mobilité de la myoglobine adsorbée

Le déplacement carré moyen $\langle u^2 \rangle$ des atomes d'hydrogène de la myoglobine libre et adsorbée sur les nanoparticules de silice 7 nm dans une solution de D_2O a été mesuré par diffusion incohérente élastique de neutrons de 4 K à 298 K (Fig. 6-2) (voir chap. 2, §7.1).

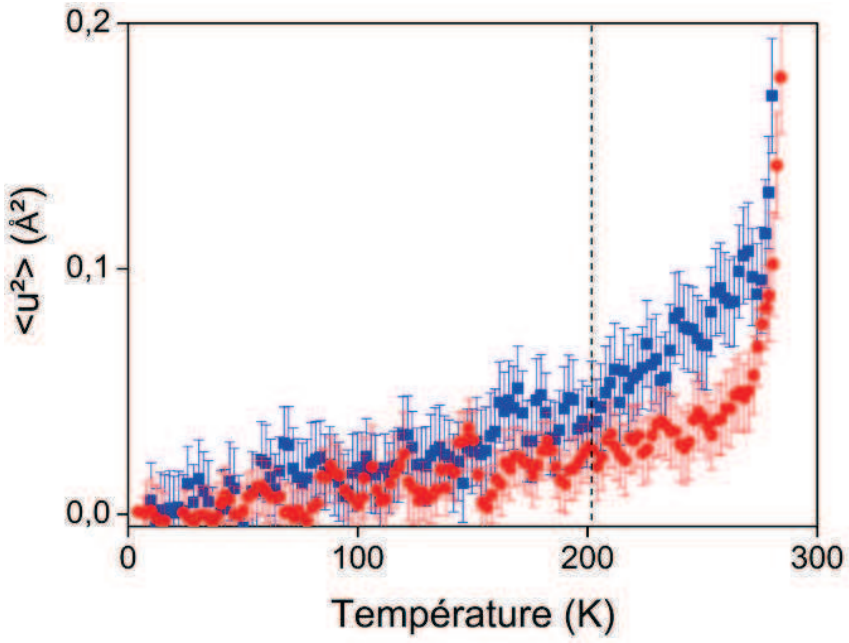


Figure 6-2. *Evolution du déplacement carré moyen $\langle u^2 \rangle$ avec la température de la myoglobine libre (■) et adsorbée (●) sur les NP de silice 7 nm dans une solution de D_2O (13% en masse Mb, 30% en masse NP), mesurée par diffusion incohérente de neutrons. Les pointillés marquent la transition dynamique de la myoglobine libre que l'on observe peu après 200 K.*

Le déplacement carré moyen de la myoglobine libre augmente linéairement avec la température de 4 à 200 K, puis une augmentation progressive de la pente de $\langle u^2 \rangle$ (T) est observée pour T > 200 K. Cette transition marque un changement de la dynamique de la myoglobine à une température de 200 K. Elle est appelée transition dynamique des protéines et est commune à toutes les protéines en solution (*25*). Elle a été observée par diffusion inélastique de neutrons (*19*) mais également par d'autres techniques : spectroscopie infrarouge (*26*), photolyse laser (*27*), cristallographie (*28*) et spectroscopie Mössbauer (*12*). La transition dynamique de la myoglobine en solution est comprise entre 180 K et 240 K d'après ces études.

Selon l'interprétation de Döster (*19*), à une température inférieure à 200 K, les atomes d'hydrogène de la myoglobine sont piégés et vibrent autour de leur position d'équilibre. Leur dynamique est harmonique et $\langle u^2 \rangle$ évolue linéairement en fonction de la température. Lorsque la température est supérieure à 200 K, les atomes d'hydrogène ont suffisamment d'énergie pour sauter d'une position à une autre, leur dynamique devient anharmonique (Fig. 6-3).

D'autres interprétations ont été proposées et sont basées sur la coïncidence entre l'échelle de temps du processus de relaxation et la fenêtre temporelle d'observation du spectromètre (*29*).

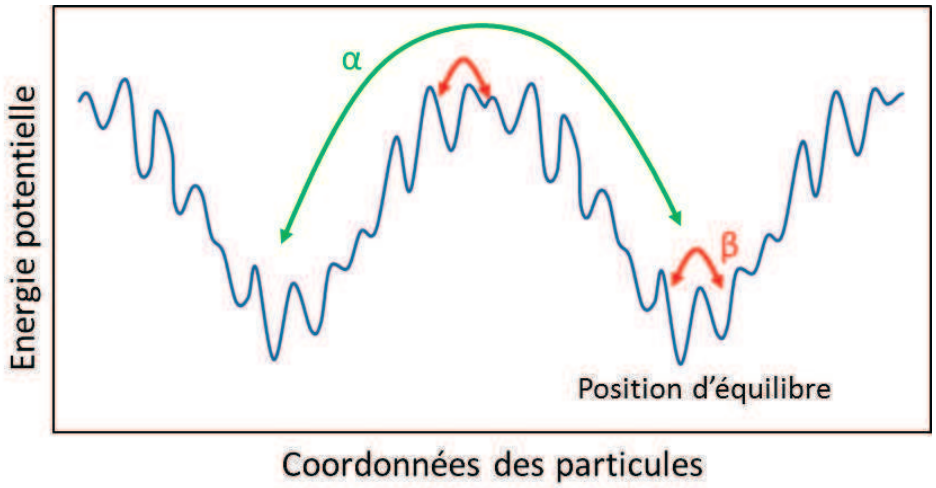


Figure 6-3. *Courbe d'énergie potentielle d'une protéine. Par analogie avec la transition vitreuse, la vibration des atomes autour de la position d'équilibre en-dessous de la température de transition correspond aux transitions* β *entre minima locaux tandis que les transitions à grande distance au-dessus de la température de transition sont associées aux relaxations* α *(adapté d'après (7))*

A l'échelle de la protéine, la transition dynamique correspondrait au passage d'une distribution figée de conformations à un ensemble de conformations pouvant être explorées. Il faut noter que seules les protéines hydratées présentent cette augmentation de la dynamique par diffusion au-delà de la température de transition (*30, 31*) et qu'elle paraît liée à une variation de la mobilité des molécules du solvant. Par ailleurs, les échanges entre conformations semblent nécessaires à l'activité : la bactériorhodospine par exemple est inactive en-dessous de la température de transition (*32*). Des études plus anciennes avaient également montré que les enzymes pouvaient être actives à basse température (*33*).

Les transitions entre minima à l'échelle atomique donnent à une protéine sa flexibilité, qui lui permet d'explorer des mouvements collectifs de grande amplitude, indispensables pour assurer sa fonction (*9, 10*).

Le déplacement carré moyen de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice évolue linéairement avec la température sans que la transition dynamique ne soit observée. Malgré l'augmentation de la température, la vibration des atomes d'hydrogène reste harmonique et confinée autour de leur position d'équilibre, la distribution de conformations de la myoglobine adsorbée est donc limitée par l'adsorption. L'augmentation de $\langle u^2 \rangle$ visible sur le graphe est associée à la fusion de la glace et non à la dynamique de la protéine. Ce résultat démontre que la flexibilité de la myoglobine diminue globalement lors de l'adsorption sur les NP de silice. L'adsorption de la myoglobine sur la surface de silice n'a donc pas seulement un effet local sur les résidus en interaction directe avec la surface mais un effet global sur la dynamique de la protéine. Les interactions entre myoglobine et NP de silice, à l'origine de la perte partielle de structure de la protéine, conduisent aussi à une diminution de la dynamique de la protéine.

3. Densité d'états vibrationnels de la myoglobine adsorbée

Nous nous intéressons ici à la distribution en énergie des modes de vibration de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice. Les neutrons sondent les mouvements des atomes d'hydrogène de la protéine, qui oscillent autour de leur position d'équilibre à une certaine fréquence. Chacune de ces fréquences correspond à un mode normal de vibration et l'ensemble des fréquences auxquelles vibrent les atomes décrivent les modes normaux de vibration caractéristiques de la protéine. La distribution en énergie (ou en fréquence) des modes de vibration est appelée densité d'états vibrationnels.

Il est possible de sonder la densité d'état vibrationnelle d'une protéine par diffusion inélastique de neutron, par spectroscopie infrarouge ou par spectroscopie Raman. L'avantage de la diffusion de neutrons par rapport aux spectroscopies infrarouge et Raman est la quasi absence de règles de sélections et le grand pouvoir pénétrant des neutrons, ce qui permet de « voir » tous les modes de vibration et de couvrir l'ensemble du spectre vibrationnel, en particulier à basse fréquence (de 1 à 300 cm^{-1}) et donc de faire une mesure beaucoup plus représentative de la densité d'états vibrationnels de la protéine.

De plus, lorsqu'une perturbation locale se propage à l'ensemble d'une protéine, il semble que les modes de vibration à basse fréquence, c'est-à-dire de basse énergie ($\hbar\omega < 40$ meV), permettent de reproduire en grande partie les mouvements observés (*34*). Les modes normaux de vibration à basse fréquence qui correspondent à des mouvements collectifs de grande amplitude des atomes

d'hydrogène sont en quelque sorte les « voies de communication » à l'intérieur de la protéine, tandis que les modes de haute fréquence sont plus restreints et plus localisés dans la protéine.

Ainsi, d'après certains modèles, les modes normaux de basse fréquence pourraient être liés aux mouvements de domaines au sein des protéines et à leur activité (*8*). Dans ce cas, la vibration des atomes selon les modes collectifs serait directement liée aux mouvements de domaines (par exemple lorsqu'une enzyme change de conformation lors de la fixation d'un ligand) et à l'activité biologique de la protéine (*35, 36*).

La densité d'états vibrationnels de la myoglobine libre et adsorbée sur les nanoparticules de silice 7 nm dans une solution de D_2O a été mesurée de 1 à 400 cm^{-1} par diffusion inélastique de neutrons à 240 K et à 298 K (Fig. 6-4) (voir chap. 2, §7.2).

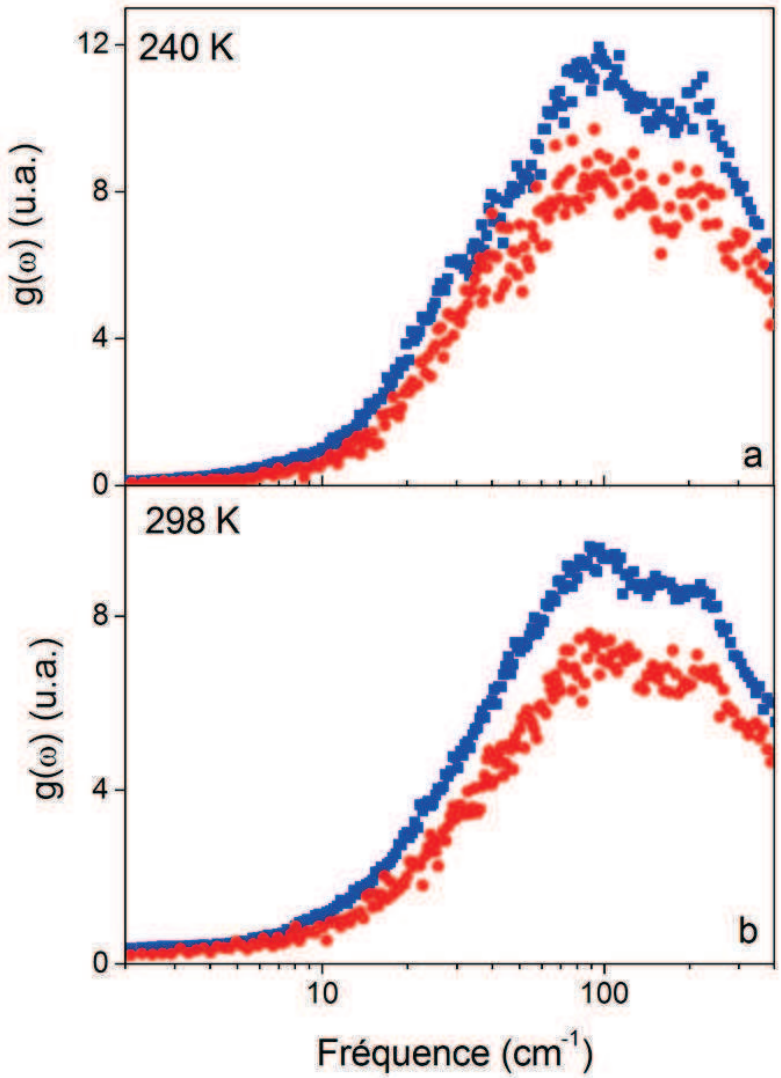


Figure 6-4. *Densité d'états vibrationnels g(ω) de la myoglobine libre (■) et adsorbée (●) sur les NP de silice 7 nm dans une solution de D_2O (13% en masse Mb, 30% en masse NP) à 240 K (a) et à 298 K (b) mesurée par diffusion inélastique de neutrons et normalisée à la masse de la protéine*

La densité d'état vibrationnelle de la myoglobine adsorbée présente une diminution très importante des modes de vibration de basse fréquence à 240 K et à 298 K, sans modification de la forme des spectres. Les données sont superposables après normalisation (Fig. 6-5).

La diminution de la densité d'états de la myoglobine adsorbée est similaire à 240 K et à 298 K, ce qui montre une bonne reproductibilité des mesures à une température supérieure à la température de transition de la myoglobine et indique que les mécanismes impliqués dans la diminution du nombre de modes de vibration sont relativement indépendants de la température.

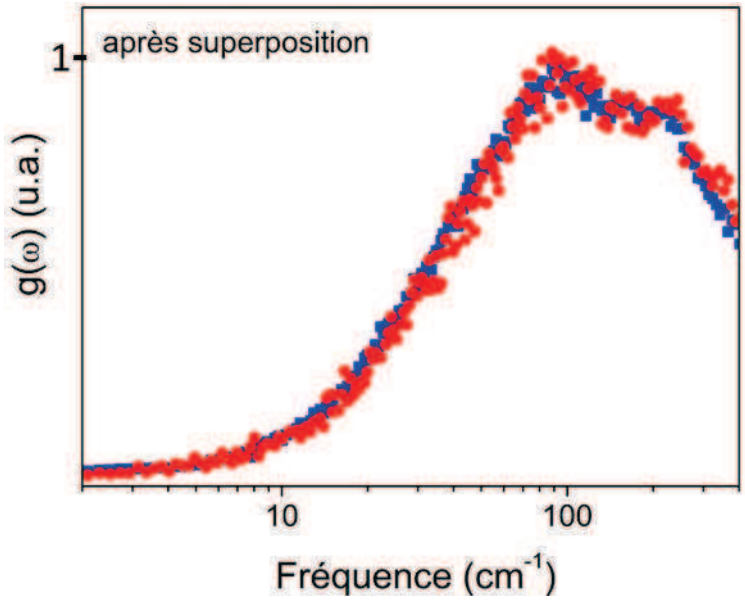


Figure 6-5. *Comparaison de la densité d'états vibrationnels g(ω) de la myoglobine libre (■) et adsorbée (●) sur les NP de silice 7 nm à 298 K après normalisation*

L'adsorption ne modifie donc pas la forme des densités d'états dans la fenêtre étudiée mais induit un appauvrissement de 20% en modes de basse fréquence calculé en intégrant la courbe, ce qui est bien supérieur aux modifications observées lors de la liaison de ligands de petite taille sur des protéines (généralement de quelques %) (*37*).

Cette diminution du nombre de modes de vibration est par contre comparable à celle prédite par simulation pour l'immobilisation des molécules d'eau à la surface d'une protéine observée à des faibles niveaux d'hydratation de la protéine (*38*) (Fig. 6-6).

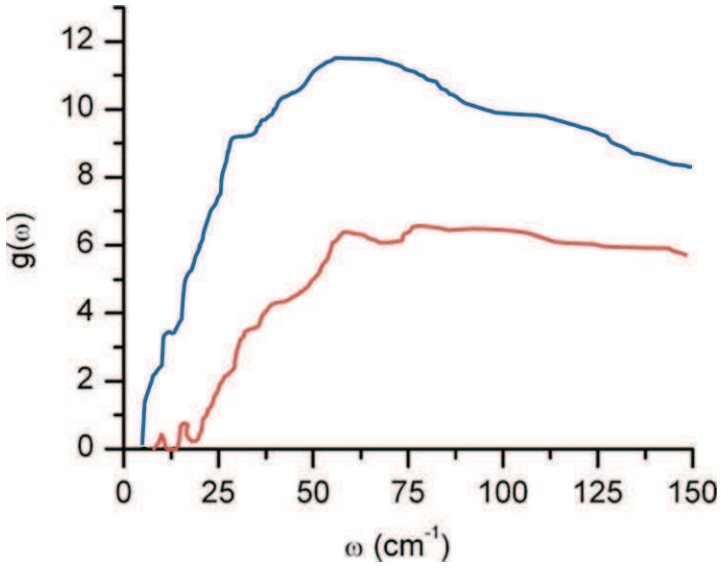


Figure 6-6. *Densité d'états vibrationnels g(ω) de la dihydrofolate réductase calculée par analyse des modes normaux lorsque les molécules d'eau à sa surface sont libres (bleu) ou immobilisées (rouge), d'après* (*38*)

Lorsque les molécules d'eau sont immobilisées sur une surface, le nombre de modes de vibration de basse énergie est limité. De la même façon, la surface de silice pourrait immobiliser les résidus à son contact et diminuer la densité d'états vibrationnels de la protéine adsorbée. Les atomes d'hydrogène de ces résidus n'auraient plus qu'une participation limitée aux modes collectifs de vibration à basse fréquence. Puisque le nombre de modes de vibration est proportionnel à la taille de la protéine (*39*), une diminution de 20% de la densité d'états vibrationnels de la myoglobine correspondrait à une diminution de 20% du nombre de résidus mobiles, soit 30 acides aminés sur 153.

Pour aller plus loin, on peut essayer d'extraire des informations sur les variations d'entropie liées à l'adsorption à partir des densités d'états vibrationnels en utilisant des relations de thermodynamique statistique. Nos mesures ne nous donnent accès qu'aux modes de basse fréquence (0-400 cm^{-1}), mais des études par simulation ont montré que seule cette partie de la densité d'états déterminait les modifications de conformation de la protéine (*3*). Une grande partie de l'entropie vibrationnelle des protéines est ainsi associée aux modes normaux de basse fréquence (ω < 400 cm^{-1}) (*40, 41*).

D'après McQuarrie, l'entropie vibrationnelle S peut être reliée à la densité d'états vibrationnels (eq. 1) (*42*).

$$S = k_B \int_0^\infty d\omega . E(\omega) W(\omega) \qquad \text{(eq. 1)}$$

avec k_B la constant de Boltzmann, E(ω) la densité des modes normaux à la fréquence ω et W(ω) une fonction de pondération.

Dans le cas d'un système harmonique, W(ω) s'écrit en fonction de β = 1/k_BT (eq. 2) :

$$W(\omega) = \frac{\beta\hbar\omega}{\exp(\beta\hbar\omega)-1} - ln[1 - \exp(-\beta\hbar\omega)] \quad \text{(eq. 2)}$$

Dans notre cas, l'intégration est très simple car la forme des densités d'états E(ω) est inchangée lors de l'adsorption (eq. 3 et 4).

$$E_{Mb\ adsorbée}(\omega) = 0{,}8 * E_{Mb\ libre}(\omega) \quad \text{(eq. 3)}$$

$$S_{Mb\ adsorbée} = 0{,}8 * S_{Mb\ libre} \quad \text{(eq. 4)}$$

La variation de l'entropie vibrationnelle de la myoglobine doit donc être proportionnelle à la diminution de 20% du nombre de modes de vibration à basse fréquence. Cependant, ces mesures ne donnent pas accès à la valeur absolue de l'entropie de la protéine libre $S_{Mb\ libre}$. L'entropie vibrationnelle moyenne d'une protéine est connue et la valeur rapportée dans la littérature est de 35 cal.K^{-1}.mol^{-1} par résidu (*6*). La variation de l'entropie vibrationnelle de la myoglobine adsorbée peut être évaluée à ΔS = 35 x 30 résidus immobilisés = -1.10^3 cal.K^{-1}.mol^{-1}.

La mesure de l'énergie d'adsorption de la myoglobine sur les NP de silice par microcalorimétrie a montré que la variation d'entropie était favorable à l'adsorption (voir chap. 4). Il existe donc un mécanisme qui compense la diminution de l'entropie vibrationnelle observée lors de l'adsorption de la myoglobine sur la silice. Lorsque les nanoparticules sont en solution, une couche d'eau est adsorbée à leur surface. Or l'eau adsorbée est presque immobile à la surface de la silice (*43*). Si les molécules d'eau se désorbent lors de l'adsorption de la myoglobine, alors elles devraient gagner en entropie. La variation d'entropie liée à la désorption des molécules d'eau de la silice peut être estimée à partir de l'entropie de désorption de la vapeur d'eau d'une surface de silice évaluée dans la littérature à 40-45 cal.K^{-1}.mol^{-1} (*44*) (Fig. 6-7). L'entropie de l'eau liquide et de la vapeur d'eau utilisées sont de 16,72 et 45,11 cal.K^{-1}.mol^{-1} respectivement.

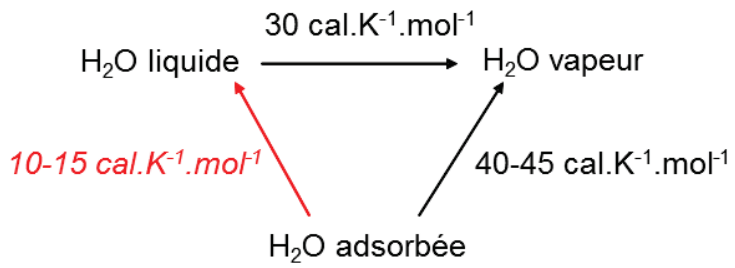


Figure 6-7. *Calcul de l'entropie de désorption des molécules d'eau de la surface de silice à partir de l'entropie de désorption de la vapeur d'eau de la silice (44)*

L'entropie liée à la désorption des molécules d'eau de la surface de silice est de l'ordre de 10 à 15 $cal.K^{-1}.mol^{-1}$ par molécule d'eau. La désorption de 70 à 100 molécules d'eau de la surface serait donc suffisante pour compenser la diminution de l'entropie vibrationnelle d'une molécule de myoglobine adsorbée. La surface occupée par une molécule d'eau est de 0,1 nm², soit une surface totale de 7 à 10 nm² pour 70 à 100 molécules d'eau (*44*). Compte-tenu de sa taille, la surface occupée par la myoglobine est au minimum de 7 nm². On peut donc tout à fait envisager une désorption de l'eau sur une surface équivalente lors de l'adsorption de la protéine.

L'adsorption de la myoglobine reste toutefois un processus associé à un gain d'entropie (voir chap. 4, §5). Si toute la variation d'entropie est compensée par la désorption des molécules d'eau, cela représente 300 molécules d'eau, soit une surface de 20 à 30 nm². Cela reste inférieur à la surface maximale de 50 nm² calculée pour une myoglobine totalement déstructurée (voir chap. 5, §1). Une surface occupée par la myoglobine de 20 à 30 nm² serait tout à fait cohérente au vu de la perte partielle de structure de la protéine adsorbée. Pour aller plus loin, une étude AFM avec une grande résolution pourrait peut-être permettre de voir un « pavage » de la myoglobine sur la surface.

L'analyse de la densité d'états vibrationnels de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice montre que :

i) le nombre de modes de vibration à basse fréquence de la myoglobine diminue de 20% lors de l'adsorption,
ii) l'interaction entre les résidus et la silice conduit à une diminution de l'entropie vibrationnelle de la myoglobine de l'ordre de -1.10^3 $cal.K^{-1}.mol^{-1}$,
iii) la désorption des molécules d'eau adsorbées sur la silice par la myoglobine peut compenser la variation d'entropie de la protéine.

L'étude des modes de vibration de la myoglobine adsorbée nous renseigne ainsi de manière indirecte sur les mécanismes d'interaction entre myoglobine et surface : le nombre de modes de vibration à basse fréquence de la protéine diminue et serait compensé par la désorption des molécules d'eau de la surface de la silice lors de l'adsorption de la myoglobine, sur une surface égale à celle occupée par la protéine.

4. Discussion

Ces résultats montrent très clairement que la dynamique de la myoglobine est fortement modifiée lors de l'adsorption : la transition dynamique de la protéine semble totalement supprimée et les modes de vibration à basse fréquence sont réduits de 20%. Une disparition de la transition

dynamique d'une protéine en solution est très rare, ce phénomène étant habituellement restreint aux protéines totalement déshydratées. Cela montre que l'adsorption immobilise une partie de la protéine sur la surface et bloque les mouvements de diffusion intramoléculaire qui permettent la transition.

Ces résultats sont cohérents avec les quelques études d'autres systèmes réalisées par fluorescence et par RMN qui indiquaient une diminution de la dynamique des protéines adsorbées (*11, 16*). Cette étude permet de confirmer cette tendance sur un autre système et à l'aide d'une autre technique expérimentale.

L'explication d'un gain d'entropie par augmentation du nombre de degrés de liberté de la protéine adsorbée du modèle de Norde n'est donc pas valable. La perte de structure de la protéine permet d'établir plus de points de contact avec la surface par étalement mais s'accompagne d'une diminution de la mobilité de la protéine. Le gain d'entropie mesuré lors de l'adsorption pourrait être lié à la déshydratation de la surface hydrophile sur laquelle des molécules d'eau sont elles aussi immobilisées. Il serait intéressant d'étudier la dynamique de protéines adsorbées pour des systèmes très différents où des pertes très importantes d'entropie sont mesurées lors de l'adsorption (voir chap. 4, Fig. 4-16).

De plus, les protéines les plus flexibles et riches en résidus basiques sont celles qui ont le plus d'affinité pour l'adsorption, tandis que les protéines rigides pauvres en résidus basiques ne s'adsorbent pas ou seulement de manière transitoire. Les contributions enthalpiques restent une contribution défavorable par rupture de liaisons faibles s'il y a perte de structure et une contribution favorable lorsqu'un maximum d'interactions est établi avec la surface. Les protéines rigides perdraient moins d'entropie lors de l'adsorption que les protéines plus flexibles, leur non adsorption est donc probablement enthalpique, liée à un nombre insuffisant d'interactions avec la surface du fait d'un faible nombre de résidus basiques et d'une structure peu déformable qui ne permet pas un étalement de la protéine sur la surface. Au contraire, les protéines flexibles peuvent s'étaler sur la surface, ce qui permet un gain important d'entropie par désorption des molécules d'eau, et une augmentation des interactions entre résidus basiques et surface.

Pourtant, la myoglobine n'est pas totalement « étalée » sur la surface puisqu'elle conserve une partie de sa structure secondaire, peut-être du fait de régions plus rigides et peu propices à interagir avec la surface, comme l'hème.

Pourrait-on inverser le raisonnement en faisant l'hypothèse qu'une surface qui n'adsorbe pas de molécules d'eau n'adsorbera pas de protéines ? Pour augmenter la biocompatibilité des matériaux, il

est courant de fonctionnaliser les surfaces avec des polymères (PEG), ce qui empêche l'adsorption des protéines. Cet effet est-il purement stérique (c'est l'image du polymère dont les longues chaînes « balayent » la solution) ou d'autres mécanismes peuvent-ils jouer ? La fonctionnalisation pourrait supprimer les sites d'adsorption des protéines en supprimant à la fois les molécules d'eau immobilisées (et la compensation entropique) et les sites chargés (et la composante enthalpique) pour rendre l'adsorption défavorable du point de vue thermodynamique.

D'autre part, du point de vue de l'état de la protéine adsorbée, les modifications de dynamique de la myoglobine sont au moins aussi importantes que les modifications de structure. Cela montre que l'état de la protéine adsorbée est très différent, du point de vue dynamique, de celui d'une protéine dénaturée.

Il serait intéressant de poursuivre cette étude à d'autres échelles de temps, pour voir si le processus observé à l'échelle de la picoseconde se propage à des échelles de temps supérieures (Fig. 6-1). Une étude par RMN du solide peut être bien adaptée à ce type de système. La dynamique des résidus tryptophane, étudiée par anisotropie de fluorescence, apporterait aussi des informations sur une large gamme de temps caractéristiques.

Des sondes encore plus locales pourraient aussi être utilisées afin de voir si la modification de la dynamique à l'échelle globale de la protéine a des répercussions sur la dynamique locale d'éléments « clés » comme le fer de l'hème, qui pourrait être sondé par spectroscopie Mössbauer. En effet, la dynamique globale de la protéine est, selon certains auteurs, liée à la dynamique locale de l'atome de fer, grâce à la liaison entre l'atome de fer et l'histidine proximale (*45*). Une perturbation extérieure de la dynamique globale de la myoglobine (puisque l'hème ne semble pas affecté directement par l'adsorption) peut-elle conduire par couplage à une modification de la dynamique du fer ?

Les points clés

Les résultats obtenus lors de l'étude de la dynamique de la myoglobine et des protéines de levure adsorbées sur les nanoparticules de silice peuvent être résumés :

- La dynamique de la myoglobine adsorbée sur les nanoparticules de silice à l'échelle de la picoseconde à la dizaine de picoseconde, associée aux fluctuations de la structure de la protéine de quelques Å, peut être sondée par diffusion incohérente élastique et inélastique de neutrons en solution.

- Le déplacement carré moyen des atomes d'hydrogène de la myoglobine adsorbée ne présente pas de transition dynamique à 200 K caractéristique de la myoglobine libre en solution, ce qui n'a jamais été observé pour une protéine en solution. La distribution de conformations de la myoglobine adsorbée serait limitée par rapport à la myoglobine en solution. La dynamique de la myoglobine diminue lors de l'adsorption sur les nanoparticules de silice.

- L'adsorption sur les nanoparticules a un effet global sur la dynamique de la myoglobine et ne touche pas seulement les résidus en interaction directe avec la surface.

- Le nombre de modes de vibration à basse fréquence et l'entropie vibrationnelle de la myoglobine diminue de 20% lors de l'adsorption

- L'analyse thermodynamique de l'adsorption suggère que la perte d'hélicité et la diminution de la dynamique de la protéine défavorables à l'adsorption sont compensées par la formation d'interactions électrostatiques entre résidus basiques et surface de silice et par la désorption des molécules d'eau de la surface par la myoglobine.

Bibliographie

1. Yonetani T., Kanaori K. (2013) How does hemoglobin generate such diverse functionality of physiological relevance?, *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*.
2. Bhabha G., Lee J., Ekiert D. C., Gam J., Wilson I. A., Dyson H. J., Benkovic S. J., Wright P. E. (2011) A Dynamic Knockout Reveals That Conformational Fluctuations Influence the Chemical Step of Enzyme Catalysis, *Science 332*, 234-238.
3. Dobbins S. E., Lesk V. I., Sternberg M. J. E. (2008) Insights into protein flexibility: The relationship between normal modes and conformational change upon protein-protein docking, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105*, 10390-10395.
4. Valerio M., Colosimo A., Conti F., Giuliani A., Grottesi A., Manetti C., Zbilut J. P. (2005) Early events in protein aggregation: Molecular flexibility and hydrophobicity/charge interaction in amyloid peptides as studied by molecular dynamics simulations, *Proteins-Structure Function and Bioinformatics 58*, 110-118.
5. Haouz A., Glandières J. M., Alpert B. (2001) Involvement of protein dynamics in enzyme stability: The case of glucose oxidase, *FEBS Letters 506*, 216-220.
6. Karplus M., McCammon J. A. (1981) The internal dynamics of globular proteins, *Crc Critical Reviews in Biochemistry 9*, 293-349.
7. Zanotti J.-M. (2005) Vibrations et relaxations dans les molécules biologiques. Apports de la diffusion incohérente inélastique de neutrons, *J. Phys. 130*, 87-113.
8. Yon J. M., Perahia D., Ghélis C. (1998) Conformational dynamics and enzyme activity, *Biochimie 80*, 33-42.
9. Frauenfelder H., Petsko G. A. (1980) Structural dynamics of liganded myoglobin, *Biophysical Journal 32*, 465-483.
10. Jacrot B., Cusack S., Dianoux A. J., Engelman D. M. (1982) Inelastic neutron scattering analysis of hexakinase dynamics and its modification on binding of glucose, *Nature 300*, 84-86.
11. Czeslik C., Royer C., Hazlett T., Mantulin W. (2003) Reorientational dynamics of enzymes adsorbed on quartz: A temperature-dependent time-resolved TIRF anisotropy study, *Biophysical Journal 84*, 2533-2541.
12. Parak F., Knapp E. W., Kucheida D. (1982) Protein dynamics: Mössbauer spectroscopy on deoxymyoglobin crystals, *Journal of Molecular Biology 161*, 177-194.
13. Alpert B., Elmohsni S., Lindqvist L., Tfibel F. (1979) Transient effects in the nanosecond laser photolysis of carboxyhemoglobin - Cage recombination and spectral evolution of the protein, *Chemical Physics Letters 64*, 11-16.
14. Pin S., Valat P., Tourbez H., Alpert B. (1986) CO cage recombination in hemoglobin - Picosecond photolysis and nanosecond observation, *Chemical Physics Letters 128*, 79-83.
15. Mittermaier A., Kay L. E. (2006) New tools provide new insights in NMR studies of protein dynamics, *Science 312*, 224-228.
16. Drobny G. P., Long J. R., Shaw W. J., Cotten M., Stayton P. S. (2007) Structure and Dynamics of Proteins Adsorbed to Biomaterial Interfaces, In *eMagRes*, John Wiley & Sons, Ltd.
17. Johnson R. S., Walsh K. A. (1994) Mass spectrometric measurement of protein amide hydrogen exchange rates of apo- and holo-myoglobin, *Protein Science 3*, 2411-2418.
18. Buijs J., Ramström M., Danfelter M., Larsericsdotter H., Håkansson P., Oscarsson S. (2003) Localized changes in the structural stability of myoglobin upon adsorption onto silica particles, as studied with hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Journal of Colloid and Interface Science 263*, 441-448.
19. Doster W., Cusack S., Petry W. (1989) Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering, *Nature 337*, 754-756.
20. Norde W. (2008) My voyage of discovery to proteins in flatland ... and beyond, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 61*, 1-9.
21. Pastor I., Ferrer M. L., Lillo M. P., Gomez J., Mateo C. R. (2007) Structure and dynamics of lysozyme encapsulated in a silica sol-gel matrix, *Journal of Physical Chemistry B 111*, 11603-11610.
22. Gottfried D. S., Kagan A., Hoffman B. M., Friedman J. M. (1999) Impeded rotation of a protein in a sol-gel matrix, *Journal of Physical Chemistry B 103*, 2803-2807.
23. Hagen S. J., Hofrichter J., Eaton W. A. (1996) Geminate rebinding and conformational dynamics of myoglobin embedded in a glass at room temperature, *Journal of Physical Chemistry 100*, 12008-12021.
24. Sears V. F. (1992) Neutron scattering lengths and cross sections, *Neutron News 3*, 26-37.

25. Ringe D., Petsko G. A. (2003) The 'glass transition' in protein dynamics: what it is, why it occurs, and how to exploit it, *Biophysical Chemistry 105*, 667-680.
26. Kaposi A. D., Vanderkooi J. M., Wright W. W., Fidy J., S. S. S. (2001) Influence of static and dynamic disorder on the visible and infrared absorption spectra of carbonmonoxy horseradish peroxidase, *Biophysical Chemistry 81*, 3472-3482.
27. Steinbach P. J., Ansari A., Berendzen J., Braunstein D., Chu K., Cowen B. R., Ehrenstein D., Frauenfelder H., Johnson J. B., Lamb D. C., Luck S., Mourant J. R., Nienhaus G. U., Ormos P., Philipp R., Xie A. H., Young R. D. (1991) Ligand binding to heme proteins - Connection between dynamics and function, *Biochemistry 30*, 3988-4001.
28. Ostermann A., Waschipky R., Parak F. G., Nienhaus G. U. (2000) Ligand binding and conformational motions in myoglobin, *Nature 404*, 205-208.
29. Becker T., Hayward J. A., Finney J. L., Daniel R. M., Smith J. C. (2004) Neutron frequency windows and the protein dynamical transition, *Biophysical Journal 87*, 1436-1444.
30. Pérez J., Zanotti J.-M., Durand D. (1999) Evolution of the internal dynamics of two globular proteins from dry powder to solution, *Biophysical Journal 77*, 454-469.
31. Stadler A. M., Garvey C. J., Bocahut A., Sacquin-Mora S., Digel I., Schneider G. J., Natali F., Artmann G. M., Zaccai G. (2012) Thermal fluctuations of haemoglobin from different species: adaptation to temperature via conformational dynamics, *J. R. Soc. Interface 9*, 2845-2855.
32. Ferrand M., Dianoux A. J., Petry W., Zaccai G. (1993) Thermal motions and function of bacteriorhodopsin in purple membranes - Effects of temperature and hydration studied by neutron scattering, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90*, 9668-9672.
33. Douzou P., Keh E., Balny C. (1979) Cryoenzymology in aquous media - micellar solubilized water clusters, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76*, 681-684.
34. Zheng W. J., Brooks B. R., Thirumalai D. (2006) Low-frequency normal modes that describe allosteric transitions in biological nanomachines are robust to sequence variations, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103*, 7664-7669.
35. Brooks B., Karplus M. (1985) Normal modes for specific motions of macromolecules - Application to the hinge bending mode of lysozyme, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82*, 4995-4999.
36. Tama F., Sanejouand Y. H. (2001) Conformational change of proteins arising from normal mode calculations, *Protein Eng. 14*, 1-6.
37. Fischer S., Smith J. C., Verma C. S. (2001) Dissecting the vibrational entropy change on protein/ligand binding: Burial of a water molecule in bovine pancreatic trypsin inhibitor, *Journal of Physical Chemistry B 105*, 8050-8055.
38. Balog E., Smith J. C., Perahia D. (2006) Conformational heterogeneity and low-frequency vibrational modes of proteins, *Physical Chemistry Chemical Physics 8*, 5543-5548.
39. Levitt M., Sander C., Stern P. S. (1985) Protein normal mode dynamics - Trypsin inhibitor, crambin, ribonuclease and lysozyme, *Journal of Molecular Biology 181*, 423-447.
40. Dunitz J. D. (1995) Win some, lose some - Enthalpy entropy compensation in weak intermolecular interactions, *Chemistry & Biology 2*, 709-712.
41. Carrington B. J., Mancera R. L. (2004) Comparative estimation of vibrational entropy changes in proteins through normal modes analysis, *Journal of Molecular Graphics & Modelling 23*, 167-174.
42. Macquarrie D. (2000) *Statistical mechanics*, University Science Books, Sausalito, CA.
43. Musat R., Renault J. P., Candelaresi M., Palmer D. J., Le Caer S., Righini R., Pommeret S. (2008) Finite Size Effects on Hydrogen Bonds in Confined Water, *Angew. Chem.-Int. Edit. 47*, 8033-8035.
44. Fripiat J. J., Jelli A., Poncelet G., Andre J. (1965) Thermodynamic properties of adsorbed water molecules and electrical conduction in Montmorrillonites and silicas, *Journal of Physical Chemistry 69*, 2185-2197.
45. Melchers B., Knapp E. W., Parak F., Cordone L., Cupane A., Leone M. (1996) Structural fluctuations of myoglobin from normal-modes, Mossbauer, Raman, and absorption spectroscopy, *Biophysical Journal 70*, 2092-2099.

CHAPITRE 7
Activité des protéines adsorbées

Relativement peu d'études de l'activité des protéines adsorbées portent sur des systèmes non enzymatiques. La plupart des études se rapportent à des enzymes immobilisées sur une surface, domaine d'étude bien documenté et qui a récemment été étendu aux nanomatériaux (*1, 2*). Lors de l'adsorption d'une enzyme sur un matériau nanostructuré, son activité peut être conservée (*3*), inhibée (*4-6*) ou au contraire augmentée (*7, 8*). La réponse de chaque système dépend à la fois de l'enzyme considérée et du type de nanomatériau (*9, 10*). Si l'activité du lysozyme est partiellement inhibée sur les NP de silice (*11*), il reste cependant difficile de prédire l'activité d'autres protéines, même lorsque celles-ci sont adsorbées sur une même surface (*3*).

La mesure de l'activité d'enzymes adsorbées sur des NP peut poser un problème d'interférence : le substrat ainsi que les cofacteurs nécessaires à l'activité enzymatique peuvent interagir tout comme la protéine avec les NP et interférer avec le protocole de mesure (*12, 13*). Pour minimiser ce type d'interférences lors des mesures d'activité, nous avons mesuré une activité de fixation de gaz, l'oxygénation de l'hémoglobine. Une étude a en effet montré que l'oxygène n'interagissait pas avec la silice colloïdale (*14*). L'activité de l'hémoglobine après désorption est également étudiée pour évaluer la réversibilité du système.

Notre étude de l'activité des protéines adsorbées sur les nanoparticules de silice est centrée sur l'hémoglobine. Cependant, nous avons également voulu déterminer l'activité de fixation de deux petites molécules en solution, azoture et imidazole, de notre seconde protéine modèle, la metmyoglobine. En effet, une étude a montré que la metmyoglobine adsorbée sur des NP d'or et d'argent peut fixer l'azoture (*15*), mais ne rapporte pas l'affinité de la protéine pour son ligand dans ces conditions. Nous avons mesuré l'affinité de la metmyoglobine adsorbée pour deux ligands différents. Pour prendre en compte de possibles interférences pour ce système, les interactions entre azoture et nanoparticules de silice ont été testées. Cette étude est rapportée dans la première partie de ce chapitre.

L'activité de l'hémoglobine est étroitement liée à sa structure tétramérique : la dissociation des sous-unités en dimères ou monomères conduit à la disparition de la coopérativité (*16*). Pour déterminer si l'hémoglobine conserve sa structure tétramérique lors de l'adsorption sur les nanoparticules de silice, nous avons mesuré la coopérativité de l'hémoglobine adsorbée. L'affinité de l'hémoglobine est

sensible aux effecteurs, tels que protons, 2,3-diphosphoglycérate (DPG) et inositol hexaphosphate (IHP). Les modifications d'activité de l'hémoglobine adsorbée dans différentes conditions de pH et en présence de DPG et d'IHP ont été étudiées. De plus, le DPG et l'IHP sont spécifiques du tétramère d'hémoglobine et ne peuvent se lier à l'hémoglobine adsorbée qui si leur site de fixation est préservé. Nous avons également étudié l'adsorption et l'oxygénation d'une hémoglobine pontée Hb DCL dont les sous-unités sont liées. Ces résultats sont présentés dans la deuxième partie de ce chapitre.

Une fois le protocole expérimental bien établi pour la mesure d'oxygénation de l'hémoglobine adsorbée, nous avons cherché à déterminer si nos observations sur l'hémoglobine de porc étaient généralisables à d'autres systèmes. Suite à une discussion avec Frédéric Galactéros du CHU Henri Mondor à Créteil, et avec Véronique Baudin-Creuza, Laurent Kiger et Michael Marden (INSERM U779) du CHU du Kremlin-Bicêtre, nous avons choisi d'étendre notre étude à l'hémoglobine humaine, à l'hémoglobine pontée Hb DCL et à une hémoglobine anormale, HbS. Cette étude nous a permis de valider le modèle choisi au cours de la thèse (Hb de porc) et d'étudier un effet de variabilité ou de sensibilité particulière de certains variants de l'hémoglobine à l'adsorption sur les NP de silice. Les résultats obtenus sur la protéine purifiée ont également été comparés à ceux réalisés à partir d'un hémolysat, environnement plus complexe mais plus pertinent du point de vue biologique.

Enfin, les modifications d'activité de l'hémoglobine adsorbée sont discutées à partir des principaux modèles de coopérativité de la littérature.

1. Fixation de ligands de la metmyoglobine

Sous sa forme native, la myoglobine peut fixer une molécule d'oxygène. Cependant, l'oxymyoglobine est instable dès la purification et s'oxyde très rapidement en metmyoglobine. Il est difficile de travailler avec une solution contenant 100% d'oxyMb sans contamination par la metMb. De plus, si nous voulons mesurer la fixation d'oxygène de la myoglobine adsorbée sur les NP de silice, il est nécessaire d'agiter longtemps la solution sous un flux d'argon pour désoxygéner la suspension, ce qui risquerait de conduire à une formation très importante de metMb. Plutôt que de travailler sur une solution instable d'oxyMb, nous avons préféré travailler directement sur la forme stable et contrôlable de la metMb.

La metmyoglobine peut fixer d'autres ligands, tels que le cyanure CN^-, l'azoture N_3^-, l'ion nitrite NO_2^-, l'ion fluorure F^- ou l'imidazole $C_3H_4N_2$. L'azoture N_3^- est un ligand chargé de petite taille qui a une

forte affinité pour la metmyoglobine (K_a = 1,5.10^4 M^{-1} à pH 7,1 (*17*)), tandis que l'imidazole est un cycle aromatique de taille plus importante et d'affinité nettement plus faible pour la myoglobine (K_a = 0,6.10^2 M^{-1} (*17*)). Etudier la fixation de l'azoture et de l'imidazole sur la metmyoglobine adsorbée sur des nanoparticules de silice permet ainsi de comparer la fixation de deux ligands aux propriétés bien différentes.

1.1 Azoture

La fixation de l'azoture sur la metmyoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice 7 nm a été mesurée en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 25°C (Fig. 7-1).

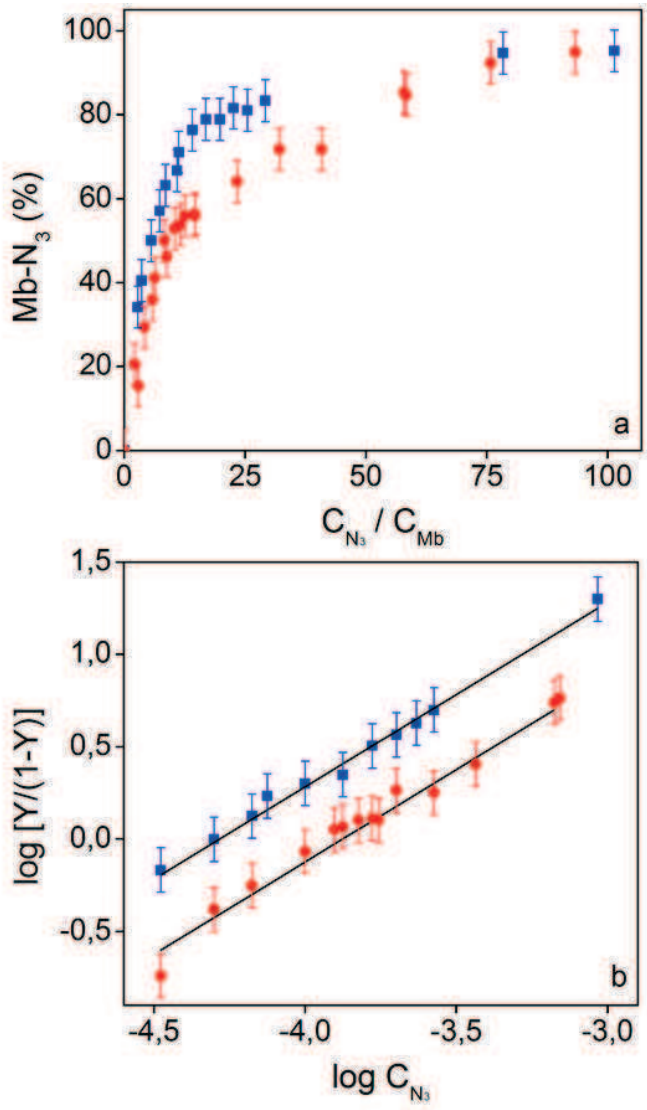


Figure 7-1. *(a) Fixation de l'azoture sur la metmyoglobine libre (■) et adsorbée sur les nanoparticules de silice 7 nm (●) en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 (C_{Mb}=10 µM, C_{NP}=15 mg/mL). (b) Diagramme de Hill et régression linéaire de pente 1 avec Y la fraction de metmyoglobine liée à l'azoture*

Dans les conditions expérimentales, 90 % de la metmyoglobine est adsorbée sur les NP de silice. L'ajout d'azoture ne provoque pas de désorption de la protéine. La metmyoglobine adsorbée peut être saturée au même niveau que la metMb libre par l'azoture comme le montre la figure 6-1a, l'hème reste donc accessible au ligand après adsorption.

La mesure de fixation de l'azoture est représentée sous la forme d'un diagramme de Hill (Fig. 7-1b). Une régression linéaire de pente 1, définie pour un système non coopératif, permet de déterminer la constante d'association K_a de la metmyoglobine pour l'azoture et donc l'affinité de la metmyoglobine libre et adsorbée pour l'azoture (voir chap. 2, §6.1) (tableau 7-1).

Conditions	$K_a^{\text{Mb libre}}$ (M^{-1})	$K_a^{\text{Mb adsorbée}}$ (M^{-1})
Tampon Phosphate pH 7,4	$1,9 \pm 0,1.10^4$	$0,8 \pm 0,1.10^4$
Tampon BisTris-HCl pH 6	$3,5 \pm 0,2.10^4$	$2,9 \pm 0,7.10^4$

Tableau 7-1. *Constantes d'association de l'azoture avec la metmyoglobine libre et adsorbée sur les nanoparticules de silice 7 nm à pH 6 et à pH 7,4*

A pH 8,7 où moins de 20 % de la metmyoglobine est adsorbée, aucune différence significative n'est observée entre la constante de fixation de la metmyoglobine libre sans NP ($K_a = 1,6 \pm 0,2.10^4$ M^{-1}) et de la metmyoglobine libre en présence de NP ($K_a = 1,3 \pm 0,3.10^4$ M^{-1}). Il n'y a donc pas d'artefact ou d'interaction avec la silice lors de la mesure de fixation de l'azoture en présence de NP. Nous avons montré qu'il n'y avait pas d'interférence entre azoture et NP lors de la mesure d'activité de la metmyoglobine adsorbée.

A pH 7,4, la constante d'association de la metmyoglobine libre correspond à la valeur de la littérature (*17*). La constante d'association de la metmyoglobine adsorbée pour l'azoture ($K_a = 0,8 \pm 0,1.10^4$ M^{-1}) est divisée par deux par rapport à celle de la metmyoglobine libre ($K_a = 1,9 \pm 0,1.10^4$ M^{-1}). On observe une diminution de l'affinité de la metmyoglobine pour l'azoture lorsque la protéine est adsorbée sur les NP de silice, mais cette diminution reste faible comparée aux variations de plusieurs ordres de grandeur observées lorsque le ligand change (*17*).

L'affinité de la metmyoglobine pour l'azoture dépend du pH de la solution : plus la solution est acide, plus l'affinité est grande (*17*). La constante d'association mesurée à pH 6 en tampon BisTris-HCl est plus grande que la constante à pH 7,4 en tampon Phosphate (notre mesure), mais aussi plus grande que la valeur de la littérature à pH 6 en tampon Phosphate ($K_a = 2,5.10^4$ M^{-1} (*17*)), par effet conjoint du tampon et du pH.

A pH 6 où 100 % de la metmyoglobine est adsorbée sur les NP de silice, la constante d'association de la metmyoglobine libre pour l'azoture (K_a = 3,5 ± 0,2.10^4 M^{-1}) n'est pas significativement supérieure à celle de la metmyoglobine adsorbée (K_a = 2,9 ± 0,7.10^4 M^{-1}). Pourtant la perte d'hélicité de la metmyoglobine adsorbée est similaire à pH 6 et à pH 7,4 (voir chap. 5, §2.2). Aucune modification des propriétés électroniques n'a par ailleurs été observée lors de l'adsorption (voir chap. 5, §4.2). La perte d'hélicité, qui représente pourtant une diminution de 50% de la structure de la protéine, n'affecte donc pas ou peu la fixation d'un ligand de la metmyoglobine.

La différence de la modification de l'affinité lors de l'adsorption à pH 6 et à pH 7,4 pourrait être expliquée par un effet de charge. Une étude a montré que des anions en solution, tels que ClO_4^-, I^- ou Br^-, pouvaient diminuer l'affinité de la myoglobine pour l'azoture (*18*), grâce à un site d'interaction proche de l'hème impliquant notamment les résidus histidine (E7), thréonine (E10) et arginine (CD3). La fixation d'un anion sur ce site diminuerait la densité de charge positive de l'hème et l'affinité de la protéine pour l'azoture. Même si cette région très proche de l'hème n'est probablement pas en interaction directe avec la surface de silice, un des sites potentiels d'adsorption implique des résidus des hélices E et F (voir chap. 5, §6). Il est possible que la surface chargée négativement de la silice ait un effet similaire à celui des anions en solution et induise une diminution de la densité de charge positive au niveau de l'hème. Le potentiel ζ, qui est un indicateur de cette charge de surface, est de -4,2 mV en tampon BisTris-HCl à pH 6 et de -20,4 mV en tampon Phosphate à pH 7,4 (voir chap. 3, §2.4). La surface des NP de silice est donc peu chargée à pH 6 comparée à pH 7,4, ce qui pourrait expliquer le plus faible effet de l'adsorption de la metmyoglobine sur la fixation de l'azoture à pH 6.

La mesure de l'affinité pour l'azoture de la myoglobine adsorbée sur des NP non chargées pourrait permettre de confirmer ou non l'hypothèse d'un effet de charge. Nous avons étudié la fixation d'un ligand non chargé sur la metmyoglobine adsorbée sur les NP de silice : l'imidazole.

1.2 Imidazole

La fixation de l'imidazole sur la metmyoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice 20 nm a été mesurée en tampon Phosphate à pH 7,4 à 25°C, conditions dans lesquelles l'imidazole est à 71% sous sa forme déprotonée de charge nulle (pKa = 7,0 à 25°C) (Fig. 7-2)(*19*).

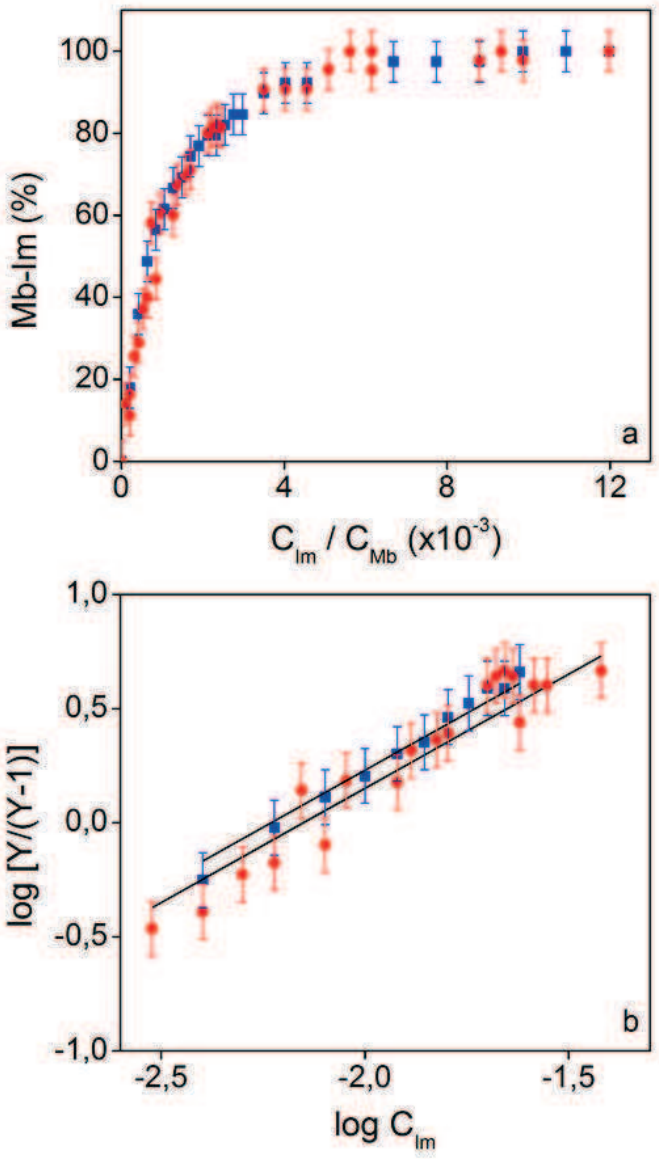


Figure 7-2. *(a) Fixation de l'imidazole sur la metmyoglobine libre (■) et adsorbée sur les nanoparticules de silice 7 nm (●) en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 (C_{Mb}=10 µM, C_{NP}=15 mg/mL). (b) Diagramme de Hill et régression linéaire de pente 1 avec Y la fraction de metmyoglobine liée à l'imidazole*

La mesure de la fixation de l'azoture ne montre aucune différence entre myoglobine libre et adsorbée : fixation et affinité de la myoglobine libre et adsorbée pour l'imidazole sont identiques. Par contre, la désorption d'une partie de la myoglobine adsorbée (18 %) est observée aux concentrations les plus élevées en imidazole. En effet, la myoglobine ayant une affinité beaucoup plus faible pour l'imidazole que pour l'azoture, une concentration bien plus élevée d'imidazole doit être utilisée pour lier 100 % de la protéine : jusqu'à 100 mM d'imidazole (6,8 g/L) pour 10 µM de myoglobine (0,2 g/L). A cette concentration, le tampon Phosphate 100 mM ne permet plus de fixer le pH à 7,4. Le pH de la solution atteint 8,2 ce qui explique la désorption partielle de la myoglobine aux concentrations les plus élevées en imidazole. Il n'y a cependant pas de désorption à des concentrations moyennes en

imidazole et aucune différence n'est observée entre les courbes de fixation de la myoglobine libre et adsorbée.

La mesure de fixation de l'imidazole sur la metmyoglobine adsorbée à pH 6 n'a pas pu être réalisée car des concentrations encore plus élevées en imidazole sont nécessaires, l'affinité étant plus faible à pH 6 (*17*), ce qui conduit à la désorption de la myoglobine. De même, nous n'avons pas réalisé la mesure en tampon Tris-HCl car le pH de la solution est supérieur à 9, ce qui risque de déstabiliser la surface de silice (voir chap. 3, §2.1). Le système n'est alors plus comparable à celui étudié à pH 7,4.

Le diagramme de Hill (Fig. 7-2) permet de calculer la constante d'association de l'imidazole avec la metmyoglobine (tableau 7-2).

Conditions	$K_a^{\text{Mb libre}}$ (M^{-1})	$K_a^{\text{Mb adsorbée}}$ (M^{-1})
Tampon Phosphate pH 7,4	$1,7 \pm 0,2.10^2$	$1,5 \pm 0,4.10^2$

Tableau 7-2. *Constantes d'association de l'imidazole avec la metmyoglobine libre et adsorbée sur les nanoparticules de silice 7 nm à pH 7,4*

La constante mesurée à pH 7,4 est supérieure à la valeur rapportée dans la littérature à pH 7,1 ($K_a = 0,6.10^2$ M^{-1}) (*17*) ce qui est très probablement lié aux différentes conditions de mesure utilisées (pH, température et tampon). Les constantes d'association de l'imidazole avec la metmyoglobine libre ($K_a = 1,7 \pm 0,2.10^2$ M^{-1}) et adsorbée sur les NP de silice 7 nm ($K_a = 1,5 \pm 0,4.10^2$ M^{-1}) sont équivalentes à l'incertitude près. L'hème reste donc accessible et disponible pour lier une molécule d'imidazole lorsque la myoglobine est adsorbée sur les NP de silice 7 nm. Aucune modification de l'affinité de la metmyoglobine adsorbée pour l'imidazole n'est observée.

Au-delà de la constante d'association, il serait intéressant de poursuivre cette étude par la mesure par microcalorimétrie ITC des variations d'enthalpie et d'entropie de fixation des ligands de la metmyoglobine adsorbée sur les NP de silice. Une autre approche, par mesure des vitesses d'entrée et de sortie des ligands pourrait également être intéressante. En effet, la constante d'association K_a est égale au rapport de la vitesse d'entrée k_{on} sur la vitesse de sortie du ligand k_{off}. Or nous ne savons pas si k_{on} et k_{off} sont identiques avant et après adsorption, ou si seul le rapport k_{on}/k_{off} reste constant.

D'une façon plus générale, il est surprenant de constater que la metmyoglobine adsorbée, bien qu'en partie déstructurée conserve presque intégralement son activité. La perte d'hélicité ne modifie pas (imidazole) ou peu (azoture) l'affinité de la protéine pour son ligand, alors qu'il est généralement admis que la perte de structure d'une protéine s'accompagne de la perte de son activité. Contrairement aux études de dénaturation en température ou en milieu dénaturant, l'étude de la

myoglobine adsorbée sur les NP de silice permet de mesurer l'affinité de la myoglobine lorsque la protéine est en partie déstructurée, sans perte d'hème (voir chap. 5). L'adsorption des protéines sur les nanomatériaux représente un nouveau stress pour les protéines (comme la température ou la pression) et pourrait permettre de nouvelles études sur la relation entre structure et activité d'une protéine sous contrainte.

L'activité de la metmyoglobine semble dominée par la formation de la liaison ligand-hème et peu sensible aux modifications structurales de la globine, ce qui pourrait être lié à la présence d'un Fe^{3+} plutôt que d'un Fe^{2+}. Une mesure de l'activité de fixation du CO par le Fe^{2+} de la myoglobine pourrait apporter une plus grande sensibilité à des modifications au niveau de la globine mais est délicate à mettre en œuvre. Il est plus simple de travailler directement sur l'oxygénation de l'hémoglobine.

2. Oxygénation de notre protéine modèle, l'hémoglobine de porc

L'étude de l'activité de l'hémoglobine adsorbée sur les nanoparticules de silice a été réalisée dans un premier temps sur notre protéine modèle, l'hémoglobine de porc, pour les mêmes raisons qui nous ont conduits à l'étudier jusqu'ici : la possibilité de purifier l'hémoglobine en grandes quantités au Laboratoire de Radiolyse (sans agrément spécifique) et la fixation d'un ligand gazeux.

L'adsorption de protéines oligomériques sur une surface a été très peu étudiée et l'hémoglobine, de par sa coopérativité, possède une signature de sa structure quaternaire visible lors de la mesure de son activité. Nous pourrons également tester la disponibilité de plusieurs sites de fixation de l'hémoglobine adsorbée : celui des molécules d'oxygène au niveau du groupement prosthétique mais également celui de deux effecteurs, le 2,3-diphosphoglycérate (DPG) et l'inositol hexaphosphate (IHP) au niveau de la globine.

Pour étudier l'activité de l'hémoglobine adsorbée sur les nanoparticules de silice, nous avons mesuré la fixation d'oxygène par la protéine, son affinité et sa coopérativité dans différentes conditions.

2.1 Oxygénation de l'hémoglobine adsorbée

L'oxygénation de l'hémoglobine de porc libre et adsorbée sur les NP de silice 20 nm a été mesurée en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6 à 25°C par tonométrie (voir chap. 2, §6.2) (Fig. 7-3).

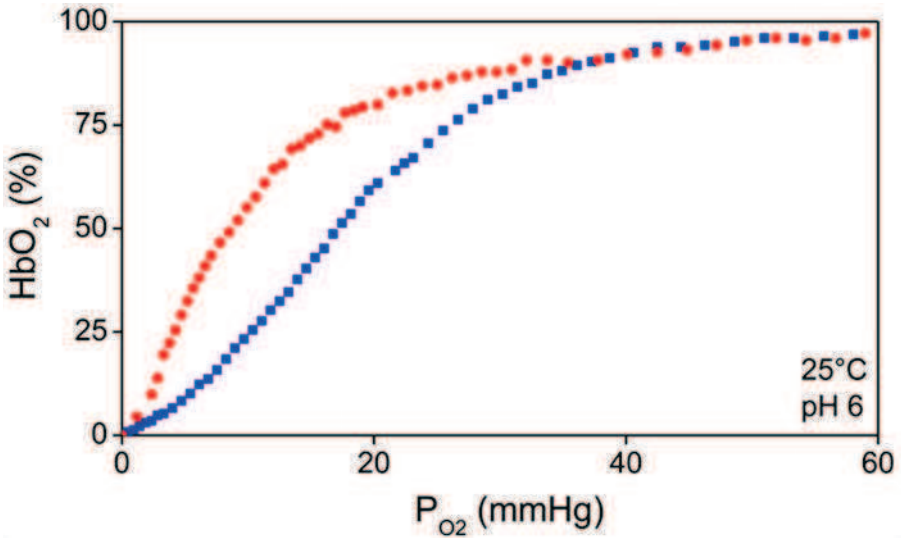


Figure 7-3. *Oxygénation de l'hémoglobine de porc libre (■) et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm (●) à 25°C en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6. L'hémoglobine est totalement adsorbée sur les NP (C_{Hb} = 50 µM, C_{NP} = 34 mg/mL)*

La courbe d'oxygénation de l'hémoglobine libre est caractérisée par sa forme sigmoïde qui témoigne de la coopérativité de l'hémoglobine, et par la pression partielle en oxygène à laquelle 50% de l'hémoglobine est oxygénée (P_{50}), indicateur de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène (plus la courbe est déplacée vers les basses pressions en oxygène, plus la P_{50} est faible, plus l'affinité est élevée). La P_{50} de l'hémoglobine de porc libre à pH 6 à 25°C est de 17,1 ± 0,5 mmHg.

Lorsque l'hémoglobine est adsorbée sur les nanoparticules de silice, un déplacement de la courbe d'oxygénation vers la gauche est observé, ce qui correspond à une augmentation de l'affinité de l'hémoglobine adsorbée. La P_{50} de l'hémoglobine de porc adsorbée sur les NP de silice à pH 6 à 25°C est de 8,7 ± 0,5 mmHg, soit une diminution de la P_{50} d'un facteur 2 lors de l'adsorption.

La courbe d'oxygénation de l'hémoglobine adsorbée a également une forme plus hyperbolique, ce qui indique une diminution de la coopérativité de la protéine adsorbée. Pour quantifier cette variation, l'oxygénation de l'hémoglobine est représentée sous la forme d'un diagramme de Hill. Une régression linéaire permet de calculer le coefficient de Hill (n), indicateur de la coopérativité de l'hémoglobine lors de la fixation de l'oxygène (*20*) (Fig. 7-4).

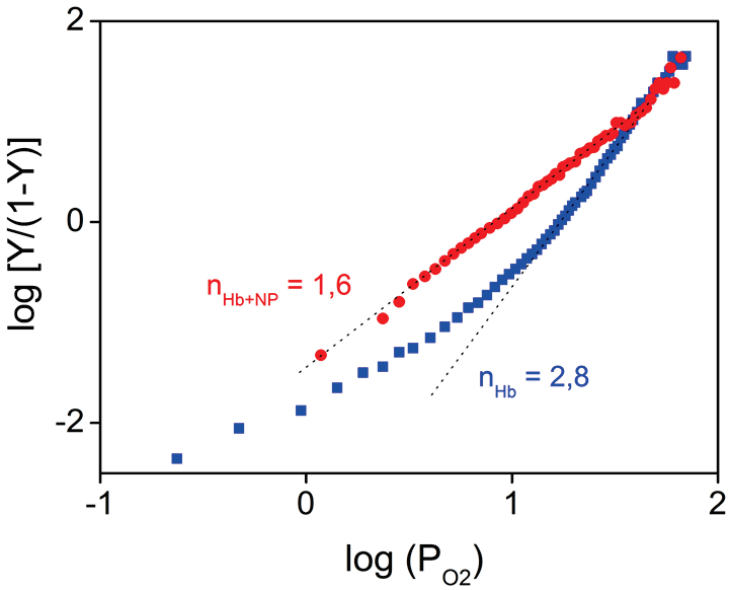


Figure 7-4. *Diagramme de Hill avec Y la fraction d'hémoglobine oxygénée de l'hémoglobine de porc libre (■) et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm (●) à 25°C en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6. La pente de la régression linéaire indiquée en pointillés correspond au coefficient de Hill (n).*

Le coefficient de Hill de l'hémoglobine libre est de 2,8 ± 0,1, valeur identique pour l'hémoglobine de porc et l'hémoglobine humaine (*21*). La fixation d'une molécule d'oxygène sur un hème augmente l'affinité des autres sites de fixation. Le coefficient de Hill de l'hémoglobine adsorbée est de 1,6 ± 0,1. Le coefficient de Hill reste supérieur à 1, valeur associée à un système non coopératif, ce qui signifie que l'hémoglobine adsorbée reste coopérative, même si ce mécanisme est moins efficace que pour l'hémoglobine libre. Puisque la coopérativité dépend de la structure quaternaire de l'hémoglobine (monomères, dimères et trimères sont non coopératifs (*16, 22, 23*)), un coefficient de Hill supérieur à 1 indique clairement que l'hémoglobine adsorbée reste structurée en tétramère et qu'il n'y a pas de dissociation de l'oligomère lors de l'adsorption de la protéine sur la surface de silice.

L'adsorption de l'hémoglobine de porc sur les NP de silice 20 nm à pH 6 à 25°C conduit à d'importantes modifications de l'activité de la protéine qui se traduisent par une augmentation d'un facteur 2 de son affinité et une diminution de sa coopérativité, sans dissociation du tétramère.

2.2 Effet des protons

L'activité de l'hémoglobine est modulée par la fixation de protons et est donc sensible au pH de la solution (*17*). Plus le pH est bas, plus l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène est faible, ce qui se traduit par un déplacement de la courbe d'oxygénation vers les pressions en oxygène plus élevées. C'est l'effet Bohr. Pour évaluer la sensibilité de l'hémoglobine adsorbée à un effet du pH,

l'oxygénation de l'hémoglobine de porc libre et adsorbée sur les NP de silice 20 nm a été comparée à pH 6, à pH 7,4 et à pH 8,7 à 25°C (Fig. 7-5).

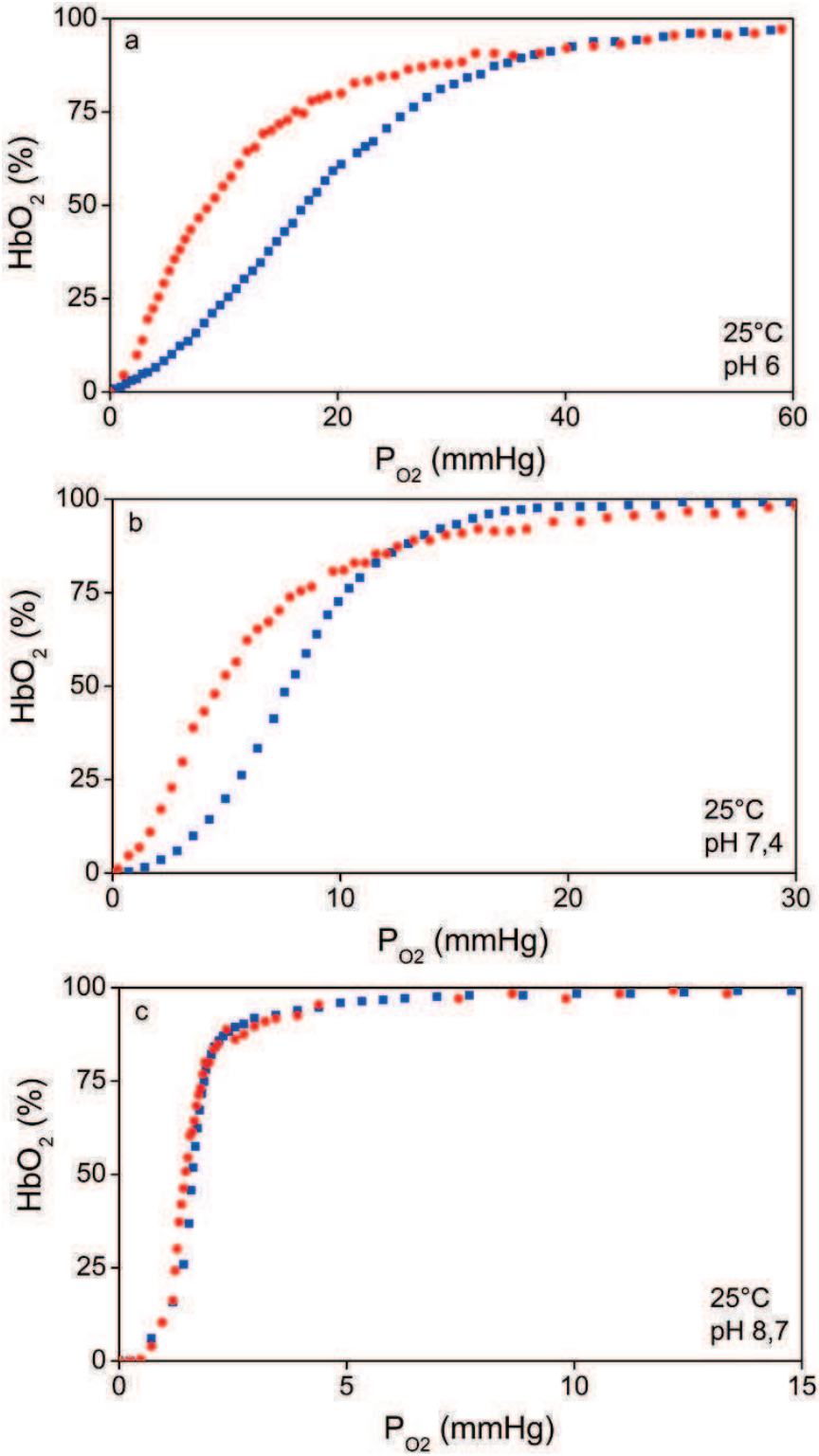


Figure 7-5. *Oxygénation de l'hémoglobine de porc libre (■) et en présence de nanoparticules de silice 20 nm (●) à 25°C en tampon 100 mM BisTris-HCl à pH 6 (a), Phosphate à pH 7,4 (b) et Tris-HCl à pH 8,7 (c). L'hémoglobine est totalement adsorbée sur les NP à pH 6 et à pH 7,4 et n'est pas adsorbée à pH 8,7 (C_{Hb} = 50 µM, C_{NP} = 34 mg/mL)*

L'effet Bohr se vérifie bien pour l'hémoglobine de porc dont la P_{50} est de 3,2 ± 0,5 mmHg à pH 8,7, de 7,7 ± 0,5 mmHg à pH 7,4 et de 17,1 ± 0,5 mmHg à pH 6 à 25°C. Les valeurs obtenues sont proches de celles de la littérature, mesurées dans des tampons différents (*24*).

A pH 8,7 l'hémoglobine n'est pas adsorbée sur les NP de silice et aucune modification de la courbe d'oxygénation n'est observée en présence de NP. Cela montre que la mesure n'est pas perturbée par la présence des NP en solution, même à forte concentration.

L'adsorption de l'hémoglobine à pH 6 et à pH 7,4 se traduit par une diminution de la P_{50} d'un facteur de l'ordre de 2, soit 8,7 ± 0,5 mmHg pour l'hémoglobine adsorbée à pH 6 et 4,7 ± 0,5 mmHg pour l'hémoglobine adsorbée à pH 7,4. De plus l'hémoglobine adsorbée à pH 6 a une affinité plus faible que l'hémoglobine adsorbée à pH 7,4 : l'effet Bohr est donc conservé sur l'hémoglobine adsorbée et l'affinité de la protéine est modulée par des effets d'amplitude similaire à la fois par l'adsorption et par le pH de la solution. Cela implique que les sites de fixation des protons restent protonables après adsorption.

Le coefficient de Hill n est calculé à partir des courbes d'oxygénation (tableau 7-3).

Conditions	P_{50} (mmHg) Hb	P_{50} (mmHg) Hb + NP	n Hb	n Hb + NP
BisTris-HCl pH 6,0 T = 25°C	17,1 ± 0,5	8,7 ± 0,5	2,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Phosphate pH 7,4 T = 25°C	7,7 ± 0,5	4,7 ± 0,5	3,0 ± 0,1	1,9 ± 0,1
Tris-HCl pH 8,7 T = 25°C	3,2 ± 0,5	3,2 ± 0,5	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1

Tableau 7-3. *P_{50} et indice de coopérativité n de l'hémoglobine de porc libre (C_{Hb} = 50 µM) et en présence de nanoparticules de silice 20 nm (C_{NP} = 34 mg/mL) en tampon 100 mM à 25°C. L'hémoglobine est totalement adsorbée sur les NP à pH 6 et à pH 7,4 et n'est pas adsorbée à pH 8,7.*

Le coefficient de Hill de l'hémoglobine libre est en moyenne de 2,9 et reste inchangé de pH 6 à pH 9. L'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice conduit à une diminution du coefficient de Hill aussi bien à pH 6 qu'à pH 7,4 (1,9 ± 0,1). L'effet de l'adsorption est donc similaire à pH 6 et à pH 7,4 et se traduit par une augmentation de l'affinité et une diminution de la coopérativité de l'hémoglobine.

Bien que l'effet Bohr soit connu depuis plus d'un siècle (*25*), les résidus directement impliqués par protonation/déprotonation ne sont pas tous identifiés avec certitude (*26*). Le tétramère d'hémoglobine compte par exemple 38 résidus histidine dont le pKa dépend de leur position dans la

protéine, de l'interaction avec le solvant et de l'état de protonation de tous les autres résidus protonables dans cette gamme de pH. Le grand nombre de résidus pouvant être impliqués dans l'effet Bohr rend délicate une attribution au sein de l'hémoglobine adsorbée. D'autres effecteurs, dont le site de fixation est bien connu, peuvent être étudiés.

2.3 Effet du DPG et de l'IHP

Le 2,3-diphosphoglycérate (DPG) est un effecteur naturel de l'hémoglobine humaine et de l'hémoglobine de porc (*27*). Le DPG est naturellement présent dans les globules rouges (C_{DPG} = 6 mM, C_{Hb} = 20 mM (*28*)) et sa fixation sur l'hémoglobine induit une diminution de l'affinité de la protéine pour l'oxygène, nécessaire au relargage de l'oxygène dans les tissus. Puisque l'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice provoque une augmentation de son affinité, nous avons testé la possibilité de contrebalancer cet effet par l'ajout de DPG. Un second effecteur, l'inositol hexaphosphate (IHP), couramment utilisé pour étudier l'activité de l'hémoglobine, a également été utilisé. Présent naturellement chez les oiseaux et les tortues (*29*), il partage le même site de fixation que le DPG mais induit une diminution plus importante de l'affinité de l'hémoglobine. La structure du DPG et de l'IHP sous leur forme protonée est présentée ci-dessous (Fig. 7-6).

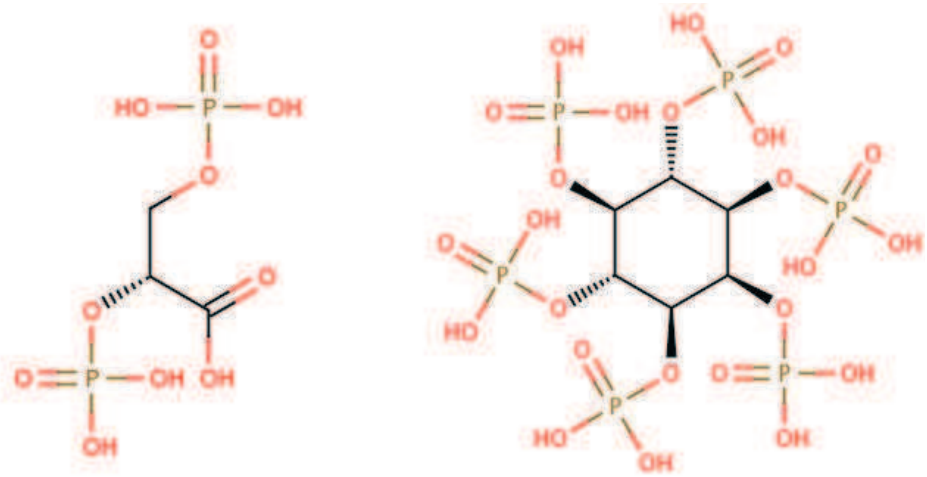


Figure 7-6. *Structure du 2,3-disphosphoglycérate (DG2.pdb) (à gauche) et de l'inositol hexaphosphate (IP6.pdb) (à droite) sous leur forme protonée*

L'oxygénation de l'hémoglobine de porc associée au DPG et à l'IHP a été mesurée sur l'hémoglobine libre et sur l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice 20 nm en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6 à 25°C, conditions dans lesquelles les effets de l'adsorption sur l'activité de l'hémoglobine sont les plus importants (Fig. 7-7). Le DPG et l'IHP se lient à l'hémoglobine avec une stœchiométrie d'une molécule par tétramère et une constante d'association de l'ordre de 10^4 M^{-1} (DPG) (*30*) à 10^7 M^{-1}

(IHP) (*31*). Nous avons travaillé avec un excès d'effecteur de 10 molécules par tétramère, soit une concentration de 125 µM pour 50 µM d'hémoglobine (exprimée par hème).

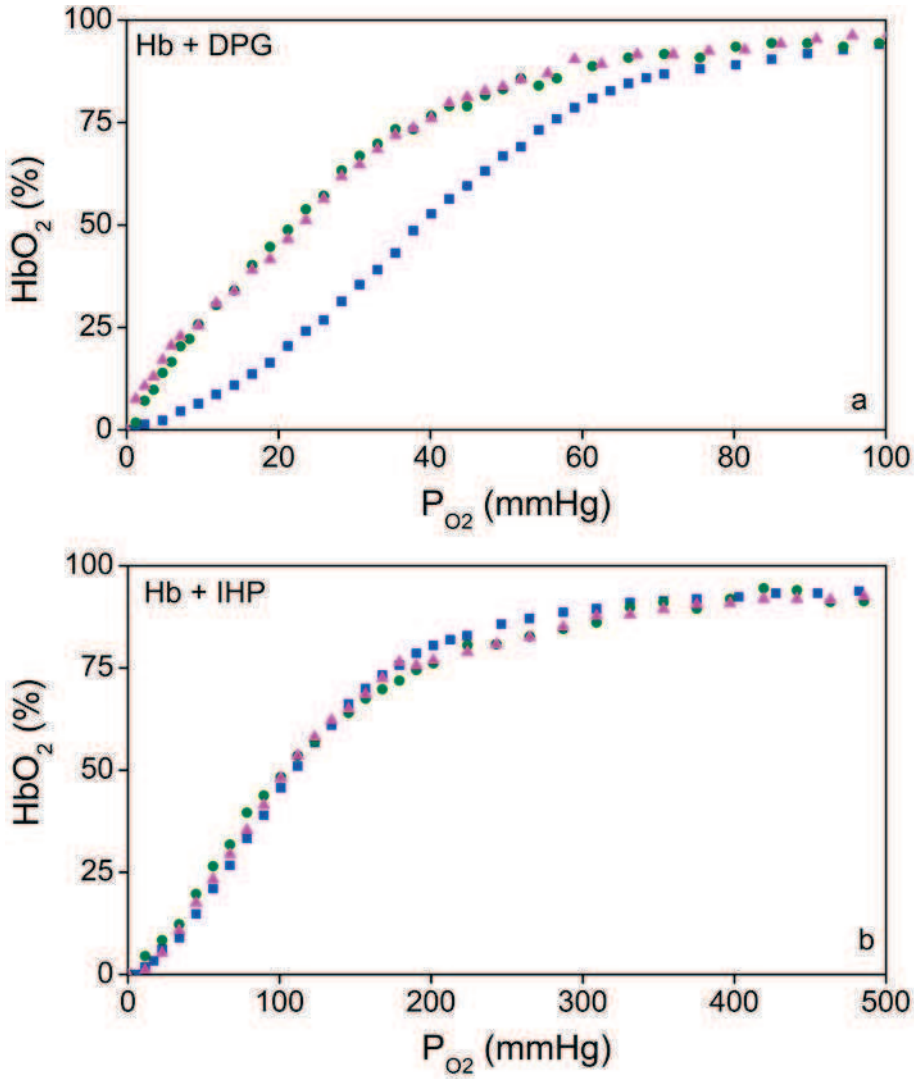


Figure 7-7. *Oxygénation de l'hémoglobine de porc libre (■) et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm à 25°C en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6 en présence de 2,3-DPG (a) et d'IHP (b). L'effecteur est ajouté soit avant adsorption (●) soit après adsorption (▲) de Hb sur les NP. Hb est totalement adsorbée sur les NP en présence des effecteurs (C_{Hb} = 50 µM, $C_{DPG,IHP}$ = 125 µM, C_{NP} = 34 mg/mL)*

La P_{50} de l'hémoglobine sans effecteur est de 17,1 mmHg. L'affinité de l'hémoglobine libre diminue d'un facteur 2 lors de la fixation du DPG (P_{50} = 38,5 ± 0,5 mmHg) et d'un facteur 6 lors de la fixation de l'IHP (P_{50} = 110 ± 1 mmHg). La coopérativité de l'hémoglobine est maintenue lors de la fixation du DPG et diminue de 2,8 à 2,2 lors de la fixation de l'IHP (tableau 7-4).

L'étude de la fixation des effecteurs sur l'hémoglobine adsorbée a été réalisée dans deux conditions : 1) l'effecteur est ajouté à l'hémoglobine libre en solution, puis l'hémoglobine liée à l'effecteur est mise en contact des NP de silice, 2) l'effecteur est ajouté à l'hémoglobine adsorbée sur les NP de

silice. Le DPG et l'IHP sont deux groupements phosphate organiques chargés négativement pour lesquels la silice n'a pas d'affinité. L'ajout du DPG et de l'IHP en large excès par rapport à l'hémoglobine n'empêche pas l'adsorption de l'hémoglobine dans le premier cas et n'induit pas de désorption de la protéine dans le second. L'hémoglobine reste totalement adsorbée sur les NP de silice lors de la mesure.

Les courbes d'oxygénation de l'hémoglobine adsorbée avec ajout du DPG et de l'IHP avant (condition 1) ou après (condition 2) adsorption sont identiques et montrent une très nette diminution de l'affinité de l'hémoglobine par rapport aux mesures réalisées sans effecteur, ce qui montre que le DPG et l'IHP sont effectivement liés à l'hémoglobine adsorbée. Dans le premier cas, la fixation du DPG et de l'IHP sur l'hémoglobine n'empêche pas son adsorption sur la silice. Dans le second cas, le DPG et l'IHP peuvent se lier à l'hémoglobine adsorbée.

Conditions	P_{50} (mmHg) Hb	P_{50} (mmHg) Hb + NP	n Hb	n Hb + NP
2,3 - DPG T = 25°C	38,5 ± 0,5	23,0 ± 0,5 (a) 22,0 ± 0,5 (b)	2,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1
IHP T = 25°C	110 ± 1	104 ± 1 (a) 104 ± 1 (b)	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1

Tableau 7-4. *P_{50} et indice de coopérativité n de l'hémoglobine de porc libre et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm en présence de 2,3-DPG et d'IHP ajoutés avant (a) ou après (b) adsorption de l'hémoglobine sur les NP en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6 à 25°C*

En présence de DPG, l'hémoglobine adsorbée (P_{50} = 22 ± 0,5 mmHg) a une plus grande affinité que l'hémoglobine libre (P_{50} = 38,5 ± 0,5 mmHg) et une plus faible coopérativité (n = 1,7). Au contraire, en présence d'IHP, l'affinité de l'hémoglobine adsorbée et de l'hémoglobine libre sont quasiment identiques (P_{50} = 104 et 110 ± 1 mmHg) sans diminution significative de la coopérativité (n= 2,1).

La diminution de la P_{50} lors de l'adsorption est du même ordre de grandeur avec et sans DPG, de plus l'augmentation de la P_{50} avec DPG est du même ordre de grandeur pour la protéine libre et adsorbée. Le DPG semble ainsi avoir le même effet allostérique sur l'hémoglobine libre et sur l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice. D'un autre point de vue, les nanoparticules de silice semblent également induire les mêmes modifications d'activité de l'hémoglobine associée ou non au DPG. Les nanoparticules de silice pourraient alors être assimilées à un nouvel effecteur de l'hémoglobine, d'un effet de même ordre de grandeur mais de sens opposé à celui du DPG. Ce serait

alors le seul effecteur positif de l'hémoglobine connu (l'augmentation de l'affinité avec le pH étant associée à une déprotonation).

Les courbes d'oxygénation de l'hémoglobine liée à l'IHP, libre et adsorbée sur les NP de silice, sont quasiment identiques. En présence d'IHP, l'activité de l'hémoglobine adsorbée est donc identique à celle de l'hémoglobine libre, sans désorption. L'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice ne perturbe pas le mécanisme d'interaction entre Hb et IHP. Pour déterminer si la fixation de l'IHP pouvait modifier la structure secondaire de l'hémoglobine adsorbée, une mesure en dichroïsme circulaire a été réalisée (Fig. 7-9).

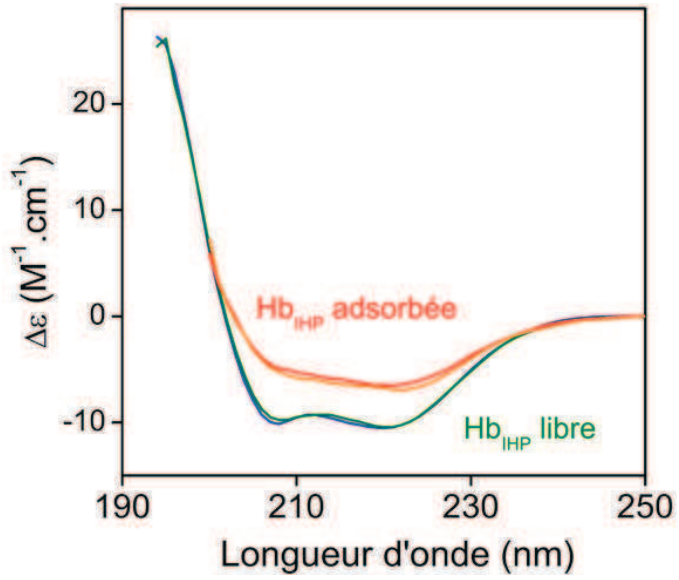


Figure 7-9. *Spectres de dichroïsme circulaire de l'hémoglobine ligandée à l'IHP libre (en vert) et adsorbée (en rouge) sur les nanoparticules de silice 20 nm, et de l'hémoglobine sans IHP libre (en bleu) et adsorbée (en orange) sur les NP de silice 20 nm en tampon BisTris-HCl 10 mM à pH 6 (C_{Hb}=10 µM, C_{NP}=6 mg/mL, C_{IHP}=25 µM)*

La perte d'hélicité de l'hémoglobine adsorbée par rapport à l'hémoglobine libre est identique avec et sans IHP. La fixation de l'IHP n'entraîne pas de « restauration » de la structure secondaire de l'hémoglobine adsorbée qui pourrait expliquer que la protéine adsorbée retrouve la même activité que la protéine libre. L'IHP compte 6 charges négatives et sa fixation pourrait affaiblir les interactions intra-protéiques dans lesquelles les résidus Val1, His2, His143 et Lys182 sont engagés. Sans permettre la restructuration de l'hémoglobine adsorbée, la fixation de l'IHP pourrait affaiblir dans une certaine mesure les interactions entre hémoglobine et surface, ce qui pourrait expliquer la très faible différence d'activité entre hémoglobine (liée à l'IHP) libre et adsorbée. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser par microcalorimétrie ITC les paramètres

thermodynamiques de fixation de l'IHP et du DPG sur l'hémoglobine libre et adsorbée, ainsi que ceux de l'adsorption de l'hémoglobine liée à l'IHP sur les nanoparticules de silice.

Une autre hypothèse pourrait cependant être avancée. Dans l'un des modèles de coopérativité (discutés dans le §4.1), la diminution de l'affinité de l'hémoglobine lors de la fixation des effecteurs est expliquée par une augmentation de la constante de vitesse k_{off}, qui est limitante par rapport à k_{on} (*32*). Jusqu'ici, rien ne nous permet de dire si l'augmentation de l'affinité de l'hémoglobine adsorbée est liée à une augmentation de k_{on} (plus de fixation) ou à une diminution de k_{off} (moins de dissociation). Si l'un des mécanismes devient prédominant lorsque l'hémoglobine est liée à l'IHP, par exemple si le k_{on} devient limitant, alors l'adsorption pourrait ne plus produire la même modification d'activité que sans IHP.

Le DPG et l'IHP se fixent tous deux dans la cavité formée par les deux chaines β de la déoxyhémoglobine. Les chaines latérales des résidus Val1-N terminale, His2, Lys82 et His 143 situés de part et d'autre des deux chaines β interagissent avec les charges négatives portées par les phosphate (*33-35*) (Fig. 7-8).

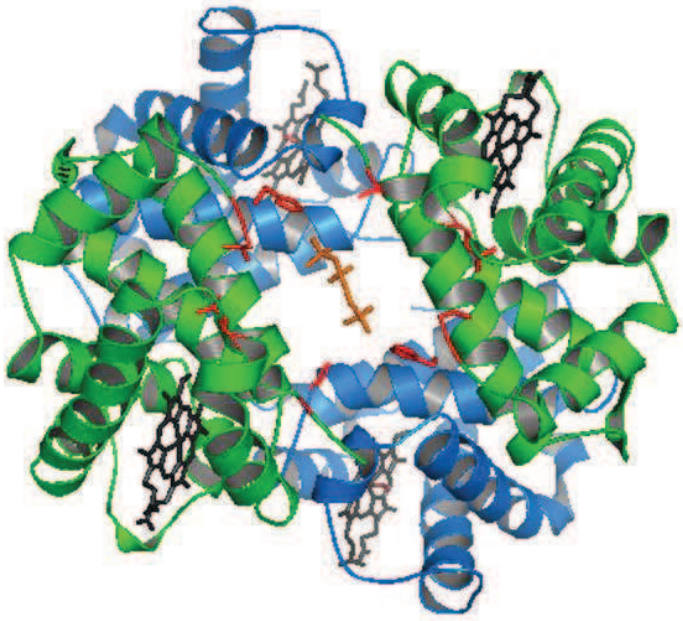


Figure 7-8. *Site de fixation du 2,3-DPG et de l'IHP (orange) sur l'hémoglobine humaine (1B86.pdb) impliquant les résidus Val1, His2, Lys82 et His 143 (rouge) de chacune des deux chaînes* β *(vert) (33)*

La fixation de ces deux effecteurs sur l'hémoglobine adsorbée sur les nanoparticules de silice et la diminution de l'affinité induite indiquent une préservation de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire du site de fixation du DPG et de l'IHP. En effet, si la fixation de l'IHP sur un dimère α ou un dimère β reste possible, la diminution de l'affinité observée est bien moindre (*36*). Il s'agit d'une

seconde preuve, avec la mesure de la coopérativité, du maintien de la structure tétramérique de l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice. Ces conclusions sont contraires à celles d'Hallaway, qui interprétait l'augmentation de l'affinité de l'hémoglobine adsorbée sur une surface de Cab-O-Sil par une dissociation de la protéine en dimères (*37*).

L'activité de l'hémoglobine adsorbée peut être modulée à souhait, dans une gamme d'affinité plus importante que celle de l'hémoglobine libre, en fonction du pH de la solution et des effecteurs présents. Si les mécanismes mis en jeu ne sont pour l'instant pas identifiés, il semble que les nanoparticules de silice puissent jouer le rôle d'effecteur en modifiant l'activité de l'hémoglobine adsorbée, à l'image du DPG ou de l'IHP mais dans un sens opposé. La réversibilité de cet effet a également été testée (voir §2.5).

Dans le cas de l'IHP, la perte de structure n'a aucune influence sur l'activité de l'hémoglobine, qui reste totalement active, d'affinité et de coopérativité identique à celle de l'hémoglobine libre. Cette observation nous conduit à deux conclusions : d'une part l'intégrité de la structure de l'hémoglobine n'est pas nécessaire pour que IHP et DPG soient actifs (modèle allostérique), d'autre part, tout comme pour la myoglobine, une perte importante d'hélicité n'empêche pas la fonctionnalité de l'hémoglobine, qui peut fixer l'oxygène avec une certaine coopérativité et qui reste sensible à l'effet Bohr et aux effecteurs. Ces résultats semblent très différents de ceux obtenus, par exemple, par mutagenèse dirigée où le remplacement d'un seul acide aminé suffit à perturber l'activité d'une protéine. Lors de l'adsorption, l'hémoglobine comme la myoglobine sont soumises à un stress qui modifie une partie très importante de la structure de la protéine, sans perte d'activité.

2.4 Effet de la température

L'affinité de l'hémoglobine des mammifères diminue avec la température, ce qui peut être lié à la réaction exothermique de fixation de l'oxygène, mais pourrait également être associé à une augmentation des fluctuations thermiques de la protéine (*32*).

Nous avons mesuré l'oxygénation de l'hémoglobine de porc libre et adsorbée sur les NP de silice 20 nm à 37°C à l'aide de l'appareil HEMOX (voir chap. 2, §6.2) (Fig. 7-10), qui permet un meilleur contrôle de la température que lors de la mesure par tonométrie. Pour différencier les deux techniques utilisées, les mesures d'oxygénation réalisées à l'aide du tonomètre sont représentées par des points, celles de l'HEMOX par des courbes.

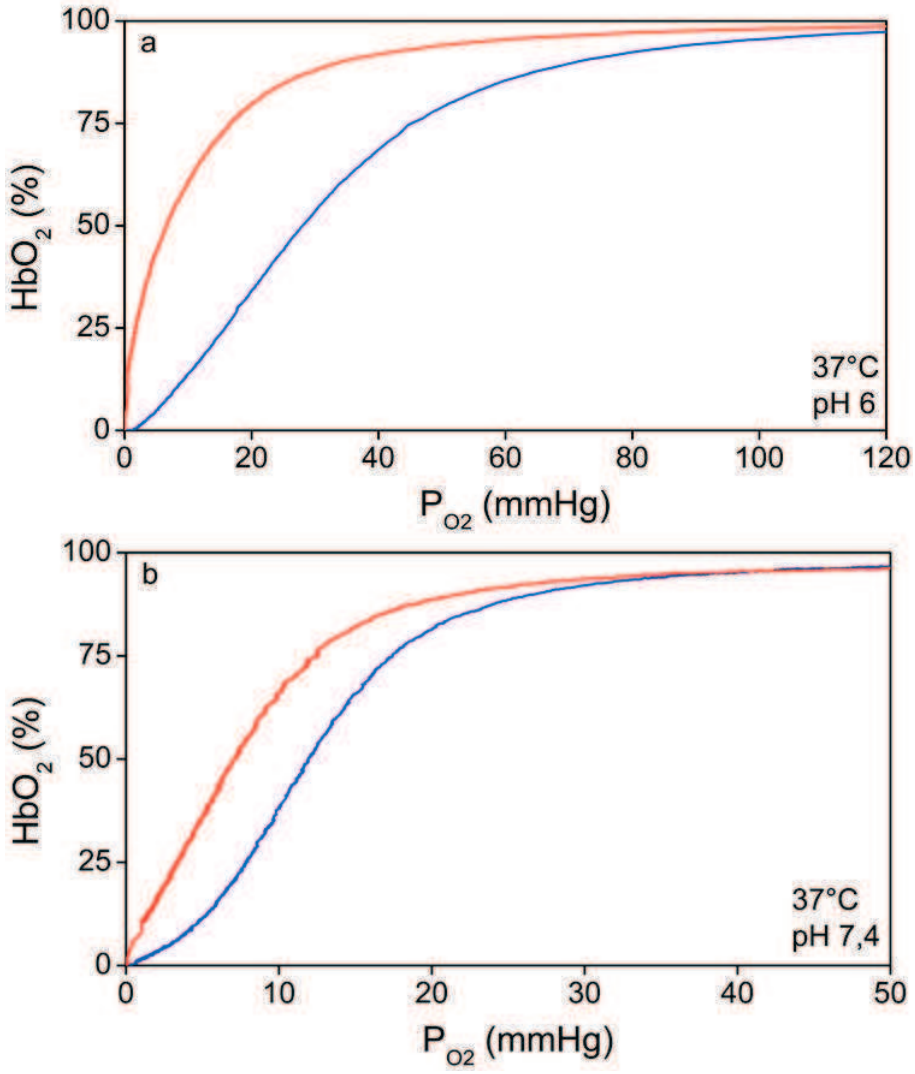


Figure 7-10. *Oxygénation de l'hémoglobine de porc libre (bleu) et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm (rouge) à 37°C (a) en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6, (b) en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4. L'hémoglobine est totalement adsorbée sur les NP (C_{Hb} = 50 µM, C_{NP} = 34 mg/mL)*

L'affinité de l'hémoglobine de porc diminue lorsque la température augmente : la P_{50} augmente de 17,1 à 26,1 mmHg entre 25 et 37°C à pH 6, et de 7,7 à 12,0 mmHg à pH 7,4. La sensibilité de l'hémoglobine de porc à la température est de l'ordre d'un facteur 1,3 pour 10°C, contre un facteur 2 pour l'hémoglobine humaine. L'activité de l'hémoglobine de porc est donc moins sensible à la température que celle de l'hémoglobine humaine (*24*).

L'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice à 37°C s'accompagne d'une augmentation de l'affinité du même ordre de grandeur que celle mesurée à 25°C : la P_{50} de l'hémoglobine adsorbée est de 10,4 ± 0,5 mmHg à pH 6 et de 7,0 ± 0,5 mmHg à pH 7,4. Le coefficient de Hill associé aux courbes d'oxygénation mesurées à 37°C est reporté ci-dessous (tableau 7-5).

Conditions	P_{50} (mmHg) Hb	P_{50} (mmHg) Hb + NP	n Hb	n Hb + NP
BisTris-HCl pH 6,0 T = 37°C	26,1 ± 0,5	10,4 ± 0,5	2,1 ± 0,1	1,7 ± 0,1
Phosphate pH 7,4 T = 37°C	12,0 ± 0,5	7,0 ± 0,5	2,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1

Tableau 7-5. *P_{50} et indice de coopérativité n de l'hémoglobine de porc libre et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6 et en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 37°C*

L'adsorption de l'hémoglobine de porc à 37°C conduit à une diminution de la coopérativité (n = 1,7 à pH 6, n = 2,0 à pH 7,4) identique à celle mesurée à 25°C à l'incertitude près (n = 1,6 à pH 6, n = 1,9 à pH 7,4). L'augmentation de l'affinité et la diminution de la coopérativité de l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice sont donc similaires à 25°C et à 37°C.

Comme pour l'effet Bohr, l'hémoglobine adsorbée reste sensible à un effet de température de la même façon que l'hémoglobine libre. L'hémoglobine adsorbée conserve donc en grande partie ses caractéristiques fonctionnelles, malgré le stress (modifications structurales) lié à l'adsorption.

Le diagramme de Hill permet également d'évaluer l'affinité de la forme oxy de plus grande affinité K_{high} et de la forme déoxy de plus basse affinité K_{low} de l'hémoglobine libre et adsorbée (Fig. 7-11). Ce calcul n'est réalisé que sur les courbes mesurées par HEMOX qui ont suffisamment de points de mesure à basse pression partielle en oxygène.

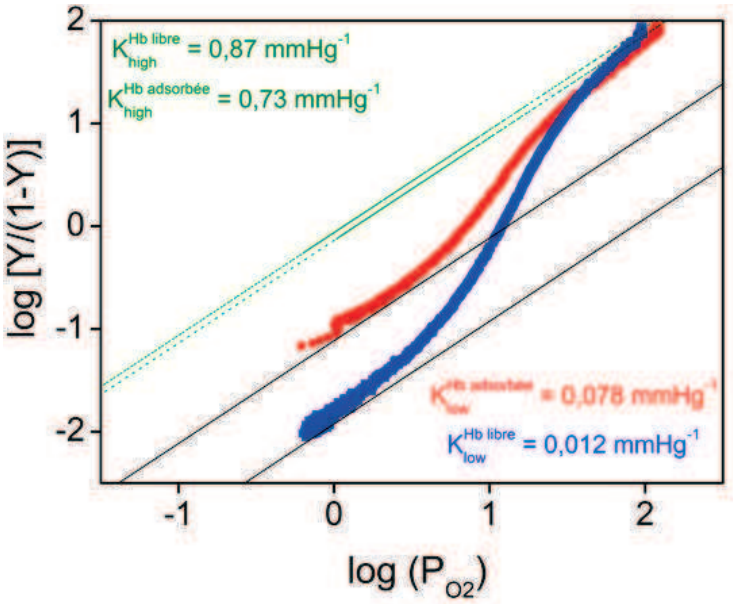


Figure 7-11. *Diagramme de Hill de l'hémoglobine de porc libre (■) et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm (●) à 37°C en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4. L'affinité K_{high} de la forme oxy et K_{low} de la forme déoxy sont calculées à partir des asymptotes représentées en pointillés (K_{high}) et en trait plein (K_{low}).*

L'analyse du diagramme de Hill montre que l'affinité de la forme oxy est très proche pour l'hémoglobine libre (K_{high} = 0,89 $mmHg^{-1}$) et adsorbée (K_{high} = 0,73 $mmHg^{-1}$), tandis que l'affinité de la forme déoxy est quasiment 10 fois plus élevée pour l'hémoglobine adsorbée (K_{low} = 0,078 $mmHg^{-1}$) que pour l'hémoglobine libre (K_{low} = 0,012 $mmHg^{-1}$). C'est donc en très grande partie l'augmentation de l'affinité de la forme déoxy de basse affinité de l'hémoglobine adsorbée qui explique l'augmentation globale de l'affinité de la protéine mesurée par la P_{50}. De ce point de vue, la baisse de coopérativité de l'hémoglobine adsorbée se comprend bien aussi : la différence d'affinité entre la forme de haute et de basse affinité de l'hémoglobine adsorbée diminue de 25% par rapport à l'hémoglobine libre (s'il n'y a plus de différence d'affinité pour la fixation de l'oxygène, alors l'hémoglobine n'est plus coopérative).

2.5 Oxygénation de l'hémoglobine désorbée

L'activité de l'hémoglobine a été mesurée après désorption de la protéine des nanoparticules de silice 20 nm en tampon Tris-HCl 100mM à pH 8,7 à 25°C et comparée à une mesure de référence dans les mêmes conditions (Fig. 7-12).

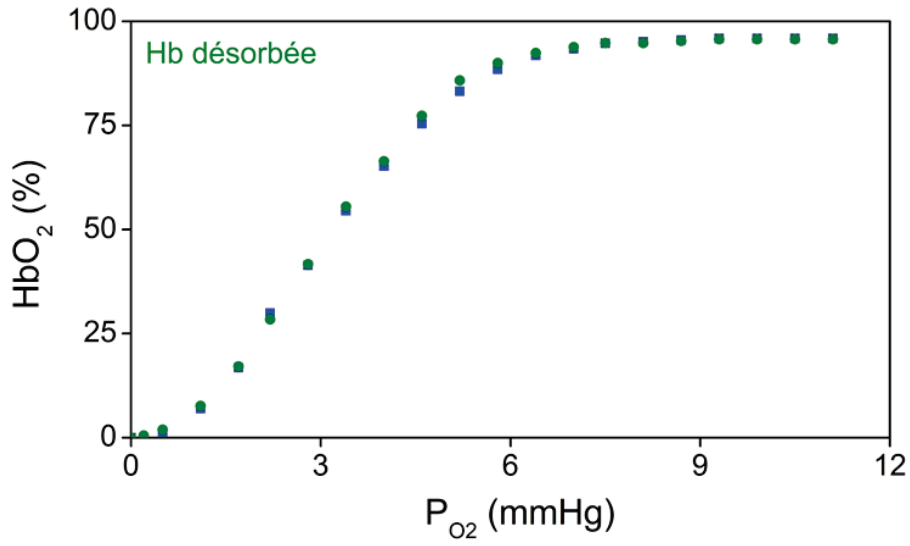


Figure 7-12. *Oxygénation de l'hémoglobine de porc libre (■) et désorbée des nanoparticules de silice 20 nm (●) en tampon Tris-HCl 100 mM à pH 8,7 à 25°C*

La désorption de l'hémoglobine est de 85% dans ces conditions. Aucune différence n'est visible entre hémoglobine libre et désorbée lors de l'oxygénation : la P_{50} est de 3,2 ± 0,5 mmHg et le coefficient de Hill de 3,0 ± 0,1 dans les deux cas (tableau 7-6).

Conditions	P_{50} (mmHg) Hb	P_{50} (mmHg) Hb désorbée	n Hb	n Hb désorbée
Tris-HCl pH 8,7 T = 25°C	3,2 ± 0,5	3,2 ± 0,5	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1

Tableau 7-6. *P_{50} et indice de coopérativité n de l'hémoglobine de porc libre et désorbée des nanoparticules de silice 20 nm en tampon Tris-HCl 100 mM à pH 8,7 à 25°C*

L'activité de l'hémoglobine désorbée est donc identique à celle de l'hémoglobine native. La désorption dans des conditions douces permet de restaurer la structure et l'activité de la protéine, ce qui démontre que les modifications induites par l'adsorption sont entièrement réversibles.

3. Ouverture sur l'hémoglobine humaine

Les nanoparticules de silice peuvent-elles être un nouvel effecteur de l'hémoglobine humaine ? Pour tester l'effet de l'adsorption sur l'activité de l'hémoglobine humaine, nous avons travaillé avec Frédéric Galactéros du CHU Henri Mondor ainsi qu'avec l'équipe de Michael Marden au CHU du Kremlin-Bicêtre. Le but de cette étude est d'une part de comparer la réponse à l'adsorption de l'hémoglobine de porc et de l'hémoglobine humaine pour valider notre modèle, et d'autre part d'étudier l'effet des nanoparticules de silice sur un ensemble d'hémoglobines présentant des caractéristiques bien différentes. Nous nous sommes intéressés à l'hémoglobine A purifiée, à l'hémoglobine S et à une hémoglobine pontée Hb DCL, puis nous avons directement mesuré l'oxygénation de l'hémoglobine en présence de NP à partir d'une suspension de globules rouges.

3.1 Adsorption et oxygénation de l'hémoglobine A

L'activité de l'hémoglobine humaine est étudiée en présence de nanoparticules de silice afin de déterminer si les modifications observées lors de l'adsorption de l'hémoglobine de porc sont reproduites lors de l'adsorption de l'hémoglobine humaine. L'isotherme d'adsorption de l'hémoglobine humaine et de l'hémoglobine de porc sur les NP de silice 20 nm sont également comparées.

Isotherme d'adsorption

L'isotherme d'adsorption de HbA sur les nanoparticules de silice 20 nm a été mesurée en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 25°C (Fig. 7-13).

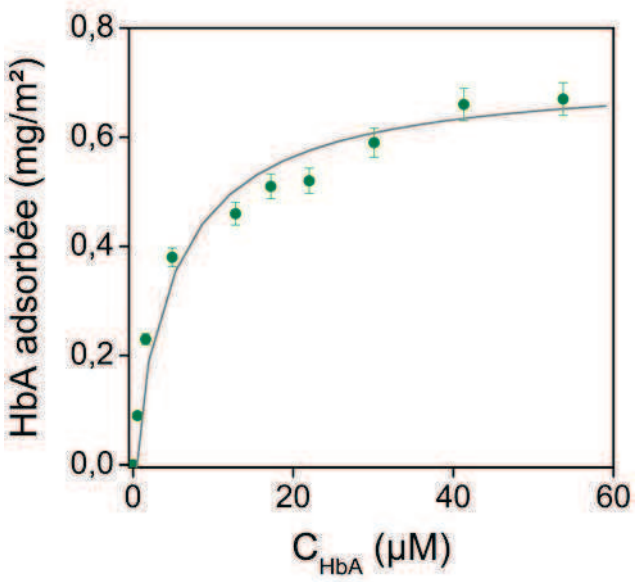


Figure 7-13. *Isotherme d'adsorption de l'hémoglobine humaine HbA sur les nanoparticules de silice 20 nm en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 25°C (●) représentée par le modèle de Langmuir (en gris)*

L'adsorption de l'hémoglobine A sur les NP de silice 20 nm augmente jusqu'à saturation à 0,64 mg/m² et est bien décrite par le modèle de Langmuir. Les caractéristiques de l'adsorption de l'hémoglobine humaine sont comparées à celles de l'hémoglobine de porc dans le tableau 7-7.

Protéine	m (mg/m²)	K_{ads} (M^{-1})
Hb de porc	0,36 ± 0,02	$3,4 \pm 0,3.10^5$
HbA humaine	0,67 ± 0,04	$1,8 \pm 0,2.10^5$

Tableau 7-7. *Comparaison de l'adsorption de l'hémoglobine humaine HbA et de l'hémoglobine de porc sur les nanoparticules de silice 20 nm en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 25°C : masse de protéine adsorbée à saturation (m) et constante d'adsorption (K_{ads})*

La quantité d'hémoglobine adsorbée est presque deux fois supérieure pour l'hémoglobine humaine par rapport à l'hémoglobine de porc dans les mêmes conditions. Au contraire, la constante d'adsorption est plus faible pour l'hémoglobine humaine. Nous avons déjà observé lors de l'adsorption de la sérum albumine par exemple (voir chap. 4, §3) que la quantité de protéine adsorbée et la constante d'adsorption n'augmentaient pas forcément simultanément. Lors de l'adsorption, la protéine « s'étale » sur la surface en augmentant les points de contact et les interactions favorables avec la surface (*38*) (voir chap. 4, §4.2). On peut penser qu'une protéine de grande affinité sera plus « étalée » et donc adsorbée en plus faible quantité (*39, 40*). Dans le cas de l'hémoglobine, une adsorption en plus grande quantité avec une plus faible affinité correspondrait à un plus faible étalement de la protéine sur la surface.

Pour essayer de comprendre la différence d'affinité entre hémoglobine humaine et hémoglobine de porc, nous avons comparé leurs séquences primaires (tableau 7-8). En effet, nous avons observé lors de l'adsorption des protéines de levure sur les NP de silice que certains déterminants physico-chimiques (par exemple le nombre de résidus chargés) pouvaient être associés à une adsorption plus ou moins favorable des protéines sur la silice (voir chap. 4, §7).

Type de résidus	Hb humaine par rapport à Hb de porc	
Polaires	Appauvrie (-10)	Arg (-2), Asp (-3), Asn (-4), Glu (+2), Gln (-3)
Basiques	Appauvrie (-2)	Arg (-2)
Acides	Appauvrie (-1)	Asp (-3), Glu (+2)
Aliphatiques	Enrichie (+8)	Ala (+2), Gly (-4), Pro (+5), Thr (+5)
Hydrophobes	Enrichie (+1)	Cys (+1), Met (+1), Ile (-1)
Aromatiques	Enrichie (+2)	Tyr (+2)

Tableau 7-8. *Homologie de l'hémoglobine humaine (41) et de l'hémoglobine de porc (42) en fonction du type de résidu*

L'hémoglobine humaine est appauvrie en acides aminés basiques, ce qui est défavorable à l'adsorption sur la silice, pilotée en partie par les interactions électrostatiques entre résidus basiques et silanols. L'hémoglobine humaine est également appauvrie en acides aminés polaires et enrichie en acides aminés aliphatiques et aromatiques, toutes ces caractéristiques sont défavorables à l'adsorption (dans le cas des protéines de levure) et peuvent expliquer la plus faible affinité de l'hémoglobine humaine pour la surface de silice comparée à l'hémoglobine de porc.

L'analyse de la séquence primaire ne tient pas compte des modifications post-traductionnelles de l'hémoglobine : notamment acétylation (αK17) et glycosylation (αK8, αK17, αK41, αK62, βK9, βK18, βK67, βK121, βK145) (*43*) qui conduisent à la perte d'une charge de surface (réaction sur le groupement NH_3^+ de la lysine) et peuvent donc jouer un rôle important lors de l'adsorption. Toutes les modifications indiquées ont été identifiées sur l'hémoglobine humaine. Il n'y a pas de données sur l'hémoglobine de porc permettant la comparaison de la protéine.

Courbes d'oxygénation sur les NP de silice 20 nm

La courbe d'oxygénation de l'hémoglobine A libre et adsorbée sur les NP de silice 20 nm a été mesurée en tampon BisTris-HCl à pH 6 et en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 37°C (Fig. 7-14).

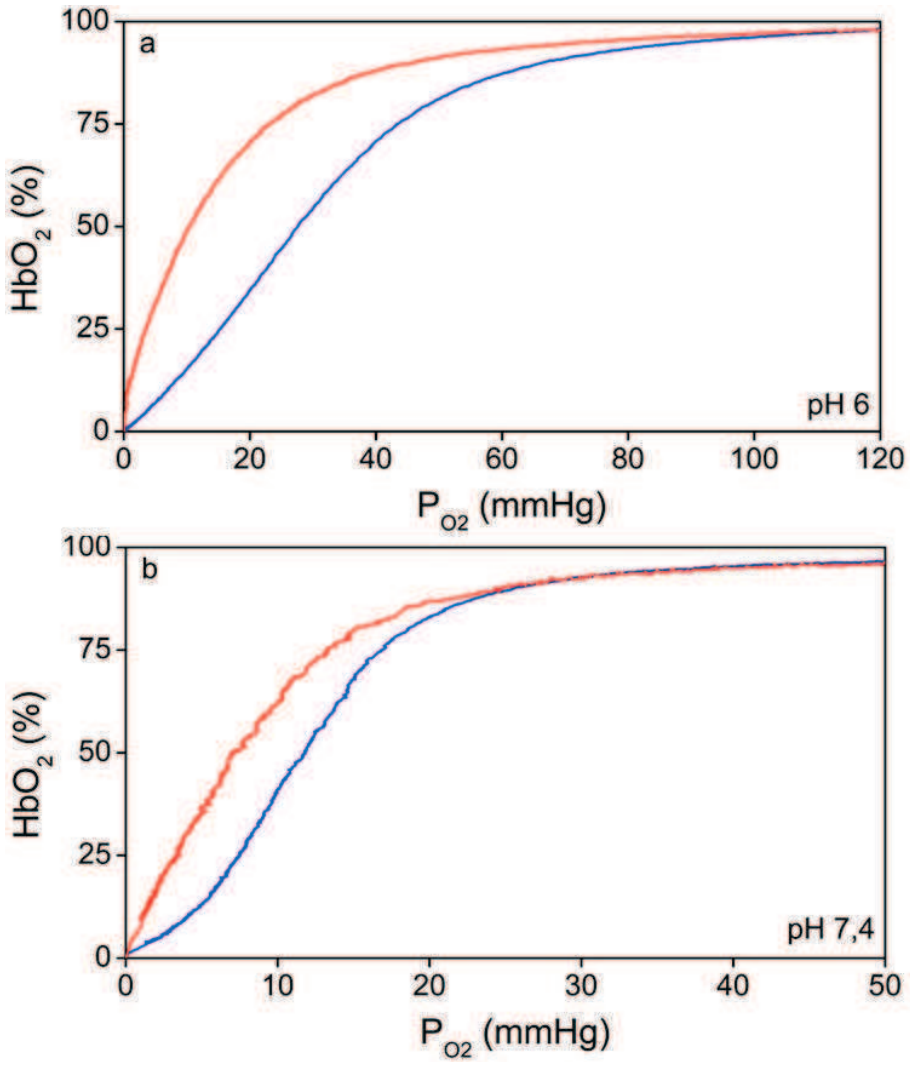


Figure 7-14. *Oxygénation de HbA humaine libre (bleu) et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm (rouge) à 37°C en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6 (a) et en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 (b). L'hémoglobine est totalement adsorbée sur les NP (C_{Hb} = 50 µM, C_{NP} = 34 mg/mL)*

L'oxygénation de HbA est caractérisée par une P_{50} de 26,0 ± 0,5 mmHg en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6 et une P_{50} de 11,7 ± 0,5 mmHg en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 37°C, ce qui est conforme aux valeurs attendues dans ces conditions (*44*). Par ailleurs, l'effet Bohr conduit aux mêmes variations d'affinité pour l'hémoglobine de porc et pour l'hémoglobine humaine. L'oxygénation de l'hémoglobine humaine adsorbée sur les NP de silice conduit à une augmentation de son affinité correspondant à une P_{50} de 10,7 ± 0,5 mmHg à pH 6 et de 7,2 ± 0,5 mmHg à pH 7,4, soit une diminution de la P_{50} due à l'adsorption du même ordre de grandeur.

La forme des courbes d'oxygénation apparaît également plus hyperbolique. Le coefficient de Hill associé à chacune des courbes est indiqué dans le tableau 7-9.

Conditions	P_{50} (mmHg) HbA	P_{50} (mmHg) HbA + NP	n HbA	n HbA + NP
BisTris-HCl pH 6,0 T = 37°C	26,0 ± 0,5	10,7 ± 0,5	2,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1
Phosphate pH 7,4 T = 37°C	11,7 ± 0,5	7,2 ± 0,5	2,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1

Tableau 7-9. *P_{50} et indice de coopérativité n de l'hémoglobine humaine HbA libre (C_{Hb} = 50 µM) et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm (C_{NP} = 34 mg/mL) en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6 et en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 37°C*

L'activité de l'hémoglobine humaine adsorbée sur les NP de silice est marquée par une diminution de la coopérativité aussi bien à pH 6 (n = 1,4 ± 0,1) qu'à pH 7,4 (n = 1,8 ± 0,1). Pour faciliter la lecture, les paramètres caractéristiques de l'oxygénation de l'hémoglobine de porc adsorbée sur les NP de silice dans les mêmes conditions sont rappelés ci-dessous (tableau 7-5).

Conditions	P_{50} (mmHg) Hb	P_{50} (mmHg) Hb + NP	n Hb	n Hb + NP
BisTris-HCl pH 6,0 T = 37°C	26,1 ± 0,5	10,4 ± 0,5	2,1 ± 0,1	1,7 ± 0,1
Phosphate pH 7,4 T = 37°C	12,0 ± 0,5	7,0 ± 0,5	2,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1

Tableau 7-5. *P_{50} et indice de coopérativité n de l'hémoglobine de porc libre et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6 et en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 37°C*

Les constantes d'affinité de la forme oxy et déoxy de l'hémoglobine libre et adsorbée ont également été déterminés sur le diagramme de Hill (Fig. 7-15).

Aucune différence d'affinité de la forme oxy de l'hémoglobine libre et adsorbée n'est visible (K_{high} = 0,68 $mmHg^{-1}$), tandis que l'affinité de la forme déoxy est nettement plus élevée pour l'hémoglobine adsorbée (K_{low} = 0,081 $mmHg^{-1}$) que pour l'hémoglobine libre (K_{low} = 0,021 $mmHg^{-1}$). Comme pour l'hémoglobine de porc (voir Fig. 7-9), c'est l'augmentation de l'affinité de la forme de basse affinité de l'hémoglobine qui est responsable de l'augmentation globale de l'affinité mesurée par la P_{50}. La diminution de la coopérativité est due à la diminution de la différence d'affinité entre la forme oxy et déoxy de l'hémoglobine.

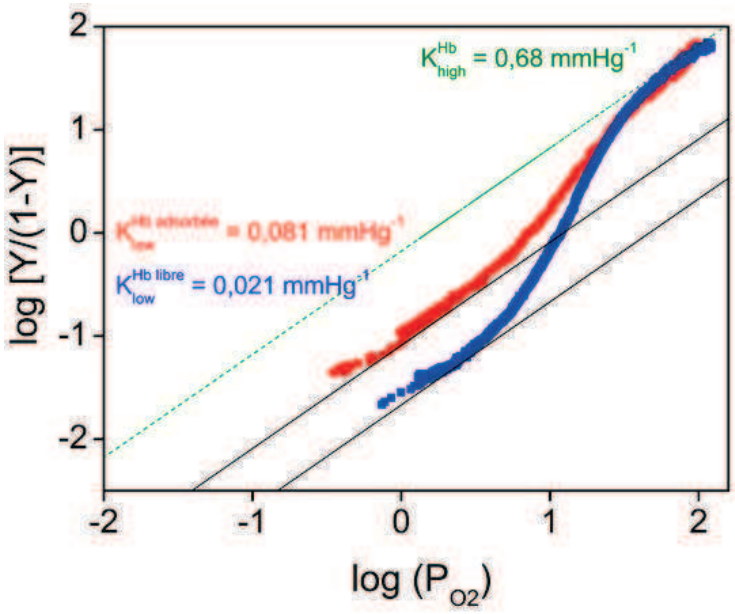


Figure 7-15. *Diagramme de Hill avec Y la fraction d'hémoglobine oxygénée de l'hémoglobine de porc libre (■) et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm (●) à 37°C en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4. L'affinité K_{high} de la forme oxy et K_{low} de la forme déoxy sont calculées à partir des asymptotes représentées en pointillés (K_{high}) et en trait plein (K_{low}).*

Les modifications d'activité de l'hémoglobine humaine et de l'hémoglobine de porc libres et adsorbées sur les NP de silice 20 nm à 37°C mesurées sur l'HEMOX sont quasiment identiques, ce qui nous permet de valider le modèle utilisé. Les mécanismes à l'origine de l'augmentation de l'affinité de la forme déoxy sont donc probablement très proches pour les deux protéines et les conclusions associées à la première pourront être appliquées à la seconde.

3.2 Oxygénation d'un hémolysat

Après l'étude des interactions entre HbA purifiée et nanoparticules de silice, nous nous sommes intéressés à l'effet des nanoparticules de silice sur l'hémoglobine non purifiée, ici une suspension de globules rouges (GR). En effet, les globules rouges contiennent d'autres protéines et petites molécules qui pourraient interagir soit avec les NP de silice, soit avec l'hémoglobine, et modifier l'impact des NP sur l'activité de l'hémoglobine. Outre l'hémoglobine et les membranes, les globules rouges sont composés de nombreuses protéines membranaires (comme les glycophorines), de protéine du cytosquelette (actine, spectrine), des enzymes responsables de la glycolyse et de la synthèse du DPG (pyruvate kinase et glucose 6-phosphate déshydrogénase) et de la cytochrome b5 réductase impliquée dans la réduction de la methémoglobine (*45, 46*). De petites molécules (glucose, DPG, ADP-ATP et NADPH-NADH) sont également présentes. La préparation de la suspension de globules rouges est détaillée dans le chap. 2, §3.

L'oxygénation d'HbA a été mesurée directement sur une suspension de globules rouges, en milieu isotonique (tampon BisTris-HCl 50mM, NaCl 140 mM à pH 7,4) à 37°C, à laquelle les NP de silice 20 nm conditionnées dans le même tampon ont été ajoutées (Fig. 7-16).

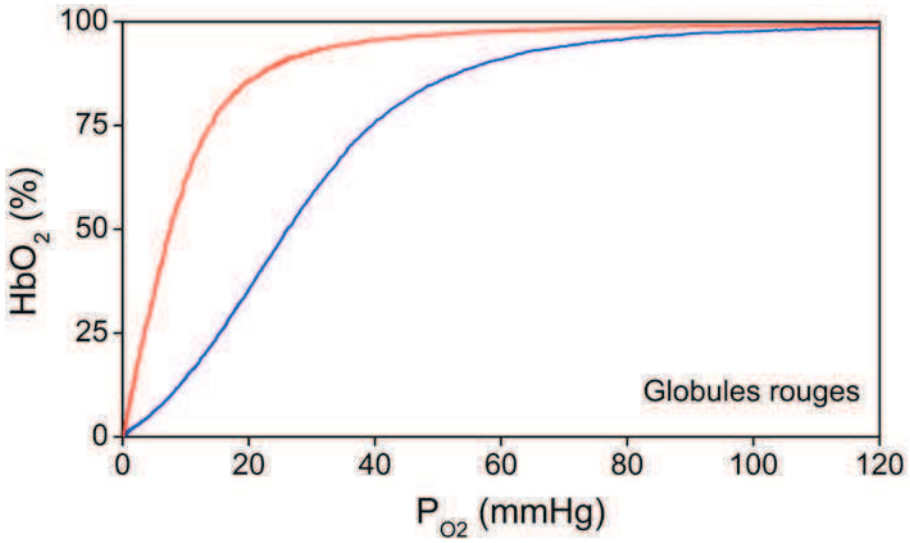


Figure 7-16. *Oxygénation d'une suspension de globules rouges contenant 50 µM d'HbA libre (bleu) en conditions isotoniques à pH 7,4 (tampon BisTris-HCl 50 mM avec 140 mM de NaCl) à 37°C et après hémolyse par les nanoparticules de silice 20 nm dans les mêmes conditions de tampon (C_{NP} = 34 mg/mL), accompagnée par une adsorption totale de HbA sur les NP*

La courbe de référence présentée ici est celle d'une suspension de globules rouges, pour laquelle nous mesurons une hémolyse de 16% au cours de la mesure. Contrairement aux mesures réalisées sur HbA purifiée, une grande partie de l'hémoglobine est encore associée à son effecteur naturel, le DPG, ce qui explique la plus faible affinité mesurée (P_{50} = 26,0 ± 0,5 mmHg).

L'ajout des nanoparticules de silice à une concentration élevée (C_{NP} = 34 mg/mL, C_{Hb} = 50 µM après hémolyse) entraîne une hémolyse rapide suivie par l'adsorption complète de l'hémoglobine libérée sur les NP. La courbe d'oxygénation est mesurée directement après hémolyse en présence de nanoparticules de silice, sans centrifugation des membranes. Le potentiel hémolytique n'a pas pu être déterminé précisément car l'hémoglobine libérée s'adsorbe immédiatement sur les NP. Plusieurs études ont cependant démontré que des micro et nanoparticules de silice amorphe (*47-49*) et cristalline (*50*) provoquaient une hémolyse partielle à totale des hématies.

Les autres protéines et molécules n'empêchent pas l'adsorption de l'hémoglobine sur les NP, probablement du fait de leur faible concentration comparée à celle de l'hémoglobine au sein des GR. Nous n'avons cependant pas analysé l'ensemble des protéines adsorbées, il est possible que d'autres protéines soient également adsorbées sur la silice ou interagissent avec l'hémoglobine adsorbée.

Une approche protéomique, telle que celle développée lors de l'étude d'un extrait cellulaire de protéine de levure, serait adaptée pour identifier les autres protéines présentes à la surface de la silice.

La courbe d'oxygénation de HbA adsorbée après hémolyse montre une plus grande affinité (P_{50} = 7,6 ± 0,5 mmHg) et une plus faible coopérativité (n = 1,9 ± 0,1) que HbA libre contenue dans les GR (tableau 7-10).

Conditions	P_{50} (mmHg) GR	P_{50} (mmHg) Hémolysat-NP	n GR	n Hémolysat-NP
GR en tampon isotonique à pH 7,4 T = 37°C	26,0 ± 0,5	7,6 ± 0,5 **hémolyse**	2,6 ± 0,1	1,9 ± 0,1 **hémolyse**

Tableau 7-10. *P_{50} et indice de coopérativité n de l'hémoglobine HbA d'une suspension de globules rouges (GR) après hémolyse par les nanoparticules de silice 20 nm en tampon isotonique BisTris-HCl 50 mM NaCl 140 mM à pH 7,4 à 37°C (C_{NP} = 34 mg/mL). L'hémolyse de la suspension de GR sans NP est de 16% au cours de la mesure.*

Pour permettre la comparaison de l'oxygénation de l'hémoglobine libre et adsorbée dans les mêmes conditions d'hémolyse, un hémolysat a été préparé (hémolyse dans l'eau distillée puis centrifugation des membranes) puis mis en contact avec les NP de silice en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 37°C (Fig. 7-17).

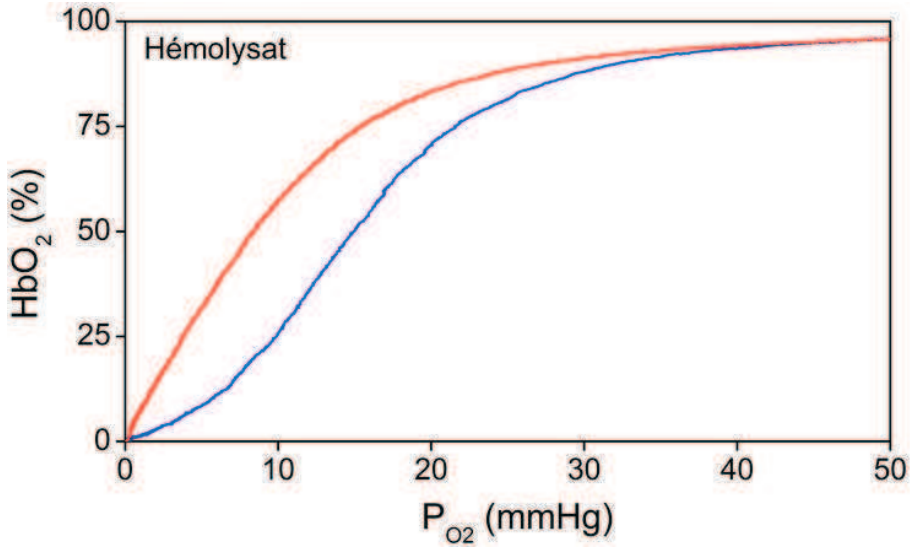


Figure 7-17. *Oxygénation d'un hémolysat (après centrifugation des membranes) contenant 50 µM d'HbA libre (bleu) et adsorbée (rouge) sur les nanoparticules de silice 20 nm à une concentration de 34 mg/mL à 37°C en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4. HbA est totalement adsorbée sur les NP.*

L'affinité de l'hémoglobine A adsorbée sur les NP de silice est bien supérieure à celle de l'hémoglobine libre dans les mêmes conditions d'hémolyse (tableau 7-11).

Conditions	P_{50} (mmHg) HbA	P_{50} (mmHg) HbA + NP	n HbA	n HbA + NP
Hémolysat Phosphate pH 7,4 T = 37°C	15,1 ± 0,5	8,3 ± 0,5	2,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1

Tableau 7-11. *P_{50} et indice de coopérativité n de l'hémoglobine d'un hémolysat, HbA libre et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm (C_{Hb} = 50 µM, C_{NP} = 34 mg/mL) en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 37°C*

Il y a donc une très bonne adéquation entre les résultats obtenus sur l'hémoglobine purifiée et sur un hémolysat. Cela signifie également que l'environnement (protéines et molécules présentes dans les globules rouges, membranes) n'a pas d'influence sur l'adsorption et sur l'augmentation de l'affinité de l'hémoglobine en présence de NP de silice.

A l'échelle moléculaire, en cas de contact direct entre hémoglobine et NP de silice, les modifications d'activité observées sont loin d'être anodines. L'augmentation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène peut en effet empêcher son relargage au niveau des tissus et conduire à une mauvaise oxygénation. Certaines mutations sont à l'origine d'une augmentation de l'affinité de l'hémoglobine et peuvent conduire, à l'échelle de l'organisme, à une érythrocytose (*51*), c'est-à-dire à une augmentation de la production d'hémoglobine et de la masse des globules rouges en réponse à une mauvaise oxygénation des tissus.

Il serait intéressant de poursuivre ces mesures à des concentrations plus faibles en nanoparticules afin d'évaluer la quantité à partir de laquelle un effet notable sur l'activité de l'hémoglobine est observé.

Peu d'études proposent un mécanisme pour expliquer l'hémolyse par les NP de silice. Pourtant une étude montrait dès 1976 que les silanols chargés négativement à la surface des particules de silice peuvent interagir avec les groupements tetraalkylammonium chargés positivement et exposés à la surface des membranes des globules rouges (*52*) (eq. 1).

$$\equiv SiO^- + {}^+N(CH_3)_3 - CH_2 - R \leftrightarrow \equiv SiO^- {}^+N(CH_3)_3 - CH_2 - R \qquad \text{(eq. 1)}$$

Il a été montré depuis que l'hémolyse dépendait de la concentration de surface en silanols (*49*) et pouvait être supprimée par la fonctionnalisation de la surface par des polymères, comme le polyéthylène glycol (PEG) (*48*). Les NP de silice 20 nm sont effectivement riches en silanols (voir chap.

3, §2.1) : l'interaction des silanols avec des cations exposés à la surface des membranes des hématies et la déformation de la membrane induite par la courbure des NP (*53*) pourraient expliquer l'hémolyse.

Nous avons observé une adsorption massive de la sérum albumine purifiée, la protéine la plus abondante du sérum, sur les NP de silice (voir chap.4, §6.1). Il serait intéressant de déterminer si après adsorption de la sérum albumine, ou après incubation des NP dans le sérum, il y a toujours hémolyse.

3.3 Oxygénation de l'hémoglobine pontée DCL

Pour mieux comprendre les mécanismes associés à la modification de l'activité de l'hémoglobine adsorbée, nous avons étudié l'adsorption d'une hémoglobine pontée, Hb DCL (Diaspirin Cross-Linked Hemoglobin), dont les chaînes α sont liées par une molécule de DBBF (Fig. 7-18). Le pontage entre les sous-unités rigidifie la structure tétramérique de l'hémoglobine, empêche la dissociation de l'oligomère et diminue la mobilité des sous-unités l'une par rapport à l'autre (*54, 55*).

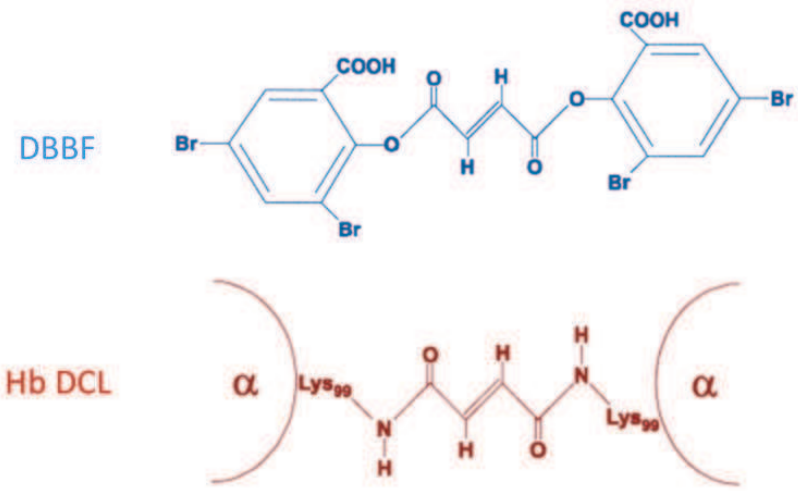


Figure 7-18. *Formation de l'hémoglobine DCL par réaction entre la molécule de DBBF et les résidus Lys99 des chaînes α de la déoxyhémoglobine. Les chaînes* β *ne sont pas représentées (d'après (56))*

Le pontage par le DBBF peut être réalisé soit sur la forme oxy entre les chaînes β (Lys82), soit sur la forme déoxy entre les chaînes α (Lys99), suivant la distance la plus courte pour chaque structure (*56, 57*). L'affinité de l'hémoglobine DCL dépend du pontage : elle augmente lorsque le pontage se fait entre les chaînes β, et diminue lorsqu'il se fait entre les chaînes α. Puisque l'adsorption sur les NP de silice augmente l'affinité de HbA, nous nous sommes intéressés à l'oxygénation de Hb DCL de plus faible affinité (pontée entre les chaînes α). Hb DCL a été synthétisée à partir de la déoxyHb A humaine.

L'isotherme d'adsorption de Hb DCL sur les NP de silice n'a pas pu être mesurée car la quantité de protéine disponible n'était pas suffisante. La courbe d'oxygénation de l'hémoglobine DCL libre et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm a été mesurée en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 37°C (Fig. 7-19). Dans les conditions de l'oxygénation, la totalité de Hb DCL est adsorbée sur les NP de silice.

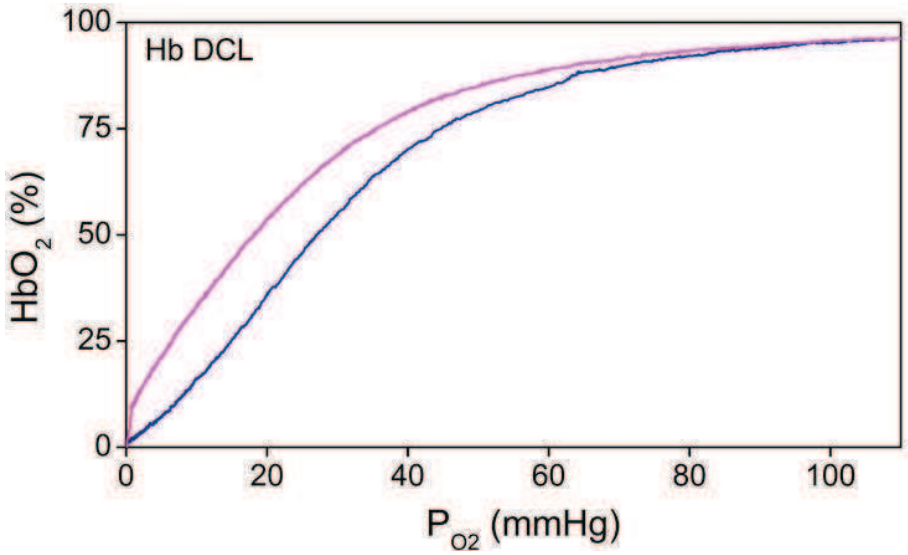


Figure 7-19. *Oxygénation de Hb DCL libre (bleu) et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm (rose) à 37°C en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4. Hb DCL est totalement adsorbée sur les NP (C_{Hb} = 20 µM, C_{NP} = 14 mg/mL)*

L'hémoglobine DCL présente une affinité plus faible que celle de l'hémoglobine A dans les mêmes conditions (P_{50} = 26,7 et 11,7 ± 0,5 mmHg respectivement). En présence de NP, elle est totalement adsorbée sur la surface de silice. L'hémoglobine DCL adsorbée présente une augmentation d'affinité de 50% par rapport à l'hémoglobine DCL libre et la forme de la courbe d'oxygénation est visiblement plus hyperbolique. La stabilisation de la structure tétramérique de l'hémoglobine n'empêche donc ni son adsorption, ni l'augmentation de l'affinité caractéristique de l'adsorption sur les NP de silice.

Le coefficient de Hill est calculé à partir des courbes d'oxygénation (tableau 7-12).

Conditions	P_{50} (mmHg) Hb DCL	P_{50} (mmHg) Hb DCL + NP	n Hb DCL	n Hb DCL + NP
Phosphate pH 7,4 T = 37°C	26,7 ± 0,5	18,0 ± 0,5	2,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1

Tableau 7-12. *P_{50} et indice de coopérativité n de l'hémoglobine humaine pontée Hb DCL libre (C_{Hb} = 20 µM) et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm (C_{NP} = 14 mg/mL) en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 37°C*

L'hémoglobine DCL est moins coopérative (n = 2,1 ± 0,1) que l'hémoglobine A (n = 2,8 ± 0,1) du fait de la rigidification de la structure tétramérique. L'hémoglobine DCL adsorbée est moins coopérative (n = 1,6 ± 0,1) que l'hémoglobine DCL libre, mais reste coopérative avec un coefficient de Hill supérieur à 1. Cela montre une fois de plus que la dissociation de l'hémoglobine n'est pas à l'origine des modifications d'activité observées.

Les modifications d'activité de l'hémoglobine lors de l'adsorption sur les NP de silice sont identiques pour Hb DCL et pour HbA. Cela montre que l'augmentation de l'affinité induite par l'adsorption n'est pas liée à une modification de la structure quaternaire de l'hémoglobine, Hb DCL ne pouvant pas être bloquée dans un état de forte affinité où les chaînes β seraient proches.

3.4 Oxygénation de l'hémoglobine S

Nous nous sommes intéressés aux hémoglobines anormales afin de déterminer si l'effet de l'adsorption sur l'activité de l'hémoglobine était généralisable à d'autres hémoglobines aux propriétés bien différentes de celles de HbA.

Dans le cadre de cette ouverture, nous avons mesuré l'adsorption et l'oxygénation de l'hémoglobine S (sickle cell hemoglobin) particulièrement sensible à la polymérisation. Ces mesures ont été réalisées en fin de thèse et cette étude est encore préliminaire.

HbS présente une mutation du glutamate en valine en position 6 de la chaîne β, ce qui crée un site d'interaction possible entre résidus hydrophobes, à l'origine de l'agrégation de l'hémoglobine S en fibres. La polymérisation de HbS altère la forme et la déformabilité des globules rouges, ce qui bloque leur circulation dans les capillaires les plus fins et entraîne une hypoperfusion et une mauvaise oxygénation des tissus. La drépanocytose est l'une des maladies génétiques les plus répandues et l'hémoglobine S l'un des variants les mieux connus.

L'isotherme d'adsorption de HbS sous sa forme oxygénée sur les NP de silice 20 nm a été mesurée en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 25°C (Fig. 7-20).

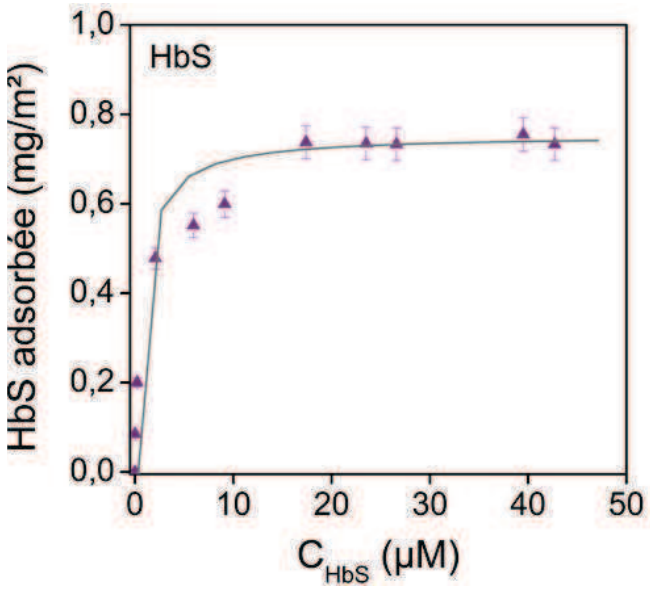


Figure 6-20. *Isotherme d'adsorption de l'hémoglobine HbS sous forme oxyHb sur les nanoparticules de silice 20 nm en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 25°C (▲) représentée par le modèle de Langmuir (en gris)*

L'adsorption de HbS sur les NP suit une isotherme d'adsorption classique, bien représentée par le modèle de Langmuir, sans signe d'agrégation. En solution, HbS ne polymérise que sous sa forme déoxyHb, lorsque la poche hydrophobe formée par les résidus phénylalanine (β85) et leucine (β88) interagit avec le résidu valine muté (β6), formant une structure en double brin (*58*). L'adsorption de HbS sous sa forme oxy ne modifie donc pas son comportement (pas d'agrégation). L'étude de l'adsorption de HbS sous sa forme déoxy n'a pas été réalisée par manque de temps, mais pourrait représenter une ouverture intéressante à ce travail, l'agrégation pouvant tout aussi bien être favorisée (exposition de nouvelles zones hydrophobes de la protéine) que défavorisée (poche hydrophobe orientée vers la surface de silice). La compétition entre adsorption et agrégation pourrait également conduire à l'adsorption non pas d'une molécule d'HbS isolée mais de celle des agrégats déjà formés.

Les caractéristiques de l'adsorption de HbS sur les NP de silice sont comparées à celles de HbA (tableau 7-13).

Protéine	m (mg/m²)	K_{ads} (M^{-1})
HbA	0,67 ± 0,04	$1,8 \pm 0,2.10^{5}$
HbS	0,74 ± 0,04	$1,3 \pm 0,2.10^{6}$

Tableau 7-13. *Comparaison de l'adsorption des hémoglobines humaines HbA et HbS sous forme oxyHb sur les nanoparticules de silice 20 nm en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 25°C : masse de protéine adsorbée à saturation (m) et constante d'adsorption (K_{ads})*

La quantité d'hémoglobine adsorbée à saturation est légèrement supérieure pour HbS (0,74 mg/m²) comparée à HbA (0,67 mg/m²). Par contre, la constante d'adsorption de HbS sur la silice est un ordre de grandeur plus élevée que celle de HbA, ce qui est considérable quand on sait que seul un acide aminé diffère entre les deux protéines. Bien que HbS (oxy) ne montre pas d'agrégation sur la silice, son affinité pour la surface est bien plus élevée que celle des HbA. La perte d'une charge négative (Glu→Val) est-elle suffisante pour expliquer cette différence ? La constante d'affinité plus élevée correspond-elle à une plus grande dénaturation de l'hémoglobine sur la surface ? Pour répondre à ces questions, il serait intéressant, à partir de plus grandes quantités d'HbS, de réaliser une étude par dichroïsme circulaire pour évaluer la perte de structure lors de l'adsorption et par microcalorimétrie ITC pour mesurer directement les paramètres thermodynamiques de l'adsorption (ΔH, ΔS) qui pourraient par exemple mettre en évidence un rôle des interactions hydrophobes dans l'adsorption de HbS.

Pour étudier l'activité de HbS adsorbée sur les NP de silice, nous avons mesuré l'oxygénation d'un hémolysat (après centrifugation des membranes) contenant 87% d'HbS et 13% d'HbA, en présence de NP de silice 20 nm en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 37°C (Fig. 7-21).

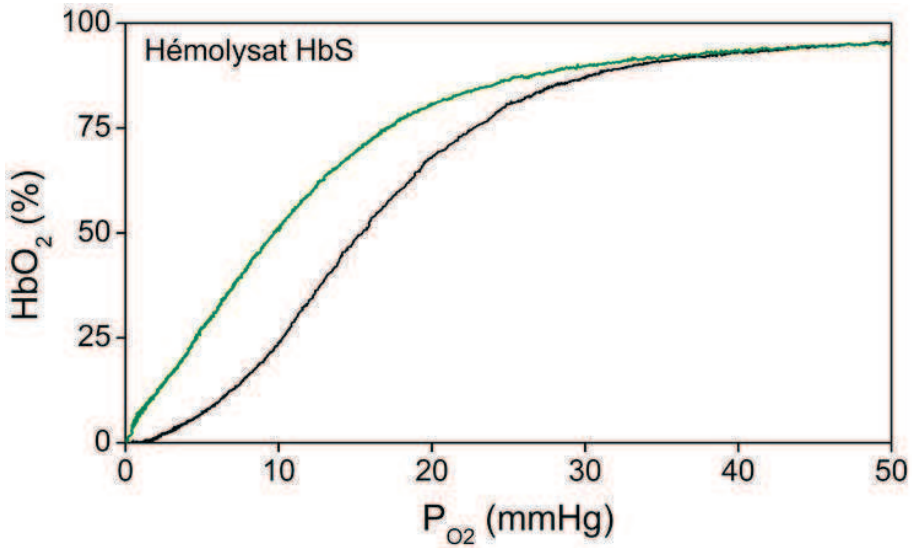


Figure 7-21. *Oxygénation d'un hémolysat contenant 87% d'HbS et 13% d'HbA pour une concentration totale C_{Hb} = 20 µM, libre (en noir) et adsorbée (en vert) sur les nanoparticules de silice 20 nm (C_{NP} = 14 mg/mL) en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 37°C. L'hémoglobine (HbA + HbS) est totalement adsorbée sur les NP.*

L'oxygénation de l'hémoglobine S (P_{50} = 15,5 ± 0,5 mmHg) est identique à celle de l'hémoglobine A dans les mêmes conditions (P_{50} = 15,1 ± 0,5 mmHg) (en absence de polymérisation, l'activité d'HbS est identique à celle d'HbA). Lorsque l'hémoglobine S est adsorbée sur les NP, la courbe

d'oxygénation montre une augmentation de l'affinité (P_{50} = 9,6 ± 0,5 mmHg) et une diminution de la coopérativité (n = 2,0 ± 0,1) similaires à celles d'HbA (tableau 7-14).

Conditions	P_{50} (mmHg) HbS	P_{50} (mmHg) HbS + NP	n HbS	n HbS + NP
Phosphate pH 7,4 T = 37°C	15,5 ± 0,5	9,6 ± 0,5	2,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1

Tableau 7-14. *P_{50} et indice de coopérativité n de l'hémoglobine à partir d'un hémolysat contenant 87% d'HbS et 13% d'HbA, libre et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 à 37°C (C_{Hb} = 20 µM, C_{NP} = 14 mg/mL)*

Une fois de plus, l'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice conduit aux mêmes variations d'activité. Cela montre bien qu'il s'agit d'un phénomène global, susceptible d'agir sur des protéines présentant des différences localement (HbA de porc, HbA humaine, Hb DCL, HbS).

D'autres études sur des hémoglobines anormales pourraient être envisagées : certaines hémoglobines présentent par exemple une affinité plus forte ou plus faible que HbA, comme Hb Montfermeil, Hb Olympia, Hb Louisville ou Hb Canebière qui ne sont que quelques exemples parmi plusieurs centaines de variants (*59*). L'étude de l'activité de ces hémoglobines en présence de NP de silice pourrait nous permettre de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la modification d'activité de l'hémoglobine adsorbée.

4. Discussion des modifications d'activité de l'hémoglobine adsorbée

Pour remettre en perspective les résultats obtenus et discuter des modifications d'activité de l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice, les principaux modèles de coopérativité de l'hémoglobine sont présentés : 1) modèle d'interaction hème-hème d'Adair, 2) modèle allostérique MWC, 3) modèle structural de Perutz, 4) modèle d'allostérie dynamique de Yonetani.

L'activité de l'hémoglobine libre est caractérisée par sa coopérativité et par la variation de son affinité au cours de l'oxygénation (ce qui donne sa forme sigmoïde à la courbe d'oxygénation) ou lors de la fixation d'effecteurs (DPG et IHP par exemple). Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la coopérativité de l'hémoglobine, dont le modèle allostérique qui s'applique à la variation d'affinité de l'hémoglobine lors de la fixation de l'oxygène (allostérie homotropique) ou des effecteurs (allostérie hétérotropique).

4.1 Modèles de coopérativité

Modèle d'interaction hème-hème (Adair)

Adair a montré dès 1925 que l'hémoglobine pouvait lier quatre molécules d'oxygène, une par hème, et proposé une équation permettant de reproduire la courbe d'oxygénation de l'hémoglobine à partir de quatre constantes d'équilibre (*60*). Ce modèle est le modèle séquentiel qui décrit un changement progressif de la conformation de l'hémoglobine lors de la fixation de l'oxygène, depuis l'hémoglobine désoxygénée de basse affinité à l'hémoglobine oxygénée de haute affinité, grâce à des interactions hème-hème (Fig. 7-22). Il a été repris et complété par Koshland en 1966 (*61*).

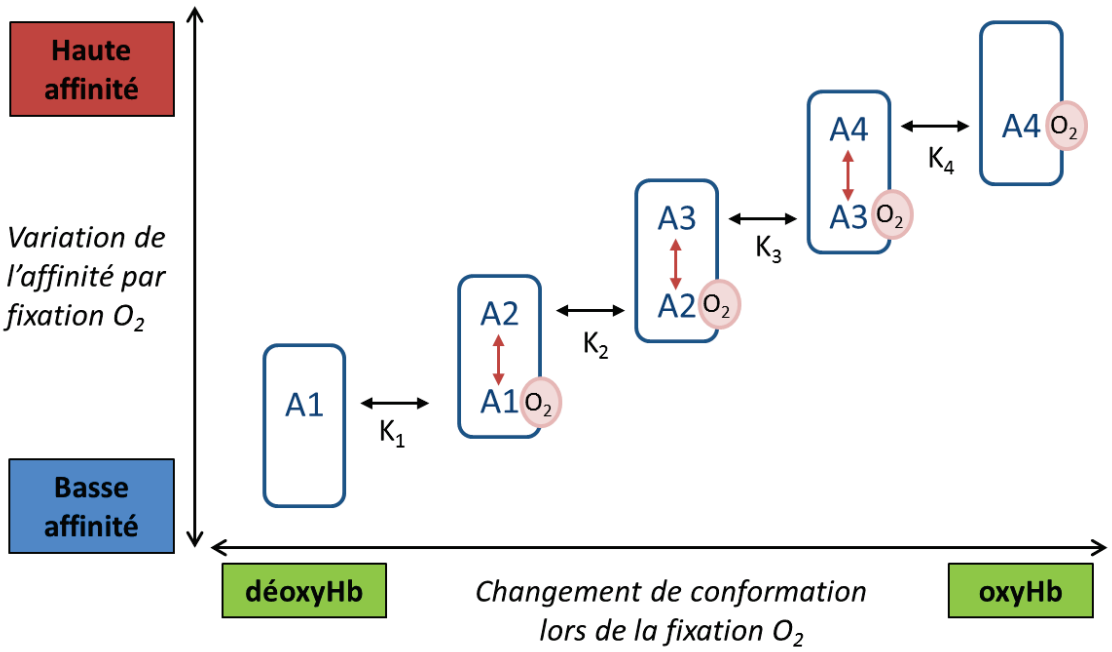


Figure 7-22. *Représentation schématique du modèle séquentiel d'Adair (60). A1, A2, A3, A4 représentent les différents états d'affinité de l'hémoglobine. La fixation de chacune des 4 molécules d'oxygène modifie la conformation de l'hémoglobine et conduit au passage d'un état d'affinité à un autre avec un constante* $K_1<K_2<K_3<K_4$

Les courbes d'oxygénation de l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice sont bien représentées par le modèle d'Adair. Cependant, celui-ci ne nous permet pas d'expliquer les modifications d'activité observées.

Modèle allostérique MWC

A partir d'une étude thermodynamique, Monod, Wyman et Changeux proposent en 1965 le modèle concerté à deux états (ou modèle MWC), basé sur un équilibre entre une forme de haute affinité et une forme de basse affinité de l'hémoglobine (*62*). Il s'agit d'un équilibre entre deux états

fonctionnels de l'hémoglobine appelés R (haute affinité) et T (basse affinité) sans lien direct avec la structure de la protéine, hormis les conditions de symétrie et de protéine oligomérique de l'allostérie. Dans le modèle MWC, la fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine ne modifie pas son affinité, c'est l'équilibre allostérique entre la forme de haute et de basse affinité qui se déplace au cours de l'oxygénation (Fig. 7-23).

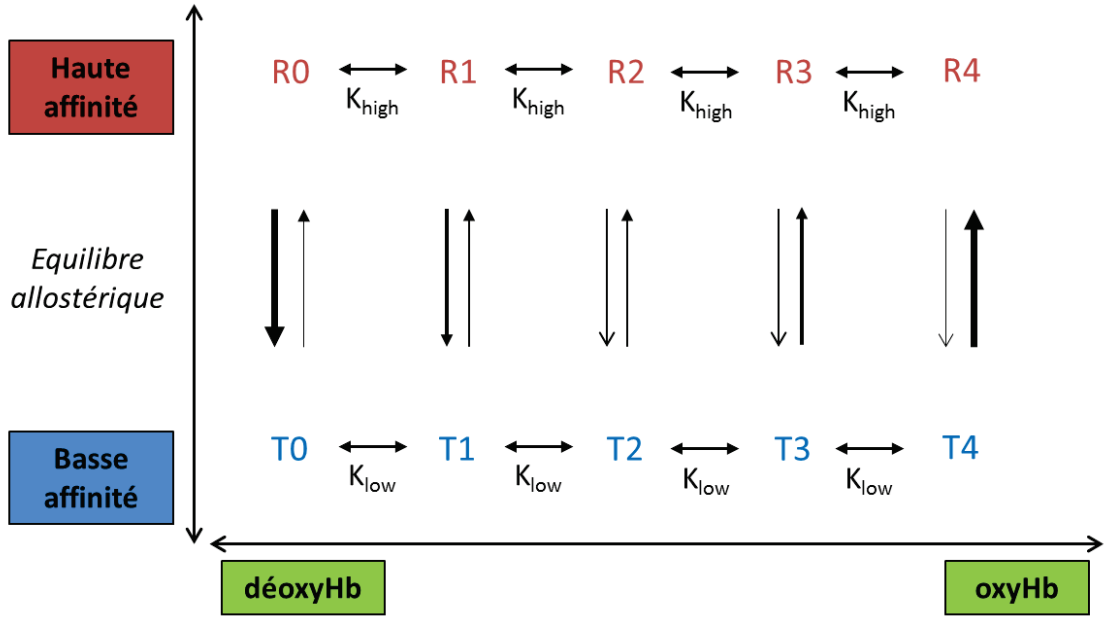


Figure 7-23. *Représentation schématique du modèle à deux états MWC (62), basé sur un équilibre allostérique entre l'état fonctionnel R de haute affinité et l'état fonctionnel T de basse affinité, sans modification de l'affinité par fixation de l'oxygène et sans lien avec la structure de la protéine*

A partir du modèle MWC, nous avons pu déterminer que l'augmentation de l'affinité de l'hémoglobine adsorbée était due uniquement à une augmentation de la constante d'association de l'oxygène de la forme de basse affinité K_{low}, la constante K_{high} associée à la forme de haute affinité restant inchangée. Ce modèle ne permet toutefois pas de proposer un mécanisme à l'origine de l'augmentation de la constante d'association de l'oxygène sur la forme de basse affinité.

Modèle structural (Perutz)

La structure cristallographique de l'hémoglobine a été déterminée par Perutz qui observa une différence entre les structures quaternaires de l'oxyhémoglobine et de la déoxyhémoglobine (*63, 64*) : les sous-unités β de l'oxyHb sont plus proches l'une de l'autre suite à une rotation de 15° des dimères αβ l'un par rapport à l'autre. Plusieurs ponts salins entre sous-unités sont également spécifiques de la structure désoxygénée, dont l'atome de fer se trouverait hors du plan de l'hème. A partir de ces observations, Perutz proposa en 1970 le modèle stéréochimique en faisant l'hypothèse

que l'état fonctionnel de basse affinité est associé à la structure quaternaire T de l'hémoglobine désoxygénée et l'état fonctionnel de haute affinité à la structure quaternaire R de l'hémoglobine oxygénée (*65*). Perutz établit ainsi une relation directe entre la structure de la protéine et sa fonction : la fixation de l'oxygène induit un déplacement de l'atome de fer par rapport à l'hème ce qui déclenche la rotation des dimères et modifie l'affinité de l'hémoglobine. Cette hypothèse est reprise sous une forme équivalente à un modèle séquentiel par Szabo et Karplus en 1972 (*66*) (Fig. 7-24) et plus récemment par Eaton (*67, 68*) qui s'appuie sur des modifications de la structure tertiaire de l'hémoglobine au cours de l'oxygénation.

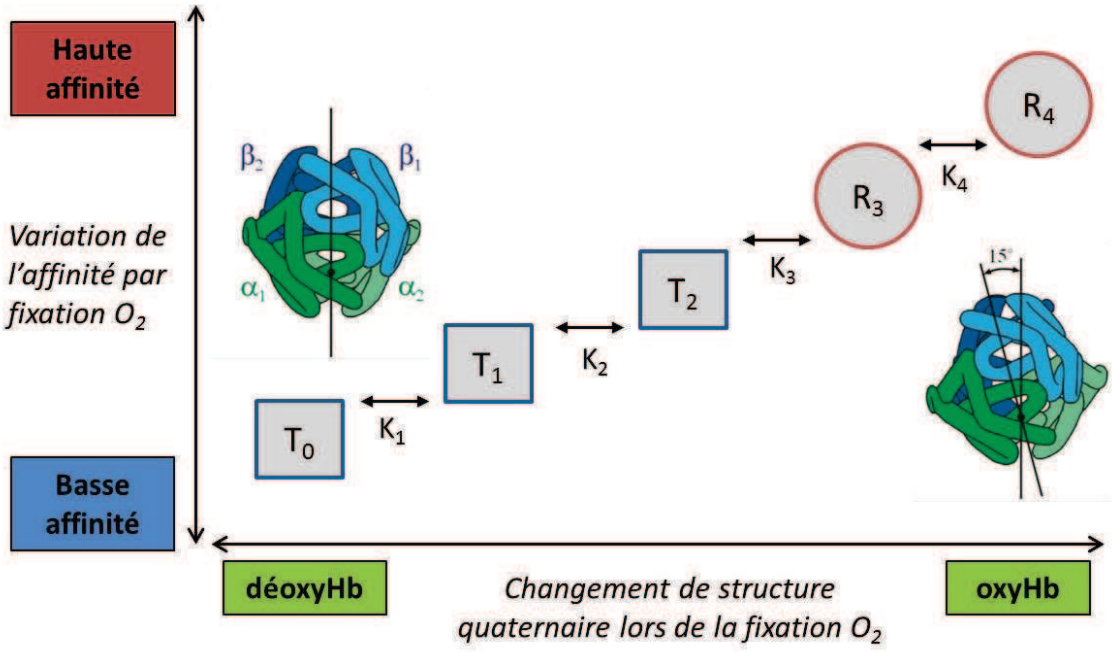


Figure 7-24. *Représentation schématique du modèle de Szabo et Karplus (66) basé sur l'hypothèse de Perutz , d'après (68) : la forme de haute affinité correspond à la structure quaternaire R et celle de basse affinité à la structure quaternaire T. L'oxygénation induit un changement de structure quaternaire et donc un changement d'affinité. Les structures tertiaires r et t du modèle d'Eaton ne sont pas représentées.*

Cependant, une des critiques majeures de ce modèle, développée entre autre par Yonetani, repose sur l'observation de modifications de l'activité de l'hémoglobine lors de la fixation d'effecteurs sans changement de la structure quaternaire de la protéine d'une part, et de l'existence de différentes structures tertiaires et quaternaires de l'hémoglobine sans modification de l'affinité de la protéine d'autre part (*32*). Alors que Perutz avait identifié les structures quaternaires R et T sur des cristaux d'hémoglobine, Yonetani et ses collaborateurs identifient les deux structures quaternaires en solution par RMN du proton, ce qui leur permet de comparer directement la structure et l'activité de l'hémoglobine dans différentes conditions (*69, 70*). Ils observent ainsi une diminution de plusieurs

ordres de grandeur de l'affinité de la forme oxy (K_{high}) et de la forme déoxy (K_{low}) de l'hémoglobine lors de la fixation d'effecteurs.

Le changement de position de l'atome de fer lors de l'oxygénation a depuis été remis en question et plusieurs études ont montré que la position du fer n'était pas modifiée lors de l'oxygénation (*71*). Une étude a également montré que la structure de l'hème et la coordination du fer (liaison fer-histidine) ne changeait pas lors de l'ajout d'effecteurs, alors que l'affinité de l'hémoglobine varie (*70, 72*). Le modèle structural de Perutz semble ainsi restreint aux changements de structure tertiaire (Eaton) et quaternaire (Perutz) de l'hémoglobine lors de l'oxygénation, comme seuls déterminants de la variation d'affinité de l'hémoglobine.

Modèle d'allostérie dynamique (Yonetani)

Yonetani et al. ont montré par simulation moléculaire que les fluctuations thermiques de la structure secondaire de l'hémoglobine étaient corrélées à son affinité : l'hémoglobine de plus faible affinité présente des fluctuations de la structure secondaire de plus grande amplitude que l'hémoglobine de forte affinité (les fluctuations considérées ont une fréquence supérieure au GHz, soit un temps inférieur à la nanoseconde, et une amplitude inférieure à 3 Å) (*73*). Une explication du lien entre dynamique et affinité est tirée d'expériences et de simulations plus anciennes de photodissociation laser de l'hémoglobine sous sa forme HbCO ou HbO_2 (*74, 75*). Le monoxyde de carbone est un ligand compétiteur de l'oxygène. Lorsqu'il se dissocie du fer sous l'impulsion laser, il peut soit se recombiner, soit migrer dans la globine puis s'échapper de la protéine, ce qui se traduit par la vitesse et le taux de recombinaison géminée mesurés. Il n'y pas dans la structure de l'hémoglobine de « canal » permettant la sortie du ligand : celui-ci diffuse depuis l'hème vers la globine et sa sortie de la protéine est favorisée par les fluctuations de la structure (*76*). Plus les fluctuations sont importantes, plus le ligand peut s'échapper et moins le taux de recombinaison géminé sera important. Yonetani applique ce raisonnement à la fixation d'oxygène par l'hémoglobine : le paramètre limitant est celui de la sortie de l'oxygène, qui est d'autant plus favorisée que la dynamique de la protéine est importante (*32*) (Fig. 7-25).

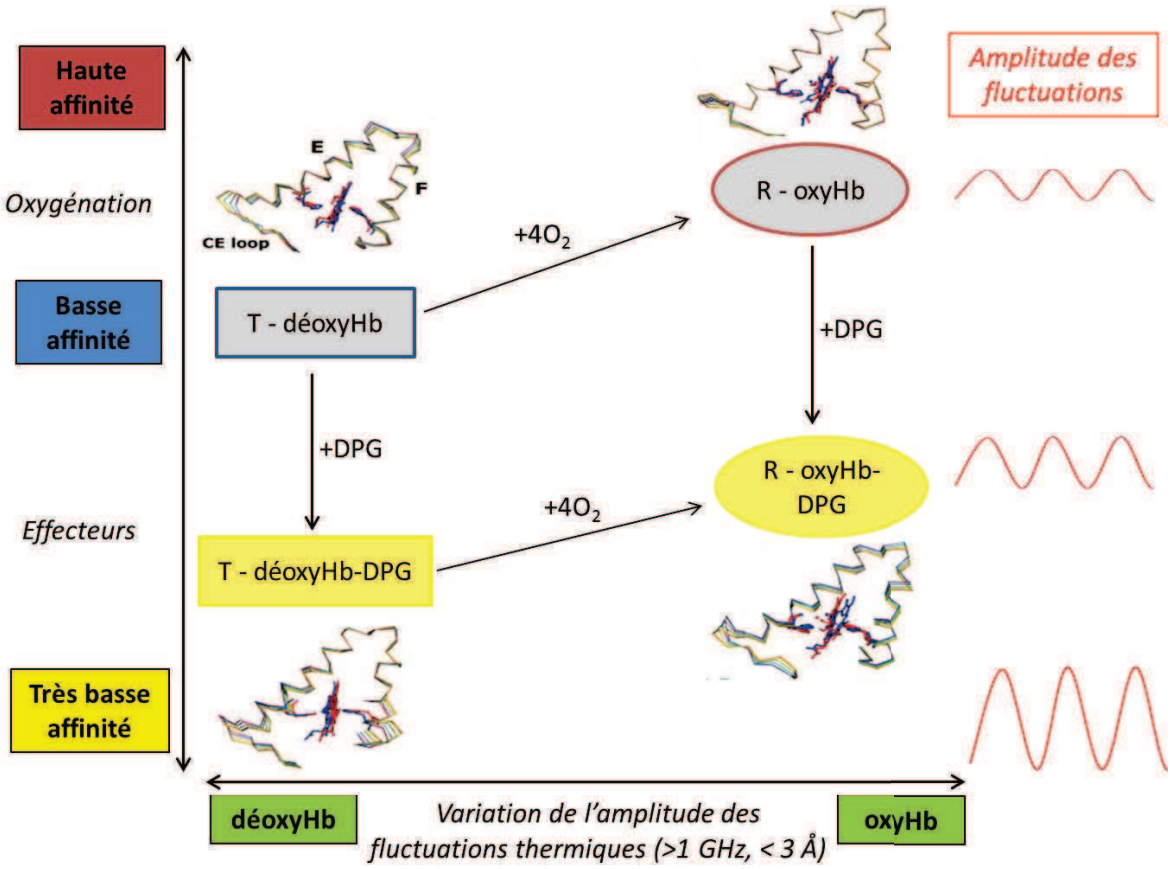


Figure 7-25. *Représentation schématique du modèle d'allostérie dynamique de Yonetani (32). Les états de haute et de basse affinité se distinguent par leur dynamique : plus les fluctuations thermiques de la structure secondaire sont de grande amplitude, plus l'oxygène peut facilement s'échapper et plus l'affinité de la protéine diminue. La structure quaternaire R (oxyHb) et T (déoxyHb) est indépendante des variations d'affinité (d'après Yonetani, com. pers.)*

L'hémoglobine désoxygénée conserve une structure quaternaire différente de celle de l'hémoglobine oxygénée, sans lien avec leur affinité. L'oxygénation diminue ces fluctuations tandis que la fixation des effecteurs l'augmente. La coopérativité dépend alors de la différence d'affinité entre l'état de haute affinité et l'état de basse affinité : plus cette différence est faible, moins la protéine est coopérative.

La confusion du lecteur peu familier des modèles de coopérativité de l'hémoglobine est alors grande car les mêmes termes R et T ont été repris par (presque) tous les modèles pour désigner des objets très différents : états fonctionnels du modèle MWC, structures quaternaires du modèle de Perutz ou états dynamique de l'hémoglobine du modèle de Yonetani. Pour plus de clarté, je parlerai d'états de haute et basse affinité (MWC), de structures quaternaires (Perutz) et d'états dynamiques (Yonetani) plutôt que d'hémoglobine R et T.

De plus, de grandes différences apparaissent du point de vue dynamique entre les différents modèles de coopérativité : le changement de structure quaternaire R-T du modèle de Perutz est un mécanisme qui se déroule à l'échelle de quelques microsecondes à la dizaine de microsecondes (*77*), il s'agit donc d'un processus relativement lent, tandis que les fluctuations thermiques du modèle de Yonetani sont associées à des mouvements d'amplitude inférieure à 3 Å et d'une fréquence supérieure au GHz ce qui correspond à une échelle de temps d'une dizaine à une centaine de picosecondes, et donc à un mécanisme beaucoup plus rapide (*78*). Une telle différence de plusieurs ordres de grandeur de temps caractéristique de chacun de ces mécanismes peut avoir des implications importantes pour la prédiction de la réponse/réactivité du système.

Il faut noter que si l'hémoglobine est un système d'intérêt, notamment du point de vue biologique, l'objectif de la thèse n'est pas de produire de nouveaux résultats en faveur de l'un ou l'autre modèle de coopérativité. Les modifications d'activité de l'hémoglobine adsorbées sont discutées à l'aide du modèle structural de Perutz et du modèle dynamique de Yonetani pour essayer de mieux comprendre quels mécanismes peuvent expliquer les changements d'activité observés.

4.2 Un effet global et reproductible

L'activité de l'hémoglobine adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm est caractérisée par :

- **une augmentation de l'affinité de l'ordre de 50%**
- **une diminution de la coopérativité avec un coefficient de Hill supérieur à 1**
- **la préservation de la structure tétramérique de l'hémoglobine**
- **la préservation de l'effet Bohr**
- **la préservation de l'effet de la température**
- **la préservation de l'effet du DPG et de l'IHP et du site de fixation correspondant**
- **la réversibilité totale après désorption**

De plus ces modifications sont communes à :

- **l'hémoglobine de porc**
- **l'hémoglobine A humaine**
- **l'hémoglobine S**
- **l'hémoglobine DCL**
- **quelles que soient les conditions de pH (pH 6 et pH 7,4), de tampon (BisTris-HCl et Phosphate), de température (25°C et 37°C) et d'environnement (hémolysat)**

Ces résultats montrent que i) la fonctionnalité de l'hémoglobine adsorbée, c'est-à-dire sa sensibilité à la température, au pH et aux effecteurs, est préservée, ii) les modifications de son activité, augmentation de l'affinité de l'ordre de 50% et diminution de la coopérativité avec un coefficient de Hill supérieur à 1, sont communes à des molécules d'hémoglobine de composition, de charge, de structure et de comportement différent que sont Hb de porc, HbA humaine, Hb DCL et Hb S, iii) ces modifications sont insensibles aux conditions physico-chimiques du milieu (pH, tampon, température, environnement).

Les différences entre molécules d'hémoglobine se traduisent par une adsorption variable. Les conditions du milieu influencent également la quantité et la structure de la protéine adsorbée. Pourtant les modifications d'activité observées sont reproductibles pour toutes les hémoglobines testées quelles que soient les conditions du milieu. La grande reproductibilité des effets sur des systèmes différents implique que le mécanisme sous-jacent aux changements d'activité est suffisamment général pour conduire aux mêmes effets sur les différents systèmes et s'applique de façon globale à l'hémoglobine.

La préservation de la fonctionnalité de l'hémoglobine adsorbée montre qu'une partie de la structure de la protéine est préservée lors de l'adsorption, notamment la structure tétramérique, le site de fixation du DPG et les résidus protonables associés à l'effet Bohr. D'après le modèle de Perutz, si l'on met de côté le changement de position du fer, c'est une modification de la structure tertiaire et quaternaire de l'hémoglobine lors de l'adsorption qui conduirait à une augmentation de l'affinité de l'hémoglobine adsorbée (*68*). Il est possible que l'adsorption crée un point d'ancrage d'une partie de l'hémoglobine sur la surface, ce qui pourrait empêcher en partie la rotation d'un dimère αβ par rapport à l'autre. La modification de l'activité de Hb DCL, dont les sous-unités sont liées et rigidifiées, contredit cependant cette hypothèse.

De plus, la structure de l'hémoglobine adsorbée, dont une partie importante de la structure secondaire est altérée, ne peut correspondre à aucune des structures quaternaires définies par Perutz. Par ailleurs, la structure électronique du fer de l'hémoglobine est préservée lors de l'adsorption. La reproductibilité des modifications d'activité semble indiquer que la structure n'est pas l'élément déterminant de ces modifications.

Un effet de l'adsorption sur la dynamique de la protéine serait un phénomène suffisamment global pour être reproductible d'une hémoglobine à l'autre, tout en préservant la fonctionnalité de l'hémoglobine.

D'après le modèle de Yonetani, la dynamique de l'hémoglobine joue un rôle clé dans la régulation de son affinité. Puisque l'hémoglobine adsorbée a une plus grande affinité, cela correspondrait à une plus faible dynamique, c'est-à-dire à des fluctuations thermiques de faible amplitude peu favorables à l'éjection d'une molécule d'oxygène. Ce mécanisme pourrait s'appliquer à l'ensemble des molécules d'hémoglobine étudiées et aux différentes conditions physico-chimiques utilisées.

En parallèle de l'étude de l'activité de l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice, nous avons étudié par diffusion incohérente de neutrons la dynamique de la metmyoglobine adsorbée sur les NP de silice (voir chap. 6). Cette étude nous a permis de montrer que la flexibilité et la dynamique de la metmyoglobine adsorbée diminuaient fortement lors de l'adsorption sur les NP de silice, à une échelle de temps comparable. Bien qu'il ne s'agisse pas du même système protéine-NP, hémoglobine et myoglobine ont un comportement proche lors de l'adsorption et il est possible que l'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice conduise également à une diminution de sa flexibilité.

Une diminution de la dynamique de l'hémoglobine adsorbée sur la silice serait cohérente avec l'augmentation de l'activité observée, du point de vue du modèle d'allostérie dynamique de Yonetani : les fluctuations de grande amplitude permettant la libération de l'oxygène et la diminution de l'affinité seraient limitées par les interactions fortes avec la surface de silice, par exemple par un ancrage à partir des résidus basiques. Dans ce cas, la diminution de la coopérativité de l'hémoglobine s'expliquerait aussi par la réduction de la différence d'affinité (amplitudes des fluctuations) entre hémoglobine oxygénée et désoxygénée.

Si les méthodes de diffusion incohérente de neutrons sont probablement applicables au système hémoglobine/nanoparticules, une autre approche pour étudier la dynamique de notre système serait de mesurer par photolyse laser la vitesse et le taux de recombinaison géminée de HbO_2 ou HbCO de l'hémoglobine adsorbée sur les NP de silice, pour évaluer l'effet d'une modification de la dynamique de la protéine adsorbée sur la recombinaison géminée de l'oxygène ou du CO.

Le modèle de Yonetani ne permet cependant pas d'expliquer l'ensemble des modifications d'activité observées. L'absence de modification d'activité de l'hémoglobine adsorbée liée à l'IHP reste inexpliquée dans ce modèle. Le modèle de Yonetani est avant tout basé sur un effet de la globine sur l'affinité de l'hémoglobine, sans effet de l'hème. Lorsque l'affinité est grandement diminuée, comme avec l'IHP, il est possible que l'effet de la globine ne soit plus le facteur principal, ou limitant, de la fixation de l'oxygène. Si l'effet de l'hème devient prédominant, alors l'hémoglobine adsorbée aurait très probablement la même activité que l'hémoglobine libre car l'adsorption n'a pas ou peu

d'influence sur l'hème, comme dans le cas de la metmyoglobine dont l'activité n'est pas ou peu affectée par l'adsorption.

L'étude de l'adsorption et de l'activité de l'hémoglobine met en évidence deux cas particuliers, pour lesquels il serait intéressant de poursuivre cette étude. Du point de vue de l'activité, il s'agit de l'absence de modification d'activité de l'hémoglobine adsorbée liée à l'IHP, inexpliquée par les modèles de coopérativité. Du point de vue de l'adsorption, une adsorption de l'hémoglobine S avec une constante d'affinité 10 fois plus élevée que celle de l'hémoglobine A reste mystérieuse. Une étude par microcalorimétrie ITC pourrait permettre de mieux comprendre les différences d'adsorption de HbS et HbA liée à l'IHP sur les NP de silice.

Enfin, la fixation de l'oxygène n'est pas le seul critère permettant à l'hémoglobine d'assurer sa fonction de transporteur au sein des globules rouges. L'hémoglobine circule en effet pendant 120 jours en moyenne dans le corps humain et quelques % de methémoglobine, incapable de lier l'oxygène, sont formés chaque jour et réduits en retour par la cytochrome b5 réductase présente dans les hématies. Cependant, lorsque l'hémoglobine subit des modifications, la vitesse d'auto-oxydation de la protéine peut augmenter, ce qui génère un niveau plus important de metHb au détriment de la forme active de la protéine. Les hémoglobines mutées Hb Saale, Hb Trento, Hb Poitiers et Hb J-Cairo présentent toutes une augmentation de l'auto-oxydation, sans lien direct avec leur activité : Hb Saale a une activité normale, Hb Trento a une plus forte affinité et une plus faible coopérativité, Hb Poitiers a une plus forte affinité sans modification de la coopérativité et Hb J-Cairo a une plus faible affinité et une plus faible coopérativité (*59*). Il serait intéressant de mesurer la cinétique d'oxydation de l'hémoglobine adsorbée, puisque celle-ci n'est pas liée à l'activité de l'hémoglobine, et d'évaluer l'efficacité de la réduction de la metHb adsorbée par la cytochrome b5 réductase.

Les points clés

Les principaux résultats obtenus lors de l'étude de l'activité de l'hémoglobine et de la metmyoglobine adsorbées sur les nanoparticules de silice peuvent être résumés :

- Lors de l'adsorption de la metmyoglobine sur les NP de silice, l'activité de fixation de ligands de la protéine est inchangée pour l'imidazole et caractérisée par une légère diminution de l'affinité pour l'azoture. Une hypothèse permettant d'expliquer cette différence serait un effet des NP de silice sur la densité de charge de l'hème.

- Lors de l'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice, l'activité de la protéine est modifiée, ce qui se traduit par une augmentation de l'affinité de l'ordre de 50% et une diminution de la coopérativité, sans dissociation du tétramère. L'hémoglobine adsorbée reste sensible à un effet du pH, de la température, du DPG et de l'IHP. Seule la constante K_{low} de fixation de l'oxygène par la forme de basse affinité est modifiée par l'adsorption, la constante K_{high} associée à la forme de haute affinité reste constante.

- La préservation de la structure tétramérique de l'hémoglobine adsorbée est démontrée par sa coopérativité, la fixation du DPG et de l'IHP et la modification de l'activité de l'hémoglobine pontée Hb DCL après adsorption. Le site de fixation du DPG et de l'IHP est également préservé lors de l'adsorption.

- Les modifications d'activité observées sont communes à l'hémoglobine de porc, à l'hémoglobine A humaine, à l'hémoglobine S et à l'hémoglobine DCL quelles que soient les conditions de pH, de tampon, de température et sont également reproduites sur un hémolysat.

- Le mécanisme impliqué est reproductible et global. Une interprétation dynamique des modifications d'activité de l'hémoglobine adsorbée peut être proposée en suivant le modèle d'allostérie dynamique de Yonetani.

Bibliographie

1. Gupta M. N., Kaloti M., Kapoor M., Solanki K. (2011) Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization, *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol. 39*, 98-109.
2. Ge J., Lu D., Liu Z., Liu Z. (2009) Recent advances in nanostructured biocatalysts, *Biochemical Engineering Journal 44*, 53-59.
3. Fischer N. O., McIntosh C. M., Simard J. M., Rotello V. M. (2002) Inhibition of chymotrypsin through surface binding using nanoparticle-based receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99*, 5018-5023.
4. Fischer N. O., Verma A., Goodman C. M., Simard J. M., Rotello V. M. (2003) Reversible "irreversible" inhibition of chymotrypsin using nanoparticle receptors, *J. Am. Chem. Soc. 125*, 13387-13391.
5. Karajanagi S. S., Vertegel A. A., Kane R. S., Dordick J. S. (2004) Structure and function of enzymes adsorbed onto single-walled carbon nanotubes, *Langmuir 20*, 11594-11599.
6. Sanfins E., Dairou J., Hussain S., Busi F., Chaffotte A. F., Rodrigues-Lima F., Dupret J.-M. (2011) Carbon black nanoparticles impair acetylation of aromatic amine carcinogens through inactivation of arylamine N-acetyltransferase enzymes, *Acs Nano 5*, 4504-4511.
7. Pandey P., Singh S. P., Arya S. K., Gupta V., Datta M., Singh S., Malhotra B. D. (2007) Application of thiolated gold nanoparticles for the enhancement of glucose oxidase activity, *Langmuir 23*, 3333-3337.
8. Welsch N., Becker A. L., Dzubiella J., Ballauff M. (2012) Core-shell microgels as "smart" carriers for enzymes, *Soft Matter 8*, 1428-1436.
9. Zoungrana T., Findenegg G. H., Norde W. (1997) Structure, stability, and activity of adsorbed enzymes, *J. Colloid Interface Sci. 190*, 437-448.
10. Koutsopoulos S., Patzsch K., Bosker W. T. E., Norde W. (2007) Adsorption of trypsin on hydrophilic and hydrophobic surfaces, *Langmuir 23*, 2000-2006.
11. Vertegel A. A., Siegel R. W., Dordick J. S. (2004) Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme, *Langmuir 20*, 6800-6807.
12. Schrurs F., Lison D. (2012) Focusing the research effort, *Nature Nanotechnology 7*, 546-548.
13. Guadagnini R., Halamoda Kenzaoui B., Cartwright L., Pojana G., Magdolenova Z., Bilanicova D., Saunders M., Juillerat L., Marcomini A., Huk A., Dusinska M., Fjellsbo L. M., Marano F., Boland S. (2013) Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests, *Nanotoxicology. In press*.
14. Moaddeb M., Koros W. J. (1996) Effects of colloidal silica incorporation on oxygen/nitrogen separation properties of ceramic-supported 6FDA-IPDA thin films, *Journal of Membrane Science 111*, 283-290.
15. Tom R. T., Samal A. K., Sreeprasad T. S., Pradeep T. (2006) Hemoprotein bioconjugates of gold and silver nanoparticles and gold nanorods: structure−function correlations, *Langmuir 23*, 1320-1325.
16. Hewitt J. A., Kilmartin J. V., Eyck L. F. T., Perutz M. F. (1972) Noncooperativity of the αβ dimer in the reaction of hemoglobin with oxygen, *Proceedings of the National Academy of Sciences 69*, 203-207.
17. Antonini E. (1971) *Hemoglobin and myoglobin in their interactions with ligands*, Vol. 21, New York.
18. De Rosa M. C., Bertonati C., Giardina B., Di Stasio E., Brancaccio A. (2002) The effect of anions on azide binding to myoglobin: an unusual functional modulation, *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology 1594*, 341-352.
19. Walba H., Isensee R. W. (1961) Acidity constants of some arylimidazoles and their cations, *Journal of Organic Chemistry 26*, 2789-2791.
20. Hill A. V. (1910) Proceedings of the Physiological Society, *The Journal of Physiology 40*, i-vii.
21. Sinet M., Bohn B., Guesnon P., Poyart C. (1982) Temperature independence of the alkaline Bohr effect in pig red cells and pig hemoglobin solutions, *Biochimica Et Biophysica Acta 708*, 105-111.
22. Fushitani K., Riggs A. F. (1991) The extracellular hemoglobin of the earthworm, Lumbricus terrestris - Oxygenation properties of isolated chains, trimer and a reassociated product, *Journal of Biological Chemistry 266*, 10275-10281.
23. Venkatesh B., Miyazaki G., Imai K., Morimoto H., Hori H. (2004) Oxygen equilibrium and EPR studies on α1β1 hemoglobin dimer, *Journal of Biochemistry 136*, 595-600.
24. Condo S. G., Corda M., Sanna M. T., Pellegrini M. G., Ruiz M. P., Castagnola M., Giardina B. (1992) Molecular basis of low temperature sensitivity in pig hemoglobins, *Eur. J. Biochem. 209*, 773-776.
25. Bohr C., Hasselbalch K., Krogh A. (1904) Über einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt *Skand. Arch. Physiol. 16*, 401-412.
26. Kovalevsky A. Y., Chatake T., Shibayama N., Park S.-Y., Ishikawa T., Mustyakimov M., Fisher Z., Langan P., Morimoto Y. (2010) Direct determination of protonation states of histidine residues in a 2 Å neutron

structure of deoxy-human normal adult hemoglobin and implications for the Bohr effect, *Journal of Molecular Biology 398*, 276-291.
27. Novy M. J., Hoversland A. S., Dhindsa D. S., James M. (1973) Blood oxygen affinity and hemoglobin type in adult, newborn, and fetal pigs, *Respiration Physiology 19*, 1-11.
28. Bartlett G. R. (1959) Human Red Cell Glycolytic Intermediates, *Journal of Biological Chemistry 234*, 449-458.
29. Rapoport S., Leva E., Guest G. M. (1941) Phytase in plasma and erythrocytes of various species of vertebrates, *Journal of Biological Chemistry 139*, 621-632.
30. Benesch R., Benesch R. E., Yu C. I. (1968) Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 59*, 526-532.
31. Zuiderweg E. R. P., Hamers L. F., Debruin S. H., Hilbers C. W. (1981) Equilibrium aspects of the binding of myoinositol hexakisphosphate to human hemoglobin as studied by P31 NMR and pH-Stat techniques, *Eur. J. Biochem. 118*, 85-94.
32. Yonetani T., Kanaori K. (2013) How does hemoglobin generate such diverse functionality of physiological relevance?, *Biochimica Et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, In press.
33. Arnone A. (1972) X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhemoglobin, *Nature 237*, 146-149.
34. Richard V., Dodson G. G., Mauguen Y. (1993) Human deoxyhemoglobin-2,3-diphosphoglycerate complex low salt structure at 2.5 angstrom resolution, *Journal of Molecular Biology 233*, 270-274.
35. Imai K. (1982) *Allosteric effects in haemoglobin*, Cambridge.
36. Tsuneshige A., Kanaori K., Samuni U., Danstker D., Friedman J. M., Neya S., Giangiacomo L., Yonetani T. (2004) Semihemoglobins, high oxygen affinity dimeric forms of human hemoglobin respond efficiently to allosteric effectors without forming tetramers, *Journal of Biological Chemistry 279*, 48959-48967.
37. Hallaway B. E., Hallaway P. E., Tisel W. A., Rosenberg A. (1979) Changes in conformation and function of hemoglobin and myoglobin induced by adsorption to silica, *Biochem. Biophys. Res. Commun. 86*, 689-696.
38. van der Veen M., Stuart M. C., Norde W. (2007) Spreading of proteins and its effect on adsorption and desorption kinetics, *Colloid Surf. B-Biointerfaces 54*, 136-142.
39. Soderquist M. E., Walton A. G. (1980) Structural changes in proteins adsorbed on polymer surfaces, *J. Colloid Interface Sci. 75*, 386-397.
40. Kim D. T., Blanch H. W., Radke C. J. (2002) Direct imaging of lysozyme adsorption onto mica by atomic force microscopy, *Langmuir 18*, 5841-5850.
41. Braunitzer G., Gehring-Mueller R., Hilschmann N., Hilse K., Hobom G., Rudloff V., Wittmann-Liebold B. (1961) The structure of normal adult human hemoglobins, *Hoppe Seylers Z Physiol Chem 325*, 283-286.
42. Braunitzer G., Schrank B., Stangl A., Scheithauer U. (1978) Hemoglobins, XXI: sequence analysis of porcine hemoglobin, *Hoppe Seylers Z Physiol Chem 359*, 137-146.
43. Shapiro R., McManus M. J., Zalut C., Bunn H. F. (1980) Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin A, *J Biol Chem 255*, 3120-3127.
44. Antonini E., Rossifanelli A., Caputo A., Wyman J. (1962) Studies on relations between molecular and functional properties of hemoglobin. 3. Influence of salts on Bohr effect in human hemoglobin, *Journal of Biological Chemistry 237*, 2773-2777.
45. Hultquis D. E., Passon P. G. (1971) Catalysis of methaemoglobin reduction by erythrocyte cytochrome b5 and cytochrome b5 reductase, *Nature-New Biology 229*, 252-254.
46. Choury D., Leroux A., Kaplan J. C. (1981) Membrane bound cytochrome b5 reductase (methemoglobin reductase) in human erythrocytes, *Journal of Clinical Investigation 67*, 149-155.
47. Rabolli V., Thomasse L. C. J., Princen C., Napierska D., Gonzalez L., Kirsch-Volders M., Hoet P. H., Huaux F., Kirschhock C. E. A., Martens J. A., Lison D. (2010) Influence of size, surface area and microporosity on the in vitro cytotoxic activity of amorphous silica nanoparticles in different cell types, *Nanotoxicology 4*, 307-318.
48. Lin Y.-S., Haynes C. L. (2010) Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity, *J. Am. Chem. Soc. 132*, 4834-4842.
49. Slowing I. I., Wu C.-W., Vivero-Escoto J. L., Lin V. S. Y. (2009) Mesoporous silica nanoparticles for reducing hemolytic activity towards mammalian red blood cells, *Small 5*, 57-62.
50. Warheit D. B., Webb T. R., Colvin V. L., Reed K. L., Sayes C. M. (2007) Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics, *Toxicological Sciences 95*, 270-280.

51. Wajcman H., Galacteros F. (2005) Hemoglobins with high oxygen affinity leading to erythrocytosis. New variants and new concepts, *Hemoglobin 29*, 91-106.
52. Depasse J., Warlus J. (1976) Relation between toxicity of silica and its affinity for tetraalkylammonium groups - Comparison between SiO2 and TiO2, *J. Colloid Interface Sci. 56*, 618-621.
53. Thornassen L. C. J., Rabolli V., Masschaele K., Aberto G., Tomatis M., Ghiazza M., Turci F., Breynaert E., Martra G., Kirschhock C. E. A., Martens J. A., Lison D., Fubini B. (2011) Model System to Study the Influence of Aggregation on the Hemolytic Potential of Silica Nanoparticles, *Chem. Res. Toxicol. 24*, 1869-1875.
54. Chatterjee R., Welty E. V., Walder R. Y., Pruitt S. L., Rogers P. H., Arnone A., Walder J. A. (1986) Isolation and characterization of a new hemoglobin derivative cross-linked between the alpha chains, *Journal of Biological Chemistry 261*, 9929-9937.
55. Snyder S. R., Welty E. V., Walder R. Y., Williams L. A., Walder J. A. (1987) HbXL99 alpha: A hemoglobin derivative that is cross-linked between the alpha subunits is useful as a blood substitute, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84*, 7280-7284.
56. D'Agnillo F., Alayash A. I. (2000) Site-specific modifications and toxicity of blood substitutes: The case of diaspirin cross-linked hemoglobin, *Advanced Drug Delivery Reviews 40*, 199-212.
57. Walder J. A., Zaugg R. H., Walder R. Y., Steele J. M., Klotz I. M. (1979) Diaspirins that cross-link beta chains of hemoglobin - bis(3,5-dibromosalicyl)succinate and bis(3,5-dibromosalicyl)fumarate, *Biochemistry 18*, 4265-4270.
58. Harrington D. J., Adachi K., Royer W. E. (1997) The high resolution crystal structure of deoxyhemoglobin S, *Journal of Molecular Biology 272*, 398-407.
59. Database of human hemoglobin variants. http://globin.cse.psu.edu.
60. Adair G. S., Field H. (1925) The hemoglobin system: VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin, *Journal of Biological Chemistry 63*, 529-545.
61. Koshland D. E., Nemethy G., Filmer D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits, *Biochemistry 5*, 365-385.
62. Monod J., Wyman J., Changeux J. P. (1965) On nature of allosteric transitions - a plausible model, *Journal of Molecular Biology 12*, 88-118.
63. Perutz M. F., Rossmann M. G., Cullis A. F., Muirhead H., Will G., North A. C. T. (1960) Structure of haemoglobin - 3 dimensional Fourier synthesis at 5.5 A resolution, obtained by X-ray analysis, *Nature 185*, 416-422.
64. Muirhead H., Perutz M. F. (1963) Structure of haemoglobin - A 3-dimensional Fourie synthesis of reduced human haemoglobin at 5.5 A resolution, *Nature 199*, 633-638.
65. Perutz M. F. (1970) Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin, *Nature 228*, 726-734.
66. Szabo A., Karplus M. (1972) A mathematical model for structure-function relations in hemoglobin, *Journal of Molecular Biology 72*, 163-197.
67. Henry E. R., Bettati S., Hofrichter J., Eaton W. A. (2002) A tertiary two-state allosteric model for hemoglobin, *Biophysical Chemistry 98*, 149-164.
68. Eaton W. A., Henry E. R., Hofrichter J., Bettati S., Viappiani C., Mozzarelli A. (2007) Evolution of allosteric models for hemoglobin, *Life 59*, 586-599.
69. Yonetani T., Park S., Tsuneshige A., Imai K., Kanaori K. (2002) Global allostery model of hemoglobin - modulation of O2 affinity, cooperativity, and Bohr effect by heterotropic allosteric effectors, *Journal of Biological Chemistry 277*, 34508-34520.
70. Kanaori K., Tajiri Y., Tsuneshige A., Ishigami I., Ogura T., Tajima K., Neya S., Yonetani T. (2011) T-quaternary structure of oxy human adult hemoglobin in the presence of two allosteric effectors, L35 and IHP, *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics 1807*, 1253-1261.
71. Fermi G., Perutz M. F., Shulman R. G. (1987) Iron distances in hemoglobin: comparison of x-ray crystallographic and extended x-ray absorption fine structure studies, *Proc Natl Acad Sci U S A 84*, 6167-6168.
72. Yokoyama T., Neya S., Tsuneshige A., Yonetani T., Park S.-Y., Tame J. R. H. (2006) R-state haemoglobin with low oxygen affinity: crystal structures of deoxy human and carbonmonoxy horse haemoglobin bound to the effector molecule L35, *Journal of Molecular Biology 356*, 790-801.
73. Yonetani T., Laberge M. (2008) Protein dynamics explain the allosteric behaviors of hemoglobin, *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics 1784*, 1146-1158.
74. Alpert B., Elmohsni S., Lindqvist L., Tfibel F. (1979) Transient effects in the nanosecond laser photolysis of carboxyhemoglobin - cage recombination and spectral evolution of the protein, *Chemical Physics Letters 64*, 11-16.

75. Karplus M., McCammon J. A. (1981) The internal dynamics of globular proteins, *Crc Critical Reviews in Biochemistry 9*, 293-349.
76. Pin S., Valat P., Tourbez H., Alpert B. (1986) CO cage recombination in hemoglobin - picosecond photolysis and nanosecond observation, *Chemical Physics Letters 128*, 79-83.
77. Cammarata M., Levantino M., Wulff M., Cupane A. (2010) Unveiling the timescale of the R–T transition in human hemoglobin, *Journal of Molecular Biology 400*, 951-962.
78. Stadler A. M., Garvey C. J., Bocahut A., Sacquin-Mora S., Digel I., Schneider G. J., Natali F., Artmann G. M., Zaccai G. (2012) Thermal fluctuations of haemoglobin from different species: adaptation to temperature via conformational dynamics, *J. R. Soc. Interface 9*, 2845-2855.

Tableau récapitulatif : affinité et coopérativité de l'hémoglobine libre et adsorbée sur les nanoparticules de silice

Hémoglobine	Conditions	P_{50} (mmHg) Hb libre	P_{50} (mmHg) Hb adsorbée	n Hb libre	n Hb adsorbée
HbA de porc	BisTris-HCl pH 6 T = 25°C	17,1 ± 0,5	8,7 ± 0,5	2,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1
	BisTris-HCl pH 6 T = 37°C	26,1 ± 0,5	10,4 ± 0,5	2,1 ± 0,1	1,7 ± 0,1
	Phosphate pH 7,4 T = 25°C	7,7 ± 0,5	4,7 ± 0,5	3,0 ± 0,1	1,9 ± 0,1
	Phosphate pH 7,4 T = 37°C	12,0 ± 0,5	7,0 ± 0,5	2,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1
	Tris-HCl pH 8,7 T = 25°C	3,2 ± 0,5	3,2 ± 0,5	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1
HbA de porc liée au DPG	BisTris-HCl pH 6 T = 25°C	38,5 ± 0,5	23,0 ± 0,5 (a) 22,0 ± 0,5 (b)	2,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1
HbA de porc liée à l'IHP	BisTris-HCl pH 6 T = 25°C	110 ± 1	104 ± 1 (a) 104 ± 1 (b)	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1
HbA de porc désorbée	Tris-HCl pH 8,7 T = 25°C	3,2 ± 0,5	3,2 ± 0,5	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1
HbA humaine	BisTris-HCl pH 6 T = 37°C	26,0 ± 0,5	10,7 ± 0,5	2,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1
	Phosphate pH 7,4 T = 37°C	11,7 ± 0,5	7,2 ± 0,5	2,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1
	Globules rouges Isotonique pH 7,4 T = 37°C	26,0 ± 0,5	7,6 ± 0,5 hémolyse	2,6 ± 0,1	1,9 ± 0,1 hémolyse
	Hémolysat Phosphate pH 7,4 T = 37°C	15,1 ± 0,5	8,3 ± 0,5	2,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1
Hb DCL	Phosphate pH 7,4 T = 37°C	26,7 ± 0,5	18,0 ± 0,5	2,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1
HbS	Hémolysat Phosphate pH 7,4 T = 37°C	15,5 ± 0,5	9,6 ± 0,5	2,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1

Tableau récapitulatif. *Mesures d'affinité (P_{50}) et de coopérativité (coefficient de Hill, n) de l'hémoglobine libre et adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm en fonction de la protéine, du pH, du tampon et de la température*

Conclusion et perspectives

De nouvelles méthodes expérimentales pour l'étude des protéines adsorbées

Pour étudier les protéines adsorbées sur les nanomatériaux, nous avons tout d'abord utilisé différentes méthodes classiques d'étude des protéines. Toutefois, leur utilisation sur des solutions colloïdales a nécessité une certaine adaptation. Pour s'affranchir des problèmes de diffusion de la lumière par les nanoparticules, une sphère d'intégration a été utilisée pour toutes les analyses réalisées par spectroscopie UV-visible, y compris pour les mesures d'activité de la myoglobine et de l'hémoglobine adsorbées. Pour vérifier la fiabilité des données, plusieurs contrôles ont été systématiquement effectués à partir de solutions contenant les nanoparticules de silice mais dans des conditions où les protéines ne sont pas adsorbées à leur surface. En dichroïsme circulaire, la concentration en nanoparticules des solutions est assez limitée pour permettre l'acquisition d'un spectre de bonne qualité. Les contrôles ne montrent cependant pas d'artefacts liés à la présence des nanoparticules lors de la mesure, et la perte partielle de structure observée est corroborée par les résultats de microcalorimétrie DSC.

Certaines techniques se sont révélées peu adaptées à l'étude des protéines adsorbées : c'est le cas de la spectroscopie infrarouge où le montage est délicat et les mesures non quantitatives, et de la spectroscopie d'absorption X où les mesures ont pour l'instant manqué de résolution et de reproductibilité, mais qui constituent plutôt une ouverture vers de nouvelles études.

Certaines techniques ont montré une grande stabilité et une bonne reproductibilité : la spectroscopie UV-visible, la fluorescence, la microcalorimétrie DSC et la microcalorimétrie ITC. Ces techniques sont maintenant utilisées en routine au laboratoire pour la mesure des isothermes d'adsorption de différents systèmes protéines/nanoparticules, pour l'étude de la structure et de l'activité des protéines adsorbées et pour la mesure des paramètres thermodynamiques de l'adsorption.

La microcalorimétrie ITC, bien que généralement peu appliquée à ces systèmes, s'est révélée très intéressante pour l'étude du processus d'adsorption car elle permet une mesure quantitative de l'ensemble des paramètres thermodynamiques de l'adsorption des protéines sur les nanoparticules. C'est une technique sensible et particulièrement adaptée à l'étude des solutions protéines/nanoparticules : une très bonne cohérence entre la constante d'adsorption mesurée par ITC et par spectroscopie est obtenue sur le système étudié. Elle pourrait être utilisée de façon

beaucoup plus systématique pour caractériser les mécanismes d'adsorption dans différentes conditions : en fonction du pH, de la température, du milieu, de la protéine et de la nanoparticule. De plus, étant donné que l'adsorption des protéines dépend fortement du type de surface (hydrophile, hydrophobe, fonctionnalisée), une analyse thermodynamique de l'adsorption sur différentes surfaces pourrait fournir des données quantitatives sur les processus d'adsorption corrélées aux propriétés de surface des matériaux. Cette technique pourrait également être utilisée pour étudier la sensibilité des protéines à l'adsorption en fonction de leur état et donc de leur « cycle de vie » au sein de la cellule : par exemple, protéines ligandées, protéines dénaturées, complexes...

Des techniques qui n'avaient jusqu'à présent pas été appliquées à l'étude des protéines adsorbées ont été développées au cours de la thèse. Elles ont permis d'apporter de nouvelles informations sur le processus d'adsorption et sur la biochimie et biophysique des protéines adsorbées.

L'analyse protéomique d'un grand nombre de protéines adsorbées et non adsorbées à partir d'un extrait cellulaire a permis d'une part d'identifier les protéines qui ont le plus d'affinité pour la surface et qui pourraient être adsorbées en conditions réelles d'exposition, d'autre part de déterminer les critères physico-chimiques d'adsorption des protéines pour un matériau donné. Cette technique pourrait être utilisée pour comparer l'adsorption à partir de protéines de différents milieux cellulaires ou extracellulaires sur d'autres surfaces. De plus, les protéines adsorbées identifiées pourraient être étudiées spécifiquement car plus pertinentes du point de vue biologique que les protéines modèles choisies arbitrairement.

Pour augmenter la capacité d'analyse des protéines et tester un grand nombre de surfaces (par exemple pour étudier les propriétés d'adsorption des protéines sur des biomatériaux), il est possible de remplacer l'analyse par électrophorèse bidimensionnelle par une analyse par spectrométrie de masse à haut débit (« Shotgun »). Cette technique est assez proche de celle utilisée pour la cartographie de surface, appliquée ici à un extrait protéique. Les protéines adsorbées et non adsorbées sont digérées par la trypsine puis analysées sur un spectromètre de masse en tandem couplé à une colonne de chromatographie (*1*). Les protéines de chaque groupe sont identifiées à partir de la séquence des peptides analysés et d'une base de données. L'avantage de cette technique est de pouvoir identifier un nombre plus important de protéines par rapport à l'électrophorèse bidimensionnelle et surtout de pouvoir réaliser cette analyse à haut débit sur un grand nombre de protéines et de matériaux différents.

La cartographie de surface par irradiation a permis d'identifier certains domaines d'interaction entre protéine et nanoparticule. Cette technique est prometteuse car il existe actuellement très peu de

moyens pour étudier localement l'adsorption. L'analyse des protéines adsorbées à une échelle très locale sera certainement une des clés pour mieux définir l'état des protéines adsorbées.

La diffusion incohérente de neutrons est une mesure expérimentale de la dynamique des protéines adsorbées qui a permis de mettre en évidence une diminution de la flexibilité et de l'entropie vibrationnelle d'une protéine adsorbée sur la silice, marquée par la disparition de la transition dynamique de la protéine adsorbée. C'est la première fois qu'un effet aussi important sur la dynamique d'une protéine est mis en évidence.

De plus, ce résultat remet en cause le modèle d'adsorption de Norde dans lequel la déstructuration des protéines adsorbées s'accompagne d'une augmentation de leur dynamique et d'un gain d'entropie, moteur de l'adsorption. Nous proposons que le gain d'entropie soit provoqué par la libération de molécules d'eau immobilisées sur la surface par l'adsorption de la protéine. Toutefois, l'étude de la dynamique d'autres systèmes est nécessaire pour généraliser cette hypothèse. Cette étude pourrait être complétée par une analyse des modes normaux de la protéine adsorbée par simulation moléculaire. Les études par diffusion de neutrons peuvent aussi être accompagnées par la mesure des capacités calorifiques (Cp) à basse température, pour corréler données thermodynamiques et dynamique de la protéine à différentes températures.

Les déterminants moléculaires de l'adsorption

Les déterminants structuraux de l'adsorption et de la non adsorption des protéines sur les nanoparticules de silice sont d'une part un enrichissement en résidus basiques (arginine et lysine), en clusters de charges positives et négatives, et une plus grande flexibilité (protéines adsorbées), d'autre part un enrichissement en résidus aromatiques et un plus grand nombre d'interactions π-π et cations-π qui conduisent à une plus grande rigidité (protéines non adsorbées). Alors que le rôle favorable des résidus chargés dans l'adsorption grâce à la formation d'interactions électrostatiques avait déjà été montré dans d'autres études, le rôle des résidus aromatiques dans la plus grande rigidité des protéines et leur résistance à l'adsorption n'avait jusqu'à présent pas été mis en évidence. De plus, l'absence de corrélation entre point isoélectrique et adsorption sur une surface chargée a été démontrée : c'est l'organisation locale en clusters de charges qui favorise l'adsorption.

Cette étude peut être appliquée à d'autres nanoparticules de taille, nature, surface différente. Une première analyse de l'adsorption des protéines de levure sur des nanoparticules d'oxyde de titane et d'oxyde de fer selon la même méthodologie a montré que la majorité des protéines adsorbées/non adsorbées identifiées sur la silice l'étaient également sur l'oxyde de titane et de fer, ce qui permettrait de généraliser les critères d'adsorption proposés à d'autres surfaces d'oxyde

hydrophiles. Il existe toutefois quelques exceptions : deux protéines sont par exemple adsorbées sur les nanoparticules de TiO_2 et de Fe_3O_4 et non adsorbées sur les nanoparticules de silice. Ces protéines sont fortement phosphorylées, or une des premières différences physico-chimiques entre la surface de TiO_2, Fe_3O_4 et SiO_2 est une fixation de groupements phosphates sur TiO_2 et Fe_3O_4 mais pas sur la silice, ce qui laisse penser que les deux protéines adsorbées uniquement sur TiO_2 et Fe_3O_4 interagissent avec la surface grâce à leurs résidus phosphorylés. Le changement de comportement de ces deux protéines montrerait qu'il existe aussi des interactions plus spécifiques entre protéines et surfaces.

D'une manière plus générale, il semble possible de créer une base de données de l'adsorption des protéines sur les nanomatériaux à partir d'une analyse protéomique à haut débit d'un très grand nombre de protéines et d'un très grand nombre de nanomatériaux. Les travaux réalisés à l'échelle moléculaire pourraient alors constituer une base de travail pour les études de toxicité à l'échelle cellulaire. Il est en effet indispensable de ne pas considérer la nanoparticule seule, mais l'objet formé par la nanoparticule et la couronne de protéines adsorbées dans des conditions réelles d'exposition. Ainsi « l'identité biologique » de la nanoparticule pourrait être définie pour chaque type de nanoparticule et d'environnement.

De plus, face au très grand nombre de nanomatériaux manufacturés dont il faudrait étudier la toxicité, les toxicologues cherchent à déterminer des critères (taille, surface, forme, propriétés physico-chimiques…) qui permettraient d'évaluer leur toxicité, ou du moins de regrouper les nanomatériaux qui auraient des caractéristiques communes en termes de toxicité. Notre étude peut soulever une question inattendue : si plusieurs nanoparticules ont la même couronne de protéines adsorbées, partagent-elles les mêmes voies de toxicité ? Si certaines caractéristiques sont propres à la nanoparticule, d'autres caractéristiques communes pourraient venir d'une « identité biologique » partagée. Il est (peut-être) possible qu'un effet de lissage des propriétés des nanomatériaux avec leur couronne de protéines adsorbées soit observé, ce qui diminuerait de fait le nombre de réponses biologiques possibles.

Protéine adsorbée, protéine stressée

L'adsorption de la myoglobine et de l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice s'accompagne d'une perte importante de structure et d'une diminution de la stabilité en température. L'état de la protéine adsorbée est un état partiellement déplié de la protéine, qui diffère d'un état dénaturé en température ou en pression, où l'on aurait par exemple une dissociation du tétramère d'hémoglobine (*2*). De nouvelles études structurales pourraient être développées : par RMN du

proton et RMN du solide pour étudier la structure de l'hémoglobine adsorbée, par mesure de fluorescence à l'échelle de la molécule unique pour étudier l'hétérogénéité de structure des protéines adsorbées, et par cristallographie X pour étudier l'ordre au sein même de la protéine adsorbée.

Cependant, la myoglobine et l'hémoglobine adsorbées conservent tout ou partie de leur fonctionnalité. Comment expliquer un maintien de l'activité de la myoglobine adsorbée et une augmentation de l'activité de l'hémoglobine adsorbée malgré une déstructuration aussi importante des protéines ? La vision classique de la relation structure/fonction des protéines est basée sur un lien étroit entre structure des protéines et activité. Par exemple, la mutagenèse dirigée cherche à moduler l'activité d'une protéine grâce à la substitution d'un seul de ses résidus. Dans notre cas, la structure secondaire impliquant 40 à 50% des acides aminés de la protéine est fortement perturbée, avec une bonne conservation de l'activité. Malgré la perte de structure, l'état d'une protéine adsorbée est donc très différent de celui d'une protéine dénaturée. L'adsorption conduit véritablement à un nouveau type de stress pour la protéine, pour lequel d'importantes modifications de structure ne sont pas nécessairement liées à des pertes d'activité, et qui s'accompagne d'une diminution très importante de la dynamique de la protéine.

Dans le cas de l'hémoglobine, seul un changement de dynamique peut expliquer la modification globale et non spécifique de son activité, puisque la même augmentation d'affinité est observée pour des systèmes différents (hémoglobine de porc, hémoglobine humaine, avec et sans effecteurs, à différents pH, tampons et températures, HbS, Hb DCL). La perte de structure ne serait donc pas le phénomène le plus important, devant la dynamique et l'activité de la protéine adsorbée. Ceci reste toutefois une hypothèse, qu'il faudrait tester en étudiant la dynamique de l'hémoglobine adsorbée, par diffusion de neutrons par exemple.

Les remarques précédentes sur la microcalorimétrie ITC sont ici aussi pertinentes : l'activité de fixation de ligands d'une protéine adsorbée pourrait être analysée par ITC pour déterminer si l'adsorption conduit à des modifications thermodynamiques propres à la fonction d'une protéine. Cela suggère de façon plus générale de réaliser de nouvelles études sur les relations entre structure, dynamique et activité des protéines adsorbées pour avoir une vision intégrée de l'état d'une protéine adsorbée.

Les protéines modèles que nous avons étudiées sont deux hémoprotéines globulaires. D'autres protéines pourraient avoir un comportement différent lors de l'adsorption, notamment les glycoprotéines pour lesquelles l'interaction avec les nanoparticules serait en grande partie due à l'interaction entre les sucres exposés à la surface de la protéine et les nanoparticules. Lorsque des

nanoparticules sont inhalées, elles sont en contact avec le mucus des voies respiratoires. Or une hypersécrétion de mucus, que l'on peut également retrouver chez les fumeurs, a été observée *in vitro* (*3*). La mucine étant une glycoprotéine du mucus, l'interaction entre mucine et nanoparticules semble donc importante à étudier pour cette voie d'exposition et les mécanismes d'élimination qui lui sont associés.

Conséquences biologiques

La couronne de protéines adsorbées sur les nanoparticules représente l'interface entre le matériau et le milieu biologique : elle est donc à la fois très importante pour le devenir des nanoparticules dans l'organisme et peut représenter un risque de toxicité directe à cause des modifications biochimiques des protéines adsorbées. Parmi les risques possibles identifiés par Nel (*4*) (voir chap. 1), nous n'avons pas observé d'oxydation des protéines adsorbées, d'agrégation ou de fibrillation. Nous avons bien observé une perte de structure et une modification d'activité, ici pour un système non enzymatique. Cependant, ces modifications sont entièrement réversibles après désorption, sauf dans le cas d'une désorption très douce où la protéine désorbée n'est pas complètement restructurée. Les protéines qui pourraient se désorber dans l'organisme ne seraient pas nécessairement les plus toxiques, le risque venant plutôt des protéines adsorbées dont la structure et l'activité seraient fortement modifiées.

Habituellement, seule la perte d'activité enzymatique est présentée comme un risque potentiel lié à l'interaction entre protéines et nanoparticules, du point de vue fonctionnel (*4*). Or l'augmentation inattendue de l'affinité de l'hémoglobine adsorbée sur les nanoparticules de silice pour l'oxygène représenterait un effet néfaste pour l'organisme, dans l'hypothèse où les nanoparticules se trouveraient dans les hématies, car elle entraînerait un plus faible relargage de l'oxygène aux tissus et donc une moins bonne oxygénation. Selon la fonction de la protéine adsorbée, une modification de son activité peut donc s'avérer néfaste, qu'elle se traduise par une augmentation ou une diminution de son activité.

Il serait intéressant de tester spécifiquement l'activité de protéines qui pourraient participer aux effets cytotoxiques ou génotoxiques observés en présence de nanoparticules. Une étude a montré que certaines nanoparticules de silice pouvaient entrer dans le noyau des cellules et interagir avec les protéines nucléaires (*5*). L'activité d'enzymes de réparation de l'ADN pourrait être étudiée en présence de nanoparticules pour voir si leur activité peut être inhibée par l'adsorption. De la même façon, on peut se demander si l'adsorption de protéines contenant des cofacteurs métalliques pourrait les rendre pro-oxydantes, et contribuer au stress oxydant observé *in vitro* pour de

nombreuses nanoparticules. A l'inverse, il serait intéressant de tester l'activité d'enzymes anti-oxydantes en présence de nanoparticules. De ce point de vue, l'adsorption de la superoxide dismutase à manganèse sur les nanoparticules de silice à partir d'un extrait de levure n'est donc pas anodine : son activité est-elle préservée lors de l'adsorption ?

Il semble d'autre part que l'interaction entre les membranes et les nanoparticules, entourées de leur couronne de protéine, soit sous-estimée (*6*) : pourtant les nanoparticules pourraient interagir avec certains groupements fonctionnels portés par les lipides, avec les protéines membranaires, avec les récepteurs... (*7*) En cas d'internalisation, les nanoparticules, si elles se retrouvent libres dans le cytosol, pourraient également interagir avec les membranes des mitochondries. Si celles-ci sont endommagées, des espèces réactives de l'oxygène et des facteurs pro-apoptotiques pourraient être relargués. L'interaction entre globules rouges et nanoparticules de silice qui conduit à l'hémolyse a été souvent observée mais rarement expliquée. Une étude publiée en 1976 propose un mécanisme d'interaction entre silanols et groupements chargés portés par les lipides membranaires dans le cas de particules de silice (*8*). L'adsorption de protéines à la surface des nanoparticules pourrait par ailleurs complètement modifier ces interactions. Etudier la biophysique des interactions entre nanoparticules (recouvertes de protéines modifiées, déstructurés) et membranes pourrait être une étape clé aussi bien en termes de toxicologie que pour les applications des nanomatériaux en biologie.

Parmi les protéines de l'extrait cellulaire qui sont préférentiellement adsorbées, nous avons observé une surreprésentation des protéines impliquées dans le cycle de vie des protéines, comme des sous-unités ribosomiques, des ARNt ligases et des protéines chaperonnes. Or personne n'a étudié l'influence des nanoparticules sur le cycle de vie des protéines : traduction, repliement, adressage, modifications post-traductionnelles, dégradation. On peut se demander si tous les effets des nanoparticules au sein des cellules ont bien été identifiés. Que se passe-t-il par exemple si une protéine en cours de synthèse a une forte affinité pour la nanoparticule ?

Bibliographie

1. Armengaud J. (2013) Microbiology and proteomics, getting the best of both worlds!, *Environmental Microbiology 15*, 12-23.
2. Pin S., Royer C. A. (1994) High-pressure fluorescence methods for observing subunit dissociation in hemoglobin, *Methods in Enzymology 232*, 42-55.
3. Chen E. Y. T., Garnica M., Wang Y.-C., Chen C.-S., Chin W.-C. (2011) Mucin secretion induced by titanium dioxide nanoparticles, *Plos One 6*.
4. Nel A. E., Madler L., Velegol D., Xia T., Hoek E. M. V., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M. (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface, *Nat Mater 8*, 543-557.
5. Chen M., von Mikecz A. (2005) Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO2 nanoparticles, *Experimental Cell Research 305*, 51-62.
6. Leroueil P. R., Hong S., Mecke A., Baker J. R., Orr B. G., Banaszak Holl M. M. (2007) Nanoparticle interaction with biological membranes: does nanotechnology present a Janus face?, *Accounts of Chemical Research 40*, 335-342.
7. Marano F., Hussain S., Rodrigues-Lima F., Baeza-Squiban A., Boland S. (2011) Nanoparticles: molecular targets and cell signalling, *Archives of Toxicology 85*, 733-741.
8. Depasse J., Warlus J. (1976) Relation between toxicity of silica and its affinity for tetraalkylammonium groups - Comparision between SiO2 and TiO2, *Journal of Colloid and Interface Science 56*, 618-621.

Adsorption des protéines sur les nanomatériaux. Biochimie et physico-chimie d'un nouveau stress

Les nanomatériaux posent de nouvelles questions en termes de toxicologie humaine et environnementale et représentent une nouvelle interface avec le milieu biologique aux propriétés spécifiques. De nombreuses inconnues demeurent, en particulier à l'échelle moléculaire, pour permettre d'expliquer certains mécanismes de toxicité. Lorsqu'elles entrent en contact avec le milieu biologique, les nanoparticules se couvrent d'une couche de protéines adsorbées. Celle-ci leur confère une nouvelle « identité biologique » qui contrôle la réponse cellulaire et leur devenir au sein de l'organisme.

Nous avons étudié l'adsorption de protéines modèles sur la silice nanostructurée. Après avoir caractérisé la silice nanoporeuse et les nanoparticules de silice utilisées, l'adsorption de la myoglobine, de l'hémoglobine et des protéines d'un extrait cellulaire de levure a été étudiée afin de déterminer les paramètres physico-chimiques et thermodynamiques de l'adsorption des protéines sur la silice. Un enrichissement en résidus basiques, regroupés en clusters de charge, favorise l'adsorption des protéines grâce à la formation d'interactions électrostatiques avec la surface chargée de la silice, indépendamment de la charge globale de la protéine. A l'inverse, un enrichissement en résidus aromatiques est défavorable à l'adsorption car ces résidus forment des interactions π-π qui rigidifient la structure de la protéine. L'identification des protéines adsorbées et non adsorbées à partir d'un milieu complexe pourrait également être utilisée pour les études de toxicité cellulaire.

A partir de l'étude de la structure, de la dynamique et de l'activité de la myoglobine et de l'hémoglobine adsorbées sur les nanoparticules de silice, nous avons cherché à définir l'état d'une protéine adsorbée. L'étude de la structure, réalisée par dichroïsme circulaire, spectroscopie UV-visible, d'absorption X, infrarouge, fluorescence et microcalorimétrie, montre une perte partielle de structure importante des protéines adsorbées associée à une grande hétérogénéité de conformations, sans modification majeure de la structure de l'hème. Deux sites potentiels d'interaction entre myoglobine et nanoparticules de silice ont été identifiés à l'aide d'une technique de cartographie de surface par irradiation. L'étude de la dynamique de la myoglobine adsorbée par diffusion élastique et inélastique de neutrons a permis de montrer que l'adsorption s'accompagnait d'une diminution importante de la flexibilité de la protéine. Malgré la perte de structure, la metmyoglobine adsorbée conserve une activité de fixation de ligands très proche de celle de la protéine libre. L'hémoglobine adsorbée présente de façon inattendue une augmentation de son affinité pour l'oxygène et une diminution de sa coopérativité, sans dissociation du tétramère. Cet effet est reproductible lors de l'adsorption de l'hémoglobine humaine, de l'hémoglobine pontée DCL et de l'hémoglobine mutée S. Deux effecteurs permettent par ailleurs de moduler l'affinité de l'hémoglobine adsorbée. Aussi importantes soient-elles, les modifications de structure et d'activité observées sont entièrement réversibles après désorption dans des conditions douces. L'adsorption des hémoprotéines sur les nanoparticules de silice représente véritablement un nouveau type de stress avec résilience pour les protéines en termes de relations entre structure, dynamique et activité.

Protein adsorption on nanomaterials. Biochemistry and physical-chemistry of a new stress

Nanomaterials raise new questions in environmental and human toxicology and represent a novel interface with specific properties with the biological medium. Several unknown remain to explain all the mechanisms of toxicity, especially at the molecular lever. When they enter the biological medium, nanoparticles get covered by a protein corona. This corona yields to a new “biological identity” that controls the cellular response to nanoparticles and their fate in the organism.

We studied the adsorption of model proteins on nanostructured silica. The first part is dedicated to the characterization of nanoporous silica and silica nanoparticles that we used. Then the adsorption of myoglobin, hemoglobin and protein mixture from yeast cells was studied to determine the thermodynamic and physical-chemical parameters of protein adsorption on silica. The enrichment of basic residues, gathered in charge clusters, favors the adsorption of proteins by the formation of electrostatic interactions with the charged surface of silica, independently of the global charge of the protein. On the contrary, the enrichment in aromatic residues is unfavorable to protein adsorption because they form π-π interactions that rigidify the protein structure. The identification of adsorbed and non-adsorbed proteins from a complex medium could also be used for cellular toxicity studies.

From the study of the structure, the dynamics and the activity of myoglobin and hemoglobin adsorbed on silica nanoparticles, we tried to define the state of an adsorbed protein. The structural study, based on circular dichroism, fluorescence, infrared, X-ray and UV-visible spectroscopy and microcalorimetry, shows a substantial partial structure loss of adsorbed proteins together with a high conformational heterogeneity, without major modifications of the heme structure. Two potential interaction sites of myoglobin with silica nanoparticles have been identified by a footprinting technique. The study of adsorbed myoglobin dynamics by elastic and inelastic neutron scattering highlighted the important decrease of protein dynamics that occurs upon adsorption. However, despite the structure loss, adsorbed metmyoglobin retains almost all of its activity of ligand binding. Unexpectedly, adsorbed hemoglobin shows an increase of its oxygen affinity and a decrease of its cooperativity, without any dissociation of the tetramer. This effect can be reproduced on human hemoglobin, cross-linked DCL hemoglobin and variant S hemoglobin. Besides, two effectors allow modulating the affinity of adsorbed hemoglobin. Despite the extent of structural and activity changes, all these modifications are entirely reversible upon desorption in soft conditions. The adsorption of hemoproteins on silica nanoparticles depicts a new sort of stress with resilience for proteins in terms of structure, dynamics and activity relationship.