



HAL
open science

Interactions protéines-nanoparticules : émergence de nouveaux facteurs déterminant la formation de la couronne de protéines

Laurent Marichal

► **To cite this version:**

Laurent Marichal. Interactions protéines-nanoparticules : émergence de nouveaux facteurs déterminant la formation de la couronne de protéines. Biophysique. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS100 . tel-01809525

HAL Id: tel-01809525

<https://theses.hal.science/tel-01809525>

Submitted on 6 Jun 2018

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.

Interactions protéines-nanoparticules Émergence de nouveaux facteurs déterminant la formation de la couronne de protéines

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°571 Sciences Chimiques : Molécules, Matériaux,
Instrumentation et Biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat: Chimie

Thèse présentée et soutenue à Saint-Aubin, le 27 avril 2018, par

M. Laurent MARICHAL

Composition du Jury :

Mme Claire-Marie PRADIER Directrice de Recherche Université Pierre et Marie Curie/CNRS (Laboratoire de Réactivité de Surface)	Présidente
M. Jean-Marie DUPRET Professeur d'Université Université Paris Diderot-Paris 7 (Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative)	Rapporteur
Mme Valérie FOREST Maitre de Conférences École des Mines de Saint Etienne (Centre Ingénierie et Santé U1059 Inserm - Sainbiose)	Rapporteuse
Mme Camille LOUPIAC Maitre de Conférences AgroSup Dijon (UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques)	Examinatrice
M. Jean-Pierre MAHY Professeur d'Université Université Paris-Sud (Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay)	Examineur
M. Jean LABARRE Directeur de Recherche CEA Saclay (Service de Biologie Intégrative et Génétique Moléculaire)	Directeur de thèse
M. Serge PIN Directeur de Recherche CEA Saclay/CNRS (Laboratoire Interdisciplinaire sur l'Organisation Nanométrique et Supramoléculaire)	Directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse, financée par le Programme Transversal Toxicologie du CEA, a été effectuée au CEA Saclay au sein du Laboratoire Interdisciplinaire sur l'Organisation Nanométrique et Supramoléculaire (LIONS) et du Service de Biologie Intégrative et de Génétique Moléculaire (SBIGeM) du 1^{er} décembre 2014 au 28 février 2018.

Je remercie en premier lieu mes directeurs de thèse, Serge Pin (CEA Saclay/LIONS, CNRS) et Jean Labarre (CEA Saclay/SBIGeM), sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. J'ai toujours pu trouver auprès de vous deux de l'écoute, des encouragements, de la bienveillance ainsi qu'une grande patience... Vos différences de tempéraments se sont avérées extrêmement complémentaires et m'ont permis de donner le meilleur de moi-même. Je suis réellement honoré d'avoir été votre étudiant.

Je remercie également tout particulièrement Jean-Philippe Renault qui a été, pour moi, mon troisième directeur de thèse. Merci pour son très grand apport scientifique et pour sa faculté à apporter les bonnes réponses même si ce ne sont presque jamais les réponses que l'on aimerait entendre !

Je remercie mes collègues du LIONS pour leurs apports scientifiques. Merci notamment à Antoine Thill pour son travail sur les simulations de sphères sur des sphères. Merci à Élodie Barruet et Valérie Geertsens pour leur aide sur les expériences d'ICP-MS. Je remercie Fanny Buhler-Varenne pour ses connaissances en diffusion dynamique de la lumière et en zétamétrie. Je remercie également Sandrine Moreau pour la gestion des commandes.

Je remercie mes collègues du SBIGeM pour leur soutien. Je remercie notamment Benoit D'Autréaux pour son aide dans la purification des hémoprotéines par FPLC. Merci à Jean-Christophe Aude pour ses analyses en bio-informatique. Merci à Gilles Lagniel d'avoir effectué les Western Blotting. Je remercie Stéphane Chédin pour son aide dans l'application de la méthode des Mégaprimers. Merci à Sylvie Labarre-Mariotte de m'avoir aidé à réaliser mes premières expériences de biologie moléculaire. Je remercie Jean-Baptiste Charbonnier et Carine Tellier-Lebegue de m'avoir permis d'utiliser le calorimètre VP-ITC. Je remercie également Rosa Alves Barrosa d'avoir préparé bon nombre de milieux de culture.

Un grand merci également à toutes les personnes externes avec qui j'ai pu collaborer étroitement. Je remercie Fabrice Cousin et Sophie Combet, du Laboratoire Léon Brillouin (CEA Saclay), pour leurs grands apports sur les techniques de diffusion des neutrons aux petits angles et de dichroïsme

circulaire. Merci à Yves Boulard (CEA Saclay/SB2SM) pour son travail sur les simulations de dynamique moléculaire. Merci à Jean-Luc Pellequer et Jean-Marie Teulon (Institut de Biologie Structurale, Grenoble) pour leur travail sur la microscopie à force atomique. Merci à Jean Armengaud et Jean-Charles Gaillard (CEA Marcoule/SPI) pour leur travail en spectrométrie de masse. Je remercie Jean Mary et Stéphane Hourdez (Station Biologique de Roscoff) de m'avoir permis d'obtenir et de purifier les hémoglobines d'annélides. Je remercie Pierre Chervy (CEA Saclay/SB2SM) pour son aide en microscopie électronique à transmission. Je remercie Ahmed Haouz, de l'Institut Pasteur (Paris), pour avoir lancé une campagne de cristallogénèse et avoir fait des analyses par diffraction des rayons X. Je remercie Stéphane Moutereau (Hôpitaux Universitaires Henri Mondor) de m'avoir permis de mieux caractériser l'hémoglobine de porc. Merc à Camille Roesch (Izon Science, Lyon) d'avoir effectué les expériences de TRPS. Merci à Andrea Zittolo (Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin) de m'avoir permis d'effectuer des expériences d'absorption des rayons X.

Je remercie également tous mes camarades, stagiaires, doctorants et postdocs, pour leurs apports professionnels comme personnels. Je remercie Anouchka Gatin et Nolwenn Raffray, mes premières stagiaires qui m'ont apporté au moins autant que je leur ai apporté. Un grand merci à Alexy Freitas, Maxime Lainé, Théo Veaudor, Cyril Carvalho, Josiane Kadissy, Aurélie Paquirissamy, Alise Ponsero, Indranil Adhya, Diyavarshini Gopaul, Yuanyuan Liao, Gaël Giraudon--Colas, Paul Datin.

Je remercie mes financeurs, au sein du Programme Transversal Toxicologie du CEA : Philippe Bergonzo, Jean-Michel Dolo, et Laure Sabatier.

Enfin, un très grand merci à ma famille et mes amis pour m'avoir épaulé durant toute ma thèse et m'avoir supporté... dans tous les sens du terme. Merci à mon frère Julien, à mes amis Florian, Ignacio, François, Aurélien. J'ai une pensée particulière pour mes parents qui ont été mes plus fervents supporters et m'ont permis d'en arriver là.

« C'est une bonne blague Laurent... et dire qu'il aura fallu attendre trois ans pour en entendre une ! »
dirent d'une même voix Jean et Serge

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction.....	1
1. Le nanomonde.....	1
1.1. Une question de taille	1
1.2. Les nanoparticules.....	2
2. Les nanomatériaux dans notre quotidien	5
2.1. Production de nanomatériaux	5
2.2. Propriétés des nanomatériaux.....	7
2.3. Utilisation des nanomatériaux	7
2.4. La nanotoxicologie.....	8
2.5. Vers une nanomédecine.....	13
3. Les interactions protéines/surface.....	14
3.1. Adsorption d'acides aminés et de peptides sur une surface de silice	14
3.2. L'adsorption des protéines sur une surface	18
3.3. Adsorption des protéines sur la silice	22
4. Principaux paramètres influençant l'interaction protéines/nanoparticules de silice.....	23
4.1. Effet de l'environnement biologique	24
4.2. Impact du type de nanoparticules de silice.....	25
4.2.1. Effet de la surface des nanoparticules de silice	25
4.2.2. Effet taille des nanoparticules.....	27
4.3. Effet du type de protéines.....	29
4.3.1. Effet de l'adsorption sur la structure et la fonction des protéines	29
4.3.2. Étude de l'effet taille des protéines	31
4.3.3. Etudes sur un mélange de protéines.....	33
5. Approches expérimentales.....	36
Bibliographie – Chapitre 1.....	38
Chapitre 2 : Caractérisation des nanoparticules de silice et des hémoprotéines.....	48
1. Caractérisation des nanoparticules de silice.....	48
1.1. Observation des nanoparticules de silice au microscope électronique.....	48
1.2. Mesure du rayon physique des nanoparticules de silice	51
1.3. Mesure du rayon hydrodynamique des nanoparticules de silice	52
1.4. Mesure du potentiel ζ des nanoparticules.....	54
1.5. Caractérisation des nanoparticules de silice par spectroscopie infrarouge	55
2. Structure des hémoprotéines	57
2.1. Généralités	57
2.2. L'hème.....	58
2.3. Spectroscopie UV-visible des hémoprotéines.....	58
2.4. Myoglobine.....	59
2.5. Hémoglobine	60
2.6. Hémoglobines extracellulaires	60
2.7. Hémoglobine de <i>Riftia pachyptila</i>	62
2.8. Hémoglobine d' <i>Arenicola marina</i>	62
2.9. L'effet stabilisateur des cations divalents	66
3. Mesure de la taille des protéines.....	66

3.1.	Rayon minimum	66
3.2.	Rayons expérimentaux	68
3.3.	Mesure du rayon de giration des protéines.....	69
3.4.	Mesure du rayon hydrodynamique des protéines.....	71
3.5.	Mesures du potentiel ζ des protéines et des nanoparticules	73
3.6.	Caractérisation des hémoprotéines par spectrophotométrie UV-visible	73
4.	Conclusion	77
	Bibliographie – Chapitre 2.....	79
Chapitre 3 : Effet de la taille des protéines sur l'interaction protéines/nanoparticules		82
1.	Isothermes d'adsorption par déplétion	83
1.1.	Modèle de Langmuir	83
1.2.	Évaluation de la quantité maximale de protéines adsorbables sur une sphère	85
1.3.	Effet de la taille des protéines sur les isothermes d'adsorption.....	87
1.4.	Effets de la nature du tampon et du pH.....	90
2.	Isothermes d'adsorption par calorimétrie	94
2.1.	Titration calorimétrique isotherme.....	94
2.2.	Comparaison avec les isothermes par déplétion	102
3.	Dichroïsme circulaire.....	104
3.1.	Spectres Dichroïques des SiNPs et des hémoprotéines.....	104
3.2.	Spectres de DC des mélanges hémoprotéines/LUDOX.....	105
3.3.	Impact de l'adsorption sur la structure secondaire	107
3.4.	Impact de l'adsorption sur la structure secondaire et tertiaire	108
4.	Diffusion de neutrons aux petits angles.....	111
4.1.	Diffusion des SiNPs et des hémoprotéines	111
4.2.	Etude des mélanges hémoprotéines/LUDOX en 100% D ₂ O.....	116
4.3.	Etude des mélanges hémoprotéines/LUDOX en 60% D ₂ O.....	122
5.	Conclusion	126
	Bibliographie – Chapitre 3.....	130
Chapitre 4 : Effet de la taille des nanoparticules sur l'interaction protéines/nanoparticules.....		135
1.	Etude de l'effet taille des nanoparticules en présence d'hémoprotéines.....	136
1.1.	Isothermes d'adsorption par déplétion	136
1.2.	Dichroïsme circulaire.....	140
1.2.1.	Spectres dichroïques des SiNPs et des hémoprotéines	140
1.2.2.	Spectres DC des mélanges hémoprotéines/SiNPs	141
2.	Protéomique appliquée à l'étude de l'effet taille des nanoparticules.....	146
2.1.	Isothermes d'adsorption sur extraits protéiques.....	146
2.2.	Analyse protéomique	148
2.2.1.	Comparaison des protéines adsorbées et non adsorbées	152
2.2.2.	Comparaison entre les protéines Ads	156
3.	Conclusion	158
	Bibliographie – Chapitre 4.....	161
Chapitre 5 : Importance de la méthylation sur l'interaction protéines/nanoparticules.....		163
1.	Affinité des protéines à ARN pour les SiNPs	163
1.1.	Importance des motifs RGG	163

1.2.	Importance de la méthylation des résidus arginine.....	171
1.2.1.	Cas de Npl3.....	171
1.2.2.	Cas d'autres protéines à motifs RGG.....	174
2.	Importance de la diméthylation asymétrique.....	175
2.1.	Isothermes d'adsorption de peptides de synthèse.....	176
2.2.	Titration calorimétrique isotherme des peptides RGG.....	181
2.3.	Impact structural de l'adsorption de peptides RGG.....	184
2.4.	Impact de l'adsorption sur l'environnement électrostatique du tryptophane.....	187
2.5.	Étude des peptides RGG par simulation de la dynamique moléculaire.....	189
2.5.1.	Propriétés électrostatiques des acides aminés testés.....	190
2.5.2.	Simulations de l'adsorption des peptides sur une surface de silice.....	191
3.	Conclusion.....	193
	Bibliographie – Chapitre 5.....	196
	Chapitre 6 : Discussion et perspectives.....	200
1.	Perspectives.....	200
1.1.	Mesure de la taille de la couronne de protéines par TRPS.....	201
1.2.	Mesure de la taille de la couronne de protéines par AFM.....	205
1.3.	Cristallographie d'hémoprotéines adsorbées sur des nanoparticules de silice.....	208
2.	Discussion générale.....	212
	Bibliographie – Chapitre 6.....	221
	Chapitre 7 : Protocoles et Méthodes d'Analyse.....	223
1.	Synthèse et caractérisation des nanoparticules de silice.....	223
1.1.	Synthèse des nanoparticules de silice.....	223
1.2.	Microscopie électronique en transmission.....	224
1.3.	Diffusion des rayons X aux petits angles.....	224
1.4.	Diffusion de neutrons aux petits angles.....	225
1.5.	Diffusion dynamique de la lumière.....	227
1.6.	Charge de surface.....	227
1.7.	Spectroscopie infrarouge.....	229
2.	Purification et caractérisation des hémoprotéines.....	230
2.1.	Myoglobine.....	230
2.2.	Hémoglobine.....	230
2.3.	Hémoglobines extracellulaires d'annélides.....	232
2.4.	Spectrophotométrie UV-visible.....	235
2.5.	ICP-MS.....	235
3.	Techniques de mesure des interactions protéines/nanoparticules.....	236
3.1.	Isotherme d'adsorption par déplétion.....	236
3.1.1.	Principe.....	236
3.1.2.	Hémoprotéines.....	237
3.1.3.	Extraits protéiques de levure.....	238
3.1.4.	Peptides synthétiques.....	239
3.2.	Fluorimétrie.....	239
3.3.	Titration calorimétrique isotherme.....	240
3.4.	Dichroïsme circulaire.....	243
3.5.	Spectrométrie de masse Shotgun.....	246
4.	Techniques de biologie moléculaire.....	246

4.1.	Souches de levures et milieux de cultures utilisés	246
4.2.	Construction des plasmides	247
4.3.	Transformation chez <i>S. cerevisiae</i>	250
4.4.	Expression des plasmides et extraction des protéines solubles	251
4.5.	Western blotting	252
4.6.	Peptides de synthèse.....	252
	Bibliographie – Chapitre 7	254
	Annexe : Articles.....	256

Chapitre 1 : Introduction

« There is plenty of room at the bottom. »

Richard P. Feynman

Conférence annuelle de l'American Physical Society (1959)

1. Le nanomonde

1.1. Une question de taille

Afin de comprendre le monde qui nous entoure, la sagesse impose bien souvent de prendre du recul. Paradoxalement, la seule façon d'étudier dans toute sa complexité un système, qu'il soit physique ou biologique, consiste également à s'avancer au plus près, à rentrer au cœur de la matière. C'est ainsi que depuis l'invention du premier microscope, au XVII^e siècle, l'Homme n'a eu de cesse de s'intéresser à l'infiniment petit et d'y faire des découvertes révolutionnaires. Depuis la découverte de la cellule biologique par Robert Hooke en 1665 jusqu'à l'identification et la caractérisation des particules élémentaires telles que le Boson de Higgs (découverte officiellement par le CERN en 2012), en passant par les premières déterminations de la structure de virus et de protéines dans les années 1950, grâce à la cristallographie, des avancées fondamentales ont été faites. La principale limite dans l'étude de l'infiniment petit a généralement été une limite technique qui empêcha d'avoir accès aux tailles inférieures. Néanmoins, au cours de ces quatre derniers siècles, le progrès technique a permis des découvertes qui révolutionnèrent à plusieurs reprises la vision du monde tel que nous le connaissons. De nos jours, la limite technique est moins perceptible puisqu'il est possible d'étudier la matière dans toutes les gammes d'échelle de taille, depuis l'échelle macroscopique (visible à l'œil nu) jusqu'à l'échelle subatomique ($< 1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$).

Il apparaît maintenant clairement que chaque niveau de structure, présent à une échelle de taille donnée, possède une diversité et une complexité extrêmement importante. Cependant, bien que possédant des propriétés propres, un niveau de structure donné dépendra nécessairement des échelles de taille inférieures et supérieures. Ceci est particulièrement vrai dans le cas de l'étude du vivant. La compréhension approfondie du fonctionnement des mécanismes cellulaires ne peut ainsi se faire qu'en étudiant la structure et la biochimie des molécules qui composent la cellule. Ainsi, bien souvent, certains mécanismes biologiques ne peuvent être pleinement compris qu'à l'échelle moléculaire, c'est-à-dire l'échelle nanométrique ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$, voir Fig. 1-1).

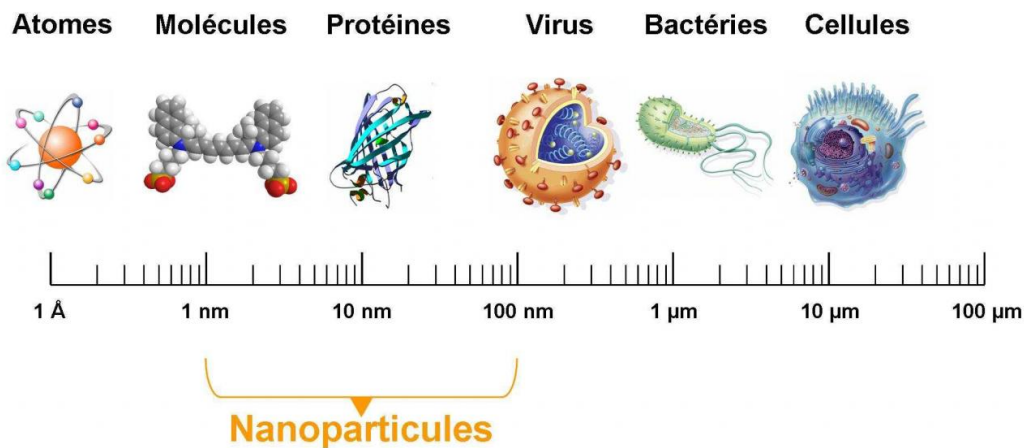


Figure 1-1 : Échelle de taille représentant différents niveaux de structure d'objets biologiques.

Les nanoparticules sont une famille de composés qui, par définition, possèdent la même gamme de taille que les macromolécules composant les cellules (entre 1 et 100 nm). Comme nous allons le voir, cette petite taille leur permet d'être présentes dans tous les environnements biologiques. Cette présence n'est pas sans conséquence quant au bon fonctionnement du vivant. Les nanoparticules vont, en particulier, interagir avec les protéines présentes. Or cette interaction peut avoir des conséquences à la fois sur le devenir des protéines et des nanoparticules.

Cette thèse porte ainsi sur l'**étude de la formation de la couronne de protéines**. À partir d'études sur divers systèmes protéines/nanoparticules, un affinement de la compréhension des mécanismes moléculaires d'adsorption des protéines est attendu. En outre, au-delà de cette approche mécanistique essentiellement fondamentale, une meilleure compréhension des conséquences de la présence de nanoparticules dans les milieux biologiques est également espérée. En effet, une meilleure connaissance des paramètres physico-chimiques déterminants la formation et la composition de la couronne protéique est primordiale pour mieux aborder les problématiques liées à la nanomédecine et à la nanotoxicologie.

1.2. Les nanoparticules

D'un point de vue physique, un **nano-objet** est un objet aux contours définis dont au moins une des trois dimensions est à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire comprise entre 1 et 100 nm. Les nano-objets peuvent ensuite être divisés en trois catégories : les nanoplaques, les nanofibres, et les **nanoparticules** (ISO/TS 80004-2:2015). La distinction entre ces termes se trouve dans le fait qu'ils possèdent respectivement une, deux, ou trois dimensions comprises à l'échelle nanométrique. Cette limite de taille est très controversée car parfaitement arbitraire. En effet, il n'existe aucune différence physico-chimique fondamentale entre deux objets de taille inférieure ou supérieure à 100 nm.

Cependant, dans le cadre de cette thèse, la définition de nanoparticule indiquée ici convient tout à fait. Au-delà de ces questions de dimensions, les nano-objets peuvent présenter une incroyable diversité physico-chimique (Fig. 1-2).

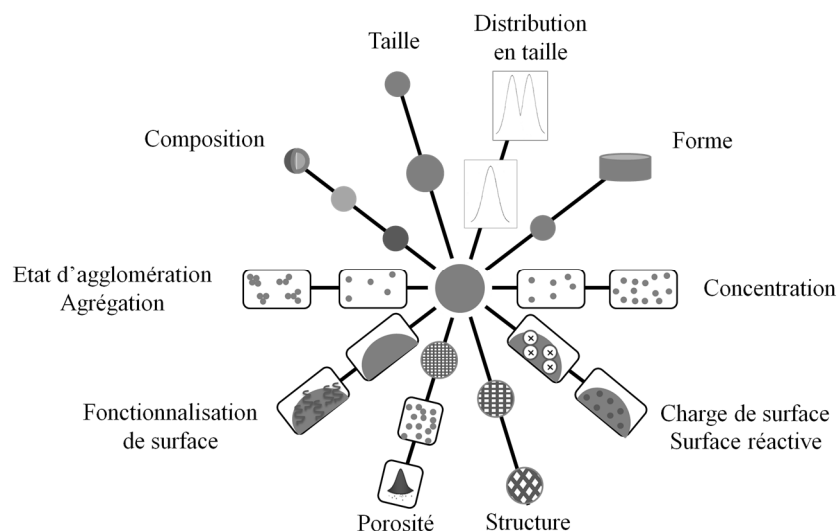


Figure 1-2 : Principales caractéristiques physico-chimiques permettant de caractériser précisément un nano-objet (ISO/TC 229, 2009).

Tout d'abord, la **composition chimique** des nano-objets est extrêmement diverse. En effet, la plupart des éléments peuvent être utilisés pour former des nano-objets homogènes comme hétérogènes. De nombreux nano-objets formés de complexes métalliques, non métalliques voire organiques sont ainsi conçus pour leurs propriétés particulières (Jha *et al.*, 2014). De plus, des nano-objets de nature chimique identiques peuvent posséder une **structure** radicalement différente selon leur état cristallin ou amorphe, voire selon le type de cristal formé. L'exemple des nano-objets carbonés est révélateur. Il existe en effet une grande diversité de structures cristallines (diamant, nanotube, fullerène, graphite, Fig. 1-3). Cette diversité structurale du carbone induit une diversité de taille ainsi qu'une forte différence de toxicité (Li *et al.*, 2012).

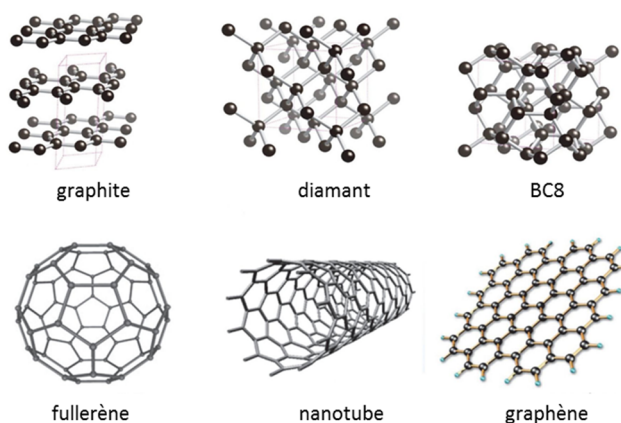


Figure 1-3 : Six phases stables et métastables du carbone. Seuls le graphite et le diamant existent naturellement (Oganov *et al.*, 2013).

Cette diversité structurale s'accompagne généralement d'une diversité de la **forme** des nano-objets. Deux cas de figure peuvent se présenter. Si les nano-objets sont bien distincts et de tailles identiques (nano-objets monodisperses), une forme caractéristique généralement assimilable à un motif géométrique relativement simple (sphère, tube, étoile, parallélépipède...) pourra être identifiée. Ce cas, plutôt rare, se présente pour des nano-objets synthétiques. Dans la grande majorité des cas cependant, les nano-objets présents possèdent des formes variables ainsi qu'une grande **distribution en taille** (nano-objets polydisperses). Cette polydispersité est encore accrue dans le cas d'objets **agrégés**. Ces agrégats vont former un nouvel objet de forme différente et de taille plus élevée donc différent des nano-objets initiaux.

Enfin, à la surface de ces nano-objets, la **réactivité** peut être très variée avec l'existence de surfaces polaires ou apolaires, chargées positivement, négativement, ou neutres. En outre il est courant de modifier les propriétés de la surface des nano-objets en recourant à une fonctionnalisation de celle-ci. Une **fonctionnalisation** peut être de nature covalente comme par exemple avec l'ajout de polyéthylène glycol (PEG) à la surface de nano-objets à des fins thérapeutique (Schöttler *et al.*, 2016). Elle peut également être de nature électrostatique, avec l'adsorption de protéines notamment (Walczyk *et al.*, 2011).

On comprend ainsi qu'englober dans une même dénomination des objets de natures et de structures aussi différentes pose des problèmes quant à l'étude de leur potentielle interaction avec le vivant. En effet, il est à ce jour très risqué d'extrapoler un effet biologique d'un nano-objet à partir d'analyses faites pour d'autres nano-objets même très proches. Une approche au cas par cas est nécessaire et c'est ce qui a été fait dans cette thèse. Ainsi, seules des nanoparticules de silice (SiNPs) ont été étudiées. La silice est composée de dioxyde de silicium (SiO_2) sous forme amorphe. Elle est donc différente du quartz, également constitué de SiO_2 mais possédant plusieurs structures cristallines (Rimola *et al.*, 2013). Il est par exemple établi que cette différence de structure a un impact considérable sur la toxicité puisque la silice amorphe est relativement inerte tandis que le quartz présente une forte toxicité et est notamment à l'origine de la maladie pulmonaire appelée silicose (Fubini, 1998).

2. Les nanomatériaux dans notre quotidien

2.1. Production de nanomatériaux

La pertinence d'étudier l'influence biologique des nanoparticules réside dans **leur omniprésence dans l'environnement**. En effet, que ce soit dans les sols, les eaux, ou même l'air, tous les milieux en contiennent. Généralement ces nanoparticules sont d'origine naturelle, issues de l'érosion des sols, ou de cendres volcaniques. Toutefois, depuis l'ère industrielle, une production anthropique importante a lieu. La majorité de cette production n'est pas désirée et est le résultat de l'activité humaine moderne. Une part importante des nanoparticules contenues dans l'air provient ainsi du transport routier (60%) et des activités industrielles et ménagères (23% ; Air Quality Expert Group, 2005). Il a également été montré qu'une quantité importante de nanoparticules était produite par l'activité ferroviaire et contaminait localement l'air ambiant (Moreno *et al.*, 2015). Cependant, une nouvelle catégorie est apparue ces dernières décennies, celle des nanoparticules manufacturées. Cette catégorie attire tous les regards car elle nous interroge sur l'innocuité de composés présents dans des objets du quotidien. Aussi, une grande méfiance envers les produits contenant des nanoparticules s'est installée chez les consommateurs (Fig. 1-4).



Figure 1-4 : Premières de couverture de journaux interpellant sur la présence de nanoparticules dans les objets du quotidien. À gauche : 60 Millions de Consommateurs (septembre 2017). À droite : Que Choisir (février 2018).

Les nanoparticules manufacturées sont généralement regroupées sous la dénomination de **nanomatériaux**. La Commission Européenne définit les nanomatériaux comme tout matériau « naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm » (recommandation n°2011/696/UE). Cette définition est actuellement en cours de rediscussion par la Commission Européenne.

La production de nanomatériaux augmente d'années en années. À l'heure actuelle, le dioxyde de silicium représente plus de la moitié des nanomatériaux produits dans le monde (Tab. 1.1.). Le dioxyde de titane et l'oxyde de zinc ont également des productions conséquentes. Cependant la Commission Européenne a établi que les groupes de nanomatériaux représentant le plus de potentiel industriel à l'avenir sont : argent, or, zinc, sélénium, titane, et carbone (Commission Européenne : SWD 288, 2012).

Tableau 1-1 : Production mondiale de nanomatériaux en 2014 (Nanomaterials, The global market, Forecast from 2010 to 2025, Future markets, Ed. 2, February 2015).

Nanomatériaux	Production mondiale (tonne)
Dioxyde de silicium	185000
Dioxyde de titane	60000
Oxyde de zinc	32000
Nanoargiles	25000
Oxyde d'aluminium	5000
Nanotubes de carbone	1550
Oxyde de cérium	880
Nanocellulose	400
Oxyde de cuivre	290
Argent	135
Oxyde Antimoine/Étain	120
Oxyde de zirconium	80
Graphene	60
Fullerènes	40
Oxyde de bismuth	35
Oxyde de magnésium	15
Oxyde de fer	9
Oxyde de cobalt	5
Nickel	5
Boîtes quantiques	4.5
Oxyde de manganèse	2
Or	1
Dendrimères	0,3

2.2. Propriétés des nanomatériaux

L'intérêt des industriels pour les nanomatériaux provient de leurs propriétés intrinsèques fondamentalement différentes comparés à des matériaux de taille micrométrique ou millimétrique. Il y a deux principaux effets pour expliquer cette différence : les **effets de taille** et les effets quantiques. Les effets quantiques ne seront pas détaillés ici. Ils permettent d'expliquer par exemple le renforcement des propriétés électriques, optiques, et magnétiques des boîtes quantiques (Jayalakshmi *et al.*, 2006). Les effets de taille sont dus à la très importante augmentation du ratio surface/masse de la particule appelé également surface spécifique. L'augmentation de la surface spécifique induit une forte augmentation de la réactivité chimique à la surface des nanoparticules. Ainsi, à masse égale, des nanoparticules auront une plus grande surface réactionnelle par rapport à de plus grosses particules (Fig. 1-5). L'intérêt industriel est évident puisqu'une quantité inférieure de produit sera nécessaire pour arriver à un résultat équivalent.

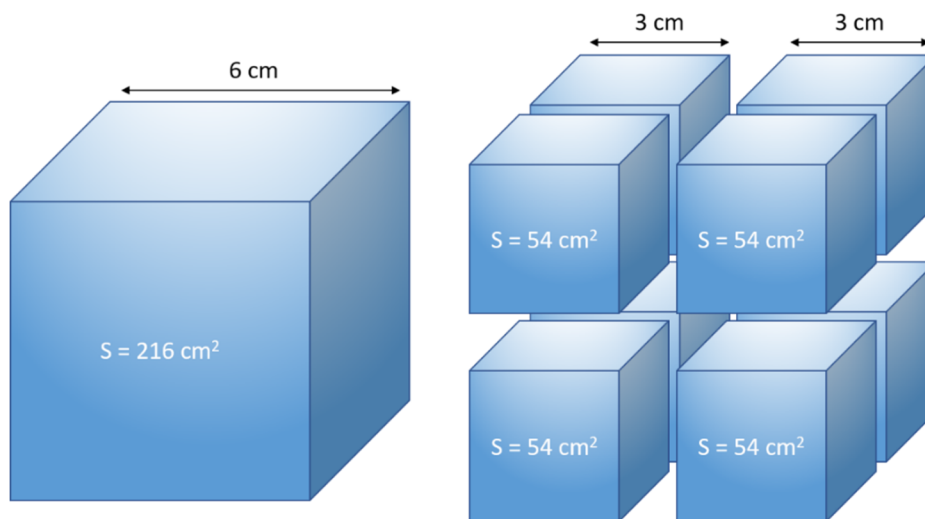


Figure 1-5 : Comparaison des surfaces d'un gros cube de 6 cm de côtés et de 8 petits cubes de 3 cm de côtés. À volume égal, les 8 petits cubes ont une surface S égale à 432 cm^2 , deux fois plus importante que le gros cube.

2.3. Utilisation des nanomatériaux

De nos jours, les nanomatériaux sont utilisés dans tous les secteurs industriels. On les retrouve notamment dans des produits issus des industries agroalimentaires, cosmétiques, textiles, ou encore pharmaceutiques, donc des produits en contact direct avec le corps humain.

Dans le secteur agroalimentaire, quatre additifs alimentaires autorisés contiennent des nanomatériaux : il s'agit du dioxyde de silicium amorphe (E551), du dioxyde de titane (E171), de l'oxyde de fer (E172) et du carbonate de calcium (E170). Suivant le type d'aliment, l'ajout d'un ou plusieurs de

ces additifs a différentes fonctions. On peut notamment citer les propriétés anti-agglomérantes et clarifiantes de la silice qui vont être exploitées respectivement dans des poudres alimentaires et des boissons (Wang *et al.*, 2013). Les trois autres additifs sont principalement utilisés pour leur fonction de coloration (INRS, 2014).

Les produits cosmétiques, textiles, et pharmaceutiques peuvent contenir une très grande diversité de nanomatériaux. Une liste des nanomatériaux utilisés par ces industries a été communiquée par l'INRS (2014). Ainsi, bon nombre de nanomatériaux sont utilisés pour leurs propriétés antimicrobiennes. L'argent par exemple est utilisé pour ses propriétés bactéricides et fongicides, et a des applications industrielles dans tous les domaines dont le médical, les objets de sport/loisirs ou encore les emballages à contact alimentaire (Pulit-Prociak et Banach, 2016). De façon similaire, l'oxyde de zinc possède des propriétés antimicrobiennes. Son usage est plus répandu que l'argent du fait de ses propriétés de blocage des ultraviolets (UV) ainsi que de son plus faible coût (Dastjerdi et Montazer, 2010). Une revue de l'utilisation des nanoparticules utilisées comme "nanoantibiotiques" a été faite par Huh and Kwon (2011). Le dioxyde de titane possède également des propriétés antibactériennes mais est surtout utilisé pour sa capacité à réfléchir les UV (Ruszkiewicz *et al.*, 2017). On le retrouve ainsi dans la majorité des crèmes solaires.

En 2014, plus de 1800 produits de consommation courante non alimentaire contenaient des nanomatériaux (Vance *et al.*, 2015). La présence de nanomatériaux dans les objets du quotidien, en contact direct avec les individus, est donc une réalité. *Quid* des conséquences de cette présence sur la santé ?

2.4. La nanotoxicologie

Concomitamment à la production toujours plus importante de nanomatériaux, l'**exposition** des organismes vivants à ceux-ci ne cesse de croître. Les nanoparticules (NPs) étant les composantes les plus sensibles des nanomatériaux, nous nous focaliserons sur elles par la suite. Les voies d'exposition possibles aux nanoparticules chez l'Homme sont l'**inhalation** (voie principale en milieu professionnel), l'**ingestion** (voie prédominante pour la population générale), et le **contact cutané** (Buzea *et al.*, 2007). Si la voie pulmonaire a fait l'objet de nombreuses études (Hougaard *et al.*, 2015 ; De Matteis, 2017), les deux autres voies sont beaucoup moins explorées en toxicologie. Cependant, l'absorption cutanée de nanoparticules d'oxyde de zinc (Ruszkiewicz *et al.*, 2017) et de silice (Nabeshi *et al.*, 2011) a pu être observée. De plus, la présence de certains nanomatériaux a pu être quantifiée dans des aliments (Bouwmeester *et al.*, 2007) et, récemment, une migration à partir de matériaux au contact d'aliments, a pu être démontrée (Souza et Fernando, 2016).

Le lien entre exposition à certaines nanoparticules et effet négatif sur la santé est maintenant établi (ANSES, 2014). Ainsi, il a par exemple été montré que la présence de fortes concentrations en nanoparticules atmosphériques induit une augmentation des maladies respiratoires, cardiovasculaires et de cancers (Kumar Rai, 2015). Cette **toxicité** est propre aux nanoparticules. En effet, la toxicité des plus petits nano-objets est plus importante que leurs équivalents de plus grande taille du fait de la plus grande surface spécifique mais ce facteur à lui seul ne permet pas d'expliquer une telle différence (Mu *et al.*, 2014).

Un autre facteur propre à la taille des nanoparticules semble jouer un rôle primordial dans leur toxicité. Il s'agit de leur faculté de pouvoir **passer les barrières biologiques** et en premier lieu les membranes cellulaires. Il a ainsi été montré à de multiples reprises que les nanoparticules pouvaient être internalisées *in vitro*. Différentes lignées cellulaires ont été utilisées pour étudier l'internalisation des nanoparticules, en particulier des cellules d'épithéliums intestinaux (Bannunah *et al.*, 2014) et pulmonaires (Zhang *et al.*, 2012) ou encore des cellules tumorales (Guidi *et al.*, 2013).

L'**internalisation** des nanoparticules peut se faire par divers mécanismes d'endocytose divisés en deux catégories : la pinocytose et la phagocytose. La phagocytose est présente uniquement dans les phagocytes (macrophages, cellules dendritiques, et neutrophiles) et peut internaliser une grande gamme d'objets allant de molécules à des bactéries. La pinocytose par contre a lieu dans toutes les cellules et regroupe les voies d'endocytose dépendante de la clathrine, endocytose dépendante des cavéoles, transcytose, et macropinocytose qui sont toutes spécifiques de certains types de molécules (Yameen *et al.*, 2014). Chacune de ces différentes voies d'internalisation produit des vésicules de tailles spécifiques. Les nanoparticules ne seront donc pas internalisées de la même façon en fonction de leur taille. Les plus grosses particules (plusieurs centaines de nanomètres voire $> 1\mu\text{m}$) passeront par la phagocytose ou la macropinocytose tandis que les nanoparticules de taille inférieure à 100 nm passeront par des voies d'endocytose spécifiques (Geiser *et al.*, 2005). Après internalisation, les nanoparticules sont transportées dans des endosomes puis des lysosomes. Si elles arrivent à sortir de ces vésicules, les NPs peuvent diffuser dans le cytoplasme voire potentiellement entrer dans le noyau. Toutefois, seul le passage de la membrane nucléaire par des NPs de tailles inférieures à 9 nm a pu être démontré (Macara, 2001).

In vivo, l'entrée dans les cellules et surtout le passage des **barrières biologiques** est plus difficile à établir. Certaines études ont mis en évidence le fait que la voie d'exposition et l'espèce animale sont des paramètres susceptibles, comme dans le cas des composés chimiques classiques, de modifier la biocinétique (circulation et évolution d'un composé dans l'organisme). Cependant, contrairement aux

composés classiques, toute modification de surface des nanoparticules, comme par exemple celles survenant en présence de fluides biologiques, va avoir un impact sur leur passage des barrières.

En effet, dans un milieu biologique, les nanoparticules en solution ne sont pas présentes "nues", mais sont rapidement recouvertes par des molécules issues de l'environnement proche qui peuvent venir s'adsorber à la surface de la nanoparticule. Du fait de leur importante surface spécifique les nanoparticules vont interagir à leur surface avec un grand nombre de ces molécules. Ces molécules sont essentiellement des protéines. On parle d'ailleurs de **couronne de protéines** (Walczyk *et al.*, 2011). Cependant, d'autres molécules organiques, comme les lipides, les sucres, et les acides nucléiques peuvent interagir avec des nanoparticules (Wan *et al.*, 2015 ; Hellstrand *et al.*, 2009). La nouvelle entité formée par l'ensemble nanoparticule/couronne de protéines possède ainsi une "**identité biologique**" particulière qui peut induire une reconnaissance cellulaire causant l'internalisation ou non de la nanoparticule (Monopoli *et al.*, 2012 ; Caracciolo *et al.*, 2017). Les nanoparticules combinent donc deux caractéristiques cruciales pour le passage des barrières cellulaires et épithéliales : une petite taille et la présence d'une couronne de protéines.

On peut par exemple citer le rôle du surfactant au niveau pulmonaire ou du mucus au niveau de diverses muqueuses dans les interactions avec les nanomatériaux qui ont fait l'objet de nombreuses publications afin de mieux qualifier l'exposition interne et les facteurs modulant les effets de cette exposition (das Neves *et al.*, 2012 ; Mura *et al.*, 2011 ; Gasser *et al.*, 2012 ; Schleh *et al.*, 2013 ; Schuster *et al.*, 2013). Cette dernière étude a ainsi pu mettre en évidence une différence de mobilité dans la muqueuse selon la taille des particules. Les particules de taille supérieures à 500 nm restent immobilisées dans le mucus tandis que les particules plus petites pénètrent la muqueuse pulmonaire et peuvent entrer en contact avec l'épithélium.

Deux types de barrières physiologiques doivent être distinguées (Fig. 1-6) : celles qui contrôlent le passage de l'organe primo-exposé vers le sang ou la lymphe (alvéolo-capillaire, cutanée, intestinale) et celles qui contrôlent le passage du sang vers les organes systémiques (hémato-encéphalique, placentaire, testiculaire). Les mécanismes gouvernant le passage de ces différentes barrières peuvent être distincts.

Les preuves *in vivo* de l'internalisation de nanoparticules par l'organisme existent mais sont beaucoup plus rares. L'absorption par l'intestin de nanoparticules de TiO₂ a ainsi été montrée (Brun *et al.*, 2014) de même que le passage de la barrière cutanée par des NPs de SiO₂ (Nabeshi *et al.*, 2011).

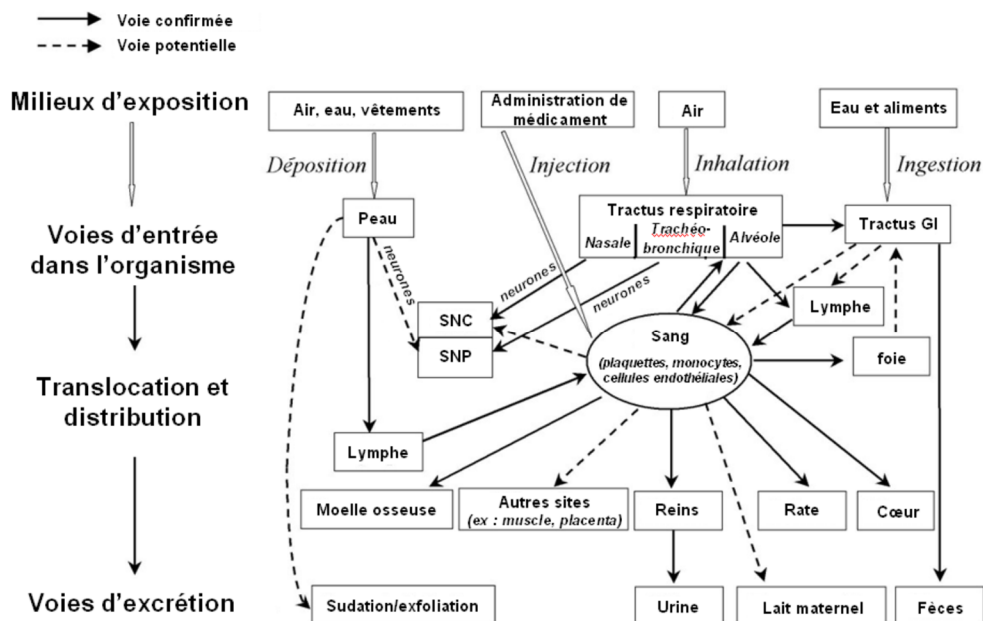


Figure 1-6 : Biocinétique des nanoparticules. Traduit de Oberdörster (2005).

Cependant, au-delà de l'entrée des NPs à l'intérieur de l'organisme, la problématique principale est leur faculté à passer les barrières biologiques internes et donc à rentrer dans tous les tissus. Si de nombreuses voies d'absorption et de translocation (migration des particules à partir de leur site de déposition) ont été démontrées, induisant ainsi un risque systémique potentiel (Nel *et al.*, 2013), d'autres sont encore hypothétiques : par exemple depuis la circulation sanguine vers le système nerveux central (SNC) ou le placenta (Oberdörster *et al.*, 2009). Pourtant, des études ont pu démontrer précisément la capacité pour des nanoparticules de TiO₂ et de polystyrène de traverser la barrière placentaire, empêchant une embryogenèse normale (Shimizu *et al.*, 2009 ; Wick *et al.*, 2010), ainsi que la barrière hémato-testiculaire (Yoshida *et al.*, 2010). Ces résultats d'études animales sont associés à des doses importantes. Néanmoins, ils posent la question de la toxicité des nanomatériaux pour la reproduction.

En ce qui concerne le passage des nanomatériaux vers le cerveau, trois voies ont été proposées : le transport axonal, le passage par les bulbes olfactifs ou encore le passage au travers de la barrière hémato-encéphalique après altération de ses propriétés par les nanomatériaux eux-mêmes ou dans le cas de pathologies (Simko et Mattsson, 2010). Très peu d'études ont ainsi réellement pu mettre en évidence le passage de la barrière hémato-encéphalique. Khan *et al.* (2013) ont notamment pu montrer ce passage pour des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium.

En outre, l'absence d'internalisation ne signifie pas forcément l'absence de toxicité des NPs. L'accumulation de nanotubes de carbones dans les alvéoles pulmonaires d'enfants asthmatiques a ainsi été montrée (Kolosnjaj-Tabi *et al.*, 2015). Aussi, même en absence de passage, le cerveau n'est

pas entièrement protégé puisqu'une toxicité induite indirectement par des NPs présentes ailleurs dans l'organisme a déjà été observée (Disdier *et al.*, 2015).

La faculté des NPs d'entrer dans l'organisme et à l'intérieur des cellules est le principal problème quant à leur toxicité. Si, globalement, l'ensemble des mécanismes responsables du transport des nanomatériaux vers les organes systémiques ne sont pas encore élucidés (Kulvietis *et al.*, 2011), il est raisonnable de penser qu'aucun organe n'est épargné. Les conséquences toxicologiques moléculaires et cellulaires de la présence de NPs dans les cellules ont été étudiées pour de nombreux systèmes. Nous rappellerons par la suite quelques données propres aux nanoparticules de silice.

Cas des nanoparticules de silice

Du fait de la forte exposition humaine aux nanoparticules de silice (SiNPs), il existe un grand nombre d'études *in vitro* comme *in vivo* faites pour évaluer leur éventuelle toxicité. Le problème de la diversité des SiNPs ainsi que des voies d'exposition qu'elles empruntent rend difficile toute généralisation. Cependant, la présence de SiNPs occasionne généralement un stress oxydant provoqué par la production directe ou indirecte d'espèces activées de l'oxygène (Wang *et al.* 2009 ; Ye *et al.* 2010). Une méta-analyse de la toxicologie des nanoparticules de silice portant sur 128 articles a été publiée récemment (Murugadoss *et al.*, 2017) et voici les principales conclusions :

- Toutes les SiNPs induisent une cytotoxicité à partir d'une concentration de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Le stress oxydant et l'apoptose occasionnés sont induits par la voie mitochondriale (voie dépendante des caspases).
- Les SiNPs (particulièrement les SiNPs colloïdales) induisent de la génotoxicité sur des lignées cellulaires tumorales humaines. De plus cette toxicité semble inversement proportionnelle à la taille des particules (Li *et al.*, 2011).
- Au niveau de l'immunotoxicité il y a assez peu de données. Cependant les SiNPs semblent induire une plus forte réponse pro-inflammatoire comparés à de la silice de taille micrométrique.
- *In vivo*, les SiNPs inoculées par inhalation, ingestion ou par intraveineuse ont des effets néfastes sur les poumons, les reins et le foie. Toutefois les SiNPs sont rapidement excrétées et il y a généralement peu d'accumulation dans les tissus donc pas de toxicité à long terme.

Bien qu'étant autorisées et fortement utilisées comme additifs alimentaires, les SiNPs présentent une toxicité non négligeable. La conjonction du danger que représentent les SiNPs et de notre exposition toujours plus grande crée un risque. Il est donc important de comprendre les mécanismes moléculaires de toxicité afin de mieux maîtriser ce risque.

2.5. Vers une nanomédecine

À cette exposition fortuite s'ajoute l'inoculation de nanoparticules à des fins médicales (vaccins, traçages...) qui est une exposition intentionnelle. Cette entrée se fait soit par intraveineuse, soit localisée dans un tissu biologique donné. Ainsi, si l'entrée non souhaitée de nanoparticules dans l'organisme est un réel problème de santé publique il existe des cas où leur faculté unique de passage des barrières biologiques peut être bénéfique. En effet, depuis deux décennies, le milieu médical conçoit des nanomatériaux à des fins thérapeutiques. Il existe à ce jour de nombreux exemples recouvrant une large gamme d'applications.

Dans la biomédecine, l'application la plus courante des nanoparticules est en tant que **nanovecteur** permettant d'acheminer une substance active dans un tissu cible (Bianco *et al.*, 2005 ; Lademann *et al.*, 2007). Ceci implique que le devenir des nanoparticules dans l'organisme puisse être contrôlé. Il est notamment connu que les tumeurs présentent une forte perméabilité pour des particules présentant des tailles de quelques centaines de nm. Cette spécificité des cellules tumorales (appelé effet EPR, Beretta et Cavalieri, 2016) permet à des principes actifs présents dans des matrices de cette gamme de taille (les nanovecteurs) de se concentrer sur les cellules tumorales tout en limitant leur toxicité dans les reste de l'organisme.

D'autres utilisations dans le domaine du marquage et de l'imagerie sont également développées (Medintz *et al.*, 2005 ; Roberti *et al.*, 2009). Une nouvelle application prometteuse des NPs est également leur utilisation en théranostique (Xie *et al.*, 2010). La **théranostique** consiste à combiner, dans un même nanosystème, son acheminement spécifique vers un tissu cible, le diagnostic médical, et le traitement. Si aucune application commerciale n'existe encore à ce jour, des agents de théranostic pouvant cibler et détruire spécifiquement les tumeurs cancéreuses sont en cours de développement (Sancey *et al.*, 2014).

Cependant, malgré de nombreuses avancées en nanotechnologie et en biomédecine ces dernières années, les nanoparticules ne sont pas parvenues à répondre complètement aux attentes. Des formulations comme le Doxil® ont montré leur efficacité mais la plupart des produits (Endorem®, Sinerem®...) ont fini par être retirés du marché (Strojan *et al.*, 2017). Il y a de nombreuses raisons à ces revers, notamment des problèmes de fabrication des nanomédicaments, mais la raison principale est que le devenir des nanoparticules dépend fortement de l'identité biologique qu'elles acquièrent. Or, bien souvent, certaines protéines adsorbées à la surface de la nanoparticule peuvent induire des réactions immunitaires. Il a notamment été montré que des nanoparticules peuvent subir des phénomènes d'opsonisation du fait de la présence de protéines issues du système du complément

dans la couronne protéique (Chen *et al.*, 2017). Les nanoparticules opsonisées sont rapidement prises en charge par le système immunitaire et ne peuvent plus circuler librement ni se rendre dans un organe cible.

Afin d'améliorer la biocompatibilité, de nombreux nanosystèmes sont testés et, notamment, des nanoparticules fonctionnalisées. En effet, il est possible d'augmenter le temps de rétentions dans le système sanguin en modifiant la nature de la surface. Ceci est souvent entrepris en fonctionnalisant la surface des nanoparticules avec du polyéthylène glycol (PEG, He *et al.*, 2008). Comme nous allons le voir par la suite, le PEG agit en modifiant quantitativement et qualitativement la couronne de protéines formée autour des nanoparticules. On se rend donc compte de l'importance de mieux comprendre la formation de cette couronne pour de futures applications biomédicales.

3. Les interactions protéines/surface

3.1. Adsorption d'acides aminés et de peptides sur une surface de silice

Pour comprendre les mécanismes d'interaction protéine/silice, il est important de connaître la nature exacte des interactions qui peuvent avoir lieu. Ici nous nous concentrerons sur les mécanismes d'adsorption d'acides aminés et de peptides sur des surfaces de **silice**.

En milieu hydraté, la surface de la silice est composée de groupements **silanol** $-\text{Si}-\text{OH}$ et de ponts **siloxane** $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$. Il existe une certaine variabilité dans la proportion de groupements silanol et siloxane en fonction des traitements thermiques qui ont été effectués au préalable (voir § 4.2.). Contrairement aux ponts siloxane qui sont assez peu réactifs (hormis sous fortes contraintes), les groupements silanol peuvent présenter divers types de réactivité (Rimola *et al.*, 2013). Ces derniers peuvent être déprotonés en solution ce qui leur confère un caractère légèrement acide. Ils forment ainsi facilement des liaisons hydrogène (entre deux silanol ou avec des bases de Lewis présentes dans l'environnement aqueux). Les différents types de groupements retrouvés à la surface de la silice sont indiqués dans la figure 1-7.

La présence de différents types de groupements a des conséquences sur la réactivité de surface. En particulier, les groupements silanol suffisamment proches pour former des liaisons hydrogène entre eux (structure Q) sont nettement plus acides que les silanol isolés (Q^3) ou géminés (Q^2). Ceci explique l'existence de deux pK_a observée sur des surfaces de silice (Ong *et al.*, 1992 ; Sulpizi *et al.*, 2012) ; les silanol associés, Q, ayant un pK_a de 4,5 et les silanol isolés, Q^2 ou Q^3 , un pK_a de 8,5. À l'inverse, il n'y a pas de consensus concernant une différence de réactivité entre Q^2 et Q^3 (Rimola *et al.*, 2013). Les ponts

siloxane sont généralement réunis sous forme de clusters $(-\text{Si-O}-)_n$ (Papirer, 2000). Les clusters contenant 4 groupements ou moins sont instables donc très minoritaires (Rimola *et al.*, 2013).

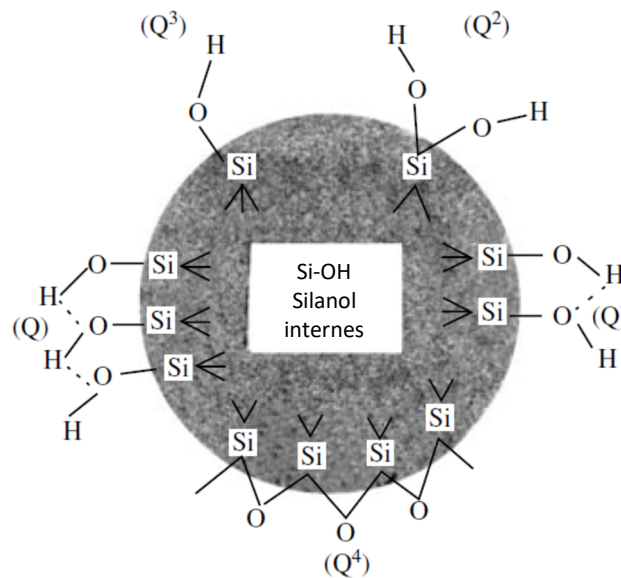


Figure 1-7 : Types de groupements silanol et ponts siloxane présents à la surface de la silice amorphe. Silanol vicinal (Q), géminé (Q²), isolé (Q³) ; pont siloxane (Q⁴). Tiré de Zhuravlev et Potapov (2006).

La présence de groupements silanol et siloxane influe également sur l'hydrophobicité de surface. En effet, une augmentation de la densité de groupements silanol induit une augmentation de l'hydrophilie. À l'inverse, les zones riches en ponts siloxane possèdent un caractère hydrophobe (Cruz-Chu *et al.*, 2006 ; Hassanali et Singer, 2007 ; Turci *et al.*, 2010).

De nombreuses études se sont intéressées aux **mécanismes d'adsorption de biomolécules**, en particulier des acides aminés, sur les surfaces de silice. La glycine a été privilégiée, notamment pour faire abstraction de la chaîne latérale. Il apparaît que la glycine, sous forme zwitterionique, interagit faiblement avec la silice par un contact direct entre le groupement carboxylique COO^- et un, ou plusieurs, groupements silanol (Costa *et al.*, 2008 ; Zhao *et al.*, 2011). Le groupement NH_3^+ peut former une liaison hydrogène avec un silanol mais cette liaison n'est pas stable. Compte-tenu du fait que la charge de surface de la silice est négative, ces résultats (réactivité des groupements silanol plus favorable à COO^- qu'à NH_3^+) semblent contre-intuitifs d'un point de vue électrostatique.

Au regard du mécanisme d'adsorption de la glycine, il est intéressant d'étudier l'adsorption d'autres acides aminés et notamment d'acides aminés chargés. Ainsi l'acide glutamique a été utilisé comme exemple d'acide aminé acide (Bouchoucha *et al.*, 2011). L'interaction avec la silice fait intervenir sa forme anionique ce qui indique un contact direct entre un groupement carboxylate et la surface. Un exemple d'acide aminé basique a également été choisi : la lysine (Kitadai *et al.*, 2009). L'adsorption se

fait, dans ce cas, par des interactions électrostatiques entre la surface négative de la silice et le groupement NH_3^+ de la forme cationique de la lysine.

On constate donc que les acides aminés peuvent interagir par l'intermédiaire de groupements acides (COO^-) et basiques (NH_3^+). Cependant, en présence d'un mélange de glycine et de lysine, l'adsorption se fait préférentiellement avec cette dernière (Stievano *et al.*, 2007), ce qui tend à indiquer que l'interaction avec un groupement NH_3^+ de la chaîne latérale est bien plus favorable qu'avec un groupement COO^- de la chaîne principale et, *a fortiori*, qu'avec un NH_3^+ de la chaîne principale.

L'adsorption sur une surface de silice a été étendue à l'ensemble des acides aminés. Bien que, comme pour la glycine, l'interaction puisse se faire dans tous les cas, par les groupements COO^- et NH_3^+ de la partie aminoacide, les liaisons hydrogène formées avec les chaînes latérales des acides aminés polaires sont beaucoup plus fortes. De plus, une échelle d'affinité vis-à-vis d'une surface de silice a pu être établie selon la chaîne latérale de l'acide aminé (Rimola *et al.*, 2009) :

polaire basique > polaire acide \approx polaire amide (Asn et Gln) > polaire non chargé > apolaire.

Les forces électrostatiques conduisant à l'adsorption jouent donc un rôle très important. Toutefois, dans le cas des acides aminés apolaires, il a été montré que l'adsorption augmente avec la taille de la chaîne latérale aliphatique ou aromatique (Gao *et al.*, 2008). Ceci a été interprété comme étant dû à la présence d'interactions hydrophobes entre la chaîne latérale apolaire et les ponts siloxane de la silice.

En résumé, les mécanismes d'adsorption des acides aminés sont dominés par deux types d'interactions :

- (1) **Interactions à caractère électrostatique** (liaisons ioniques et liaisons hydrogène) entre les groupements chargés des acides aminés et les groupements silanol -Si-OH de la surface de la silice. Ces interactions deviennent prédominantes dans le cas où l'acide aminé est chargé ;
- (2) **Interactions hydrophobes** (forces de dispersion de London) entre la chaîne latérale d'un acide aminé apolaire et les ponts siloxane Si-O-Si.

Appliqués aux peptides, les mêmes observations peuvent être faites. Il a notamment été montré que plus le pH isoélectrique d'un peptide est élevé, plus il se lie fortement à la surface de silice (Patwardhan *et al.*, 2012). De même, la présence d'acides aminés basiques augmente fortement l'affinité d'un peptide pour la silice (Chen *et al.*, 2006). Cependant, bien qu'avec une faible affinité, des peptides ne contenant pas d'acides aminés basiques peuvent s'adsorber lorsqu'une concentration peptidique minimale est atteinte. La différence d'affinité a été interprétée comme étant due aux types de liaisons formées par les peptides. Les peptides cationiques forment essentiellement des liaisons ioniques

tandis que les peptides non cationiques interagissent uniquement par des liaisons hydrogène. La différence de types de liaison peut s'observer dans le profil d'adsorption des peptides : alors que les peptides cationiques forment des monocouches à la surface de la silice (par le biais de liaisons ioniques avec des Si-OH), les peptides non cationiques peuvent former des multicouches de peptides à partir de liaisons H interpeptidiques (Patwardhan *et al.*, 2012).

Ainsi, comme pour les acides aminés, les peptides s'adsorbent sur une surface de silice par des liaisons ioniques entre résidus d'acides aminés chargés positivement et groupements silanol chargés négativement. Des liaisons hydrogène peuvent se former mais contribuent plus modestement à l'adsorption. Aussi, la présence d'interactions ion-dipôle, dipôle-dipôle et de van der Waals est également possible.

Toutefois, à la différence des acides aminés, les peptides possèdent une **grande flexibilité conformationnelle**. Ceci induit une certaine mobilité des peptides le long de la surface et il a été montré que l'"état adsorbé" d'un peptide possède une forte dynamique moléculaire. Ceci se traduit par le fait que les peptides adsorbés peuvent présenter une multitude de structures plus ou moins stables (Nonella et Seeger, 2010). Les forces d'adsorption ont déjà été exploitées afin d'induire la formation d'hélices pour des peptides adsorbés (Fig. 1-8). L'équipe de Jonsson a ainsi conçu des peptides déstructurés lorsqu'ils sont libres en solution mais qui adoptent une structure en forme d'hélice une fois adsorbé (Lundqvist *et al.*, 2006 ; Nygren *et al.*, 2008). Une discussion plus approfondie de la structuration de peptides adsorbés sera menée dans le chapitre 5, § 2.3.

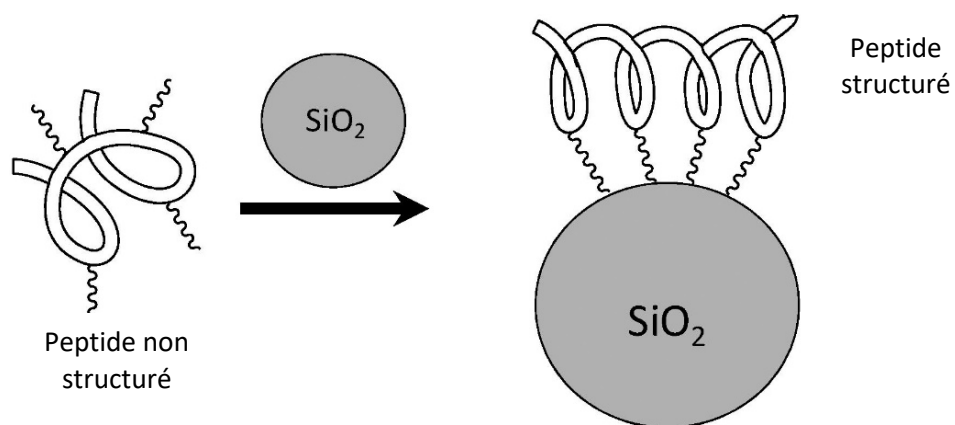


Figure 1-8 : Schéma représentant la structuration d'un peptide lors de son adsorption sur une nanoparticule de silice ; Tiré de Nygren *et al.*, 2008.

Cependant, hormis dans ces cas particuliers de peptides de synthèse, les peptides adsorbés ne présentent pas de structure particulière. Une des principales raisons pour cela est le fait que les acides aminés affins pour la silice (Lys et Arg notamment) sont également ceux fortement présents dans des

régions intrinsèquement désordonnées (Dunker, 2008). L'adsorption n'est donc généralement pas suffisante pour induire une structuration dans le cas de peptides biologiquement pertinents.

L'étude de l'adsorption de peptides est généralement conduite sur de petits peptides (moins de 30 acides aminés) conçus de façon artificielle (rarement issue d'une séquence peptidique naturelle). Aussi, s'il semble logique que la dynamique conformationnelle joue un rôle sur l'adsorption en permettant de s'adapter à la surface, il n'est guère possible de généraliser à l'ensemble des peptides et encore moins aux protéines. L'étude de petites molécules comme les acides aminés et les peptides trouve ainsi ses limites lorsque l'impact structural entre en compte. En ce sens, seule l'étude de macromolécules peut apporter des informations sur l'impact structural de l'adsorption des protéines, comme nous allons le voir.

3.2. L'adsorption des protéines sur une surface

L'adsorption des protéines sur les surfaces est un phénomène observé depuis longtemps (Abramson, 1932). Toutefois, il faut attendre les années 1970 pour que des études dédiées aux protéines soient menées. Jusqu'alors l'adsorption des protéines était étudiée par analogie avec, d'une part, de petites molécules organiques (James et Augenstein, 1966 ; Koral *et al.*, 1958), et d'autre part, des polymères (Miller et Bach, 1973 ; De Gennes, 1976). La comparaison avec de petites molécules est valable pour certains aspects (nature de l'interaction, modèle de Langmuir) mais ne permet pas de prendre en compte les spécificités propres aux macromolécules.

Aussi, d'un point de vue physico-chimique, les protéines peuvent être considérées comme des "polymères biologiques" et l'étude de polymères de synthèse, étant plus aisée, a été faite en premier (Miller et Bach, 1973). Protéines et polymères partagent en effet plusieurs points communs. Ce sont des macromolécules (molécules de grand poids moléculaire) qui possèdent des degrés variables de liberté conformationnelle, et qui peuvent avoir des régions chargées et non chargées. Les polymères les plus proches des protéines sont les polyampholytes : polymères possédant à la fois des charges positives et négatives

À partir de l'étude de l'adsorption sur des polymères, plusieurs informations peuvent en être tirées (Hesselink *et al.*, 1971) :

- L'adsorption se fait par **de multiples interactions** formant autant de points de contact. Alors que chaque liaison est réversible, la probabilité de désorption de la molécule est très faible ce qui conduit à une adsorption quasi irréversible ;

- L'adsorption sur une surface est un **phénomène spontané**. L'énergie de liaison qui est favorable compense donc la perte d'entropie conformationnelle (défavorable).
- Sur des surfaces chargées, l'adsorption se fait avec des régions de la protéine **de charge opposée** via des interactions électrostatiques ;
- Dans le cas des polyampholytes, la présence de charges positives et négatives induit la formation d'attractions ou de répulsions électrostatiques intramoléculaires. Or, au pH isoélectrique $pH(I)$ il y a autant de charges positives que négatives. Lorsque le pH est proche du $pH(I)$ les interactions électrostatiques intramoléculaires sont maximales et les répulsions minimales ce qui rend le polymère très compact. En conséquence, une plus grande quantité de molécules peut s'adsorber à la surface (Fig. 1-9).

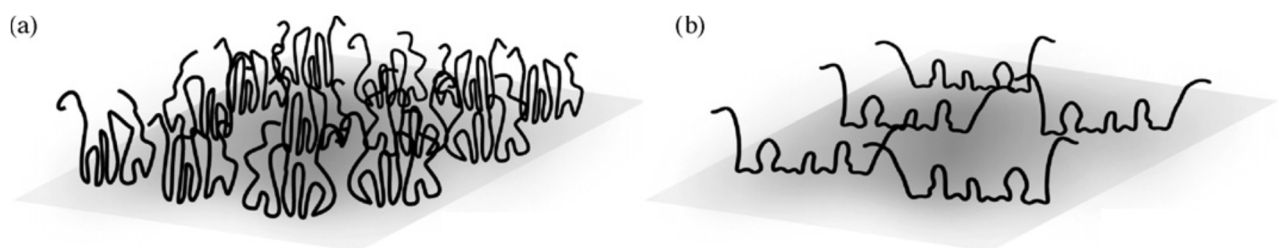


Figure 1-9 : Polyampholytes adsorbés sur une surface plane. (a) Au pH isoélectrique les interactions électrostatiques rendent les molécules relativement compactes ce qui permet une adsorption d'un grand nombre de molécules. (b) En dehors du pH isoélectrique, la présence de répulsions intra- et intermoléculaires conduit à des molécules plus dispersées et qui s'adsorbent de façon moins dense (tiré de Norde, 2008)

Toutefois, pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes d'adsorption des protéines, il n'est pas suffisant de ne se baser que sur l'étude des polymères. En effet, les protéines sont des polymères impliquant vingt acides aminés différents (aux propriétés physico-chimiques variées) organisés de façon contrôlée afin de créer des structures secondaires, tertiaires, et parfois quaternaires spécifiques. La dynamique de ces structures est également finement contrôlée (notamment par des modifications post-traductionnelles). Ainsi, bien que pouvant posséder des propriétés chimiques et structurales diverses, les polymères ne permettent pas de retranscrire toute la complexité qui peut exister au sein d'une protéine.

C'est pour cela que l'étude directe de l'adsorption de protéines a été entreprise. Un des plus grands contributeurs à ce sujet est Willem Norde. Dès le début des années 1970, il a étudié les mécanismes d'adsorption à partir de protéines modèles et de divers types de surface. Norde a pu développer 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 (Norde, 2008).

D'après Norde, l'adsorption des protéines dépend du type de protéine (pH isoélectrique et stabilité structurale) et du type de surface (charge et hydrophobicité) (Tab. 1-2). La stabilité structurale est définie dans ce modèle par rapport aux modifications structurales des protéines adsorbées : Norde définit ainsi deux catégories de protéines : les protéines "dures" qui subissent peu de modifications structurales lors de l'adsorption et les protéines "molles" qui perdent une partie de leur structure lors de l'adsorption (Lyklema et Norde, 1996).

Tableau 1-2 : Conditions de l'adsorption (A) et de la non adsorption (NA) d'une protéine sur différentes surfaces chargées positivement, négativement, ou non chargées (hydrophobe). Prédiction d'adsorption en fonction de la stabilité structurale de la protéine (protéine "dure", protéine "molle") et de sa charge globale. Tiré du modèle de Norde (2008).

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

On constate que, selon ce modèle, les protéines ont généralement tendance à s'adsorber ; 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 : l'augmentation d'entropie occasionnée par la déshydratation de la surface (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 adsorbées, les protéines s'étalent sur la surface et augmentent leur surface d'interaction. Norde conclut de façon plus générale en disant que l'adsorption des protéines augmente avec l'hydrophobicité de la surface et que toute protéine s'adsorbe sur une surface complètement hydrophobe. Pourtant il a été remarqué des exceptions comme la mucine, une glycoprotéine, qui s'adsorbe en quantité plus importante sur les surfaces hydrophiles par rapport aux surfaces hydrophobes du fait de ses chaînes oligosaccharidiques (Shi et Caldwell, 2000 ; McColl *et al.*, 2007).

Au contraire, Norde précise 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 ; 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 contrebalancée par une perte de Structure de la protéine adsorbée. La perte de structure ordonnée serait ainsi 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.

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 (Haynes *et al.*, 1994) : une perte de structure secondaire de la protéine adsorbée serait associée à une augmentation du nombre de degrés de liberté de la chaîne 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 soit 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 (Nakanishi *et al.*, 2001 ; Rabe *et al.*, 2011). Pourtant d'après ce modèle, la protéine adsorbée « s'étale » sur la surface. Il existe ainsi une contradiction entre le gain de degré de liberté considéré et la fixation de la chaîne peptidique sur la surface. 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 (Czeslik *et al.*, 2003).

De plus, Czeslik (2004) montre qu'il n'y a pas de mesure expérimentale du gain d'entropie associé à la modification de la conformation des protéines adsorbées. Il rapporte notamment 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 (Czeslik *et al.*, 2003). Le tryptophane est une sonde locale mais des données plus globales (par diffusion inélastique des neutrons) ont pu montrer que la baisse d'entropie causée par l'adsorption de la myoglobine s'accompagne bien d'une diminution de la dynamique de la protéine (Devineau *et al.*, 2013). Czeslik conclut finalement que le gain d'entropie par perte de structure est peu probable, et propose une augmentation du nombre d'interactions avec la surface lors de l'étalement de la protéine pour expliquer l'adsorption.

Cependant cette interprétation mettant en avant la contribution enthalpique dans l'adsorption n'explique pas pour autant la contribution entropique favorable mesurée par microcalorimétrie sur la plupart des systèmes lors de l'adsorption (Czeslik *et al.*, 2004 ; Goobes *et al.*, 2007). 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.

3.3. Adsorption des protéines sur la silice

La vision actualisée de l'adsorption de protéines à la surface de la silice considère qu'il existe un **équilibre dynamique entre adsorption/désorption** qui diffère selon le type de protéine (Fig. 1-10). Ce mécanisme repose ainsi sur deux paramètres propres aux protéines qui sont les propriétés électrostatiques et le degré de structure présent dans chaque protéine (Ikeda et Kuroda, 2011 ; Shemetov *et al.*, 2012). L'interaction étant essentiellement de nature électrostatique, les charges présentes à la surface des protéines jouent un rôle majeur dans leur adsorption. Ainsi, les protéines possédant des acides aminés chargés positivement interagiront plus facilement avec une surface de silice chargée négativement. En plus de l'extrémité N-terminale généralement enfouie à l'intérieur de la protéine, seuls deux acides aminés possèdent des groupements chargés positivement à pH physiologique : l'arginine et la lysine. Il a été montré que la présence de ces deux acides aminés augmente fortement l'affinité des protéines vis-à-vis d'une surface de silice. Les protéines riches en acides aminés basiques sont davantage retrouvées adsorbés à la surface que libres dans des solutions contenant des nanoparticules de silice. Ceci est particulièrement flagrant pour l'arginine qui semble être un facteur clé de l'adsorption de protéines (Mathé *et al.*, 2013).

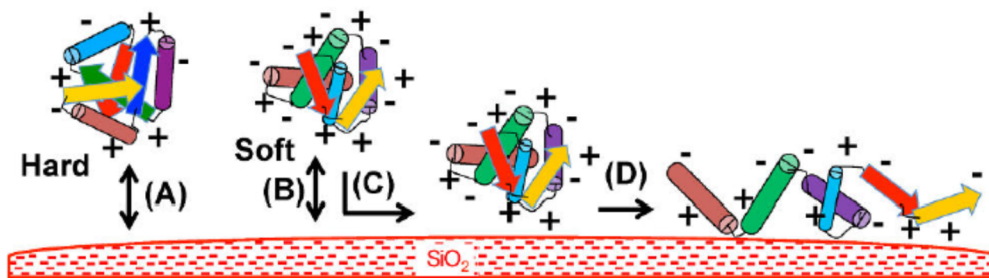


Figure 1-10 : Schéma du mécanisme d'adsorption des protéines sur une surface de silice. L'adsorption des protéines est d'abord initiée par des interactions électrostatiques. Dans les cas des protéines "dures" (A) cette interaction est transitoire et réversible. Pour les protéines "molles" par contre (B), cette interaction induit une déformation de la protéine permettant d'établir de nouvelles liaisons électrostatiques (C) ce qui peut conduire à un étalement partiel ou total de la protéine le long de la surface de silice et à une déstructuration quasi-irréversible (D).

En plus du facteur électrostatique, prépondérant dans l'adsorption des protéines, le degré de structuration des protéines intervient également. Les protéines "dures" interagissent de façon transitoire et la structure de la protéine désorbée est généralement la même que celle de la protéine native. Les protéines "molles" par contre se déforment lors de leur adsorption et cette déformation peut devenir irréversible (Norde, 2008 ; Mathé *et al.*, 2013). En effet, la déformation induit un étalement de la protéine le long de la surface et les régions découvertes peuvent créer davantage d'interactions électrostatiques ainsi que d'éventuelles interactions hydrophobes entre les ponts siloxane et les acides aminés hydrophobes, rendant la désorption impossible. Toutefois les protéines

"dures" et "molles" sont des cas extrêmes. Il existe donc de nombreux cas de figure avec des mécanismes intermédiaires aux deux précités ; la plupart des protéines possédant à la fois des régions bien structurées et des régions flexibles. De plus, il existe des protéines contenant des régions intrinsèquement désordonnées (RID) qui sont caractérisées par une absence de structures secondaires stables (Uversky, 2011). Ce type de protéine n'est pas tout à fait une protéine molle puisque son état natif est déjà déstructuré. Aussi, récemment, la forte affinité des protéines contenant des RID pour une surface de silice a été confirmée (Klein *et al.*, 2016). Cependant, les raisons exactes de cette affinité ne sont toujours pas établies à ce jour.

4. Principaux paramètres influençant l'interaction protéines/nanoparticules de silice

Si le modèle actuel d'adsorption des protéines sur une surface permet de tirer des informations générales, il n'est pas suffisant pour décrire, et encore moins prédire, tous les phénomènes d'adsorption. Par exemple, l'adsorption non spécifique de protéines qui peut être observée sur des biocapteurs ou des implants (Gifford *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2012) n'est toujours pas parfaitement expliquée. Ceci est dû à plusieurs éléments de simplification de ce modèle. En particulier, les surfaces sont considérées comme planes et chimiquement uniformes ce qui n'est en pratique jamais le cas. De plus, l'adsorption de protéines modèles ne permet pas de représenter la grande diversité de natures et de structures de protéines présentes dans des milieux complexes. Beaucoup d'études récentes ont ainsi été effectuées dans le but d'affiner ce modèle. Celles s'intéressant particulièrement aux nanoparticules de silice (SiNPs) vont être traitées.

Il existe trois types de facteurs influençant l'adsorption de protéines modèles sur une nanoparticule (Fig. 1-11) : les propriétés intrinsèques de la nanoparticule, les propriétés de la protéine, et les paramètres physico-chimiques externes (température, pH, composition du milieu...) (Rabe *et al.*, 2011). L'impact de ces trois facteurs joue un rôle crucial dans l'interaction protéines/NPs comme nous le verrons par la suite. Les paramètres physico-chimiques externes seront d'abord traités. Ensuite une attention particulière sera portée aux effets du type de surface (particulièrement des SiNPs) ainsi que du type de protéines qui peuvent interagir avec ces surfaces. Ce sont en effet ces facteurs qui ont été étudiés durant cette thèse.

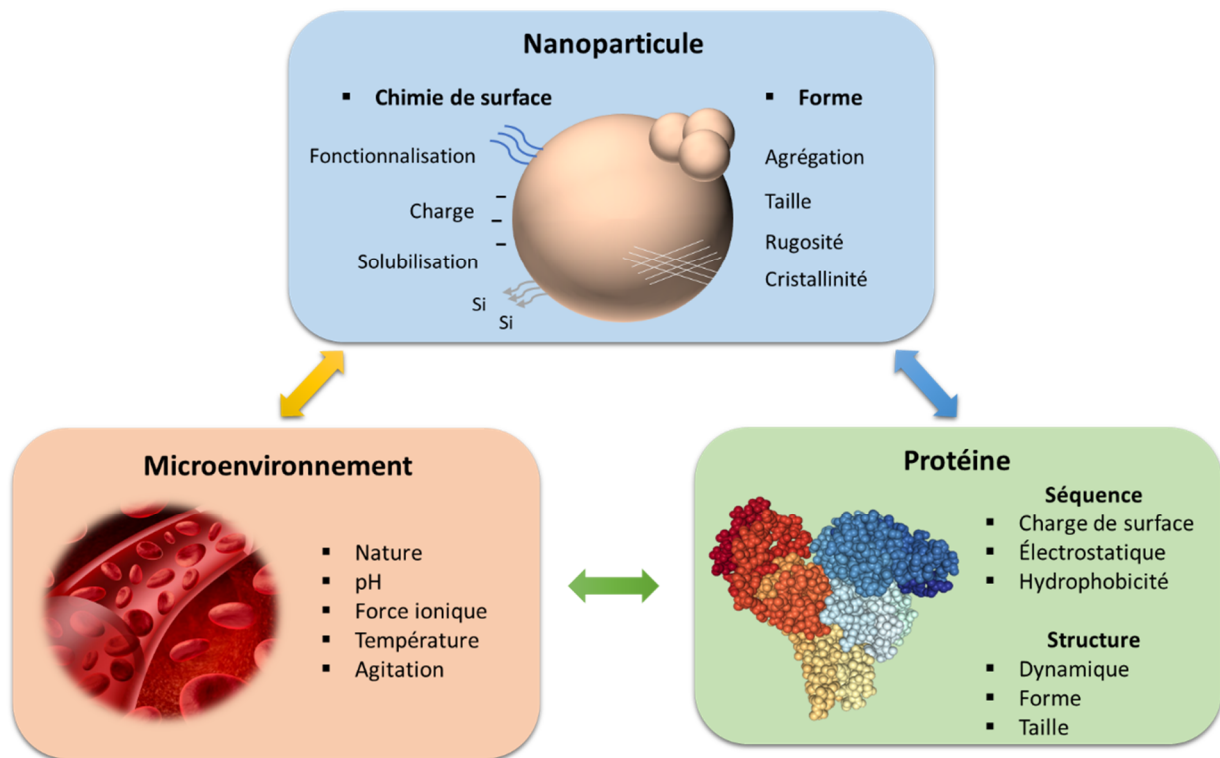


Figure 1-11 : Facteurs influençant les interactions protéines/nanoparticules.

4.1. Effet de l'environnement biologique

De nombreux facteurs externes peuvent influencer la formation et la composition de la couronne de protéines dans un milieu biologique complexe. La plupart des facteurs sont plutôt évidents et ont déjà été étudiés en profondeur sur des systèmes modèles.

Ainsi, s'agissant généralement d'interactions électrostatiques entre deux molécules chargées, le **pH** est un facteur primordial. Le pH va en effet influencer à la fois sur la charge de surface des NPs et des protéines. L'interaction est privilégiée lorsque protéines et nanoparticules ont des charges opposées. Toutefois, s'agissant d'une charge moyenne, des protéines de charge globale de même signe que la surface des NPs peuvent également s'adsorber (Kubiak-Ossowska *et al.*, 2016). De façon analogue aux polyampholytes (§ 3.2.), la quantité maximale de protéines pouvant être adsorbée sur une surface est atteinte lorsque le pH est proche du pI de la protéine. Ce phénomène, qui est dû à la diminution des répulsions intra- et interprotéiques, a pu être confirmé pour les SiNPs (Meissner *et al.*, 2015). En outre il a été montré par modélisation que le pH du milieu était le facteur le plus important devant la concentration et la taille des NPs pour permettre l'adsorption de protéines sur des surfaces chargées (Hartvig *et al.*, 2011).

Un autre facteur est la **température**. La couronne de protéines est en effet influencée par ce facteur tant du point de vue qualitatif (type de protéines adsorbées) que quantitatif. Cependant aucune

tendance générale ne peut être établie (Mahmoudi *et al.*, 2013). La température modifie également fortement les phénomènes d'agréations au sein de mélanges protéines/nanoparticules ce qui indique des différences au niveau de la structure du réseau formé entre nanoparticules et protéines (Kundu *et al.*, 2015). Il est également intéressant de constater que, pour la plupart de protéines globulaires, leur adsorption induit une déstabilisation qui se traduit par une température de dénaturation inférieure à celle de la protéine libre (Steadman *et al.*, 1992).

La présence de **sels** dans le milieu étudié joue également un rôle important. En effet, les sels dissouts en présence de NPs vont s'adsorber à leur surface et former une couche de contre-ions. Cette couche peut limiter les interactions électrostatiques protéines/NPs. Il a ainsi été montré que la quantité de protéines pouvant être adsorbée sur des NPs est plus grande en absence d'ion (Strojan *et al.*, 2017). De plus, le type d'ions présents dans le milieu de mise en contact entre protéines et nanoparticules peut influencer fortement sur la composition de la couronne de protéines (Maiorano *et al.*, 2010). Même la composition du milieu dans lequel les NPs sont dispersées avant mise en contact a son importance ; la présence préalable dans le diluant d'ions divalents peut ainsi changer la composition de la couronne de protéines de SiNPS (Strojan *et al.*, 2017).

D'autres paramètres peuvent également avoir un impact sur la formation de la couronne de protéines. Par exemple, la présence d'un milieu circulant modifie la composition de la couronne protéique par rapport à un milieu statique (Palchetti *et al.*, 2016).

Au-delà du type de nanoparticules et du type de protéines en présence, les interactions protéines/nanoparticules sont donc fortement influencées par les conditions physico-chimiques du milieu environnant. C'est pour cela que toutes les études de cette thèse ont été faites dans un microenvironnement contrôlé avec les conditions de pH, de salinité, de température, d'agitation, et de temps contrôlées.

4.2. Impact du type de nanoparticules de silice

4.2.1. Effet de la surface des nanoparticules de silice

Les nanoparticules de dioxyde de silicium possèdent une certaine diversité structurale et chimique. Premièrement, il faut distinguer la forme cristallisée (quartz, cristobalite...) de la forme amorphe (silice). Cette différence de structure induit, en effet, de fortes différences toxicologiques avec une toxicité accrue pour le quartz (Fubini, 1998). Nous nous concentrons ici sur les nanoparticules de silice amorphe.

Au sein même des silices amorphes, il existe une certaine variabilité de la proportion de groupements silanol et siloxane. On peut ainsi diviser la silice en deux catégories :

- Silices pyrogénées (n° CAS 112945-52-5) synthétisées par hydrolyse à forte température (1200 à 1600°C).
- Silices colloïdales et précipitées (n° CAS 112926-00-8) synthétisées sans traitement thermique.

La première catégorie possède une faible quantité de groupements silanol (2 groupements par nm²) et la majorité de la surface est formée de groupements siloxane (Frujtier-Pölloth, 2012 ; Rimola *et al.*, 2013). Inversement, la seconde catégorie de silice possède une majorité de groupements silanol (6-8 groupements par nm²) et donc une faible proportion de siloxane. En toute logique, la proportion de silanol (hydrophile) et de siloxane (plutôt hydrophobe) a une forte influence sur les propriétés d'hydrophilicité/hydrophobicité des SiNPs (§ 3.1.).

Une surface de silice hydrophile possède une forte quantité de groupements silanol déprotonables. Une surface hydrophobe, par contre, a des groupements silanol isolés Q³ (non déprotonables) et des ponts siloxane inertes (Bolis *et al.*, 1991). L'hydrophobicité de poudres de silice peut être augmentée en appliquant un traitement thermique à 1000°C et sous vide poussé. Dans ces conditions, des silanol voisins se condensent pour former des ponts siloxane (Bolis *et al.*, 1997). Inversement il est possible d'hydrolyser les ponts siloxane existants par hydrolyse acide ou par traitement hydrothermal dans de l'eau pure (Marucco *et al.*, 2014).

Cette différence d'hydrophobicité a un impact important sur l'interaction protéines/SiNPs. En effet, la quantité maximale d'albumine sérique bovine (BSA) et de gélatine adsorbée augmente avec la concentration en silanol (Mironyuk *et al.*, 2001 ; Catalano *et al.*, 2015) tandis qu'elle baisse pour le fibrinogène (Marucco *et al.*, 2014). Dans ce dernier cas, malgré une plus faible quantité de protéines adsorbées, les SiNPs hydrophiles induisent une plus forte inhibition de l'auto assemblage du fibrinogène (phénomène de coagulation), ce qui peut avoir des conséquences physiologiques néfastes. L'étude approfondie de l'impact de l'hydrophobicité des SiNPs sur leurs interactions avec la BSA a été menée par Catalano *et al.* (2015). Des différences fondamentales au niveau de la formation de la couronne protéique ont été observées. En présence de SiNPs hydrophobes, la formation de multicouches de BSA irréversiblement adsorbées induit une forte agglomération de celles-ci. Sur des SiNPs hydrophiles, la BSA forme une monocouche et l'agglomération est moins forte.

La silice amorphe, même pyrogénée, reste chargée négativement. Il est cependant courant de **fonctionnaliser** la surface de SiNPs afin d'étudier l'effet de la charge de surface. Les SiNPs peuvent notamment être fonctionnalisés par ajout de groupements chargés positivement (groupements

amines), négativement (groupements carboxyliques) ou neutres (polyéthylène glycol, PEG). Les SiNPs chargées positivement vont avoir un profil d'adsorption différent des SiNPs brutes, chargées négativement. En effet, l'albumine de sérum bovin (BSA), chargée négativement, interagit faiblement avec des SiNPs natives mais s'adsorbe fortement avec des SiNPs chargées positivement (Shen *et al.*, 2011). Inversement le lysozyme, chargé positivement, interagit avec les SiNPs brutes mais ne s'adsorbe pas sur des SiNPs chargés positivement (Shen *et al.*, 2011). De plus, les SiNPs fonctionnalisées par des groupements carboxylates présentent la même couronne protéique (protéines issues du plasma sanguin) que les SiNPs non fonctionnalisées (Tenzer *et al.*, 2013). Or ces deux types de SiNPs possèdent des charges globales de surface (potentiel ζ) très proches. La charge globale de surface semble donc être un facteur plus important que le type de groupements présents pour expliquer l'adsorption ou non-adsorption de protéines.

La neutralisation de la charge par l'ajout de PEG a également été étudiée car elle empêche les NPs d'être reconnues par le système immunitaire et permet ainsi de rester plus longtemps dans les milieux circulants (Gref *et al.*, 2000). La raison exacte de cette "furtivité" fait encore débat mais la formation de la couronne de protéines joue un rôle majeur. En effet, il est connu que la quantité de protéines adsorbées diminue fortement en présence de NPs "PEGylées" (Orts-Gil *et al.*, 2013 ; Pelaz *et al.*, 2015). Ceci est particulièrement le cas en présence de PEG de haut poids moléculaire (Natte *et al.*, 2013). De plus, en présence de mélanges de protéines, la composition de la couronne varie avec l'ajout de PEG (Schöttler *et al.*, 2016 ; Kurtz-Chalot *et al.*, 2017). L'absence de captation cellulaire pourrait ainsi être due à la présence de protéines particulières à la surface de la nanoparticule.

Ainsi, l'hydrophobicité comme la charge de surface jouent un rôle primordial dans les interactions protéines/nanoparticules. La charge de surface des SiNPs utilisées durant cette thèse sera analysée. L'hydrophobicité par contre n'a pas été étudiée. Toutefois d'après leur mode de synthèse (méthode de Stöber ; voir chapitre 7 § 1.1. pour plus de détails), les SiNPs colloïdales utilisées ici possèdent une surface recouverte quasi-intégralement de groupements silanol dont une forte proportion de silanol déprotonables (Zhang *et al.*, 2012). Elles sont donc très hydrophiles et présentent un caractère acide.

4.2.2. Effet taille des nanoparticules

Historiquement, la plupart des études d'adsorption de protéines sur des surfaces ont été faites en présence de surfaces planes et uniformes. Or, pour les nanoparticules, ceci n'est pas le cas. En effet, en passant d'une surface plane à une surface convexe, les **facteurs nanomorphologiques** (courbure, rugosité, géométries locales) peuvent varier considérablement.

L'essentiel des études concernant l'influence du rayon de courbure sur l'adsorption a été effectué avec des protéines globulaires. Généralement, plus la surface sur laquelle les protéines interagissent est courbe plus celles-ci conservent leur structure et leur fonction. Cet **effet taille** a été montré pour des SiNPs interagissant avec du lysozyme (Vertegel *et al.*, 2004 ; Yu et Zhou, 2016), de la BSA (Roach *et al.*, 2006), de l'anhydrase carbonique humaine (Lundqvist *et al.*, 2004), du facteur Hageman (Kushida *et al.*, 2014) et du cytochrome C (Shang *et al.*, 2009). Il y a cependant des exceptions à la règle telle que la RNase A dont le degré de dénaturation augmente proportionnellement à la courbure des SiNPs (Shang *et al.*, 2007). En outre, même lorsque la perte de structure semble identique, la fonction de la protéine peut changer selon la taille des NPs. La subtilisine Carlsberg voit ainsi sa fonction enzymatique augmentée lorsqu'elle est adsorbée sur de petites SiNPs (11 nm de diamètre) mais a au contraire son activité enzymatique inhibée lorsqu'elle est adsorbée à de plus grosses SiNPs (150 nm de diamètre, Wang *et al.*, 2011).

Les protéines fibreuses montrent quant à elles un comportement différent vis-à-vis des surfaces courbes puisque des molécules de fibrinogène voient leur structure secondaire fortement perturbée qu'elles soient adsorbées sur de petites ou de grandes SiNPs (Roach *et al.*, 2006). Ceci peut être dû à la structure des protéines fibreuses qui ont une forme fortement allongée induisant donc un étalement le long de la surface de silice ainsi que la formation d'un grand nombre d'interactions électrostatiques.

L'adsorption sur des surfaces courbes semble également jouer un rôle au niveau de la stabilité des protéines. En effet, il a été montré que les protéines adsorbées sur des nanotubes de carbone étaient moins sensibles à une élévation de température ou à l'ajout d'agent dénaturant par rapport à leur adsorption sur une surface plane (Asuri *et al.*, 2006). L'hypothèse avancée est que les protéines adsorbées sur une surface plane peuvent subir plus facilement des interactions entre protéines adjacentes (effet d'encombrement) ce qui peut contribuer à leur déstructuration et à leur agrégation. Par contre, les protéines adsorbées sur une surface courbe seraient soumises à moins d'interactions latérales entre protéines.

L'**effet d'encombrement** peut cependant agir différemment. Par exemple, alors qu'à faible concentration en lysozyme, les protéines adsorbées sur des SiNPs sont déstructurées avec une perte d'activité enzymatique, à forte concentration de lysozyme (donc à fortes interactions latérales protéines/protéines) celles-ci gardent leur structure secondaire et tertiaire ainsi que leur activité enzymatique (Wu et Narsimhan, 2008). La diminution de l'effet d'encombrement induit par l'augmentation de la courbure de surface peut donc à lui seul induire des changements structuraux et fonctionnels des protéines adsorbées. Cette modulation de l'effet d'encombrement en présence de

NPs peut également servir à étudier les phénomènes d'agrégation protéique (Gagner *et al.*, 2011) voire de fibrillation (Linse *et al.*, 2007 ; Bellezza *et al.*, 2007)

Curieusement, la **taille** d'une particule peut également avoir un impact sur sa chimie de surface. En effet, une étude de dynamique moléculaire (Chiu *et al.*, 2010) a montré que des particules parfaitement hydrophiles pouvaient acquérir des propriétés hydrophobes en passant à une taille nanoparticulaire. Ce comportement est interprété comme étant dû au changement de courbure qui agit sur l'interface particule/eau. L'hydratation interfaciale serait ainsi plus forte pour une surface plane que pour une surface courbe (Yu et Zhou, 2016). Ceci a été confirmé expérimentalement par des mesures de la charge de surface (Patwardhan *et al.*, 2012) : en passant de SiNPs (synthétisées par la méthode de Stöber) de 15 à 450 nm de diamètre, le pourcentage de groupes silanol déprotonés à pH 7 passe de 5% à 20%, diminuant donc l'hydrophobicité et augmentant l'acidité. Cette même étude s'est également intéressée à l'influence de ces changements sur l'adsorption de peptides. Des différences de profils d'adsorption des peptides ont pu être constatées avec la taille des SiNPs cependant aucune règle générale n'a pu être déterminée. Ceci est le signe que les différences de chimie de surface observées ici sont faibles et induisent des variations fines de mécanismes d'adsorption.

4.3. Effet du type de protéines

4.3.1. Effet de l'adsorption sur la structure et la fonction des protéines

Si la diversité des nanoparticules est extrêmement élevée, celle des protéines l'est tout autant. Il est donc nécessaire d'aborder également la diversité des protéines. Deux facteurs intrinsèques aux protéines se détachent particulièrement : d'une part les propriétés électrostatiques et d'autre part les propriétés structurales (voir § 3.2.)

La grande majorité des études d'interactions protéines/nanoparticules ont été faites sur des protéines globulaires (lysozyme, albumine, immunoglobulines, hémoglobines...). Une protéine globulaire est une protéine soluble constituée de structures secondaires répétitives qui se replient les unes sur les autres. Dans le cas de nanoparticules hydrophiles (surfaces polaires) l'interaction a lieu directement au moyen de liaisons hydrogène et d'interactions ioniques reliant la surface de la nanoparticule aux structures situées à la surface de la protéine. La formation de ces interactions peut n'induire aucune déstructuration mais peut être aussi suffisamment puissante pour déstructurer les hélices- α et feuillets- β présents à la surface. Le degré de perturbation de la structure protéique dépend de l'équilibre entre la formation et la rupture des différentes interactions intraprotéiques et entre la protéine et la surface.

Ainsi, l'adsorption des protéines globulaires est souvent associée à une modification de leur structure généralement analysée par dichroïsme circulaire (Zoungrana *et al.*, 1997 ; Lundqvist *et al.*, 2004 ; Devineau *et al.*, 2013 ; Devineau *et al.*, 2017). Cependant, la nature de la modification ainsi que son impact sur la fonction de la protéine sont variables. Par exemple, l'adsorption de la RNase A et du lysozyme induisent une perte de structure ainsi qu'une perte de fonction (Wei *et al.*, 2014 ; Vertegel *et al.*, 2004). À l'inverse, l'adsorption du Cytochrome C et de l'hémoglobine provoque une modification de l'environnement autour de leurs hèmes ce qui induit respectivement une augmentation de l'activité peroxydase et de l'affinité pour l'oxygène (Shang *et al.*, 2009 ; Devineau *et al.*, 2017). Une revue sur la modification de l'activité enzymatiques de protéines en interaction avec des NPs (adsorption et fonctionnalisation) a d'ailleurs été faite (Johnson *et al.*, 2014). L'activité enzymatique d'une protéine peut augmenter, diminuer ou rester constante après adsorption (Zoungrana *et al.*, 1997 ; Fischer *et al.*, 2002 ; Vertegel *et al.*, 2004 ; Pandley *et al.*, 2007 ; Sanfins *et al.*, 2011). En outre, l'adsorption d'enzymes peut augmenter leur stabilité structurale et fonctionnelle (Kim *et al.*, 2006 ; Gupta *et al.*, 2011 ; Cipolatti *et al.*, 2014). Toutes ces propriétés sont étudiées depuis longtemps et de nombreuses applications biotechnologiques sont en cours de développement (bioréacteurs, biocapteurs..., Johnson *et al.*, 2014).

Hormis les protéines globulaires, d'autres types de protéines ont très peu été étudiées. Les protéines membranaires, du fait de leur inclusion dans une bicouche lipidique, ont rarement été étudiées par rapport à leur interaction avec des NPs. Seules des études en présence de liposomes ont été réalisées et montrent un transfert des protéines de la membrane vers le liposome (Marchini *et al.*, 2010). Les protéines fibreuses ont également été beaucoup moins étudiées que les protéines globulaires. Le collagène a notamment été utilisé comme protéine modèle. C'est une protéine structurée, très rigide qui pourtant subit des perturbations structurales lors de l'interaction avec une surface de silice (Cole *et al.*, 2009).

Aussi, un autre facteur à prendre en compte est le réseau de charge de surface d'une protéine (Sire *et al.*, 1997). Cette charge est la résultante des charges de tous ses résidus aminoacides. Parce que les charges sont distribuées irrégulièrement sur la surface, des charges locales peuvent exister et être très différentes de la charge globale d'une protéine. Ceci explique comment des protéines négativement chargées telles que la myoglobine et la BSA peuvent interagir avec des surfaces chargées elles aussi négativement (Devineau *et al.*, 2014 ; Kubiak-Ossowska *et al.*, 2016). Seules les régions riches en lysine de ces protéines interagissent avec la surface de silice. Ainsi, pour ces protéines, seule une orientation optimale permet à l'adsorption d'être stable.

L'**orientation de protéines adsorbées** sur des SiNPs a également été montrée pour le lysozyme (Kubiak-Ossowska *et al.*, 2015). Le cas du lysozyme est révélateur du double impact de la structure et de la charge de surface de la protéine sur son adsorption sur des SiNPs. Le lysozyme, comme la plupart des protéines globulaires, possède une forme d'ellipsoïde allongé (Fig. 1-12). Des simulations et des données expérimentales faites par Kubiak-Ossowska *et al.* (2015) ont montré que cette protéine prend préférentiellement une orientation mixte et, dans une moindre mesure, de côté pour interagir avec la surface de silice et non pas une orientation en pointe qui permettrait pourtant un entassement plus grand de molécules sur la surface. Or, même dans les conditions de pH qui permettent de saturer au maximum la surface, ces mêmes orientations sont privilégiées. Ceci est à corrélérer au fait que les extrémités du lysozyme sont plutôt hydrophobes tandis que les côtés sont plus hydrophiles avec des régions riches en acides aminés chargés positivement correspondant aux régions d'interaction avec la surface. Le site actif situé lui en pointe reste donc libre. Il est donc possible pour le lysozyme de garder sa fonction même après adsorption. Toutefois l'activité enzymatique du lysozyme adsorbé est inférieure à celle du lysozyme seul (Vertegel *et al.*, 2004). Ceci est interprété par le fait que, si le site actif est disponible, sa structure est certainement impactée (perte de structure secondaire observée).

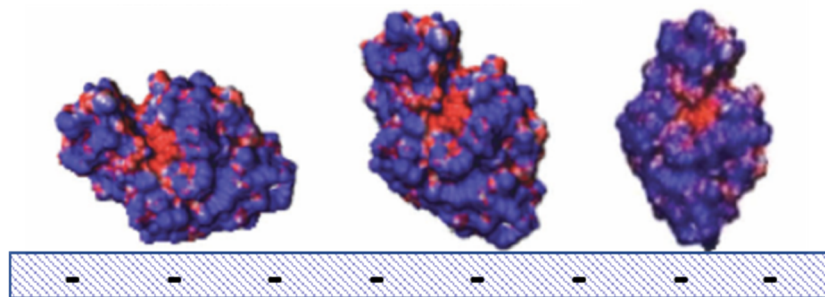


Figure 1-12 : Représentation 3D du lysozyme selon trois orientations : orientations "de côté" (gauche), "en pointe" (droite) et "mixte" (milieu). Tiré de Kubiak-Ossowska *et al.* (2015).

4.3.2. Étude de l'effet taille des protéines

L'impact du type de protéine (structure, charge de surface...) sur l'interaction protéines/nanoparticules a été étudié en détail par l'analyse de divers systèmes modèles. Plus généralement, depuis près d'un siècle, des protéines modèles sont utilisées afin d'étudier leurs interactions avec diverses surfaces organiques comme inorganiques (Hitchcock, 1925 ; Fourt, 1938 ; Williams et Choppin, 1950). Utiliser des protéines modèles simplifie grandement le milieu biologique étudié ce qui permet d'obtenir des informations uniques au sujet de la structure et/ou de la fonction des protéines. Si de nombreux facteurs ont été étudiés, l'effet de la taille des protéines sur leur adsorption sur des SiNPs n'a jamais été étudié spécifiquement.

Durant cette thèse, le sujet de l'effet taille des protéines a été abordé par l'**utilisation de protéines modèles**. L'établissement d'une gamme de protéines de tailles différentes a donc été faite. Pour ce faire, une réflexion sur le choix de protéines modèles a été entreprise.

Pour toute étude physico-chimique, une protéine modèle pertinente doit posséder les caractéristiques suivantes :

- Avoir ses propriétés structurales et fonctionnelles parfaitement connues ;
- Selon la question posée, avoir une fonction pertinente ;
- Être stable dans les conditions opératoires et durant toute la durée des expériences ;
- Pouvoir en disposer en quantité suffisante (après purification ou à l'achat à un prix raisonnable) ;
- Être facilement et précisément quantifiable.

Une des questions posées durant cette thèse est de savoir si la taille de la protéine a un effet sur l'interaction protéine/nanoparticule et, si oui, quel est cet effet. De nombreuses protéines modèles commerciales ont donc été considérées. Une liste non exhaustive de protéines modèles et de leur poids moléculaire est indiquée dans le tableau 1-3.

Tableau 1-3 : Liste de protéines commerciales couramment utilisées en physico-chimie avec leur poids moléculaire, leur fonction principale et leur prix (données Sigma-Aldrich®).

Protéine	Poids moléculaire (kDa)	Fonction	Prix/g (26/05/2017)
Thyroglobuline	670	Précurseur des hormones thyroïdiennes	646
β -galactosidase	540	Hydrolase	225
Ferritine	443	Stockage du fer	307
Catalase	250	Oxydoréductase	30
β -Amylase	200	Saccharidase	2856
Alcool Déshydrogénase	148	Oxydoréductase	476
Transferrine	80	Transport du fer	828
Albumine	66,4	Maintien de la pression osmotique	4
Hémoglobine	64,5	Transport d'oxygène	34
Albumine	44	Maintien de la pression osmotique	44
Anhydrase carbonique	29	Modulation du pH	1073
GFP	28	Protéine fluorescente	1142
Trypsine	24	Peptidase	34
Myoglobine	17	Transport d'oxygène	181
Lysozyme	14,3	Antibiotique	36
α -Lactalbumine	14,2	Synthèse du lactose	427
Cytochrome C	12,4	Rôle dans la chaîne respiratoire	490
Aprotinine	6,5	Inhibiteur de la trypsine	4381

Plusieurs critiques peuvent être formulées quant aux protéines de cette liste. Tout d'abord, ces protéines ont toutes des structures et des fonctions biologiques très différentes les unes des autres (enzyme, transporteur, antioxydant...). La taille ne sera donc jamais la seule variable entre les protéines modèles étudiées. Ensuite, les protéines modèles commerciales disponibles ne recouvrent pas l'ensemble de la gamme de tailles de protéines présentes dans un organisme. En effet, de nombreuses protéines (ou complexes protéiques) ont des tailles pouvant largement dépasser le million de Dalton (Complexe ribosomal : 4200 kDa ; Titine : 3000 kDa (Bang *et al.*, 2001) ; Complexe Notch : 1500 kDa (Jeffries *et al.*, 2002)). Enfin, à l'exception des protéines communes telles que l'albumine, la catalase ou le lysozyme, le prix d'une grande quantité de protéine est très élevé (plusieurs centaines d'euros par gramme de protéine) et devient prohibitif.

En tout état de cause, pour établir une gamme de protéines dont seule la taille varie, la meilleure solution est de se cantonner à une même famille de protéines. La famille des **hémoprotéines** s'est rapidement détachée. Elle remplit en effet toutes les conditions précitées. Les structures et fonctions de ces protéines sont connues de longue date. Ce sont des protéines solubles et stables dans la durée. Dans le sang ou les muscles, les hémoprotéines sont des protéines abondantes et dont l'extraction est aisée ce qui limite le coup de l'expérimentation. Aussi, du fait de leur propriété spectroscopique, la quantification des hémoprotéines en solution est extrêmement facilitée. Enfin, si l'étude de l'impact de l'adsorption sur de la fonction des hémoprotéines (fixation du dioxygène n'a pas été effectuée dans cette thèse), l'utilisation de ces protéines évite les écueils qui peuvent être rencontrés dans le cas d'autres protéines (comme les enzymes). Par exemple, la mesure d'une activité enzymatique peut être influencée par l'adsorption de l'enzyme mais également celle du substrat voire du produit. Ceci peut conduire à des interprétations erronées de l'impact de l'adsorption de la protéine sur une nanoparticule. Le risque artéfactuel de la présence de nanoparticules doit de plus en plus être pris en compte notamment lors de tests de cytotoxicité (Schrurs et Lison, 2012).

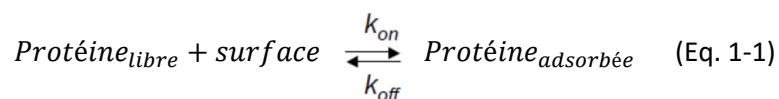
Les hémoprotéines sélectionnées pour l'étude de l'effet taille seront caractérisées avec précision dans le chapitre 2. Les poids moléculaires de cette gamme de protéines (allant de 17 à 3600 kDa) recouvrent la très grande majorité des protéines et des complexes protéiques présents naturellement.

4.3.3. Etudes sur un mélange de protéines

Si l'étude des interactions protéines/nanoparticules est généralement entreprise avec des protéines modèles, cette approche ne correspond pas à la réalité biologique. En effet, dans les fluides biologiques, les NPs sont en contact avec des milliers de protéines qui ont toutes des affinités différentes vis-à-vis de leur surface. Plusieurs études sur la composition de la couronne de protéines

formée en présence de protéines du sérum ont ainsi montré des changements dans la composition des protéines adsorbées au cours du temps (Casals *et al.*, 2010 ; Lynch et Dawson, 2008 ; Hadjidemetriou *et al.*, 2016). Ceci est l'application aux NPs de "l'effet Vroman" servant à décrire l'évolution au cours du temps de la composition de la couche de protéines adsorbées sur des surfaces planes (Vroman *et al.*, 1980). Initialement, les protéines interagissent sur une surface donnée selon une loi d'action de masse (les protéines adsorbées sont celles présentes en plus grandes quantités dans l'environnement proche). Ensuite les protéines les plus abondantes mais peu affines vont peu à peu être remplacées par des protéines présentes en plus faible quantité dans l'environnement mais possédant une plus forte affinité vis-à-vis de la surface.

Le prérequis à l'effet Vroman est le fait que la couronne protéique peut être considérée comme une entité dynamique, c'est-à-dire, dont la structure et la composition peut varier au cours du temps. En effet, en absence d'agent externe, une protéine reste adsorbée de façon permanente. Par contre, en présence de détergents, de polymères, d'autres protéines, ou dans des conditions physico-chimiques particulières (pH par exemple) une désorption peut avoir lieu (Norde, 2008 ; Devineau *et al.*, 2017). Ainsi, dans le cas d'un mélange de protéines, il y a une compétition pour la surface disponible et un équilibre entre adsorption et désorption a lieu (Eq. 1-1). Or toutes les protéines n'ont pas la même affinité vis-à-vis d'une surface donnée. Cette affinité correspond, dans le cas d'une cinétique à l'équilibre, à la constante d'adsorption K_{ads} (Eq. 1-2).



$$K_{ads} = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[Protéine_{adsorbée}]}{[Protéine_{libre}] [surface]} \quad (\text{Eq. 1-2})$$

Si les études précitées semblent indiquer que l'effet Vroman a lieu sur une gamme de temps allant de plusieurs minutes à plusieurs heures, d'autres montrent que l'état d'équilibre peut être atteint en moins d'une minute (Tenzer *et al.*, 2013). Dans tous les cas, durant cette thèse, on s'assurera que l'état d'équilibre est atteint en appliquant des temps d'incubation suffisants (en général 3h).

Ces dernières années, des techniques analytiques ont été développées afin d'identifier et de quantifier les protéines contenues dans des mélanges complexes. Deux techniques ont longtemps coexisté :

l'électrophorèse bidimensionnelle et la spectrométrie de masse en phase liquide (Tenzer *et al.*, 2011). L'électrophorèse bidimensionnelle est une méthode semi-quantitative qui sépare les protéines selon leur poids moléculaire et leur charge. Elle est très sensible et permet de distinguer plusieurs dizaines de protéines ainsi que d'établir leurs concentrations relatives. La **spectrométrie de masse** repose elle sur l'identification du rapport masse/charge (m/z) du produit d'ionisation correspondant à des fragments de digestion (généralement causés par la trypsine) des différentes protéines contenues en solution. Une comparaison des fragments identifiés par rapport à une banque de résidus de protéines connues permet alors l'identification et la quantification des protéines présentes.

Si longtemps l'électrophorèse bidimensionnelle a été la méthode de référence pour les analyses protéomique, l'augmentation continue du pouvoir résolutif de la spectrométrie de masse l'a rendue beaucoup plus pertinente pour traiter des milieux biologiques pouvant contenir des milliers de protéines. De nombreuses analyses biochimiques ont ainsi été faites afin de caractériser la couronne de protéines formée sur des SiNPs (Tenzer *et al.*, 2013 ; Pisani *et al.*, 2017 ; Strojan *et al.*, 2017). Généralement les protéines étudiées sont celles contenues dans une des deux fractions de sang : le sérum ou le plasma. Ces deux milieux possèdent des profils protéiques proches cependant, du fait de leur mode de préparation, le sérum ne possède plus de protéines impliquées dans la coagulation (comme le fibrinogène) et sa concentration protéique est inférieure à celle du plasma (Issaq *et al.*, 2007). Ces milieux représentent un niveau de complexité nettement supérieur à des solutions de protéines modèles mais possèdent également leurs limites. En effet ces milieux possèdent une forte disparité en termes de concentrations protéiques entre l'albumine qui représente seule 55% de la masse protéique du plasma et des centaines de protéines présentes mais non détectables mêmes par les techniques les plus puissantes (Anderson et Anderson, 2002). Cette grande plage de concentrations qui couvre dix ordres de grandeur induit des biais et tend à surestimer l'affinité des protéines abondantes telles que l'albumine, la protéine C3 du complément ou les immunoglobulines (Tenzer *et al.*, 2011). En outre, il a été montré que des SiNPs incubées soit dans deux milieux aussi proches que le sérum et le plasma induisaient la formation de couronnes de protéines différentes ce qui conduisait à des phénomènes différents d'internalisation cellulaire (Mirshafiee *et al.*, 2016).

En alternative au sérum/plasma, notre laboratoire a fait le choix d'utiliser des **extraits protéiques totaux**. Ces extraits possèdent une plus grande diversité protéique (l'ensemble des protéines solubles d'une cellule) ainsi qu'une plus faible dynamique d'abondance (écart de concentration entre les protéines les plus concentrées et les moins concentrées). Le laboratoire a expérimenté les extraits de cellules humaines et les extraits de levures, *S. cerevisiae*. Les résultats se sont avérés très similaires (Klein *et al.*, 2016). De plus de nombreuses modifications post-traductionnelles sont retrouvées chez

ces deux espèces eucaryotes. Aussi, pour des raisons pratiques (facilité de culture, possibilité de marquage au ³⁵S, existence de banques de mutants...), il nous est apparu plus aisé et tout aussi pertinent d'utiliser principalement des extraits de levure.

De plus, les extraits protéiques de levure sont tout à fait adaptés pour étudier les aspects physico-chimiques de l'adsorption. Avec ces extraits, nous nous sommes concentrés sur deux objectifs : étudier l'effet de la taille de nanoparticules sur la couronne de protéines formée (chapitre 4) et affiner la compréhension de mécanismes d'adsorption des protéines contenant des régions intrinsèquement désordonnées riches en motifs RGG (chapitre 5). Cette dernière étude est la suite directe des travaux antérieurs de l'équipe visant à établir les paramètres physico-chimiques des protéines favorisant leur adsorption sur une surface de silice (Mathé *et al.*, 2013 ; Klein *et al.*, 2016).

5. Approches expérimentales

Afin d'approfondir la compréhension des mécanismes d'adsorption des protéines sur des SiNPs, plusieurs approches expérimentales ont été entreprises. Tout d'abord, il est apparu que le paramètre de la taille des protéines n'avait jamais été étudié auparavant. Aussi, une gamme d'hémoprotéines de tailles comprises entre 17 à 3600 kDa) a été obtenue et leurs interactions avec des SiNPs monodisperses ont été étudiées (Chapitre 3). Un panel de techniques a été utilisé dans ce but :

- L'affinité des protéines pour la surface de silice a été mesurée par **isotherme d'adsorption** en déplétion (mesure par absorption UV-visible) ;
- Les caractéristiques thermodynamiques ont été déterminées par **titration calorimétrique isotherme** (ITC) ;
- L'effet de l'adsorption sur la structure secondaire et tertiaire a été étudié par **dichroïsme circulaire** ;
- L'effet de l'adsorption sur la structure quaternaire a été étudié par **diffusion des neutrons aux petits angles** (SANS).

Une augmentation d'affinité en fonction de la taille a été mesurée. De plus, des différences thermodynamiques fondamentales ont pu être observées entre petites et grosses protéines. Enfin, si de légères modifications de la structure secondaire ont pu être constatées, l'adsorption ne semble pas avoir de conséquences sur la structure quaternaire des hémoprotéines.

Ces mêmes hémoprotéines ont également été utilisées pour étudier leur adsorption sur des SiNPs de tailles différentes (chapitre 4). Ici l'objectif est d'établir si le passage de petites protéines adsorbées sur de grosses SiNPs à de petites SiNPs adsorbées sur de grosses protéines (inversion des ordres de

taille) a un impact sur l'interaction et, si oui, quelles sont les différences occasionnées. Des différences de profils d'adsorption entre petites et grosses SiNPs sont notamment observables. Dans ce même chapitre, les SiNPs monodisperses de tailles différentes ont été mises en contact avec des extraits de protéines solubles de levures. Une analyse protéomique a été entreprise et des différences fines de composition de la couronne protéique ont pu être observées entre petites et grosses SiNPs.

Dans le chapitre 2, les différentes hémoprotéines et SiNPs monodisperses utilisées durant cette thèse ont été caractérisées rigoureusement. Des expériences pour déterminer la taille et la forme (diffusion dynamique de la lumière, SAXS/SANS) ainsi que la charge de surface (zétamétrie) ont notamment été réalisées.

Enfin, dans la continuité de ce qui a été fait dans le laboratoire (Klein *et al.*, 2016), le chapitre 5 vise à mieux comprendre pourquoi les protéines riches en motifs RGG sont particulièrement affines pour la surface de la silice. Des études de compétition pour la surface ont été faites afin de comparer l'affinité de différents mutants de protéines à motifs RGG. Il est apparu clairement que la version diméthylée asymétriquement des résidus arginine (R) de ces protéines est responsable de leur grande affinité. L'importance de la diméthylation a ensuite été étudiée avec différents peptides à motifs RGG. Des expériences d'isothermes d'adsorption, d'ITC, de dichroïsme circulaire, et de fluorescence du tryptophane ont été entreprises afin de comprendre la spécificité de la diméthylation asymétrique.

L'étude de cette modification post-traductionnelle comme les études portant sur l'effet de la taille des protéines et des nanoparticules permettent ainsi de proposer une version affinée du modèle de formation de la couronne de protéines.

Bibliographie – Chapitre 1

- **Abramson H. A.** (1932) *Electrokinetic Phenomena: VI. Relationship between Electric Mobility, Charge, and Titration of Proteins*. *J. Gen. Physiol.* 15, 575-603.
- **Anderson N. L., Anderson N.G.** (2002) *The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects*. *Mol. Cell Proteomics*. 1, 845-867.
- **ANSES** (2014) *Évaluation des risques liés aux nanomatériaux : Enjeux et mise à jour des connaissances. Rapport d'expertise collective*.
- **Asuri P., Karajanagi S. S., Yang H., Yim T. J., Kane R. S., and Dordick J. S.** (2006) *Increasing Protein Stability through Control of the Nanoscale Environment*. *Langmuir*. 22, 5833-5836.
- **Bannunah A. M., Vllasaliu D., Lord J., and Stolnik S.** (2014) *Mechanisms of Nanoparticle Internalization and Transport Across an Intestinal Epithelial Cell Model: Effect of Size and Surface Charge*. *Mol. Pharmaceutics*. 11, 4363-4373.
- **Bellezza F., Cipiciani A., Quotadamo M. A., Cinelli S., Onori G., and Tacchi S.** (2007) *Structure, Stability, and Activity of Myoglobin Adsorbed onto Phosphate-Grafted Zirconia Nanoparticles*. *Langmuir*. 23, 13007-13012.
- **Beretta G. L. and Cavalieri F.** (2016) *Engineering Nanomedicines to Overcome Multidrug Resistance in Cancer Therapy*. *Curr. Med. Chem.* 23, 3-22.
- **Bianco A., Kostarelos K., and Prato M.** (2005) *Applications of Carbon Nanotubes in Drug Delivery*. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 674-679.
- **Bolis V., Cavenago A., and Fubini B.** (1997) *Surface Heterogeneity on Hydrophilic and Hydrophobic Silicas: Water and Alcohols as Probes for H-Bonding and Dispersion Forces*. *Langmuir*, 13, 895-902.
- **Bolis V., Fubini B., Marchese L., Martra G., and Costa D.** (1991) *Hydrophilic and Hydrophobic sites on Dehydrated Crystalline and Amorphous Silicas*. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 87, 497-505.
- **Bouchoucha M., Maguy Jaber M., Onfroy T., Lambert J.-F., and Xue B.** (2011) *Glutamic Acid Adsorption and Transformations on Silica*. *J. Phys. Chem. C*. 115, 21813-21825.
- **Bouwmeester H., Dekkers S., Noordam M., Hagens W., Bulder A., de Heer C., ten Voorde S., Wijnhoven S., and Sips A.** (2001) *Health impact of nanotechnologies in food production*. RIKILT - Institute of Food Safety.
- **Brun E., Barreau F., Veronesi G., Fayard B., Sorieul S., Chanéac C., Carapito C., Rabilloud T., Mabondzo A., Herlin-Boime N., and Carrière M.** (2014) *Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia*. *Part Fibre Toxicol.* 12, 13.
- **Buzea, C., Pacheco I.I., and Robbie K.** (2007) *Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity*. *Biointerphases*. 2, MR17-MR172.
- **Caracciolo G., Farokhzad O. C., and Mahmoudi M.** (2017) *Biological Identity of Nanoparticles In Vivo: Clinical Implications of the Protein Corona*. *Trends Biotechnol.* 35, 257-264.
- **Casals E., Pfaller T., Duschl A., Oostingh G. J., and Puntès V.** (2010) *Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona*. *ACS Nano*. 4, 3623-3632.
- **Catalano F., Alberto G., Ivanchenko P., Dovbeshko G., and Martra G.** (2015) *Effect of Silica Surface Properties on the Formation of Multilayer or Submonolayer Protein Hard Corona: Albumin Adsorption on Pyrolytic and Colloidal SiO₂ Nanoparticles*. *J. Phys. Chem. C*. 119, 26493-26505.
- **Chen H., Su X., Neoh K. G., and Choe W.S.** (2006) *QCM-D analysis of binding mechanism of phage particles displaying a constrained heptapeptide with specific affinity to SiO₂ and TiO₂*. *Anal. Chem.* 78, 4872-4979.
- **Chen F., Wang G., Griffin J. I., Brenneman B., Banda N. K., Holers V. M., Backos D. S., Wu L., Moghimi S. M., and Simberg D.** (2017) *Complement proteins bind to nanoparticle protein corona and undergo dynamic exchange in vivo*. *Nat. Nanotechnol.* 12, 387-393.

- **Chiu** C. C., Moore P. B., Shinoda W., and Nielsen S. O. (2010) *Size-Dependent Hydrophobic to Hydrophilic Transition for Nanoparticles: A Molecular Dynamics Study*. J. Chem. Phys. 131, 244706.
- **Cipolatti**, E. P., Silva M. J. A., Klein M., Feddern V., Feltes M. M. C., Oliveira J. V., Ninow J. L., and De Oliveira D. (2014) *Current Status and Trends in Enzymatic Nanoimmobilization*. J. Mol. Catal. B: Enzym. 99, 56-67.
- **Cole** D. J., Payne M. C., and Ciacchi L. C. (2009) *Water Structuring and Collagen Adsorption at Hydrophilic and Hydrophobic Silicon Surfaces*. Phys. Chem. Chem. Phys. 11, 11395-11399.
- **Commission Européenne : SWD (2012) 288** : *Types and uses of nanomaterials, including safety aspects. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee, The second regulatory review dedicated to Nanomaterials*, Brussels.
- **Costa** D., Tougerti A., Tielens F., Gervais C., Stievano L., and Lambert J. F. (2008) *DFT study of the adsorption of microsolvated glycine on a hydrophilic amorphous silica surface*. Phys Chem Chem Phys. 10, 6360-6368.
- **Cruz-Chu** E. R., Aksimentiev A., and Schulten K. (2006) *Water-silica force field for simulating nanodevices*. J. Phys. Chem. B. 110, 21497-21508.
- **Czeslik** C., Royer C., Hazlett T., and Mantulin W. (2003) *Reorientational dynamics of enzymes adsorbed on quartz: a temperature-dependent time-resolved TIRF anisotropy study*. Biophys. 84, 2533-2541.
- **Czeslik** C. (2004) *Factors Ruling Protein Adsorption*. Z. Phys. Chem. 18, 771-801.
- **das Neves** J., Rocha C. M., Gonçalves M. P., Carrier R. L., Amiji M., Bahia M. F., Sarmiento B. (2012) *Interactions of microbicide nanoparticles with a simulated vaginal fluid*. Mol. Pharm. 9, 3347-3356.
- **Dastjerdi** R., Montazer M. (2010) *A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties*. Colloids Surf. B Biointerfaces. 79, 5-18.
- **De Gennes** P.G. (1976) *Scaling theory of polymer adsorption*. J. Phys. France 37, 1445-1452.
- **De Matteis** V. (2017) *Exposure to Inorganic Nanoparticles: Routes of Entry, Immune Response, Biodistribution and In Vitro/In Vivo Toxicity Evaluation*. Toxics. 5, 29.
- **Devineau** S., Zanotti J. M., Loupiac C., Zargarian L., Neiers F., Pin S., and Renault J. P. (2013) *Myoglobin on silica: a case study of the impact of adsorption on protein structure and dynamics*. Langmuir. 29, 13465-13472.
- **Devineau** S., Mathé C., Legros V., Gonnet F., Daniel R., Renault J. P., and Pin S. (2014) *The nano-bio interface mapped by oxidative footprinting of the adsorption sites of myoglobin*. Anal. Bioanal. Chem. 406, 8037-8040.
- **Devineau** S., Zargarian L., Renault J. P., and Pin S. (2017) *Structure and Function of Adsorbed Hemoglobin on Silica Nanoparticles: Relationship between the Adsorption Process and the Oxygen Binding Properties*. Langmuir. 33, 3241-3252.
- **Disdier** C., Devoy J., Cosnefroy A., Chalansonnet M., Herlin-Boime N., Brun E., Lund A., and Mabondzo A. (2015) *Tissue biodistribution of intravenously administrated titanium dioxide nanoparticles revealed blood-brain barrier clearance and brain inflammation in rat*. Part. Fibre Toxicol. 12, 27.
- **Dunker** A. K., Silman I, Uversky V. N., and Sussman J. L. (2008). *Function and structure of inherently disordered proteins*. Curr. Opin. Struct. Biol. 18, 756-764.
- **Fischer** N. O., McIntosh C. M., Simard J. M., and Rotello V. M. (2002) *Inhibition of Chymotrypsin through Surface Binding Using Nanoparticle-Based Receptors*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 5018-5023.
- **Fourt** L. (1938) *Lateral Cohesion in Protein monolayers*. J. Phys. Chem. 43,887-899.
- **Frujtier-Pöloth** C. (2012) *The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica—A nanostructured material*. Toxicology. 294, 61-79.
- **Fubini** B. (1998) *The Surface Properties of Silicas*. Legrand A. P. Ed. 415-458.
- **Gagner** J. E., Lopez M. D., Dordick J. S., and Siegel R. W. (2011) *Effect of Gold Nanoparticle Morphology on Adsorbed Protein Structure and Function*. Biomaterials. 32, 7241-7252.

- **Gao Q.**, Xu W., Xu Y., Wu D., Sun Y., Deng F., and Shen W. (2008) *Amino acid adsorption on mesoporous materials: influence of types of amino acids, modification of mesoporous materials, and solution conditions*. J. Phys. Chem. B. 112, 2261-2267.
- **Gasser M.**, Wick P., Clift M.J., Blank F., Diener L., Yan B., Gehr P., Krug H. F., Rothen-Rutishauser B. (2012) *Pulmonary surfactant coating of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) influences their oxidative and pro-inflammatory potential in vitro*. Part. Fibre Toxicol. 24, 9:17.
- **Geiser M.**, Rothen-Rutishauser B., Kapp N., Schürch S., Kreyling W., Schulz H., Semmler M., Hof V. I., Heyder J., and Gehr P. (2005) *Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells*. Environ. Health Perspect. 113, 1555-1560.
- **Gifford R.**, Kehoe J.J., Barnes S.L., Kornilayev B.A., Alterman M.A. and Wilson G. S. (2006) *Protein interactions with subcutaneously implanted biosensors*. Biomaterials. 27, 2587-2598.
- **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., and Drobny G. P. (2007) *The structure, dynamics, and energetics of protein adsorption - lessons learned from adsorption of statherin to hydroxyapatite*. Magn. Reson. Chem. 45. Suppl 1: S32-47.
- **Gref R.**, Lück M., Quellec P., Marchand M., Dellacherie E., Harnisch S., Blunk T., and Müller R. H. (2000) *'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption*. Colloids Surf. B Biointerfaces.18, 301-313.
- **Guidi P.**, Nigro M., Bernardeschi M., Scarcelli V., Lucchesi P., Onida B., Mortera R., and Frenzilli G. *Genotoxicity of amorphous silica particles with different structure and dimension in human and murine cell lines*. Mutagenesis. 28, 171-180.
- **Gupta M. N.**, Kaloti M., Kapoor M., and Solanki K. (2011) *Nanomaterials as Matrices for Enzyme Immobilization*. Artif. Cells, Blood Substitutes Biotechnol. 39, 98-109.
- **Hadjidemetriou M.**, Al-Ahmady Z., and Kostarelou K. (2016) *Time-evolution of in vivo protein corona onto blood-circulating PEGylated liposomal doxorubicin (DOXIL) nanoparticles*. Nanoscale. 8, 6948-6957.
- **Hartvig R. A.**, Van de Weert M., Ostergaard J., Jorgensen L., and Jensen H. (2011) *Protein Adsorption at Charged Surfaces: The Role of Electrostatic Interactions and Interfacial Charge Regulation*. Langmuir. 27, 2634-2643.
- **Hassanali A.A.** and Singer S. J. (2007) *Model for the water-amorphous silica interface: the undissociated surface*. J. Phys. Chem. B. 111, 11181-11193.
- **Haynes C. A.**, Sliwinsky E., and Norde W. (1994) *Structural and electrostatic properties of globular proteins at a polystyrene water interface*. J. Colloid Interface Sci. 164, 394-409.
- **He X.**, Nie H., Wang K., Tan W., Wu X., and Zhang P. (2008) *In vivo Study of Biodistribution and Urinary Excretion of Surface-Modified Silica Nanoparticles*. Anal. Chem. 80, 9597-9603.
- **Hellstrand E.**, Lynch I., Andersson A., Drakenberg T., Dahlbäck B., Dawson K.A., Linse S., and Cedervall T. (2009) *Complete high-density lipoproteins in nanoparticle corona*. FEBS J. 276 3372-3381.
- **Hesselink F. T.**, Vrij A., and Overbeek J. T. G. (1971) *Theory of the stabilization of dispersions by adsorbed macromolecules. II. Interaction between two flat particles*. J. Phys. Chem. 75, 2094-2103
- **Hitchcock D. I.** (1925) *Protein films on colloidon membranes*. J Gen Physiol. 8, 61-74.
- **Hougaard K. S.**, Campagnolo L., Chavatte-Palmer P., Tarrade A., Rousseau-Ralliard D., Valentino S., Park M. V., de Jong W. H., Wolterink G., Piersma A. H., Ross B. L., Hutchison G. R., Hansen J. S., Vogel U., Jackson P., Slama R., Pietroiusti A., and Cassee F. R. (2015) *A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles*. Reprod Toxicol. 56 118-140.
- **Huh A. J.** and Kwon Y. J. (2011) *"Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era*. J. Control. Release 156, 128-145.

- **Ikeda** T. and **Kuroda** A. (2011) *Why does the silica-binding protein "Si-tag" bind strongly to silica surfaces? Implications of conformational adaptation of the intrinsically disordered polypeptide to solid surfaces.* *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 86, 359-363.
- **INRS** (2014) *Aide au repérage des nanomatériaux en entreprise.* ED 6174.
- **ISO/TC 229** (2009) International Standards for Nanotechnology.
- **ISO/TS 80004-2:2015** Nanotechnologies - Vocabulary - Part 2: Nano-objects.
- **Issaq** H. J., **Xiao** Z., and **Veenstra**, T. D. (2007) *Serum and plasma proteomics.* *Chem. Rev.* 107, 3601-3620.
- **James** L. K. and **Augenstein** LG. (1966) *Adsorption of enzymes at interfaces: film formation and the effect on activity.* *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 28, 1-40.
- **Jayalakshmi** M., **Mohan Rao** M., and **Kim** K-B. (2006) *Effect of particle size on the electrochemical capacitance of α -Ni(OH)₂ in alkali solutions.* *Int. J. Electrochem. Sci.* 1, 324-333.
- **Jha** R. K., **Jha** P. K., **Chaudhury** K., **Rana** S. V. S., and **Guha** S. K. (2014) *An emerging interface between life science and nanotechnology: present status and prospects of reproductive healthcare aided by nano-biotechnology.* *Nano Reviews.* 5, 22765.
- **Johnson** B. J., **Russ Algar** W., **Malanoskia** A. P., **Ancona** M. G., **Medintza** I. L. (2014) *Understanding enzymatic acceleration at nanoparticle interfaces: Approaches and challenges.* *Nano Today* (2014) 9, 102-131.
- **Khan** Z., **Combadière** C., **Authier** F. J., **Itier** V., **Lux** F., **Exley** C., **Mahrouf-Yorgov** M., **Decrouy** X., **Moretto** P., **Tillement** O., **Gherardi** R. K., and **Cadusseau** J. (2013) *Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain.* *BMC Med.* 11:99.
- **Kim** J., **Grate** J. W., and **Wang** P. (2006) *Nanostructures for Enzyme Stabilization.* *Chem. Eng. Sci.* 61, 1017-1026.
- **Kitadai** N., **Yokoyama** T., and **Nakashima** S. (2009) *ATR-IR spectroscopic study of L-lysine adsorption on amorphous silica.* *J. Colloid Interface Sci.* 329, 31-37.
- **Klein** G., **Mathé** C., **Biola-Clier** M., **Devineau** S., **Drouineau** E., **Hatem** E., **Marichal** L., **Alonso** B., **Gaillard** J. C., **Lagniel** G., **Armengaud** J., **Carrière** M., **Chédin** S., **Boulard** Y., **Pin** S., **Renault** J. P., **Aude** J. C., **Labarre** J. (2016) *RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts.* *Nanotoxicology.* 10, 1555-1564.
- **Klein** G., **Devineau** S., **Aude** J. C., **Boulard** Y., **Pasquier** H., **Labarre** J., **Pin** S., **Renault** J. P. (2016b) *Interferences of Silica Nanoparticles in Green Fluorescent Protein Folding Processes.* *Langmuir.* 32, 195-202.
- **Kolosnjaj-Tabi** J., **Just** J., **Hartman** K. B., **Laoudi** Y., **Boudjemaa** S., **Alloyeau** D., **Szwarc** H., **Wilson** L. J., and **Moussa** F. (2015) *Anthropogenic Carbon Nanotubes Found in the Airways of Parisian Children.* *EBioMedicine.* 2, 1697-1704.
- **Koral** J., **Ullman** R., and **Eirich** F. R. (1958) *The Adsorption of Polyvinyl Acetate* *J. Phys. Chem.* 62, 541-550
- **Kubiak-Ossowska** K., **Cwieka** M., **Kaczynska** A., **Jachimska** B., and **Mulheran** P. A. (2015) *Lysozyme adsorption at a silica surface using simulation and experiment: effects of pH on protein layer structure.* *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 24070-24077.
- **Kubiak-Ossowska** K., **Jachimska** B., and **Mulheran** P. A. (2016) *How Negatively Charged Proteins Adsorb to Negatively Charged Surfaces: A Molecular Dynamics Study of BSA Adsorption on Silica.* *J. Phys. Chem. B.* 120, 10463-10468.
- **Kulvietis** V., **Zalgevičienė** V., **Didziapetrienė** J., and **Rotomskis** R. (2011) *Transport of nanoparticles through the placental barrier.* *Tohoku J. Exp. Med.* 225, 225-234.
- **Kumar Rai** P. (2015) *Multifaceted health impacts of Particulate Matter (PM) and its management: An overview.* *Environ. Skept. Critics.* 4, 1-26.

- **Kundu S.**, Das K., Mehan S., Aswal V. K., and Kohlbrecher J. (2015) Structure and interaction among protein and nanoparticle mixture in solution: Effect of temperature. *Chem. Phys. Lett.* 641, 68-73.
- **Kurtz-Chalot A.**, Villiers C., Pourchez J., Boudard D., Martini M., Marche P. N., Cottier M., Forest V. (2017) *Impact of silica nanoparticle surface chemistry on protein corona formation and consequential interactions with biological cells.* *Mater Sci. Eng. C. Mater Biol. Appl.* 75, 16-24.
- **Kushida T.**, Saha K., Subramani C., Nandwana V., and Rotello V. M. (2014) *Effect of nano-scale curvature on the intrinsic blood coagulation system.* *Nanoscale.* 6, 14484-14487.
- **Lademann J.**, Richter H., Teichmann A., Otberg N., Blume-Peytavi U., Luengo J., Weiß B., Schaefer U. F., Lehr C. M., Wepf R., and Sterry W. (2007) *Nanoparticles – An Efficient Carrier for Drug Delivery into the Hair Follicles.* *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66, 159-164.
- **Li X.**, Wang L., Fan Y., Feng Q., and Cui F-Z. (2012) *Biocompatibility and Toxicity of Nanoparticles and Nanotubes.* *J. Nanomater.* Article ID 548389.
- **Linse S.**, Cabaleiro-Lago C., Xue W. F., Lynch I., Lindman S., Thulin E., Radford S. E., and Dawson, K. A. (2007) *Nucleation of Protein Fibrillation by Nanoparticles.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 8691-8696.
- **Lundqvist M.**, Sethson I., and Bengt-Harald J. (2004) *Protein Adsorption onto Silica Nanoparticles: Conformational Changes Depend on the Particles' Curvature and the Protein Stability.* *Langmuir.* 20, 10639-10647.
- **Lundqvist M.**, Nygren P., Jonsson B. H., and Broo K. (2006) *Induction of structure and function in a designed peptide upon adsorption on a silica nanoparticle.* *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45, 8169-8173.
- **Lyklema J.** and Norde W. (1996) *Interfacial behaviour of biomacromolecules.* *Interfaces, Surfactants and Colloids in Engineering.* 9-17.
- **Lynch I.** and Dawson K. A. (2008) *Protein/Nanoparticle Interactions.* *Nano Today.* 3, 40-47.
- **Macara I.G.** (2001) *Transport into and out of the Nucleus.* *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 570-594.
- **Mahmoudi M.**, Abdelmonem A. M., Behzadi S., Clement J. H., Dutz S., Ejtehadi M. R., Hartmann R., Kantner K., Linne U., Maffre P., Metzler S., Moghadam M. K., Pfeiffer C., Rezaei M., Ruiz-Lozano P., Serpooshan V., Shokrgozar M.A., Nienhaus G.U., Parak W.J. (2013) *Temperature: the "ignored" factor at the NanoBio interface.* *ACS Nano.* 7, 6555-6562.
- **Maiorano G.**, Sabella S., Sorce B., Brunetti V., Malvindi M. A., Cingolani R., and Pompa P.P. (2010) *Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response.* *ACS Nano.* 4, 7481-7491.
- **Marchini C.**, Pozzi D., Montani M., Alfonsi C., Amici A., Amenitsch H., Candeloro De Sanctis S., and Caracciolo G. (2010) *Tailoring Lipoplex Composition to the Lipid Composition of Plasma Membrane: A Trojan Horse for Cell Entry?* *Langmuir.* 26, 13867-13873.
- **Marucco A.**, Turci F., O'Neill L., Byrne H. J., Fubini B., and Fenoglio I. (2014) *Hydroxyl Density Affects the Interaction of Fibrinogen with Silica Nanoparticles at Physiological Concentration.* *J. Colloid Interface Sci.* 419, 86-94.
- **Mathé C.**, Devineau S., Aude J-C., Lagniel G., Chédin S., Legros V., Mathon M-H., Renault J-P., Pin S., Boulard Y., and Labarre J. (2013) *Structural Determinants for Protein adsorption/nonadsorption to Silica Surface.* *Plos One.* 8, e81346.
- **McColl J.**, Yakubov G. E., and Ramsden J. J. (2007) *Complex desorption of mucin from silica.* *Langmuir* 23, 7096-7100.
- **Medintz I. L.**, Uyeda H. T., Goldman E. R., and Mattoussi H. (2005) *Quantum Dot Bioconjugates for Imaging, Labelling and Sensing.* *Nat. Mater.* 4, 435-446.
- **Meissner J.**, Prause A., Bharti B., and Findenegg G. H. (2015) *Characterization of protein adsorption onto silica nanoparticles: influence of pH and ionic strength.* *Colloid Polym. Sci.* 293, 3381-3391.
- **Miller I. R.** and Bach D. L. (1973) dans E. Matijevic (Ed.) *Surface and Colloid Science*, 6, Wiley-Interscience, p185.

- **Mironyuk** I. F., Gunko V. M., Turov V. V., Zarko V. I., Leboda R., and Skubiszewska-Zięba J. (2001) *Characterization of Fumed Silicas and their Interaction with Water and Dissolved Proteins*. Colloids Surf. A. 180, 87-101.
- **Mirshafiee** V., Kim R., Mahmoudi M., Kraft M. L. (2016) *The importance of selecting a proper biological milieu for protein corona analysis in vitro: Human plasma versus human serum*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 75, 188-195.
- **Monopoli** M. P., Aberg C., Salvati A., and Dawson K. A. (2012) *Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials*. Nat. Nanotechnol. 7, 779-786.
- **Moreno** T., Martins V., Querol X., Jones T., Béru K., Cruz Minguillón M., Amato F., Capdevila M., de Miguel E., Centelles S., and Gibbons W. (2015) *A new look at inhalable metalliferous airborne particles on rail subway platforms*. Sci. Total Environ. 505, 367-375.
- **Mu** Q., Jiang G., Chen L., Zhou H., Fourches D., Tropsha A., and Yan B. (2014) *Chemical Basis of Interactions Between Engineered Nanoparticles and Biological Systems*. Chem. Rev. 114, 7740-7781.
- **Mura** S., Hillaireau H., Nicolas J., Kerdine-Römer S., Le Droumaguet B., Deloménie C., Nicolas V., Pallardy M., Tsapis N., Fattal E. (2012) *Biodegradable nanoparticles meet the bronchial airway barrier: how surface properties affect their interaction with mucus and epithelial cells*. Biomacromolecules. 12, 4136-4143.
- **Murugadoss** S., Lison D., Godderis L., Van Den Brule S., Mast J., Brassinne F., Sebaihi N., and Hoet P. H. (2017) *Toxicology of silica nanoparticles: an update*. Arch. Toxicol. 91, 2967-3010.
- **Nabeshi** H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Matsuo K., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S., and Tsutsumi Y. (2011) *Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application*. Biomaterials. 32, 2713-2724.
- **Nakanishi** K., Sakiyama T., Imamura K. (2001) *On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon*. J. Biosci. Bioeng. 91, 233-244.
- **Natte** K., Friedrich J. F., Wohlrab S., Lutzki J., von Klitzing R., Österle W., and Orts-Gil G. (2013) *Impact of polymer shell on the formation and time evolution of nanoparticle-protein corona*. Colloids Surf. B Biointerfaces. 104, 213-20.
- **Nel** A., Xia T., Meng H., Wang X., Lin S., Ji Z., Zhang H. (2013) *Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening*. Acc. Chem. Res. 46, 607-621.
- **Nonella** M. and Seeger S. (2010) *Monitoring peptide-surface interaction by means of molecular dynamics simulation*. Chem. Phys. 378, 73-81.
- **Norde** W. (2008) *My voyage of discovery to proteins in flatland ...and beyond*. Colloids Surf. B Biointerfaces. 61, 1-9.
- **Nygren** P., Lundqvist M., Broo K., and Jonsson B. H. (2008) *Fundamental design principles that guide induction of helix upon formation of stable peptide-nanoparticle complexes*. Nano Lett. 8, 1844-1852.
- **Oberdörster** G., Oberdörster E., and Oberdörster J. (2005) *Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles*. Environ. Health Perspect. 113, 823-839.
- **Oganov** A. R., Hemley R. J., Hazen R. M., Jones A. P. (2013) *Structure, Bonding, and Mineralogy of Carbon at Extreme Conditions*. Rev. Mineral. Geochem. 75, 47-77.
- **Ong** S. W., Zhao X. L., and Eisenthal K. B. (1992) *Polarization of Water-Molecules at a Charged Interface - 2nd Harmonic Studies of the Silica Water Interface*. Chemical Physics Letters. 191, 327-335.
- **Orts-Gil** G., Natte K., Thiermann R., Girod M., Rades S., Kalbe, H., Thünemann A. F., Maskos M., and Österle W. (2013) *On the Role of Surface Composition and Curvature on Biointerface Formation and*

Colloidal Stability of Nanoparticles in a Protein-Rich Model System. Colloids Surf. B Biointerfaces. 108, 110-119.

- **Palchetti S.**, Colapicchioni V., Digiacomio I., Caracciolo G., Pozzi D., Capriotti A. L., La Barbera G., Laganà A. (2016). *The protein corona of circulating PEGylated liposomes*. BBA – Biomembranes. 1858, 189-196.
- **Pandey P.**, Singh S. P., Arya S. K., Gupta V., Datta M., Singh S., and Malhotra B. D. (2007) *Application of Thiolated Gold Nanoparticles for the Enhancement of Glucose Oxidase Activity*. Langmuir. 23, 3333-3337.
- **Papirer E.** (2000) *Adsorption on silica surfaces*. Surfactant science series volume 90. Marcel Dekker Inc.
- **Patwardhan S. V.**, Emami F. S., Berry R. J., Jones S. E., Naik R. R., Deschaume O., Heinz H., and Perry C. C. (2012) *Chemistry of aqueous silica nanoparticle surfaces and the mechanism of selective peptide adsorption*. J. Am. Chem. Soc. 134, 6244-6256.
- **Pelaz B.**, del Pino P., Maffre P., Hartmann R., Gallego M., Rivera-Fernández S., de la Fuente J. M., Nienhaus G. U., and Parak W. J. (2015) *Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake*. ACS Nano. 9, 6996-7008.
- **Pilling M.**, ApSimon H., Carruthers D., Carslaw D., Roy C., Derwent D., Dorling S., Fisher B., Harrison R., Heal M., et al. AQEG (2005) *Particulate Matter in the United Kingdom*. Defra Publications: London, UK. ISBN 0-85521-143-1, 1-144.
- **Pisani C.**, Gaillard J. C., Odorico M., Nyalosaso J. L., Charnay C., Guari Y., Chopineau J., Devoisselle J. M., Armengaud J., and Prat O. (2017) *The timeline of corona formation around silica nanocarriers highlights the role of the protein interactome*. Nanoscale. 9, 1840-1851.
- **Pulit-Prociak J.** and Banach M. (2016) *Silver nanoparticles – a material of the future...?* Open Chem. 14, 76-91.
- **Rabe M.**, Verdes D., Seeger S. (2011) *Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces*. Adv. Colloid. Interface Sci. 162, 87-106.
- **Recommandation n°2011/696/UE** du 18/10/11 relative à la définition des nanomatériaux.
- **Rimola A.**, Sodupe M., and Ugliengo P. (2009) *Affinity Scale for the Interaction of Amino Acids with Silica Surfaces*. J. Phys. Chem. C., 113, 5741-5750.
- **Rimola A.**, Costa D., Sodupe M., Lambert J-F., and Ugliengo P. (2013) *Silica Surface Features and Their Role in the Adsorption of Biomolecules: Computational Modeling and Experiments*. Chem. Rev. 113, 4216-4313.
- **Roach P.**, Farrar D., and Perry C. C. (2006) *Surface Tailoring for Controlled Protein Adsorption: Effect of Topography at the Nanometer Scale and Chemistry*. J. Am. Chem. Soc. 128, 3939-3945.
- **Roberti M. J.**, Morgan M., Menendez G., Pietrasanta L. I., Jovin T. M., and Jares-Erijman E. A. (2009) *Quantum Dots as Ultrasensitive Nanoactuators and Sensors of Amyloid Aggregation in Live Cells*. J. Am. Chem. Soc. 131, 8102-8107.
- **Ruszkiewicz J. A.**, Pinkas A., Ferrer B., Peres T. V., Tsatsakis A., and Aschner M. (2017) *Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review*. Toxicol. Rep. 4, 245-259.
- **Schöttler S.**, Becker G., Winzen S., Steinbech T., Mohr K., Landfester K., Mailänder V., and Wurm F. R. (2016) *Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers*. Nature Nanotechnology. 11, 372-377.
- **Sancey L.**, Lux F., Kotb S., Roux S., Dufort S., Bianchi A., Crémillieux Y., Fries P., Coll J. L., Rodriguez-Lafrasse C., Janier M., Dutreix M., Barberi-Heyob M., Boschetti F., Denat F., Louis C., Porcel E., Lacombe S., Le Duc G., Deutsch E., Perfettini J. L., Detappe A., Verry C., Berbeco R., Butterworth K. T., McMahon S. J., Prise K. M., Perriat P., and Tillement O. *The use of theranostic gadolinium-based nanoprobe to improve radiotherapy efficacy*. Br. J. Radiol. 87, 20140134.

- **Sanfins** E., Dairou J., Hussain S., Busi F., Chaffotte A. F., Rodrigues-Lima, F., and Dupret, J. M. (2011) *Carbon Black Nanoparticles Impair Acetylation of Aromatic Amine Carcinogens through Inactivation of Arylamine N-Acetyltransferase Enzymes*. ACS Nano 2011, 5, 4504-4511.
- **Schleh** C., Kreyling W. G., and Lehr C.-M. (2013) *Pulmonary surfactant is indispensable in order to simulate the in vivo situation*. Part. Fibre Toxicol. 10:6.
- **Schöttler** S., Becker G., Winzen S., Steinbach T., Mohr K., Landfester K., Mailänder V., and Wurm F. (2016) *Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers*. Nat Nanotechnol. 11, 372-377.
- **Schuster** B. S., Suk J. S., Woodworth G. F., and Hanes J. (2013) *Nanoparticle diffusion in respiratory mucus from humans without lung disease*. Biomaterials. 34, 3439-3446.
- **Schrurs** F. and Lison D. (2012) *Focusing the research efforts*. Nat. Nanotechnol. 7, 546-548.
- **Shang** W., Nuffer J. H., Dordick J. S., and Siegel R. W. (2007) *Unfolding of Ribonuclease A on Silica Nanoparticle Surfaces*. Nano Lett. 7, 1991-1995.
- **Shang**, W.; Nuffer, J. H.; Muniz-Papandrea, V. A.; Colon, W., Siegel R. W., and Dordick J. S. (2009) *Cytochrome C on Silica Nanoparticles: Influence of Nanoparticle Size on Protein Structure, Stability, and Activity*. Small. 5, 470-476.
- **Shen** S.-C., Ng W. K., Chia L., Dong Y.-C., and Tan R. B. H. (2011) *Sonochemical Synthesis of (3-aminopropyl)triethoxysilane-modified Monodispersed Silica Nanoparticles for Protein Immobilization*. Mater. Res. Bull. 46, 1665-1669.
- **Shemetov** A.A., Nabiev I., and Sukhanova A. (2012) *Molecular interaction of proteins and peptides with nanoparticles*. ACS Nano. 6, 4585-4602.
- **Shi** L. and Caldwell K. D. (2000) *Mucin adsorption to hydrophobic surfaces*. J. Colloid Interface Sci. 224, 372-381.
- **Shimizu** M., Tainaka H., Oba T., Mizuo K., Umezawa M., and Takeda K. (2009) *Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse*. Part. Fibre Toxicol. 6:20.
- **Simkó** M. and Mattsson M. O. (2010) *Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: a critical review*. Part. Fibre Toxicol. 7:42.
- **Sire** O., Zentz C., Pin S., Chinsky L., Turpin P. Y., Martel P., Wong P. T. T., and Alpert B. (1997) *Long-Range Effects in Liganded Hemoglobin Investigated by Neutron and UV Raman Scattering, FTIR, and CD Spectroscopies*. J. Am. Chem. Soc. 119, 12095-12099.
- **Souza** V. G. L., and Fernando A. L. (2016) *Nanoparticles in food packaging: Biodegradability and potential migration to food—A review*. Food Packaging and Shelf Life. 8, 63-70.
- **Steadman** B. L., Thompson K. C., Middaugh C. R., Matsuno K., Vrona S., Lawson E. Q., and Lewis R. V. (1992) *The effects of surface adsorption on the thermal stability of proteins*. Biotechnol. Bioeng. 40, 8-15.
- **Stievano** L., Yu Piao L., Lopes I., Meng M., Costa D., and Lambert J.-F. (2007) *Glycine and lysine adsorption and reactivity on the surface of amorphous silica*. Eur. J. Mineral. 19, 321-331.
- **Strojan** K., Leonardi A., Bregar V. B., Krizaj I., Svete J., and Pavlin M. (2017) *Dispersion of Nanoparticles in Different Media Importantly Determines the Composition of Their Protein Corona*. PLoS one, DOI:10.1371/journal.pone.0169552.
- **Sulpizi** M., Gaigeot M.-P., and Spirik M. (2012) *The Silica-Water Interface: How the Silanols Determine the Surface Acidity and Modulate the Water Properties*. J. Chem. Theory Comput. 8, 1037-1047
- **Tenzer** S., Docter D., Kuharev J., Musyanovych A., Fetz V., Hecht R., Schlenk F., Fischer D., Kiouptsi K., Reinhardt C., Landfester K., Schild H., Maskos M., Knauer S. K., and Stauber R. H. (2013) *Rapid Formation of Plasma Protein Corona Critically Affects Nanoparticle Pathophysiology*. Nat. Nanotechnol. 8, 772-781.

- **Turci F.**, Ghibaudi E., Colonna M., Boscolo B., Fenoglio I., and Fubini B. (2010) *An Integrated Approach to the Study of the Interaction between Proteins and Nanoparticles*. *Langmuir*. 26, 8336-8346.
- **Uversky V. N.** (2011) *Intrinsically disordered proteins from A to Z*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1090-1103.
- **Vance M. E.**, Kuiken T., Vejerano E. P., McGinnis S. P., Hochella M. F. Jr., Rejeski D., and Hull M. S. (2015) *Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory*. *Beilstein J. Nanotechnol.* 21, 1769-1780.
- **Vertegel A. A.**, Siegel R. W., and Dordick J. S. (2004) *Silica Nanoparticle Size Influences the Structure and Enzymatic Activity of Adsorbed Lysozyme*. *Langmuir*. 20, 6800-6807.
- **Vroman L.**, Adams A.L., Fischer G.C., Munoz P.C. (1980) *Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces*. *Blood*. 55, 156-159.
- **Walczyk D.**, Baldelli Bombelli B., Monopoli M. P., Lynch I., and Dawson K. A. (2011) *What the Cell "Sees" in Bionanoscience*. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 5761-5768.
- **Wan S.**, Kelly P.M., Mahon E., Stöckmann H., Rudd P.M., Caruso F., Dawson K.A., Yan Y., Monopoli M.P. (2015) *The "sweet" side of the protein corona: effects of glycosylation on nanoparticle-cell interactions*. *ACS Nano*. 9, 2157-2166.
- **Wang F.**, Gao F., Lan M., Yuan H., Huang Y., and Liu J. (2009) *Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells*. *Toxicol. In Vitro*. 23, 808-815.
- **Wang H.**, Du L.J., Song Z.M., and Chen X.X. (2013) *Progress in the characterization and safety evaluation of engineered inorganic nanomaterials in food*. *Nanomedicine (Lond)*. 12, 2007-2025.
- **Wang J.**, Jensen U. B., Jensen G. V., Shipovskov S., Balakrishnan V. S., Otzen D., Pedersen J. S., Besenbacher F., and Sutherland D. S. (2011) *Soft Interactions at Nanoparticles Alter Protein Function and Conformation in a Size Dependent Manner*. *Nano Lett.* 11, 4985-4991.
- **Wang K.**, Zhou C., Hong Y, and Zhang X. (2012) *A review of protein adsorption on bioceramics*. *Interface Focus*. 2, 259-277.
- **Wei Y.**, Thyparambil A. A., Wu Y., and Latour R. A. (2014) *Adsorption-induced changes in ribonuclease A structure and enzymatic activity on solid surfaces*. *Langmuir*. 30, 14849-14858.
- **Wick P.**, Malek A., Manser P., Meili D., Maeder-Althaus X., Diener L., Diener P. A., Zisch A., Krug H.F., and von Mandach U. (2010) *Barrier capacity of human placenta for nanosized materials*. *Environ. Health Perspect.* 118, 432-436.
- **Williams H. B.** and Choppin A. R. (1950) *Adsorption studies in a synthetic rubber latex-ovalbumin system*. *J Gen Physiol*. 34, 183-92.
- **Wu X.** and Narsimhan G. (2008) *Effect of Surface Concentration on Secondary and Tertiary Conformational Changes of Lysozyme Adsorbed on Silica Nanoparticles*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1784, 1694-1701.
- **Xie J.**, Lee S., and Chen X. (2010) *Nanoparticle-based theranostic agents*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 1064-1079.
- **Yameen B.**, Choi W. I., Vilos C., Swami A., Shi J., and Farokhzada O. C. (2014) *Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting*. *J. Control Release*. 190, 485-499.
- **Ye Y.**, Liu J., Xu J., Sun L., Chen M., and Lan M. (2010) *Nano-SiO₂ induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line*. *Toxicol. In Vitro*. 24, 751-758.
- **Yoshida S.**, Hiyoshi K., Oshio S., Takano H., Takeda K., and Ichinose T. (2010) *Effects of fetal exposure to carbon nanoparticles on reproductive function in male offspring*. *Fertil. Steril.* 93, 1695-1699.
- **Yu G.** and Zhou J. (2016) *Understanding the curvature effect of silica nanoparticles on lysozyme adsorption orientation and conformation: a mesoscopic coarse-grained simulation study*. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18, 23500-23507.

- **Zhang** H., Dunphy D. R., Jiang X., Meng H., Sun B., Tarn D., Xue M., Wang X., Lin S., Ji Z., Li R., Garcia F. L., Yang J., Kirk M. L., Xia T., Zink J. I., Nel A., and Brinker J. (2012) *Processing Pathway Dependence of Amorphous Silica Nanoparticle Toxicity: Colloidal vs Pyrolytic*. J. Am. Chem. Soc. 134, 15790-15804.
- **Zhao**, Y. L., Köppen S., and Frauenheim T. (2011) *An SCC-DFTB/MD Study of the Adsorption of Zwitterionic Glycine on a Geminal Hydroxylated Silica Surface in an Explicit Water Environment*. J. Phys. Chem. C. 115, 9615-9621.
- **Zhuravlev** L. T. and Potapov V. V. (2006) *Density of Silanol Groups on the Surface of Silica Precipitated from a Hydrothermal Solution*. Russ. J. Phys. Chem. A. 80, 1119-1128.
- **Zoungrana** T., Findenegg G., and Norde W. (1997) *Structure, Stability, and Activity of Adsorbed Enzymes*. J. Colloid Interface Sci. 190, 437-448.

Chapitre 2 : Caractérisation des nanoparticules de silice et des hémoprotéines

Dans ce chapitre, les nanoparticules de silice (SiNPs) et les hémoprotéines utilisées par la suite sont caractérisées en détail. Des mesures de taille, de forme, et de charge de surface sont effectuées pour toutes ces macromolécules. Les SiNPs sont également analysées par spectroscopie infrarouge. Une revue bibliographique de la structure des hémoprotéines d'intérêt est également faite. Enfin, la détermination de coefficients d'extinction molaires des deux hémoglobines extracellulaires est effectuée.

1. Caractérisation des nanoparticules de silice

Les SiNPs utilisées dans cette thèse proviennent de 3 sources :

- **LUDOX** : colloïde de SiNPs sphériques monodisperses commerciales (LUDOX® TM-50) ;
- **MN10, MN50, et MN100** : colloïde de SiNPs sphériques monodisperses faites sur mesure en fonction de la taille demandée (Corpuscular Inc., Etats-Unis). Trois lots ont été commandés : 10 nm, 50 nm et 100 nm de diamètre. La synthèse de ces SiNPs est basée sur la méthode de Yokoi *et al.* (2006). Voir chapitre 7, § 1 pour plus de détails sur la synthèse de SiNPs ;
- **Sigma** : agrégats de nanoparticules de rayon moyen égal à 13 ± 2 nm et de surface spécifique égale à $170 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ (Mathé *et al.*, 2013).

Les caractéristiques physiques des SiNPs (taille, forme et dispersité) ont été déterminées par trois techniques complémentaires : microscopie électronique à transmission (TEM), diffusion des rayons X à petits angles (SAXS), et diffusion dynamique de la lumière (DLS).

1.1. Observation des nanoparticules de silice au microscope électronique

Afin de déterminer la taille, la forme et la dispersité des SiNPs utilisées durant cette thèse, des images de microscopie électronique à transmission (TEM pour Transmission Electron Microscopy) ont été obtenues (Fig. 2-1). À l'exception de l'échantillon (e) (Sigma, agrégats de SiNPs), les SiNPs observées montrent une forte homogénéité de tailles et de formes. Ceci indique la grande monodispersité des SiNPs utilisées. Cependant, des agrégats peuvent être observés. Il est connu que la préparation des échantillons, en particulier l'étape de séchage, peut provoquer l'agrégation des objets présents. L'agrégation, observée de façon ponctuelle ici, est donc artéfactuelle.

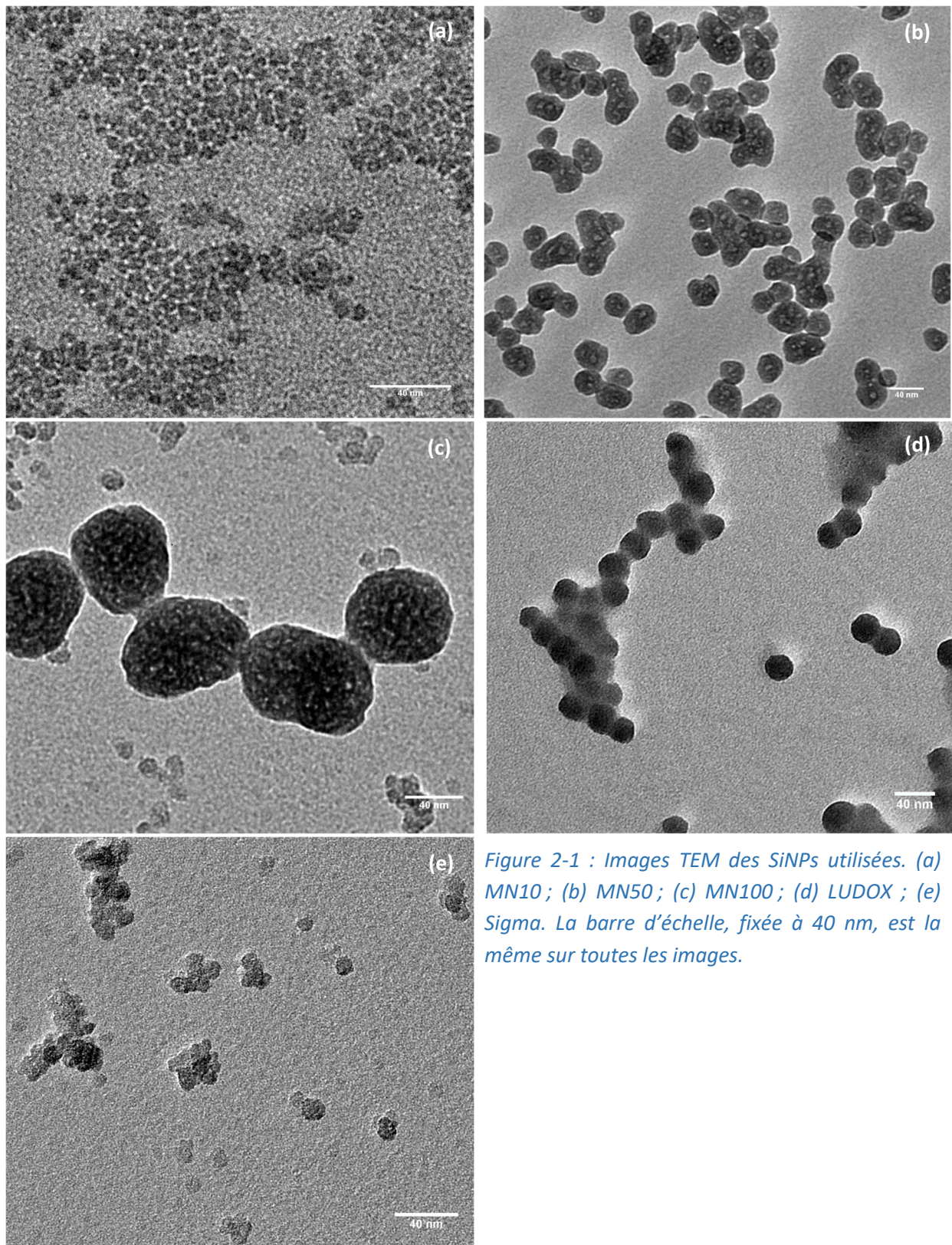


Figure 2-1 : Images TEM des SiNPs utilisées. (a) MN10 ; (b) MN50 ; (c) MN100 ; (d) LUDOX ; (e) Sigma. La barre d'échelle, fixée à 40 nm, est la même sur toutes les images.

Comme attendu, les SiNPs Sigma (e) sont polydisperses et sont des agrégats de petites sphères de 5-10 nm qui vont former des objets de 40-50 nm de diamètre. Ceci confirme les observations de Mathé *et al.* (2013) qui ont caractérisé en profondeur ces agrégats nanoparticulaires.

À partir d'un échantillonnage de nanoparticules présentes sur les images TEM, le rayon moyen a été calculé pour tous les échantillons sauf les Sigma (Tab. 2-1). On remarque que les SiNPs de Corpuscular forment bien une gamme de tailles mais que les dimensions données par le fabricant (rayons respectifs de 5, 25 et 50 nm) ne sont pas respectées. En outre, les LUDOX, qui sont indiquées comme ayant un rayon de 25 nm, possèdent en fait une taille nettement inférieure. Cette surestimation des tailles données par les fabricants tient au fait que le rayon mesuré ici est le rayon physique et que, bien souvent, les fabricants indiquent le rayon hydrodynamique plus facile à mesurer.

Tableau 2-1 : Mesure des rayons moyens des SiNPs monodisperses observées par imagerie TEM.

Nanoparticules de silice	Rayon moyen (nm)
MN10	8,3 ± 1,0
MN50	19,2 ± 3,1
MN100	33,5 ± 2,8
LUDOX	13,9 ± 0,6

En outre, on peut observer d'importantes différences morphologiques entre les LUDOX (d) d'une part et les SiNPs de Corpuscular (a, b, c) d'autre part. Si les premières sont des sphères parfaites et très uniformes du point de vue de la densité électronique, les secondes ont une forme plus ellipsoïdale et des taches blanches indiquant des défauts dans la structure amorphe de la silice. Une première explication peut venir d'une différence de porosité entre les SiNPs. Cependant, comme nous le verrons par la suite, une très faible porosité a été observée dans tous les cas.

Une autre explication peut se trouver dans la méthode de synthèse de ces nanoparticules. Les SiNPs de Corpuscular ont été synthétisées par la méthode de Yokoi *et al.* (2006) tandis que la méthode de synthèse employée pour produire les LUDOX est probablement différente mais n'a pas été rendue publique. Aussi il est raisonnable de penser que l'ajout d'acides aminés basiques pour former les noyaux de nucléation n'a eu lieu que pour les SiNPs Corpuscular. Ces acides aminés sont présents dans la matrice de la nanoparticule à la fin de la synthèse (voir § 1.5.). Dans ces conditions, le passage sous faisceau de rayons X des échantillons a pu induire une décomposition des composés organiques présents dans la matrice donc une formation de gaz (Bozack *et al.*, 1994). Ces gaz, en s'échappant de la silice, ont pu être à l'origine de la déformation apparente des SiNPs Corpuscular.

La technique TEM, bien que permettant de réellement visualiser les nanoparticules, présente donc des inconvénients. Ici, l'agrégation formée lors de la préparation des échantillons ainsi que l'impact des rayons X sur certains d'entre eux ne permet pas de caractériser les SiNPs de manière satisfaisante. C'est pour cela que des techniques complémentaires ont été utilisées par la suite.

1.2. Mesure du rayon physique des nanoparticules de silice

Afin de confirmer les observations sur la taille, la forme, et la dispersité des SiNPs obtenues par TEM, des mesures de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ont été effectuées. Les quatre échantillons de SiNPs monodisperses ont été analysés et leurs spectres de diffusion sont indiqués dans la figure 2-2.

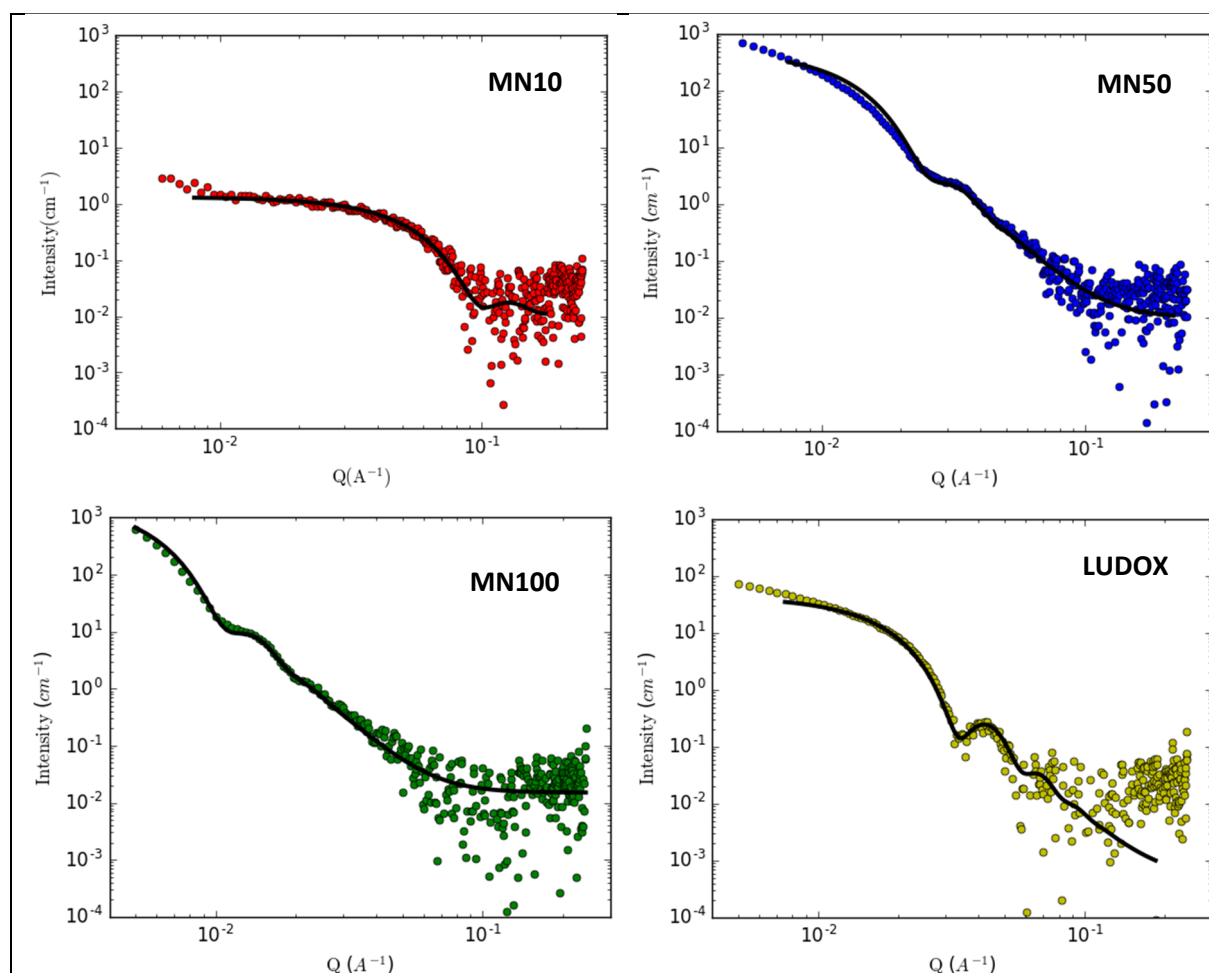


Figure 2-2 : Spectres de diffusion des rayons X aux petits angles de quatre SiNPs : ● MN10, ● MN50, ● MN100, ● LUDOX ; — modélisation des spectres expérimentaux par un modèle de sphère.

La diffusion à très petits vecteurs d'onde de diffusion q donne des informations sur la présence et le type d'agrégation des objets en solution. Pour les MN10 et les LUDOX, le régime de Guinier est atteint (intensité constante à petits q) ce qui indique clairement l'absence d'agrégation. Pour les plus grosses SiNPs (MN50 et MN100) les mesures SAXS faites ici ne permettent pas d'affirmer la présence d'un régime de Guinier. Il aurait pour cela fallu mesurer l'intensité à une gamme de q inférieure. Les mesures par DLS faites après permettront néanmoins de montrer l'absence d'agrégation (§ 1.3.).

On observe également pour chaque échantillon un facteur de forme bien défini avec plusieurs oscillations visibles. Ceci montre la présence de nanoparticules monodisperses présentant une forme

spécifique. Des spectres modèles ont donc été utilisés pour modéliser ces spectres expérimentaux. Les modèles d'ellipsoïde et de sphère ont notamment été testés (Chapitre 7, § 1.3). L'ajustement des modèles sur les spectres ne permet pas de distinguer la présence de sphères parfaites ou d'ellipsoïdes. Les quatre SiNPs monodisperses semblent donc posséder une forme sphérique ce qui ne pouvait pas être confirmé par imagerie TEM.

A partir du modèle de sphère, le rayon physique moyen R des quatre échantillons a été mesuré (Tab. 2-2). Ce rayon est comparable aux rayons mesurés par imagerie TEM mais est beaucoup plus précis. En effet, l'échantillonnage effectué lors d'une mesure SAXS est sans commune mesure avec celui fait en TEM puisque le signal de diffusion est la moyenne des signaux de toutes les particules passant au travers le faisceau de rayons X qui a un diamètre de 0,6 mm. La précision des mesures SAXS provient également du fait que l'échantillon reste dans son état natif alors que les échantillons de TEM sont séchés et parfois agrégés. C'est pour ces raisons que le rayon physique des quatre échantillons qui sera retenu par la suite est celui issu des analyses SAXS (Tab. 2-2).

Tableau 2-2 : Mesures du rayon physique R et de la courbure C des quatre échantillons de SiNPs monodisperses calculées par un modèle de sphère à partir de données de SAXS.

Nanoparticule de silice	R (nm)	C (nm ⁻¹)
MN10	4,3 ± 0,3	0,233
MN50	16,5 ± 0,2	0,061
MN100	39,0 ± 0,4	0,026
LUDOX	13,0 ± 0,2	0,077

Aussi, un autre paramètre peut être déduit du calcul du rayon physique des SiNPs ; il s'agit de la courbure d'une sphère C (Eq. 2-1). On peut remarquer que MN10 possède une courbure nettement différente des trois autres SiNPs monodisperses étudiées.

$$C = \frac{1}{R} \quad (\text{Eq. 2-1})$$

1.3. Mesure du rayon hydrodynamique des nanoparticules de silice

Comme dit précédemment, la taille des nanoparticules est généralement exprimée en rayon hydrodynamique R_H. Le R_H comprend à la fois le rayon physique R et la couche d'hydratation à la surface de la macromolécule (Chapitre 7, § 1.5.). Les mesures de taille par diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont donc été faites pour les quatre SiNPs monodisperses. Les corrélogrammes (Fig. 2-3) comme les diagrammes de distribution en taille (Fig. 2-4) montrent à nouveau la monodispersité des SiNPs utilisées.

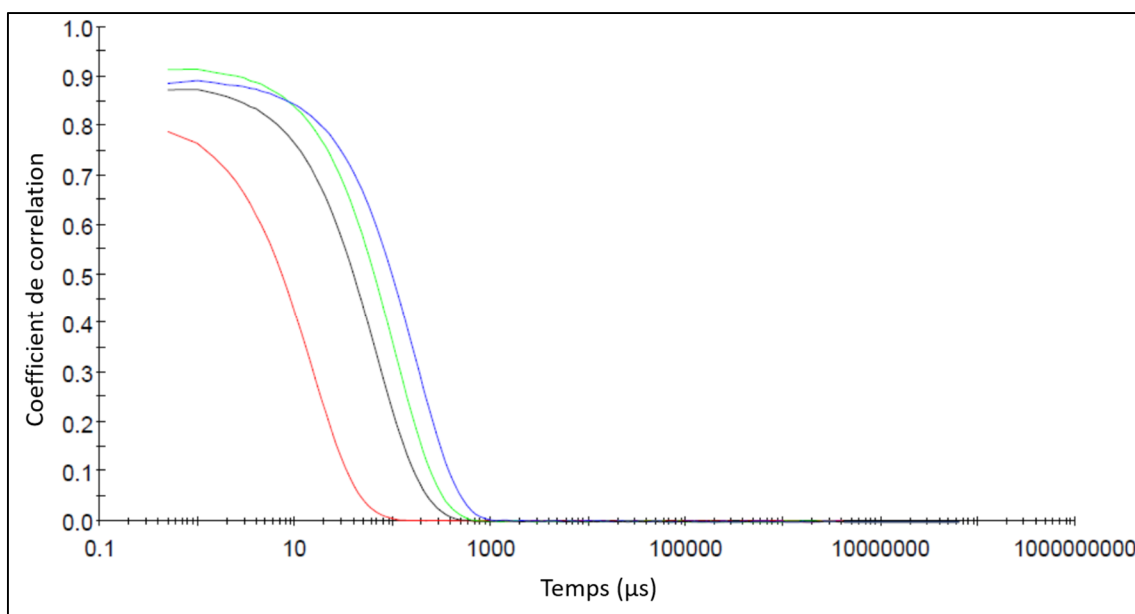


Figure 2-3 : Corrélogrammes des solutions de SiNPs (1 g.L^{-1}) en eau pure. —MN10, —MN50, —MN100, —LUDOX.

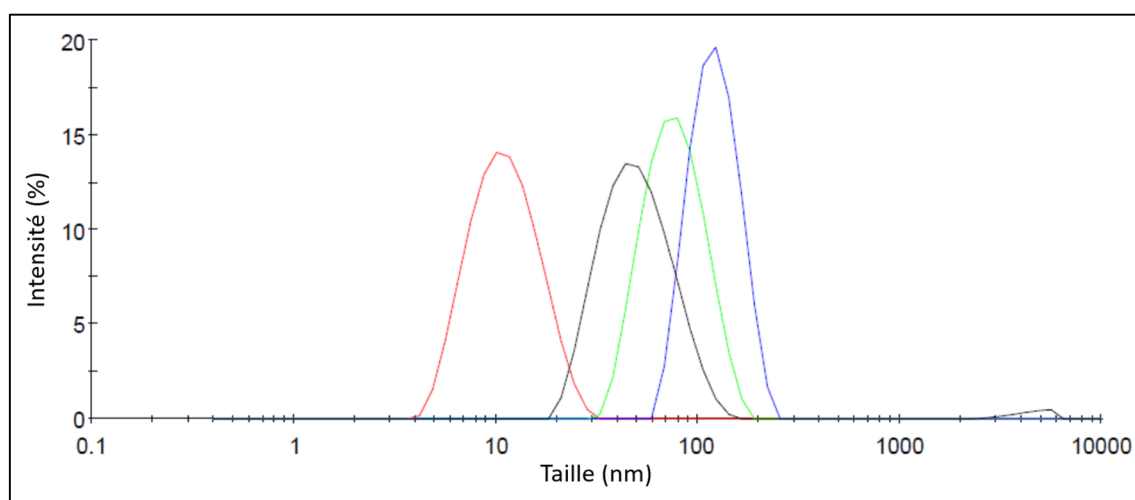


Figure 2-4 : Diagrammes de distribution en taille des solutions de SiNPs (1 g.L^{-1}) en eau pure. —MN10, —MN50, —MN100, —LUDOX.

A partir des corrélogrammes, la méthode des cumulants permet d'obtenir les valeurs de R_H pour les quatre SiNPs étudiées. Les valeurs de R et de R_H sont ainsi résumées dans le tableau 2-3.

Tableau 2-3 : Mesures des valeurs de R et R_H (à partir respectivement des mesures SAXS et DLS) des quatre SiNPs monodisperses (1 g.L^{-1}) en eau pure.

Nanoparticule de silice	R (nm)	R_H (nm)	Ratio R/R_H
MN10	$4,3 \pm 0,3$	$7,5 \pm 1,1$	0,57
MN50	$16,5 \pm 0,2$	$40,3 \pm 0,2$	0,41
MN100	$39,0 \pm 0,4$	$62,5 \pm 1,7$	0,62
LUDOX	$13,0 \pm 0,2$	$33,6 \pm 2,0$	0,39

Comme attendu, on constate que les valeurs de R_H sont nettement supérieures aux valeurs de R . L'ampleur de l'augmentation, représentée par le ratio R/R_H , est cependant plus surprenante. En effet pour les quatre SiNPs le ratio est d'environ 0,5. Cette augmentation semble exagérée puisque cela suppose que la couche d'hydratation à la surface des SiNPs soit aussi grande que la particule elle-même. Un manque de calibration du Zetasizer par des standards de tailles connues peut expliquer cette surestimation de la valeur de R_H . Il serait nécessaire de reproduire ces mesures sur un autre appareil pour confirmer ou non ces mesures.

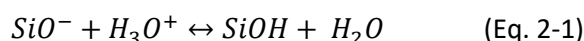
1.4. Mesure du potentiel ζ des nanoparticules

Concomitamment à l'estimation du rayon hydrodynamique R_H par DLS, le Zetasizer peut mesurer le potentiel zêta (ζ) des protéines et des nanoparticules. La technique consiste ainsi à mesurer la mobilité électrophorétique des nano-objets en solution et à en déduire le potentiel ζ à partir du modèle de Smoluchowski (voir Chapitre 7 § 1.4.). Les valeurs de potentiel ζ pour les SiNPs sont indiquées dans le tableau 2-4. Afin de mesurer l'effet du pH sur le potentiel ζ , deux solutions ont été utilisées : le tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹ à pH 6 et à pH 7.

Tableau 2-4 : Mesures du potentiel ζ des SiNPs diluées en tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹ à pH 6 et pH 7.

Nano-objet	Potentiel ζ pH 6 (mV)	Potentiel ζ pH 7 (mV)
MN10	-2,9 ± 1	-4,6 ± 0,8
MN50	-12,6 ± 1,3	-20,1 ± 1,0
MN100	-13,1 ± 1,2	-22,9 ± 0,9
LUDOX	-11,3 ± 1,1	-17,1 ± 0,4

Toutes les SiNPs étudiées ici ont une charge globale de surface négative. Cependant, à la différence de MN10 qui possède une charge proche de la neutralité, les plus grosses SiNPs possèdent un potentiel ζ fortement négatif. Ainsi MN50, MN100 et LUDOX ont un potentiel ζ d'environ -20 mV à pH 7 et -12 mV à pH 6. Cette diminution du potentiel ζ s'explique par le fait que la charge de surface des SiNPs est essentiellement due aux groupements silanol déprotonables (Eq. 2-1). Selon leur orientation à la surface de la silice, ces groupements silanol possèdent un pKa compris entre 4,5 et 8,5 (Sulpizi *et al.*, 2012). En diminuant le pH, les groupements silanol sont donc davantage sous forme protonée, non chargée, et le potentiel ζ se rapproche de la neutralité.



MN10 possède cependant un potentiel ζ proche de la neutralité. Deux raisons peuvent être avancées pour expliquer cela. Tout d'abord des observations similaires ont déjà été faites avec des SiNPs de tailles différentes (Patwardhan *et al.*, 2012). À nouveau, la charge de surface de la plus petite SiNP

étudiée (15 nm de diamètre) est moins négative que celle des plus grosses SiNPs (jusqu'à 450 nm). L'explication vient du nombre de groupes silanol déprotonés à la surface qui passe de 5% à 20% respectivement ce qui conduit à une acidité plus forte pour les grosses SiNPs. Une deuxième explication peut également être trouvée. Les SiNPs MN10 sont en fait les germes utilisés pour fabriquer par recroissance de plus grosses SiNPs (voir chapitre 7 § 1.1.). Ces germes sont produits en mélangeant au TEOS un acide aminé basique tel que l'arginine. Or, cette arginine, qui sert de catalyseur, peut se retrouver incorporée au germe, y compris à sa surface. Une incorporation, même en faible quantité, peut avoir un fort impact sur la charge globale de surface. En effet, les groupements silanol acides (ceux qui apportent la charge négative de surface aux pH d'intérêt) ne représentent pas plus de 20% des silanol totaux (Rimola *et al.*, 2013). Ainsi, une petite quantité d'arginine (positivement chargée aux pH d'intérêt) peut suffire à "neutraliser" la charge globale de surface. La présence d'arginine au sein de MN10 est discutée dans le paragraphe suivant.

1.5. Caractérisation des nanoparticules de silice par spectroscopie infrarouge

Afin de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse de la présence d'arginine à la surface des SiNPs MN10 des analyses de spectroscopie infrarouge ont été faites. La mesure des spectres de MN10, MN50 et MN100 a été effectuée sur les produits de dessiccation des solutions ainsi sur les nanopoudres Sigma pour comparaison. Les spectres sont représentés sur la figure 2-5. Comme indiqué plus en détail dans Rimola *et al.* (2013), la silice présente un spectre IR particulier avec plusieurs régions vibrationnelles caractéristiques dont voici les principales :

- 800 cm^{-1} : déformation de Si-O-Si
- 1000-1200 cm^{-1} : élongation de Si-O
- 2750-3800 cm^{-1} : élongation des groupes OH à la surface des SiNPs

Les deux premières régions vibrationnelles donnent des indications sur la structure au cœur de la silice tandis que la troisième région dépend fortement de l'hydratation à la surface des SiNPs et est donc plus délicate à étudier.

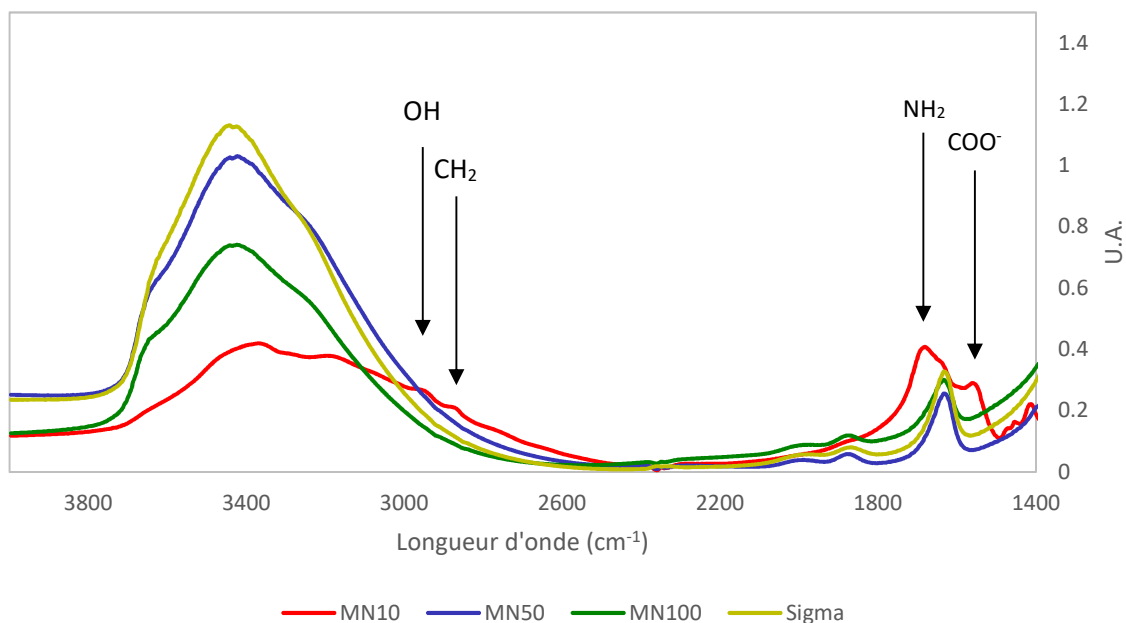


Figure 2-5 : Spectres d'absorption IR de poudres de SiNPs préparées dans les mêmes conditions. Les flèches correspondent aux vibrations provenant de l'arginine ou de groupements en interaction avec l'arginine.

En comparant les spectres IR des différentes SiNPs on constate que MN50, MN100 et Sigma ont un profil très proche par opposition à MN10 qui a un spectre distinct dans deux régions : celle entre 2750 et 3000 cm^{-1} et une région comprise entre 1400 et 1800 cm^{-1} . Dans ces deux régions, quatre pics présents uniquement chez MN10 apparaissent clairement (Fig. 2-5). Ces pics peuvent être attribués à la présence d'arginine :

- 1560 cm^{-1} : élongation asymétrique de CO dans COO^- (Herrklotz, 2012)
- 1682 cm^{-1} : élongation de NH dans NH_2 (Kumar et Rai, 2010 ; Herrklotz, 2012)
- 2872 cm^{-1} : élongation asymétrique de CH dans CH_2 (Herrklotz, 2012)
- 2959 cm^{-1} : ce dernier pic n'est pas directement attribuable mais peut être dû à la vibration des groupes OH des silanol en présence d'arginine.

La présence d'arginine dans MN10 peut donc être établie par spectroscopie IR. Il n'est cependant pas possible d'affirmer si ces molécules se trouvent à la surface des SiNPs ou non. En effet, les techniques spectroscopiques classiques telles que la spectroscopie IR ou XPS sont sensibles jusqu'à 5 nm de profondeur de l'objet étudié. Cela signifie que, dans le cas de MN10, l'intégralité des composés présents dans les SiNPs sont détectés. Néanmoins, au regard des données de potentiels ζ montrées précédemment, il semble probable qu'une partie des molécules d'arginine présentes se trouvent à la surface des SiNPs de MN10.

2. Structure des hémoprotéines

Parallèlement aux SiNPs, les hémoprotéines utilisées par la suite ont été caractérisées en détail. Une revue bibliographique de la structure de ces protéines a été faite, suivie de mesures expérimentales de taille, de potentiel ζ , et de spectrophotométrie UV-visible.

2.1. Généralités

Les hémoprotéines étudiées ici sont des pigments respiratoires dont la fonction principale est de fixer de façon réversible le dioxygène dissout afin de le distribuer au moment et au lieu désiré. Toutes les hémoglobines/myoglobines, qu'elles appartiennent aux êtres unicellulaires, aux végétaux ou aux animaux sont construites selon un même schéma. Il se résume à une chaîne polypeptidique, appelée globine, d'environ 140-150 acides aminés, dérivée d'une structure formée par 6 à 8 hélices α reliées par de courtes boucles (Bolognesi *et al.*, 1989 ; Lesk et Chotia, 1980). Ces hélices sont repliées en globule autour d'un groupe prosthétique, l'hème, qu'elles lient avec une affinité élevée dans une cavité : la poche de l'hème. L'hème est le site actif de toutes les hémoglobines. C'est d'ailleurs la présence d'un hème qui distingue la famille des hémoglobines des autres familles de pigments respiratoires (chlorocruorine, hémérythrine et hémocyanine).

Nous nous intéressons ici à quatre hémoprotéines issues d'organismes différents :

- Mb : Myoglobine de cœur de cheval
- Hb : Hémoglobine de porc
- HbC1 : Hémoglobine de coelome de *Riftia pachyptila*
- HbAm : Hémoglobine d'*Arenicola marina*

Du point de vue de la nomenclature, une hémoglobine est une protéine circulante, intra- ou extracellulaire, capable de lier réversiblement l'oxygène et donc de faciliter son transport. Hb est une hémoglobine intracellulaire tandis que HbC1 et HbAm sont des hémoglobines extracellulaires. Mb est une protéine très proche structurellement et est également capable de lier réversiblement l'oxygène. Cette molécule se trouve dans les muscles et a un rôle de stockage. Ce n'est donc pas une hémoglobine au sens fonctionnel du terme bien que faisant partie de la famille des hémoglobines de par sa possession d'un hème. C'est pour cela que ces quatre protéines sont regroupées sous le terme d'hémoprotéines.

2.2. L'hème

L'hème (MM = 616,5 Da) est le site actif de toutes les hémoprotéines. Ce groupe prosthétique est composé d'un atome de fer au centre d'un noyau tétrapyrrole : la protoporphyrine IX (Fig. 2-6).

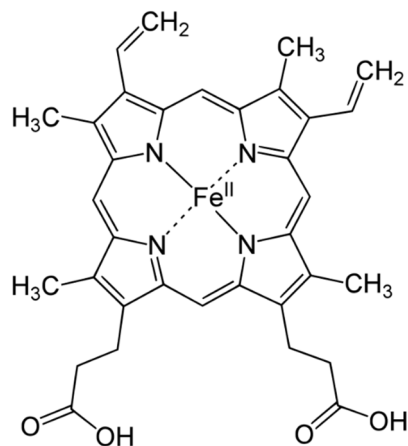


Figure 2-6 : Structure de l'hème (Kendrew et al., 1958) : complexe entre une protoporphyrine IX et un atome de fer.

Le fer est lié à la protoporphyrine IX par les quatre atomes d'azote des noyaux pyrrole. L'hème est lui-même relié à la globine par une liaison de coordination entre l'atome de fer et une histidine, appelée histidine proximale ou histidine F8. La sixième liaison de coordination, labile, se forme entre le fer et le dioxygène pour assurer son transport dans l'organisme. Dans l'hémoglobine oxygénée, le fer est ferrique (Fe^{3+}) tandis que sous la forme désoxygénée, la sixième liaison de coordination disparaît et l'ion fer devient ferreux (Fe^{2+}). Sous l'action d'oxydants, l'hème peut être irréversiblement oxydé (methémoglobine ou methmyoglobine) et la sixième liaison de coordination s'établit avec une molécule d'eau, HO^- , N_3^- , CN^- , ... suivant l'oxydant (Tab. 2-5).

Tableau 2-5 : Ligands du fer de l'hème dans l'hémoglobine.

	Abréviation	Forme du fer	6 ^{ème} ligand
Désoxyhémoglobine	desoxyHb	Fe^{2+}	
Oxyhémoglobine	HbO ₂	Fe^{3+}	O ₂
Carboxyhémoglobine	HbCO	Fe^{2+}	CO
Methémoglobine	Hb ⁺	Fe^{3+}	H ₂ O, HO ⁻ , N ₃ ⁻ , CN ⁻ , ...

2.3. Spectroscopie UV-visible des hémoprotéines

Comme la plupart des cycles aromatiques conjugués, les porphyrines sont très colorées. L'hème (porphyrine + fer) est ainsi responsable de la couleur rouge des hémoprotéines. Cette coloration est extrêmement dépendante du nombre de coordination du fer ainsi que de la nature du ligand. Les spectres d'absorption visible de desoxyHb, HbO₂, HbCO, et Hb⁺H₂O sont représentés dans la figure 2-

7. On remarque que chaque forme présente un spectre d'absorption caractéristique. Des caractérisations des échantillons d'hémoprotéines seront faits par la suite par spectrophotométrie UV-visible et seront comparés aux spectres HbO_2 et $\text{Hb}^+\text{H}_2\text{O}$.

La nomenclature et les caractéristiques spectrales présentées pour l'hémoglobine seront reprises pour l'ensemble des hémoprotéines.

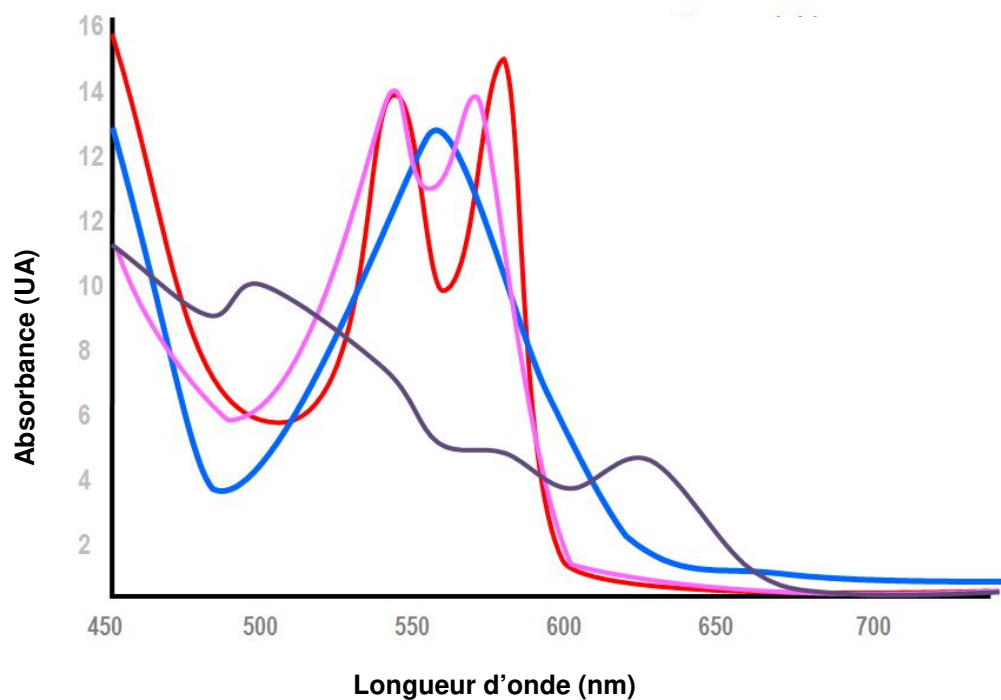


Figure 2-7 : Spectres d'absorption dans le domaine visible de **desoxyHb**, **HbO₂**, **HbCO**, **Hb⁺H₂O**. Graphique tiré de Kampen et Zijlstra (1965).

2.4. Myoglobine

La myoglobine est une protéine monomérique de 153 acides aminés et de poids moléculaire d'environ 17 000 Da. On la trouve principalement dans les tissus musculaires où elle sert de site intracellulaire de stockage de l'O₂. La myoglobine de cachalot est la première protéine globulaire dont la structure tertiaire a été déterminée par cristallographie aux rayons X (Kendrew *et al.*, 1958). Bien que la résolution de la structure cristalline ne soit pas très bonne ($\approx 6 \text{ \AA}$), elle a permis de mettre en évidence l'existence de huit hélices α A, B, ...H, entourant le groupement hémique. La structure 3D de la myoglobine de cachalot, dans son état oxygéné est maintenant connue avec une résolution de 1.6 \AA (Philips, 1980). Pour des raisons pratiques, la myoglobine utilisée ici a été celle du cœur de cheval. La structure de cette protéine a été déterminée par Evans et Brayer (1990) et est disponible sur la Protein Data Bank (PDB) sous le code 1YMB (Voir Fig. 2-13 pour une comparaison des quatre hémoprotéines étudiées ici). La myoglobine utilisée est sous forme de metmyoglobine.

2.5. Hémoglobine

Chez tous les vertébrés à l'exception des poissons agnathes, l'hémoglobine est sous une forme de tétramère hétéromérique. Elle est présente dans les globules rouges à une concentration élevée, variable selon les espèces (330 g.L⁻¹ chez l'humain, Moll, 1966). La structure de l'hémoglobine a été déterminée pour la première fois, pour l'hémoglobine de cheval, par l'équipe de Perutz (Perutz *et al.*, 1960).

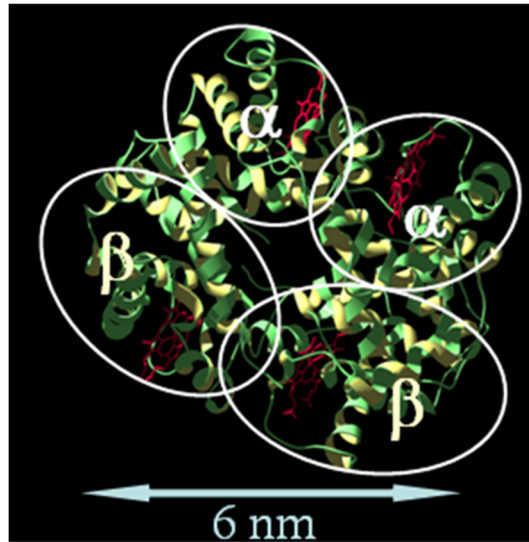






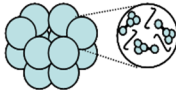

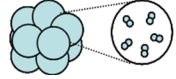

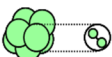

Figure 2-8 : Représentation des quatre sous-unités du tétramère formant l'hémoglobine de porc (Rousselot, 2006).

L'hémoglobine de porc (Hb), utilisée ici, est une protéine hétéro-tétramérique de poids moléculaire de 64 500 Da. Sa structure tridimensionnelle a été caractérisée par Lu *et al.* (2000) et publiée dans la PDB sous le code 1QPW (Fig. 2-13). Ses quatre chaînes polypeptidiques se répartissent en deux chaînes α de 141 acides aminés et deux chaînes β de 146 acides aminés (Fig. 2-8). Le maintien de la structure du tétramère est assuré par des interactions non covalentes où les interactions $\alpha\beta$ sont beaucoup plus nombreuses et stables que les interactions non-covalentes inter- α ou inter- β . On peut considérer que le tétramère se comporte comme l'association de deux dimères $\alpha\beta$.

2.6. Hémoglobines extracellulaires

Par comparaison aux myoglobines monomériques (≈ 17 kDa) et aux hémoglobines tétramériques (≈ 65 kDa) des vertébrés, les hémoglobines d'invertébrés ont des structures primaires et quaternaires beaucoup plus variées. Bien que les invertébrés soient phylogénétiquement plus basaux que les vertébrés, la haute variabilité de leurs hémoglobines reflète une spécialisation et une adaptation à des conditions plus variées (Weber et Vinogradov, 1978). Cependant, à ce jour, moins d'informations sont disponibles quant aux relations entre leurs fonctions physiologiques et leurs structures moléculaires.

Les différents types de structures quaternaires identifiés à ce jour chez les invertébrés sont indiqués sur la figure 2-9.

Intracellular Hbs		Mw (kD)
Monomeric		Mb, nerve & coelomic Hb, <i>Chironomus</i> ^a 17
Dimeric		Bivalve RCs, <i>Chironomus</i> ^a 34
Tetrameric		Bivalve RCs, Insect tracheal cells Vertebrate RCs 68
Polymeric		Glycera dibranchiata
Multi-subunit Hbs		
Hexagonal bilayer 12 dodecamers		Annelida, Vestimentifera 3 trimers, 3 monomers, 3 linkers (144 heme-chains, 36 linkers) <i>Lumbricus, Arenicola, Riftia</i> 3600
2 dodecamers		Vestimentifera, Pogonophora ~400
Pentagonal bilayer 10 dodecamers		Pulmonate Molluscs 5 dimers 1700 <i>Helisoma, Planorbis, Biomphalaria</i>
Multi-domain, Multi-subunit Hbs		
2 or 3 subassemblies		Polychaeta 4-domain subunits <i>Branchipolynoe</i> 115 or 174
Quadrangular bilayer		Nematoda 8 (2-domain) subunits <i>Ascaris, Parascaris</i> 328
Penta- / Octagonal bilayers	2 (9-domain) subunits 10 (2-domain) " 16 (2-domain) " 24 (2-domain) "	Branchiopod crustaceans <i>Artemia</i> (Anostracan) <i>Cyzicus</i> (Conchostracan) <i>Daphnia</i> (Cladoceran) <i>Lepidurus</i> (Notostracan) 250 300 490 800
« Rods » 14-24 domains		Bivalve molluscs <i>Astarte</i> <i>Cardita</i> 800 – 12 000

^aExtracellulaire dans la larve de *Chironomus*

Figure 2-9 : Liste des différentes structures tertiaires et quaternaires rencontrées pour les hémoglobines d'invertébrés d'après Weber and Vinogradov (2001).

En plus d'une large gamme de poids moléculaire, les hémoglobines d'invertébrés ont des propriétés fonctionnelles de fixation de l'O₂ très variées. Leur affinité pour l'O₂ qui peut être dépendante ou indépendante du pH (due à la présence ou absence respectivement d'effet Bohr) couvre environ 5 ordre de grandeurs, et le coefficient de coopérativité peut varier d'un facteur 10 (Rousselot, 2006).

Les deux dernières hémoprotéines qui nous intéressent sont des hémoglobines d'annélides. HbC1 est l'hémoglobine cœlomique de *Riftia pachyptila* et HbAm est l'hémoglobine d'*Arenicola marina*. Les annélides forment un des trois principaux phyla d'invertébrés protostomes avec les mollusques et les arthropodes. Le phylum comprend environ 8000 espèces, réparties dans six classes : les polychètes,

achètes, oligochètes, pogonophores, vestimentifères et echiuriens (Fig. 2-10). Sous cette appellation sont regroupés des animaux vermiformes (en forme de vers) qui sont connus depuis le Cambrien ; ce sont donc les plus anciens animaux pluricellulaires sur terre. Un des représentants les plus connus des annélides est le ver de terre ou *Lumbricus terrestris* qui, comme la grande majorité des autres oligochètes, est un animal terrestre. En ce qui concerne les espèces marines, elles vivent aussi bien dans le sable des zones côtières (*Arenicola marina*) qu'au fond de l'océan (*Riftia pachyptila*).

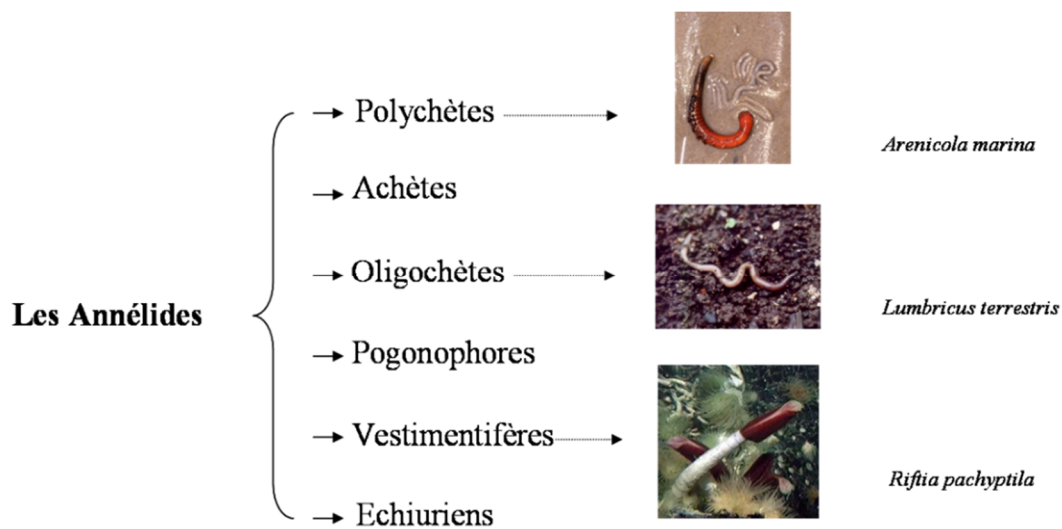


Figure 2-10 : Classification simplifiée des annélides (Rousselot, 2006)

2.7. Hémoglobine de *Riftia pachyptila*

La structure de HbC1 a récemment été résolue par cristallographie (Flores *et al.*, 2005) et est présente dans la PDB : 1YHU (Fig. 2-13). Elle est constituée d'un assemblage de 24 chaînes polypeptidiques de type globine reliées entre elles par des liaisons non covalentes. Flores *et al.* (2005) ont en effet démontré que l'intégrité de la structure quaternaire de HbC1 n'était pas due à des ponts disulfures entre résidus cystéine (hypothèse préalablement émise par Zal *et al.*, 1998) mais plutôt à la présence de 12 cations divalents Zn^{2+} répartis aux deux pôles de l'axe de symétrie d'ordre 3.

Les 24 globines sont associées au sein de deux dodécamères. Ces deux dodécamères s'assemblent ensuite pour former une sphère creuse dont les rayons externes et internes sont respectivement de 6,5 et 2,5 nm (Flores *et al.*, 2005). Le poids moléculaire a été déterminé à 406 kDa (Zal *et al.*, 1996).

2.8. Hémoglobine d'*Arenicola marina*

La plus grosse des hémoprotéines étudiées ici, HbAm, possède une structure caractéristique de type hexagonal en double couche ("hexagonal bilayer hemoglobin", Zal *et al.*, 1997). Cette structure n'a été retrouvée que chez les annélides (Rousselot, 2006). De nombreuses études ont été réalisées

par microscopie électronique à coloration négative (Vinogradov *et al.*, 1982 ; Zal *et al.*, 1996) et ont permis de mettre en évidence que ce type de protéine était formé par l'association de deux hexagones superposés, avec une cavité centrale (Fig. 2-11). Chaque hexagone est constitué de six unités globulaires, les protomères.

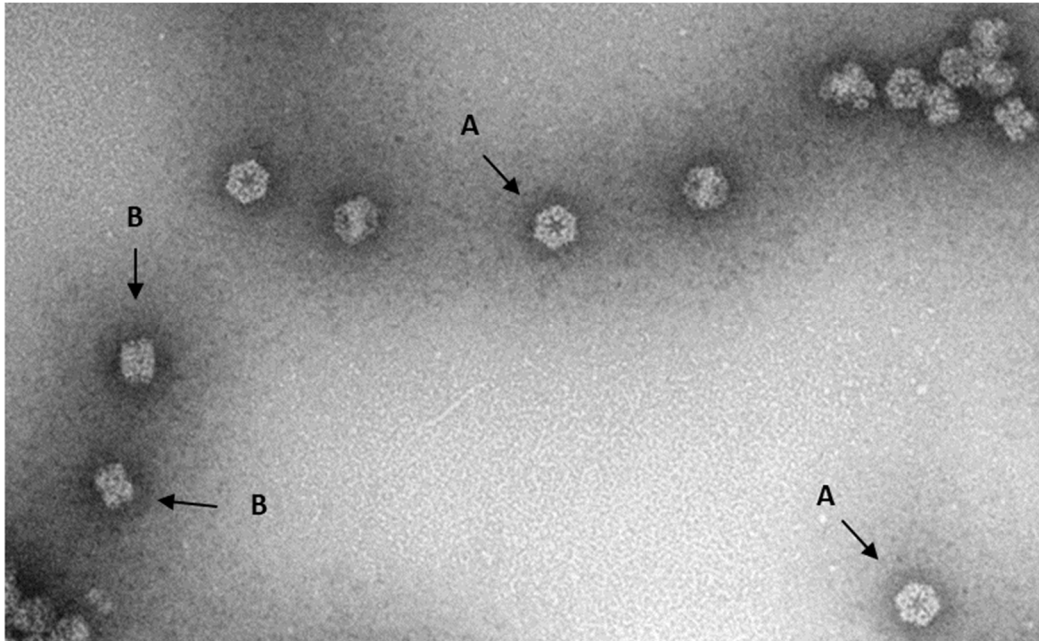


Figure 2-11 : Micrographie électronique de HbAm. A : Vue de face, on observe la forme hexagonale de HbAm. B : Vue de profil, on observe l'association en bicouche des deux hexagones (Rousselot, 2006).

Le poids moléculaire de HbAm a été obtenu par MALLS (multi-angle laser-light scattering) et est de 3648 ± 24 kDa (Zal *et al.*, 1997). La spectrométrie de masse à ionisation par électronébuliseur (ESI-MS) indique qu'elle est constituée de 156 globines et de 42 chaînes polypeptidiques de liaison ("linkers") ne possédant pas d'hème. Ces 198 chaînes sont réparties de façon homogène au sein des protomères (douzième de HbAm) de formule $[(a_1)_3(a_2)_6T]_{L_{3,5}}$ (Rousselot *et al.*, 2006), avec a_1 , a_2 et T des globines (cette dernière étant en fait un trimère de globines reliées entre elles par des ponts disulfures) et L, des linkers. Ce modèle de protomères globulaires reliés entre eux par des linkers s'appelle le modèle en "bracelet". Il a été développé par Vinogradov *et al.* (1982) puis affiné par Zal *et al.* (1996). Il permet d'assigner les chaînes peptidiques déterminées par spectrométrie de masse à la structure quaternaire obtenue par microscopie électronique.

Ce modèle a cependant été remis en cause par Jouan *et al.* (2001). En effet, pour assigner les 156 globines, le modèle en bracelet suppose que 12 globines soient présentes au centre de la bicouche (12X12 globines dans les protomères plus 12 globines au centre). Or les images de microscopie électronique montrent clairement que la densité électronique est très faible au centre du motif, ce qui interdit la présence de chaînes peptidiques de la taille des globines ($\approx 15-18$ kDa). Cependant, si le modèle en bracelet est mis en doute, Jouan *et al.* (2001) ne proposent pas de modèle alternatif mais

obtiennent par reconstruction 3D un nombre total de 144 globines et de 36 linkers (soit 3 linkers par protomère). Ce nombre de chaînes peptidiques a été confirmé par Royer *et al.* (2007) et c'est le nombre que nous garderons.

Il a été montré par microscopie électronique qu'il existe deux types de structures pour les hémoglobines d'annélides (Jouan *et al.*, 2001). Les hémoglobines de type I (chez *Lumbricus terrestris*, *Macrodella decora*, *Sabella spallanzanii*, *Riftia pachyptila*), les plus courantes, possèdent une couche hexagonale supérieure dont les arrêtes sont en rotation de 16° par rapport à celles de la couche hexagonale inférieure. Les hémoglobines de type II (*Alvinella pompejana*, *Arenicola marina*) possèdent par contre deux couches hexagonales parfaitement superposables. La première résolution de la structure de HbAm qui est également la première résolution d'hémoglobines de type II a été effectuée par Royer *et al.* (2007). Avec une faible résolution de 6 Å, ceci a permis néanmoins de confirmer l'existence de différences structurales majeures entre les deux types d'hémoglobines et d'en affiner les modèles (Fig. 2-12). La différence d'agencement des différents protomères entre les hémoglobines de type I et de type II est en effet due à l'interaction entre les trois linkers de chaque protomère. Pour les hémoglobines de type I, les linkers interagissent entre eux en début et en fin de séquence pour former deux surenroulements en forme de superhélices à triple brin. Pour les hémoglobines de type II, une seule superhélice à triple brin présente en continu sur toute la longueur des linkers est formée (Royer *et al.*, 2007).

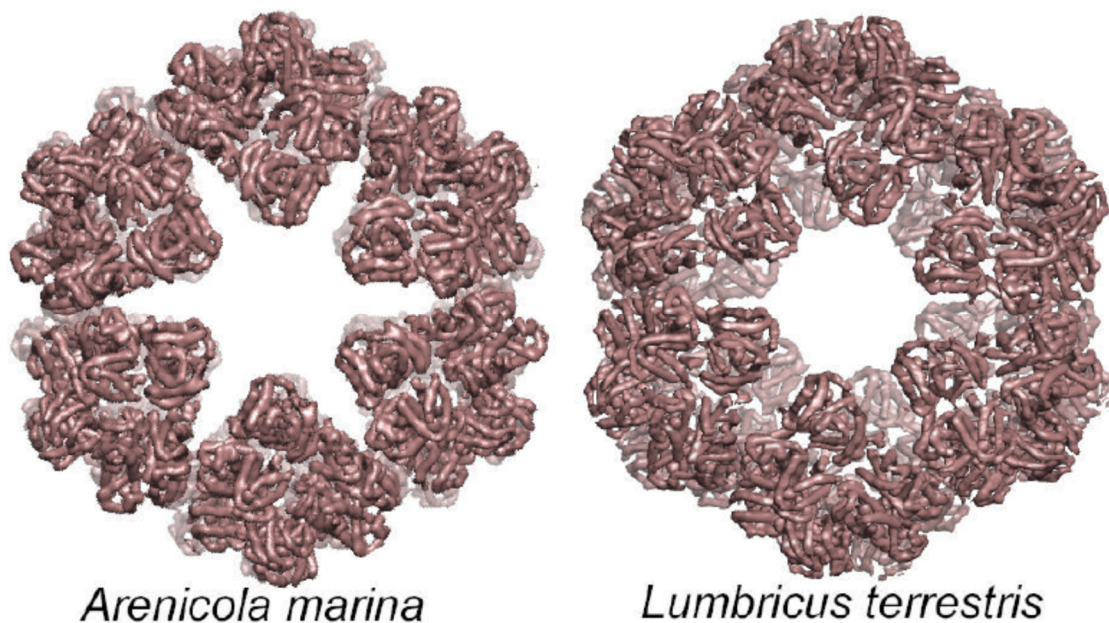


Figure 2-12 : Vue depuis l'axe C_6 de la double couche hexagonale des hémoglobines d'*Arenicola marina* et de *Riftia pachyptila*. On remarque le recouvrement parfait des deux couches de la première et le décalage de l'une par rapport à l'autre pour la deuxième hémoglobine. Tiré de Royer *et al.* (2007).

En dépit de cette différence d'organisation des linkers, les hémoglobines de types I et II sont très semblables. Elles ne peuvent d'ailleurs pas être distinguées par microscopie électronique à coloration négative. Il a fallu attendre que la cryomicroscopie électronique et la cristallographie aux rayons X soient disponibles pour observer de telles différences (Jouan *et al.*, 2003).

La structure de HbAm résolue par l'équipe de Royer n'est pas présente dans la PDB. Aussi, afin d'avoir une représentation fidèle, la structure de HbAm représentée sur la figure 2-13 est tirée de celle de *Lumbricus terrestris* (2GTL, Royer *et al.*, 2006) modifiée pour tenir compte des différences structurales.

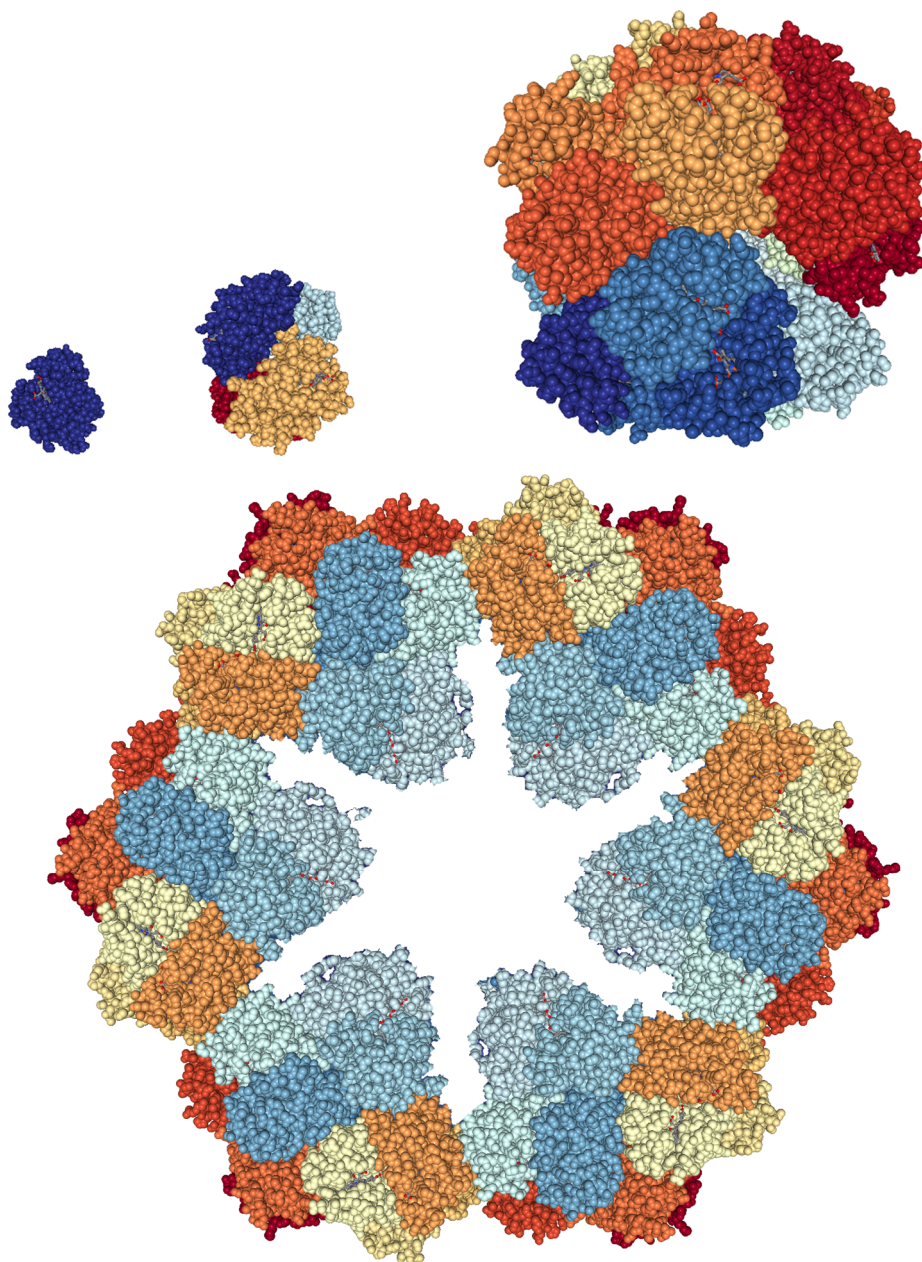


Figure 2-13 : Représentations à l'échelle des structures 3D des quatre hémoprotéines étudiées : De la plus petite à la plus grosse : Mb (1YMB), Hb (1QPW), HbC1 (1YHU), HbAm (modifiée à partir de 2GTL).

2.9. L'effet stabilisateur des cations divalents

Il a été indiqué précédemment que la structure de HbC1 était stabilisée par 12 ions Zn^{2+} . De façon similaire, la stabilité de la structure de HbAm est fortement dépendante de la présence de cations divalents (notamment Mg^{2+} et Ca^{2+} , Rousselot *et al.*, 2006). En effet, les concentrations en cations divalents est relativement élevée dans le sang des annélides avec une concentration en Ca^{2+} comprise entre 7 et 13 $mmol.L^{-1}$ et une concentration en Mg^{2+} comprise entre 2 à 44 $mmol.L^{-1}$ (Ochiai et Weber, 2002). Une étude détaillée de la dissociation et la réassociation de l'hémoglobine de *Lumbricus terrestris* (Sharma *et al.*, 1996) a d'ailleurs montré que, pour maintenir sa structure native, la concentration optimale en cation divalent est d'environ 10 $mmol.L^{-1}$. Ainsi, afin de conserver leur structure quaternaire, les solutions contenant HbC1 et HbAm sont systématiquement diluées et étudiées dans du tampon contenant 10 $mmol.L^{-1}$ de Mg^{2+} .

3. Mesure de la taille des protéines

La structure tertiaire et quaternaire des différentes hémoprotéines utilisées ici est maintenant bien établie. Toutefois, pour les hémoglobines extracellulaires notamment, il existe encore des débats sur la structure ainsi que des inconnus concernant le pH isoélectrique $pH(I)$. Une analyse physico-chimique des hémoprotéines a donc été entreprise. Des mesures de taille et de charge de surface sont présentées ici. En outre, les spectres d'adsorption UV-visible sont analysés afin de qualifier et de quantifier les protéines présentes en solution.

3.1. Rayon minimum

La taille des protéines est généralement exprimée en poids moléculaire (dalton, Da). Bien que très utilisé en biologie, il n'apporte cependant qu'une information relative de la taille. Afin de pouvoir comparer la taille des protéines à celle des nanoparticules, il convient de posséder une référence commune. Les nanoparticules sont généralement des objets géométriques (sphère, cylindre, parallélépipède...) avec des dimensions caractéristiques. Les protéines quant à elles sont des objets avec des formes complexes et dont la structure peut être dynamique. Il n'existe donc pas de dimension caractéristique parfaitement comparable avec les dimensions des nanoparticules.

Néanmoins la taille d'une protéine peut être approchée en la considérant comme une sphère possédant un rayon moyen. La première approche pour obtenir un rayon moyen est l'approche mathématique. Une protéine est en effet la somme de ses acides aminés qui peuvent se compacter de façon plus ou moins optimale. Si le niveau de compacité est maximal il n'y a alors plus d'espace libre à

l'intérieur d'une sphère théorique qui circonscrit la protéine. Le rayon minimum de la protéine est ainsi le rayon de la plus petite sphère qui peut contenir toute la masse de la protéine. L'équation 2-2 établit la relation qui existe entre le rayon minimum R_{min} en nanomètre et le poids moléculaire PM en Dalton (Erickson, 2009). Les valeurs de R_{min} pour les quatre hémoprotéines d'intérêt sont reportées dans le tableau 2-6.

$$R_{min} = \left(\frac{3V}{4\pi}\right)^{1/3} = 0,066PM^{1/3} \quad (\text{Eq. 2-2})$$

Tableau 2-6 : R_{min} des quatre hémoprotéines d'intérêt calculés à partir de leur poids moléculaire.

Protéine	Abréviation	Poids moléculaire (kDa)	R_{min} (nm)
Myoglobine de cœur de cheval	Mb	17	1,7
Hémoglobine de sang de porc	Hb	64,5	2,6
Hémoglobine de cœlome de <i>Riftia pachyptila</i>	HbC1	400	4,9
Hémoglobine de sang d' <i>Arenicola marina</i>	HbAm	3600	10,1

Sur la figure 2-14 est tracée l'équation 2-2 et les quatre hémoprotéines d'intérêt y sont placées. On se rend compte que poids moléculaire et rayon minimum d'une protéine n'évoluent pas de façon proportionnelle. En effet, entre la plus petite et la plus grosse hémoglobine le poids moléculaire varie d'un facteur 200 tandis que le rayon minimum ne varie que d'un facteur 6. Les protéines de haut poids moléculaire auront donc un rayon minimum relativement proche entre elles.

Ce rayon minimum est théorique et sous-estime la taille réelle des protéines, mêmes les plus compactes. Il s'agit néanmoins d'une façon pratique d'approcher la taille des protéines à partir de leur poids moléculaire.

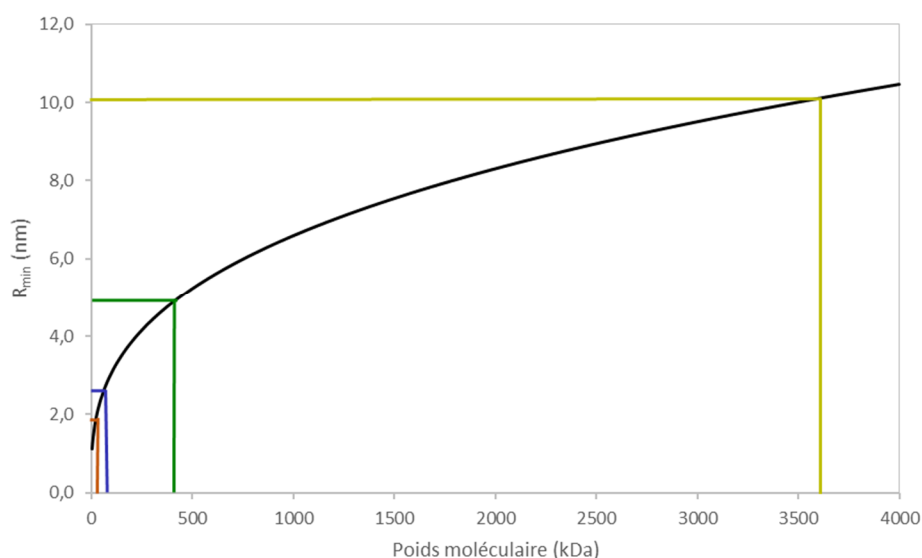


Figure 2-14 : Evolution de du rayon minimal (R_{min}) d'une protéine en fonction de son poids moléculaire. Exemples des quatre hémoprotéines étudiés dans cette thèse : — Mb, — Hb, — HbC1, — HbAm.

3.2. Rayons expérimentaux

Outre le rayon minimum théorique, deux rayons expérimentaux sont couramment utilisés pour définir la taille d'une protéine :

- Le **rayon de giration R_g** est le rayon de la sphère (creuse) qui aurait le même moment d'inertie que la protéine. Il est défini par l'équation 2-3 avec m_i la masse de l'atome i et r_i la distance de i par rapport au centre de masse de la protéine (Lairez et Pelta, 2005). Bien que de nature différente, R_{min} et R_g sont souvent proches et sous-estiment tous deux la taille réelle de la protéine.

$$R_g^2 = \frac{\sum m_i r_i^2}{\sum m_i} \quad (\text{Eq. 2-3})$$

- Le **rayon hydrodynamique R_H** est le rayon d'une sphère (pleine) possédant le même coefficient de diffusion, D , que la protéine. Il se calcule d'après la relation de Stokes Einstein (Eq. 2-4) avec k la constante de Boltzmann, T la température, et η la viscosité du milieu. R_H prend en compte à la fois la couche de solvant en interaction (hydro) et la forme de la protéine (dynamique) (Des Cloizeaux et Jannink, 1990). Cette mesure surestime donc la taille réelle de la protéine.

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (\text{Eq. 2-4})$$

De nombreuses techniques peuvent mesurer expérimentalement le rayon des protéines. Le rayon R_H s'obtient notamment par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) ou diffusion dynamique de la lumière (DLS) tandis que le rayon R_g peut être mesuré à partir de la diffusion de la lumière multiangulaire (MALLS), de la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ou de la diffusion des neutrons aux petits angles (SANS).

Certaines techniques permettent néanmoins d'établir les dimensions "physiques" d'une protéine mais se heurtent à des limitations techniques. La diffraction de rayons X par exemple peut mesurer très précisément (résolution de 1-2 Å) toutes les dimensions d'une protéine. La protéine doit cependant être sous forme cristallisée. Cette forme peut ne pas avoir la même structure que la protéine libre en solution. Une autre technique, la microscopie électronique, semble plus prometteuse puisqu'elle permet de mesurer *in situ* les dimensions d'une protéine. Cependant la limitation actuelle de cette technique est sa résolution. Bien qu'il soit possible d'atteindre une résolution de 0,5 Å, des limites techniques diminuent souvent cette résolution théorique (Smith, 2008)

Devant les limitations actuelles de ces techniques de mesure de taille des protéines l'approche que nous avons établie a été de mesurer précisément le R_g et le R_H de toutes les hémoprotéines d'intérêt. La taille réelle de la protéine est ainsi comprise entre ces deux valeurs.

3.3. Mesure du rayon de giration des protéines

La mesure du rayon de giration des quatre hémoprotéines a été effectuée par diffusion de neutrons aux petits angles (SANS). Les spectres de diffusion sont présentés en figure 2-15. A l'exception de Hb, on peut constater d'une part que l'agrégation est très faible (la diffusion à très petits vecteurs d'onde de diffusion q est constante) et d'autre part que le facteur de forme de chaque protéine est très bien défini (bonne résolution de toutes les oscillations même à grand q).

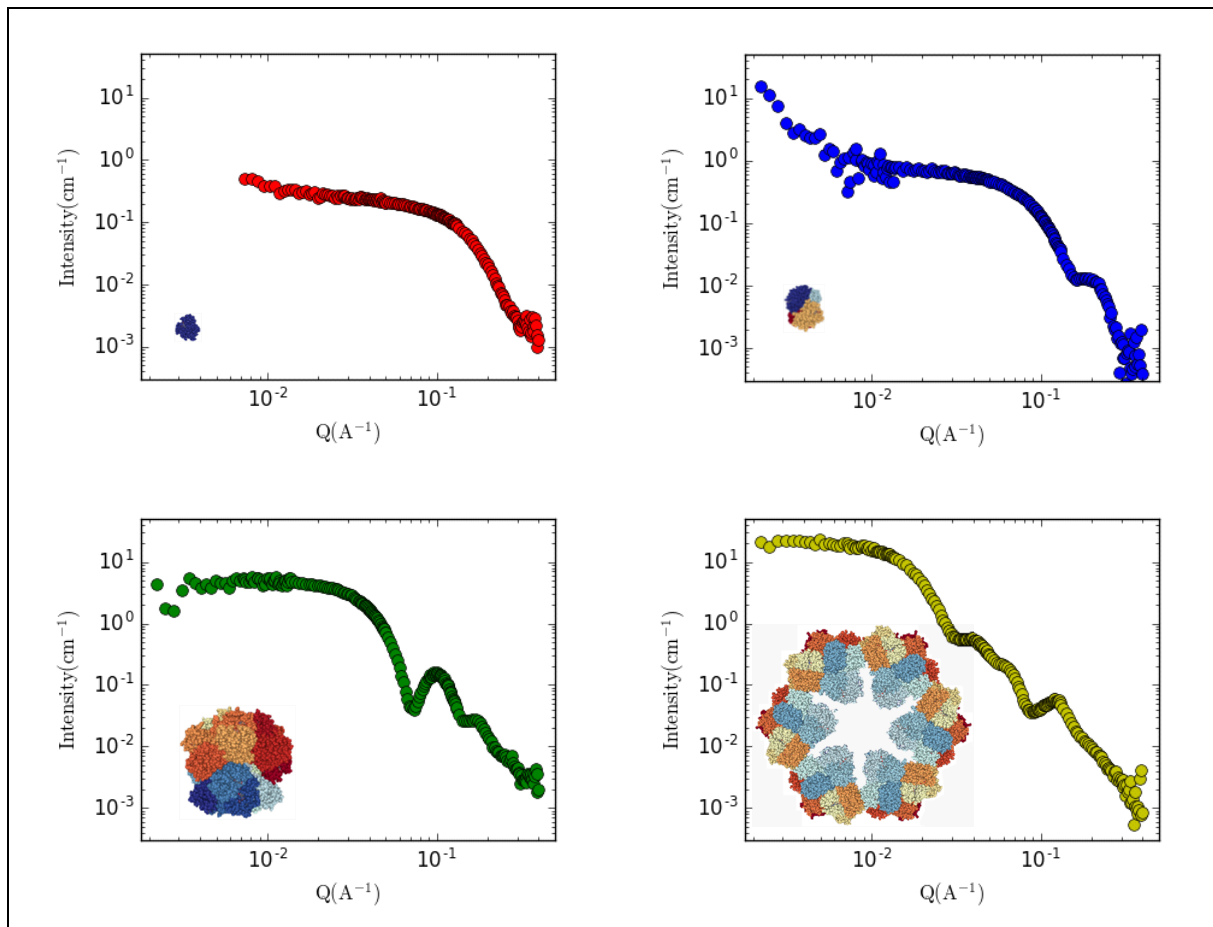


Figure 2-15 : Spectres SANS des quatre hémoprotéines concentrées à 10 g.L^{-1} en tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pD } 7,4$ ($100\% \text{ D}_2\text{O}$) : ● Mb, ● Hb, ● HbC1, ● HbAm.

Nous nous intéressons ici à la détermination du rayon de giration R_g de chaque hémoprotéine. R_g se calcul aisément en s'intéressant au régime de Guinier des spectres de diffusion. Le régime de Guinier se situe à partir de la valeur de q inférieure à l'inverse de la plus grande dimension structurale caractéristique de la protéine. Le régime de Guinier peut être visualisé par une droite de pente négative en traçant la représentation dite de Guinier : $\ln[I(Q)] = f(Q^2)$ (Fig. 2-16). Dans le cas d'objets homogènes du point de vue de leur masse volumique, la pente de la droite est proportionnelle au carré du R_g et est définie par l'équation 2-5 (Guinier et Fournet, 1955) :

$$I(Q) = I(0)e^{-\frac{R_g^2 Q^2}{3}} \quad (\text{Eq. 2-5})$$

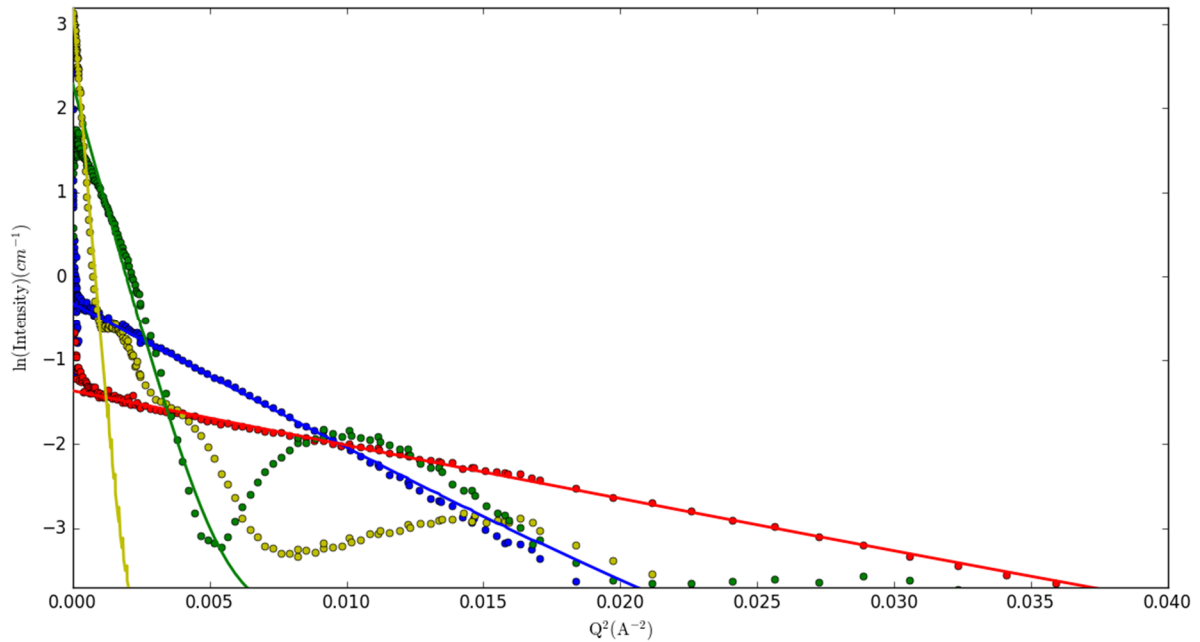


Figure 2-16 : Représentation de Guinier des spectres SANS des quatre hémoprotéines et droites du régime de Guinier correspondantes. ● Mb, ● Hb, ● HbC1, ● HbAm.

L'avantage de la représentation de Guinier est que le R_g peut être mesuré indépendamment de la valeur de l'intensité de diffusion. Si la valeur de R_g mesurée à partir du régime de Guinier est très précise dans le cas de protéines globulaires, il faudra plutôt parler de rayon de giration apparent dans le cas d'objets présentant une inhomogénéité de taille ou de forme car il s'agit en fait de la mesure de la plus grande dimension caractéristique de l'objet (Nallet, 2009). Ainsi la forme en bicouche d'hexamères de HbAm (Zal *et al.*, 1997) rend la pertinence de la valeur du R_g assez limitée pour cette protéine.

Tableau 2-7 : Valeurs du rayon de giration R_g des quatre hémoprotéines d'intérêt analysées par SANS.

Protéine	Abréviation	R_g (nm)
Myoglobine de cœur de cheval	Mb	$1,4 \pm 0,1$
Hémoglobine de sang de porc	Hb	$2,3 \pm 0,2$
Hémoglobine de cœlome de <i>Riftia pachyptila</i>	HbC1	$6,0 \pm 0,4$
Hémoglobine de sang d' <i>Arenicola marina</i>	HbAm	$11,0 \pm 0,4$

Les valeurs de R_g obtenues à partir de l'équation 2-5 sont indiquées dans le tableau 2-7. Les données de la littérature donnent pour la myoglobine de cœur de cheval un R_g de 1,5 nm (1,45 nm par Glandières *et al.*, 1995, 1,52 nm par Loupiac *et al.*, 2002) à comparer avec 1,4 nm mesuré ici. L'hémoglobine humaine (très proche de celle de porc) est donnée avec un R_g de 2,4 nm (2,47 nm par Conrad *et al.*, 1969 et 2,37 nm par Schelten *et al.*, 1972) à comparer à 2,3 nm ici. Concernant les

hémoglobines extracellulaires, HbC1 et HbAm, il n'y avait jusqu'ici pas de données SANS ni SAXS. Toutefois des données de cristallographie aux rayons X ont permis d'estimer le R_g de HbC1 à 6,5 nm (Flores *et al.*, 2005) et des analyses MALLS ont permis d'établir le R_g de HbAm à 11,3 nm (Zal *et al.*, 1997), ce qui sont très proches des valeurs respectives de 6,0 et 11,0 nm obtenues ici.

Les valeurs R_g déterminées ici sont donc en accord avec la littérature. Elles confirment les mesures faites pour HbC1 et HbAm par d'autres méthodes. L'analyse plus approfondie des spectres de HbC1 et HbAm n'a pas été poursuivie car leur structure est déjà établie. Les spectres SANS de Mb et Hb seront par contre analysés davantage en vue de comparer leur structure avant et après adsorption (Chapitre 3, § 4.1.).

3.4. Mesure du rayon hydrodynamique des protéines

Le rayon hydrodynamique R_H de chaque hémoprotéine a également été mesuré par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Les corrélogrammes (Fig. 2-17) comme les diagrammes de distribution en taille (Fig. 2-18) montrent une très grande monodispersité des hémoglobines étudiées à l'exception notable de la myoglobine. Pour cette dernière, l'apparente polydispersité (avec la présence d'une large bande de diffusion autour de 100 nm) est due aux caractéristiques du laser utilisé en DLS. La longueur d'onde du laser est en effet fixée à 633 nm. Or, l'échantillon Mb est constitué de metmyoglobine qui possède un pic d'absorbance à 630 nm (voir Fig. 2-7). Une partie du laser est ainsi absorbée par l'échantillon et la mesure ne permet pas de calculer une distribution en taille fiable. Le laser du Zetasizer peut également être réglé à 532 nm mais les hémoprotéines absorbent encore davantage à cette longueur d'onde.

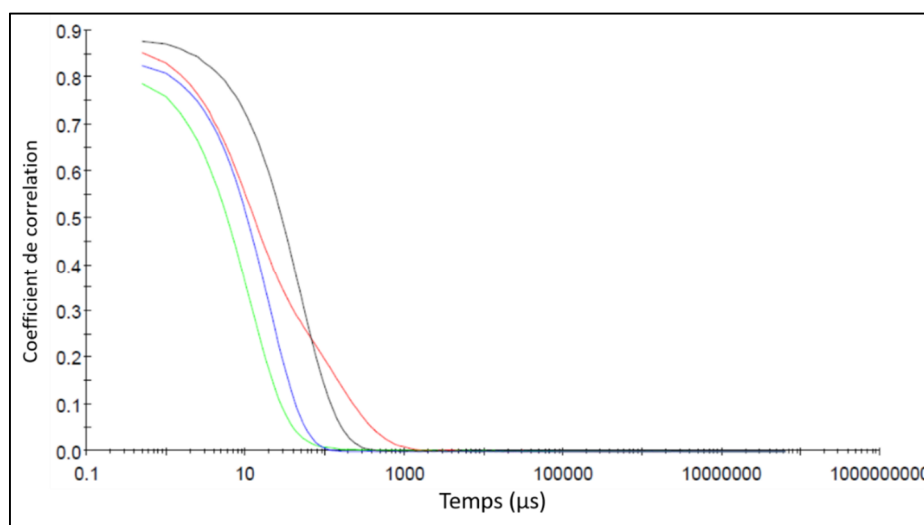


Figure 2-17 : Corrélogrammes des quatre hémoprotéines concentrées à 1 g.L⁻¹ dans du tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pH 7. —Mb, —Hb, —HbC1, —HbAm.

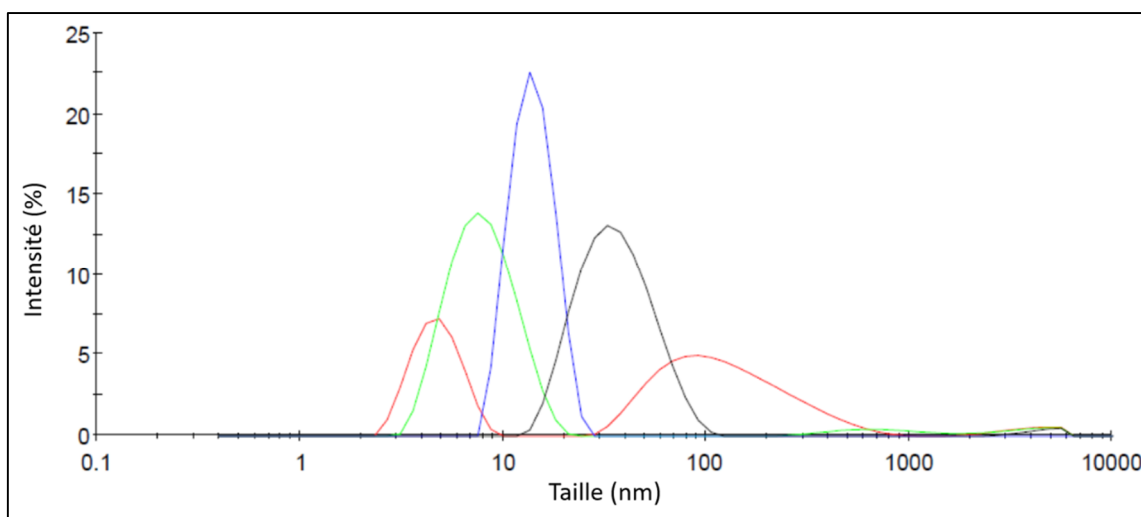


Figure 2-18 : Diagrammes de distribution en taille des quatre hémoprotéines concentrées à 1 g.L^{-1} dans du tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7. —Mb, —Hb, —HbC1, —HbAm.

Les valeurs de rayon hydrodynamique apparent ont pu être mesurées par la méthode de cumulants pour les hémoprotéines étudiées. Les valeurs de R_{\min} , R_g , et R_H des quatre hémoprotéines sont ainsi résumées dans le tableau 2-8.

Tableau 2-8 : Résumé des valeurs de différents rayons calculés (R_{\min}) ou mesurés expérimentalement (R_g et R_H) des quatre hémoprotéines étudiées.

Protéine	R_{\min} (nm)	R_g (nm)	R_H (nm)	Ratio R_g/R_H
Mb	1,7	$1,4 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$	0,58
Hb	2,6	$2,3 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,2$	0,59
HbC1	4,9	$6,0 \pm 0,4$	$7,0 \pm 0,1$	0,86
HbAm	10,1	$11,0 \pm 0,4$	$17,8 \pm 2,2$	0,62

Pour toutes les protéines on constate que R_H est nettement supérieur à R_g ce qui indique la présence d'une épaisse couche d'eau ordonnée à la surface de ces protéines (en tampon phosphate). L'ampleur de la différence est cependant très forte. Ceci s'explique notamment par le fait qu'une protéine tendance à être plus petite en milieu D_2O qu'en milieu H_2O (Efimova *et al.*, 2007). Donc les mesures du R_g faites ici en D_2O ont certainement amplifié les écarts de valeurs par rapport aux R_H mesurés en H_2O .

En outre, il a été montré, dans le cas de protéines destructurées, que le ratio R_g/R_H est proportionnel au R_g (Choy *et al.*, 2002). En d'autres termes, plus la taille d'une protéine est élevée, plus son ratio R_g/R_H sera élevé. Ceci explique l'augmentation du ratio pour les trois premières protéines. Pour HbAm cependant, sa structure particulière rend les mesures de R_g comme de R_H imprécises, d'où son ratio particulier plus proche de celui d'une petite protéine que d'une grosse protéine.

3.5. Mesures du potentiel ζ des protéines et des nanoparticules

Comme pour les SiNPs, le potentiel zêta (ζ) des hémoprotéines a été mesuré dans les conditions qui seront appliquées lors des études d'interaction hémoprotéines/SiNPs.

Tableau 2-9 : Mesures du potentiel ζ apparent des hémoprotéines (1 g.L^{-1}) diluées en tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ à pH 6 et pH 7. Les pH(I) issus de la littérature sont également indiqués.

Nano-objet	Potentiel ζ pH 6 (mV)	Potentiel ζ pH 7 (mV)	pH(I)
Mb	$-1,8 \pm 0,3$	$-4,0 \pm 1,4$	7,0
Hb	$-1,3 \pm 0,2$	$-3,5 \pm 0,9$	7,2
HbC1	$-3,1 \pm 2,1$	$-4,2 \pm 0,3$	inconnu
HbAm	$-6,1 \pm 0,3$	$-11,3 \pm 2,1$	4,6

En comparant le potentiel ζ des différentes hémoprotéines on se rend compte que celles-ci sont légèrement chargées négativement à pH 6 comme à pH 7 (Tab. 2-9). Toutefois cette charge est relativement faible par rapport aux SiNPs étudiées précédemment (§ 1.3.) et elle atteint la quasi neutralité en passant du pH 7 au pH 6. Seule HbAm diffère des autres hémoprotéines en possédant un potentiel ζ plus négatif aux deux valeurs de pH.

Ceci est à corrélérer aux pH isoélectriques pH(I) de ces protéines. Pour la myoglobine de cheval le pH(I) est de 7,0 (Biörck, 1949) et pour l'hémoglobine de porc il est de 7,2 (Antonini et Brunori, 1971). Le pH(I) de l'hémoglobine d'*A. marina* est par contre beaucoup plus acide avec un pH(I) de 4,6 (The Svedberg, 1933). Il est donc logique que, pour des valeurs de pH supérieures à son pH(I) , HbAm soit chargée négativement. Enfin, à notre connaissance, aucune valeur publiée du pH(I) de HbC1 n'a été déterminée. Cependant, d'après la valeur du potentiel ζ de HbC1, son pH(I) est probablement plus proche de celui de Mb et Hb que de celui de HbAm, donc autour de 7.

En conclusion, pour nos deux gammes de protéines et de SiNPs, la charge de surface n'est pas un paramètre constant et il conviendra d'en tenir compte pour toute interprétation à venir.

3.6. Caractérisation des hémoprotéines par spectrophotométrie UV-visible

La spectrophotométrie UV-visible a été utilisée pour les quatre hémoprotéines avec trois objectifs : (i) caractériser la forme majoritaire de la protéine présente en solution (type de ligand associé notamment), (ii) mesurer les concentrations protéiques, (iii) vérifier l'absence de protéines dénaturées (absence de fond de diffusion sur les spectres). Tous les échantillons des quatre hémoprotéines utilisées durant cette thèse ont ainsi été caractérisés par cette méthode. Les spectres UV-visible représentatifs des échantillons de Mb, Hb, HbC1 et HbAm sont ainsi présentés dans la figure 2-19.

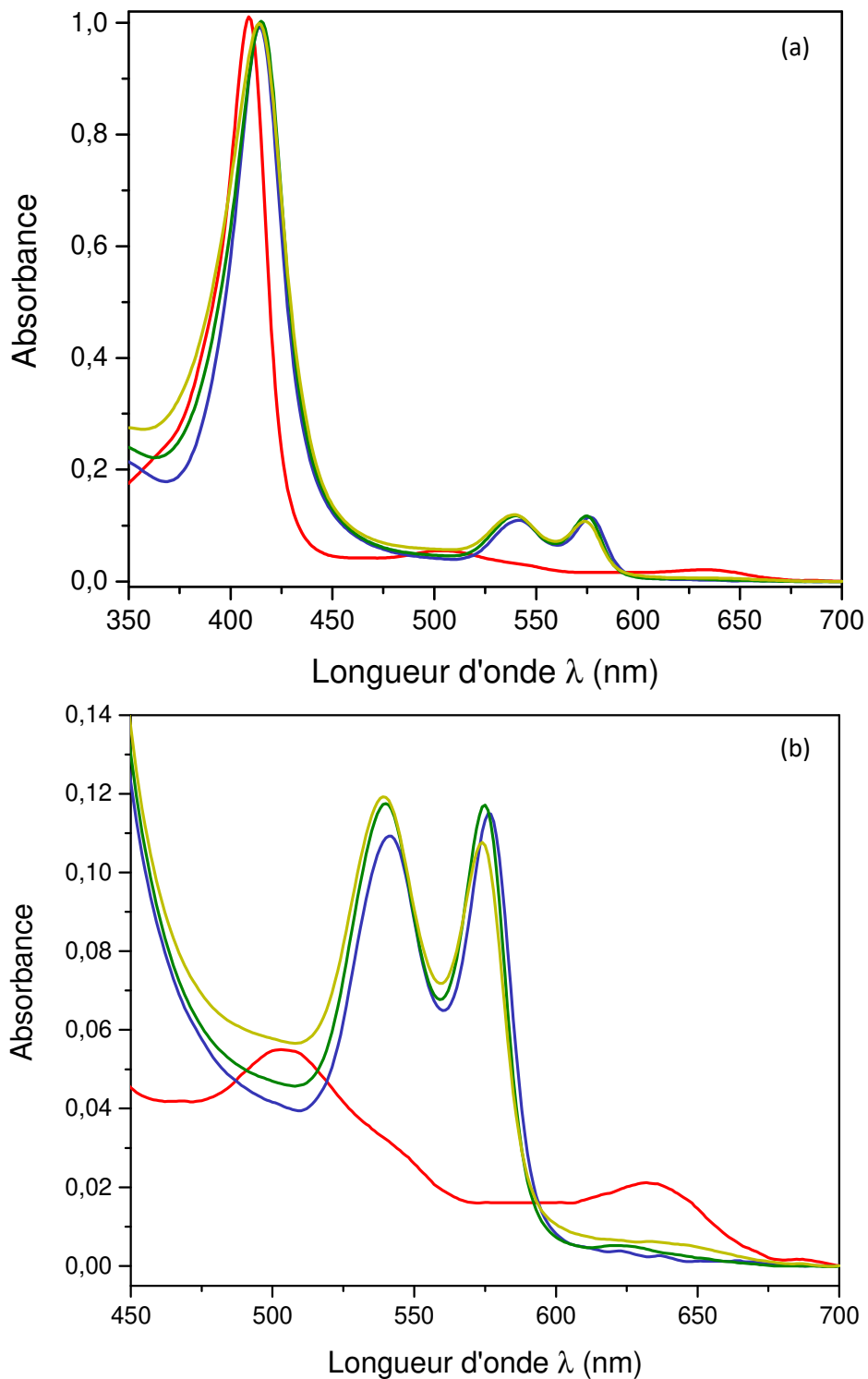


Figure 2-19 : Spectres visible normalisés au niveau du pic du Soret des quatre hémoprotéines : — Mb, — Hb, — HbC1, — HbAm. (a) spectres mesurés de 350 à 700 nm ; (b) zoom de la région comprise entre 450 et 700 nm.

Les spectres des hémoprotéines sont caractérisés par un pic d'absorption principal autour de 410 nm appelé pic du Soret. On remarque rapidement que les spectres de la myoglobine d'une part et des hémoglobines d'autre part ont un profil distinct. Le pic du Soret des hémoglobines est décalé vers le rouge ($\lambda = 414$ nm) par rapport à celui de la myoglobine ($\lambda = 408$ nm). De plus la Mb possède deux

larges bandes de faibles intensités à 500 et 630 nm tandis que les hémoglobines ont deux pics plus intenses à 541 et 576 nm. Ces différences spectrales s'expliquent par le fait que Mb est constituée de metmyoglobine ($\text{Mb}^+\text{H}_2\text{O}$), tandis que les hémoglobines possèdent des profils spectraux propres à la forme oxygénée de la protéine (HbO_2). Les hémoglobines sont sous forme oxygénée car leur purification est faite sur échantillons frais, peu de temps avant expérimentation. La metmyoglobine a été préférée car sa forme oxygénée est spontanément oxydée à l'air libre ce qui rend son utilisation délicate.

On peut noter la grande proximité spectrale entre les hémoglobines. Toutefois, si le pic du Soret est situé au même endroit, il existe des différences fines dans la région comprise entre 450 et 700 nm (Fig. 2-19b). Tout d'abord on observe une intensité plus élevée pour HbAm autour de 500 et de 630 nm. Ceci semble être dû à la présence de fer liés à d'autres ligand que l' O_2 (voir §2.2.). Il est en effet probable que sur les 144 hèmes contenus par molécule de HbAm, tous ne possèdent pas le même ligand. Dans une moindre mesure, du fait de la taille de HbAm, l'augmentation du signal peut également provenir d'un phénomène de diffusion de la lumière.

Les deux pics situés à 541 et 576 nm pour Hb sont également légèrement différents pour HbC1 et HbAm. Celles-ci possèdent des pics légèrement décalés vers le bleu. Le décalage est toutefois trop faible dans les conditions opératoires faites ici pour être interprété. Le ratio $\epsilon_{576}/\epsilon_{541}$ est lui par contre nettement différent. Alors que Hb possède un ratio r supérieur à 1 ($r = 1,06$ juste après purification), HbC1 et HbAm possèdent des ratios r inférieurs à 1 (différent selon les lots). Ceci confirme pour HbC1 et HbAm l'hypothèse que les différents hèmes contenus dans la protéine ont sûrement différents types de ligands pour une même protéine.

Il est également intéressant de noter que lorsque Hb reste stockée à l'air libre, son spectre évolue avec le ratio $\epsilon_{576}/\epsilon_{541}$ qui diminue et un pic à 630 nm qui apparait. Ce pic, caractéristique de la méthémoglobine (El Antri *et al.*, 1990), montre l'importance de travailler avec des échantillons fraîchement préparés et systématiquement caractérisés.

La concentration de l'hémoglobine HbO_2 , exprimée usuellement en concentration molaire d'hème (donc de monomère), est mesurée à 576 nm, pic d'absorbance spécifique de la forme oxygénée avec $\epsilon_{576} = 15150 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Banerjee *et al.*, 1969). Le spectre de la metmyoglobine Mb dépend fortement du pH de la solution. C'est pour cela que sa concentration est mesurée au point isobestique déterminé à 623 nm avec $\epsilon_{623} = 3500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Antonini et Brunori, 1971). On peut également trouver des coefficients ϵ au niveau du pic du Soret cependant celui-ci est également sensible au pH et à la

température donc la précision est inférieure. Les valeurs à pH 7 et à 20°C sont pour Mb de $\epsilon_{408} = 188000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et pour Hb de $\epsilon_{414} = 128000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Antonini et Brunori, 1971).

Concernant HbC1 et HbAm, il n'existe pas dans la littérature de coefficients d'extinction molaire ϵ spécifiques. Deux expériences distinctes ont ainsi été réalisées afin d'estimer un coefficient ϵ au niveau du pic du Soret (à 414 nm). Une première technique colorimétrique a été utilisée afin d'approximer les valeurs de coefficient ϵ : la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Dans un second temps un dosage du fer des hèmes a été effectué par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) afin de confirmer les estimations faites par le dosage précédent.

La méthode de Bradford consiste à quantifier la concentration en protéines présentes dans la solution en procédant à un dosage par étalonnage. À partir d'une gamme étalon de Mb de concentration massique connue, les concentrations d'un échantillon de HbC1 et de HbAm sont déterminées. Les coefficients ϵ de chacun sont ensuite déduits d'un spectre UV-visible de ces mêmes échantillons. Trois dosages de Bradford indépendants sont effectués et les valeurs moyennes des coefficients sont indiquées dans le tableau 2-10.

Une deuxième méthode de quantification par analyse élémentaire ICP-MS est ensuite effectuée. L'ICP-MS permet de mesurer la quantité de fer présent en solution. Considérant qu'il y a un atome de fer par hème (donc par globine) il est possible d'estimer la concentration protéique et *in fine* d'établir un coefficient d'extinction molaire de la même manière que pour le dosage de Bradford. Le dosage du fer a été fait par ajout dosé (ajout d'un standard de fer en quantité croissante dans plusieurs répliques d'un même échantillon) plus précis qu'un dosage simple (voir Chapitre 7, §2.5.). Les valeurs des coefficients ϵ sont indiquées dans le tableau 2-10.

Tableau 2-10 : Coefficients d'extinction molaire ϵ (exprimé en mole de globines) à 414 nm de HbC1 et HbAm déterminés par dosage colorimétrique et par analyse élémentaire du fer.

Coefficient ϵ ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	HbC1	HbAm
Méthode de Bradford	165000 ± 9900	161000 ± 12500
ICP-MS	172000 ± 28500	156000 ± 19500
ϵ approché utilisé	170000	160000

A partir de deux méthodes distinctes, les coefficients ϵ ont donc pu être mesurés avec une incertitude inférieure à 10%. Les valeurs utilisées pour quantifier les concentrations de protéines dans les échantillons sont les suivantes : $\epsilon_{414} = 170000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour HbC1 et $\epsilon_{414} = 160000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour HbAm.

La quantification précise de la concentration protéique est souvent délicate du fait de la complexité de ces macromolécules. Ainsi quel que soit la méthode employée, il existe une imprécision de la mesure du coefficient ϵ . Concernant le dosage de Bradford, cette imprécision est due à la nature même de la méthode. En effet il s'agit d'un dosage semi quantitatif nécessitant un étalon. Or la protéine étalon n'est jamais identique à la protéine analysée que ce soit en termes de poids moléculaire, de structure, de composition en acides aminés ou de pH isoélectrique. Or tous ces paramètres peuvent influencer sur la mesure de la concentration protéique (Sapan *et al.*, 1999). Afin de contrôler ces facteurs au mieux, la myoglobine a été utilisée comme étalon au lieu de l'albumine de sérum bovin utilisée habituellement.

L'ICP-MS semble particulièrement indiquée dans le cas des hémoprotéines. Un dosage absolu du fer présent en solution est effectué. La principale source d'erreur est liée à la préparation de l'échantillon. Les protéines sont en effet diluées dans une solution d'acide nitrique 2% ce qui les dénature et peut conduire à la formation d'agrégats. Une grande variabilité des mesures a ainsi pu être observée.

Pour parer à cela une préparation préalable des échantillons a été entreprise en sortant le fer hémique de la protéine par dilution dans de l'acétone acide. Cependant seule une fraction du fer présent a pu être dosé. Une mise au point de la technique de préparation aurait été nécessaire afin d'améliorer la précision de la mesure des coefficients d'extinction molaire.

4. Conclusion

Un des objectifs majeurs de cette thèse consiste à étudier la problématique de l'effet de la taille des protéines, comme celle des nanoparticules, sur leurs interactions conjointes. Deux gammes (une de nanoparticules de silice et une autre d'hémoprotéines) ont ainsi été constituées. Les constituants de ces deux gammes ont été caractérisés en détail du point de vue de la structure (taille, forme, dispersité) et de la charge de surface (potentiel ζ).

Au-delà de la taille, qui est la variable d'étude, il est apparu que d'autres paramètres physico-chimiques varient également. Si la forme sphérique et la grande monodispersité est constante chez tous les membres de la gamme des SiNPs, la forme des hémoprotéines est beaucoup plus diverse. En effet, Mb, Hb et HbC1 possèdent une forme globulaire qui s'apparente à un ellipsoïde plus ou moins sphérique tandis que HbAm possède une structure spécifique de type hexagonal en double couche très différente d'une sphère.

Concernant la comparaison de la charge de surface, quasiment toutes les SiNPs utilisées possèdent un potentiel ζ fortement négatif (aux pH d'intérêts) dû au caractère acide de la silice. Seules les plus

petites SiNPs (MN10) ont une charge de surface très faiblement négative, voire nulle. Cette particularité semble notamment due à la présence de molécules d'arginine utilisées comme initiatrices de la nucléation des nanoparticules. Les autres SiNPs sont, en effet, synthétisées par recroissance de nanoparticules plus petites et cette recroissance ne nécessite pas d'arginine. Il n'y a donc pas de contamination possible de la surface des plus grosses SiNPs par l'arginine. Les hémoprotéines ne possèdent pas non plus toutes la même charge de surface. HbAm possède un potentiel ζ nettement plus négatif que les autres hémoprotéines, ce qui est révélateur d'une forte différence au niveau du pH isoélectrique et donc de la structure primaire de la protéine. La charge de surface n'est donc constante ni au sein de la gamme de SiNPs ni au sein de celle des hémoprotéines.

Néanmoins, au regard de l'extrême diversité physico-chimique qui existe parmi toutes les protéines et toutes les nanoparticules, naturelles comme synthétiques, ces variations peuvent finalement sembler faibles. Il convient toutefois d'en prendre pleinement conscience pour toutes les interprétations qui seront faites par la suite.

Bibliographie – Chapitre 2

- **Antonini E.** and Brunori, M. (1971) *Hemoglobin and Myoglobin in Their Interactions with Ligands*. North Holland Publishing Company: Amsterdam. Vol. 21.
- **Banerjee R.**, Alpert Y., Leterrier F., and Williams R. J. P. (1969) *Visible Absorption and Electron Spin Resonance Spectra of the Isolated Chains of Human Hemoglobin. Discussion of Chain-Mediated Heme-Heme Interaction*. *Biochem.* Vol. 8, 2862-2867.
- **Biörck G.** (1949) *Notes on the chemistry of myoglobin*. *Acta. Med. Scand.* 133, 33-38.
- **Bolognesi M.**, Onesti S., Gatti G., Coda A., Ascenzi P., and Brunori M. (1989) *Aplysia limacina myoglobin. Crystallographic analysis at 1.6 Å resolution*. *J. Mol. Biol.* 205, 529-544.
- **Bozack M. J.**, Zhou Y., and Worley S. D. (1994) *Structural modifications in the amino acid lysine induced by soft x-ray irradiation*. *J. Chem. Phys.* 100, 8392.
- **Bradford M.M.** (1976) *A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem.* 72, 248-254.
- **Choy W. Y.**, Mulder F. A., Crowhurst K. A., Muhandiram D. R., Millett I. S., Doniach S., Forman-Kay J. D., Kay L. E. (2002) *Distribution of molecular size within an unfolded state ensemble using small-angle X-ray scattering and pulse field gradient NMR techniques*. *J. Mol. Biol.* 316, 101-112.
- **Conrad H.**, Mayer A., Thomas H. P., and Vogel H.I (1969) *X-ray small-angle scattering from aqueous solutions of oxy- and deoxyhaemoglobin*. *J. Mol. Biol.* 41, 225-229.
- **Des Cloizeaux J.** and Jannink G. (1990) *Polymers in Solution Their Modelling and Structure*. Clarendon Press. ISBN 0-19-852036-0. Chapter 10, Section 7.4, 415-417.
- **Efimova Y. M.**, Haemers S., Wierczinski B., Norde W., and van Well A. A. (2007) *Stability of globular proteins in H₂O and D₂O*. *Biopolymers.* 85, 264-273.
- **El Antri S.**, Sire O., and Alpert B. (1990) *Relationship between protein/solvent proton exchange and progressive conformation and fluctuation changes in hemoglobin*. *Eur. J. Biochem.* 191, 163-168.
- **Erickson H. P.** (2009) *Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy*. *Biol Proced Online*, Volume 11: Number 1.
- **Evans S. V.** and Brayer G. D. (1990) *High-resolution Study of the Three-dimensional Structure of Horse Heart Metmyoglobin*. *J. Mol. Biol.* (1990) 213, 885-897.
- **Flores J. F.**, Fisher C. R., Green B. N., Freytag J. K., Schaeffer S. W., and Royer W. E. Jr. (2005) *Sulfide binding is mediated by zinc ions discovered in the crystal structure of a hydrothermal vent tubeworm hemoglobin*. *Proc. Natl. Acad. Sci. A S A.* 102, 2713-2718.
- **Glandières J.-M.**, Calmettes P., Martel P., Zentz C., Massat A., Ramstein J., and Alpert B. (1995) *Solvent-induced structural distortions of horse metmyoglobin*. *Eur. J. Biochem.* 227, 241-248.
- **Guinier A.** and Fournet G. (1955) *Small-Angle Scattering of X-rays*. Translated by Wilson C. B. and with a bibliographical appendix by Yudowitch K. L. Wiley, New York. 268 pp. *J. Polym. Sci.* 10.1002/pol.1956.120199326.
- **Herrklotz J. V.** (2012) *Analysis of the vibrational spectra of L-lysine and L-arginine*. Thèse de Master de l'Université de Vienne.
- **Juan L.**, Taveau J.-C., Marco S., Lallier F. H., and Lamy J. N. (2001) *Occurrence of Two Architectural Types of Hexagonal Bilayer Hemoglobin in Annelids: Comparison of 3D Reconstruction Volumes of Arenicola marina and Lumbricus terrestris Hemoglobins*. *J. Mol. Biol.* 305, 757-771.
- **Jouan L.**, Marco S., Taveau J. C. (2003) *Revisiting the structure of Alvinella pompejana hemoglobin at 20Å resolution by cryoelectron microscopy*. *J. Struct. Biol.* 143, 33-44.

- **Kampen** E. J. and Zijlstra W. G. (1965) *Determination of haemoglobin and its derivatives*. Adv. Clin. Chem. Vol. 8.
- **Kendrew** J. C., Bodo G., Dintzis H. M., Parrish R. G., Wyckoff H., and Phillips D.C. (1958) *A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis*. Nature. 181, 662-666.
- **Kumar** S. and Rai S. B. (2010) *Spectroscopic studies of L-arginine molecule*. Indian J. Pure Appl. Phys. 48, 251-255.
- **Lairez** D. et Pelta J. (2005) *Diffusion de neutrons aux petits angles : application à l'étude des macromolécules biologiques en solution*. J. Phys. IV France 130, 39-62.
- **Lesk** A. M. and Chothia C. (1980) *How different amino acid sequences determine similar protein structures: the structure and evolutionary dynamics of the globins*. J. Mol. Biol. 136, 225-270.
- **Loupiac** C., Bonetti M, Pin S., and Calmettes P. (2002) *High-pressure effects on horse heart metmyoglobin studied by small-angle neutron scattering*. Eur. J. Biochem. 269, 4731-4737.
- **Lu** T. H., Panneerselvam K., Liaw Y. C. Kan F., and Lee C. J. (2000) *Structure determination of porcine haemoglobin*. Biol. Crystallogr. 56, 304-312.
- **Mathé** C., Devineau S., Aude J-C., Lagniel G., ChédinS., Legros V., Mathon M-H., Renault J-P., Pin S., Boulard Y., and Labarre J. (2013) *Structural Determinants for Protein adsorption/nonadsorption to Silica Surface*. Plos One. 8, e81346.
- **Moll** W. (1966) *The diffusion coefficient of hemoglobin*. Respir. Physiol. 1, 357-365.
- **Nallet** F. (2009) *Introduction à la diffusion aux petits angles*. École thématique. La Grande Motte.
- **Ochiai** T. and Weber R. E. (2002) *Effects of magnesium and calcium on the oxygenation reaction of erythrocrurin from the marine polychaete Arenicola marina and the terrestrial oligochaete Lumbricus terrestris*. Zoolog. Sci. 995-1000.
- **Patwardhan** S. V., Emami F. S., Berry R. J., Jones S. E., Naik R. R., Deschaume O., Heinz H., and Perry C. C. (2012) *Chemistry of aqueous silica nanoparticle surfaces and the mechanism of selective peptide adsorption*. J. Am. Chem. Soc. 134, 6244-6256.
- **Perutz** M. F., Rossmann M. G., Cullis A. F., Muirhead H., Will G., and North A. C. (1960) *Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å. resolution, obtained by X-ray analysis*. Nature. 185, 416-22.
- **Philips** S. (1980) *Structure and refinement of oxymyoglobin at 1.6 Å resolution*. J. Mol. Biol. 142, 531-554.
- **Porod** G. (1982) *Small Angle X-Ray Scattering: Chapter 2*. Academic Press, New York. 17-52.
- **Rimola** A., Costa D., Sodupe M., Lambet J.-F., and Ugliengo P. (2013) *Silica Surface Features and Their Role in the Adsorption of Biomolecules: Computational Modeling and Experiments*. Chem. 113, 4216-4313.
- **Rousselot** M. (2006) *Analyses structurales et fonctionnelles de l'hémoglobine extracellulaire de l'annélide polychète Arenicola marina dans le cadre de la mise au point d'un substitut sanguin*. Thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie, Paris VI.
- **Rousselot** M., Le Guen D., Chabasse C., and Zal. F. (2006) *Novel dissociation mechanism of a polychaetous annelid extracellular haemoglobin*. FEBS Journal. 273, 1582-1596.
- **Royer** W. E., Sharma H., Strand K., Knapp J. E., and Bhyravbhatla B. (2006) *Lumbricus erythrocrurin at 3.5 Å resolution: architecture of a megadalton respiratory complex*. Structure. 14, 1167-1177.
- **Sapan** C. V., Lundblad R. L., and Price N. C. (1999) *Colorimetric protein assay techniques*. Biotechnol. Appl. Biochem. 29, 99-108.
- **Schelten** J., Schlecht P., Schmatz W., and Mayer A. (1971) *Neutron Small Angle Scattering of Hemoglobin*. J. Biol. Chem. 247, 5436-5441.

- **Sharma** P.K., Kuchumov A.R., Chottard G., Martin P.D., Wall J.S., and Vinogradov S.N. (1996) *The role of the dodecamer subunit in the dissociation and reassembly of the hexagonal bilayer structure of Lumbricus terrestris hemoglobin*. J. Biol. Chem. 271, 8754-8762.
- **Smith** D. J. (2008) *Ultimate resolution in the electron microscope?* Mater. Today. 11, Supplement 30-38.
- **Sulpizi** M., Gaigeot M.-P., and Spirik M. (2012) *The Silica-Water Interface: How the Silanols Determine the Surface Acidity and Modulate the Water Properties*. J. Chem. Theory Comput. 8, 1037-1047
- **The Svedberg** (1933) *Sedimentation ion constants, molecular weights and isoelectric points of the respiratory proteins*. J. Biol. Chem. 103, 311-325.
- **Vinogradov** S. N., Kapp O. H., and Ohtsuki L. (1982) *The extracellular hemoglobins and chlorocuarins of annelids*. in: Electron Microscopy of Proteins, Vol. 3 (Harris, J., ed., Ed.) 135-163.
- **Weber** R. E. and, Vinogradov S. N. (2001) *Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations*. Physiol. Rev. 81, 569-628.
- **Yokoi** T., Sakamoto Y., Terasaki O., Kubota Y., Okubo T., and Tatsumi T. (2006) *Periodic Arrangement of Silica Nanospheres Assisted by Amino Acids*. J. Am. Chem. Soc. 128, 13664-13665.
- **Zal** F., Lallier F. H., Green B. N., Vinogradov S. N., and Toulmond A. (1996) *The Multi-hemoglobin System of the Hydrothermal Vent Tube Worm Riftia pachyptila*. J. Biol. Chem. 271, 8875-8881.
- **Zal** F. Green B. N., Lallier F. H., Vinogradov S. N., and Toulmond A. (1997) *Quaternary structure of the extracellular haemoglobin of the lugworm Arenicola marina A multi-angle-laser-light-scattering and electrospray-ionisation-mass-spectrometry analysis*. Eur. J. Biochem. 243, 85-92.
- **Zal** F., Leize E., Lallier F. H., Toulmond A., Dorselaer A. V., and Childress J. J. (1998) *S-Sulfohemoglobin and disulfide exchange: The mechanisms of sulfide binding by Riftia pachyptila hemoglobins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 8997-9002.
- **Zal** F. and Rousselot M. (2014) *Extracellular Hemoglobins from Annelids, and their Potential Use in Biotechnology. Outstanding Marine Molecules: Chemistry, Biology, Analysis. First Edition*. Edited by La Barre S. and Kornprobst J.-M. Wiley-Blackwell, Weinheim, 361-376.

Chapitre 3 : Effet de la taille des protéines sur l'interaction protéines/nanoparticules

« Le vrai point d'honneur n'est pas d'être toujours dans le vrai.
Il est d'oser, de proposer des idées neuves, et ensuite de les vérifier. »

Pierre-Gilles de Gennes

Ce chapitre aborde la problématique de l'effet de la taille des protéines sur leur adsorption à la surface de nanoparticules de silice (SiNPs). Ainsi, quatre protéines appartenant à la famille des hémoprotéines ont été sélectionnées pour leurs tailles différentes : la myoglobine de cœur de cheval (Mb), l'hémoglobine de porc (Hb), l'hémoglobine extracellulaire coelomique de *Riftia pachyptila* (HbC1) et l'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* (HbAm). Ces hémoprotéines ont été caractérisées en détail dans le chapitre précédent (Tab. 3-1). De façon similaire, une solution de SiNPs monodisperses (LUDOX TM-50) a été caractérisée afin d'établir la taille, la forme et la charge de surface des nanoparticules la composant (Chapitre 2, § 1.).

Tableau 3-1 : Caractéristiques des quatre hémoprotéines sélectionnées pour la gamme de protéines

Protéine	Myoglobine	Hémoglobine	Hémoglobine	Hémoglobine
Abréviation	Mb	Hb	HbC1	HbAm
Espèce	<i>Equus caballus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Riftia pachyptila</i>	<i>Arenicola marina</i>
Poids moléculaire (kDa)	17	64,5	400	3600
R_g (nm)	1,4 ± 0,1	2,3 ± 0,2	6,0 ± 0,4	11,0 ± 0,4
R_H (nm)	2,4 ± 0,1	4,1 ± 0,2	7,0 ± 0,1	17,8 ± 2,2
Nombre de globines	1	4	24	144
pH isoélectrique pI	7	7,2	≈ 7	4,6

Les quatre systèmes hémoprotéines/LUDOX ici constitués vont être étudiés selon plusieurs aspects physico-chimiques. Des isothermes d'adsorption vont tout d'abord permettre d'étudier chaque système d'un point de vue quantitatif. Des expériences de calorimétrie permettront par la suite de mieux comprendre les mécanismes thermodynamiques responsables de l'adsorption de ces protéines. Enfin, une analyse structurale des protéines adsorbées aura pour but de déterminer l'impact de l'adsorption des protéines sur leur structures secondaire, tertiaire, et quaternaire. Ainsi, une comparaison systématique entre les quatre hémoprotéines permettra de déterminer l'existence ou non d'un éventuel effet taille des protéines sur l'interaction protéines/nanoparticules.

1. Isothermes d'adsorption par déplétion

1.1. Modèle de Langmuir

La première analyse de l'interaction protéine/nanoparticule consiste généralement en un isotherme d'adsorption. L'isotherme d'adsorption vise à mesurer la quantité de molécules adsorbées sur une surface donnée en fonction de la concentration de protéines en solution. S'agissant de nanoparticules, la surface correspond à la surface de toutes les NPs présentes en solution. Un isotherme n'est valable que pour un couple protéines/NPs donné et dans des conditions physico-chimiques définies (température, pH, nature du tampon utilisé, temps d'incubation).

Il existe deux catégories de techniques permettant d'obtenir un isotherme d'adsorption. La première, appelée méthode par déplétion consiste à déterminer la quantité de protéines libres en solution (dialyse, ultracentrifugation, chromatographie ; Kurz *et al.*, 1977). Ainsi, par différence avec la quantité totale il est possible de connaître la quantité de protéines adsorbées. Le deuxième type de techniques est plus directe puisqu'il consiste à observer l'évolution d'un signal spécifique créé lors de l'adsorption des protéines sur les NPs. L'absence d'évolution du signal indique la saturation du système. Le signal suivi peut être spectroscopique (fluorescence, dichroïsme circulaire) ou thermodynamique (titration calorimétrique).

Les isothermes d'adsorption peuvent être ajustés à partir de modèles physiques correspondant aux phénomènes d'adsorption observés. De nombreux modèles d'isotherme à deux paramètres ont ainsi été développés comme par exemple les modèles de Freundlich (1906), Langmuir (1918), Temkin-Pyzhev (1939), Dubinin-Radushkevich (1947), Halsey (1948), ou Jovanovic (1969). Chaque modèle est valable pour des conditions particulières d'adsorption (formation de mono ou multicouches ; surface homogène ou hétérogène...). Il existe également des modèles d'isotherme d'adsorption à trois paramètres tels que les modèles de Redlich-Peterson (1959) ou de Langmuir-Freundlich (Umpleby *et al.*, 2001). Ces modèles permettent un meilleur ajustement avec les données expérimentales. Cependant, le sens physique donné aux paramètres calculés n'est pas toujours évident.

L'adsorption des protéines sur une surface est le plus souvent représentée par le modèle de Langmuir (Topoglidis *et al.*, 2001 ; Felsovalyi *et al.*, 2011). Le modèle de Langmuir a été développé initialement pour l'étude de l'adsorption de molécules de gaz sur une surface plane homogène. Il représente le cas idéal de l'adsorption réversible d'une monocouche de molécules sans interactions entre elles. Ces prérequis ne sont pas toujours vérifiés dans le cas d'adsorption de protéines. Néanmoins le modèle physique qui en découle permet généralement de modéliser le système de façon très satisfaisante.

Un isotherme d'adsorption est représenté par la quantité de protéines adsorbées (m_{ads} , en masse ou en mole) pour une quantité de nanoparticules donnée en fonction de la concentration en protéines libres (C , massique ou molaire). Sur la figure 3-1 est représenté un exemple d'isotherme d'adsorption.

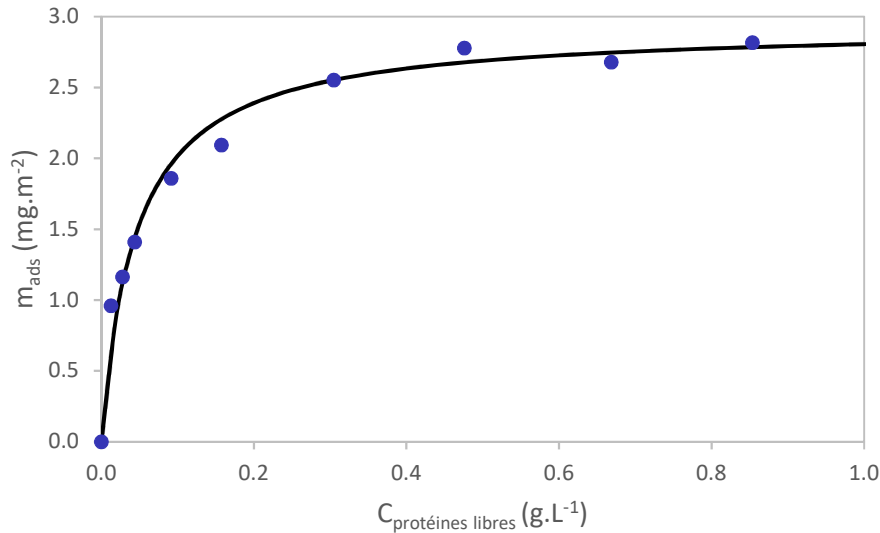


Figure 3-1 : ● Isotherme d'adsorption de l'hémoglobine Hb sur les SiNPs LUDOX TM-50 en tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹ à pH7. Courbe ajustée par le modèle de Langmuir.

La courbe formée par les points expérimentaux peut ensuite être ajustée par le modèle d'isotherme de Langmuir (Eq. 3-1) avec m_{∞} la quantité maximale de protéines adsorbées (mg.m⁻²) et K_{ads} la constante d'adsorption (L.mol⁻¹). Ce deuxième paramètre correspond à l'affinité des protéines vis-à-vis de la surface.

$$m_{ads} = \frac{m_{\infty} \cdot K_{ads} \cdot C}{1 + K_{ads} \cdot C} \quad (\text{Eq. 3-1})$$

L'unité de m_{∞} couramment appliquée est la masse surfacique (mg.m⁻²) et permet de comparer l'adsorption sur des objets de tailles différentes. Toutefois, dans le cas de protéines modèles et de NPs monodisperses, une constante plus pertinente, peut remplacer m_{∞} ; il s'agit du nombre de protéines adsorbées sur une nanoparticule, N . Cette constante dérive directement de m_{∞} . En effet, connaissant parfaitement le poids moléculaire PM des protéines ainsi que le rayon physique R des SiNPs, il est possible de calculer N directement à partir de m_{∞} . (Eq. 3-2).

$$N = \frac{m_{\infty} \cdot S_{NP} \cdot N_A}{1000 \cdot PM} \quad (\text{Eq. 3-2})$$

Avec S_{NP} la surface d'une nanoparticule (m²) et $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ le nombre d'Avogadro.

Par la suite, les deux constantes seront indiquées. m_{∞} permettra de comparer les valeurs mesurées à la littérature. N sera utilisé pour estimer le degré de recouvrement d'une surface.

1.2. Évaluation de la quantité maximale de protéines adsorbables sur une sphère

La connaissance de la valeur de N pour un système donné peut être extrêmement informative quant au type de recouvrement des protéines à la surface des SiNPs. En effet, on peut s'interroger sur le degré de saturation de la surface des SiNPs : les protéines recouvrent-elles complètement tout l'espace disponible à la surface des SiNPs ou, au contraire, le recouvrement est-il lacunaire ? Cette question est rarement abordée dans la littérature car il est souvent supposé que les protéines s'étalent et recouvrent intégralement la surface. Or, dans le cas de protéines fortement structurées comme les hémoprotéines un étalement poussé est peu probable. Par la suite, nous ferons d'ailleurs l'hypothèse d'une déstructuration limitée et négligeable de protéines adsorbées.

Une première approche est de calculer la quantité maximale théorique de protéines que peut adsorber une nanoparticule (N_T). Dans notre cas, la nanoparticule est sphérique et le système peut être simplifié en considérant les protéines comme des sphères de rayon égal à leur rayon de giration R_g . Dans le cas où la taille des sphères adsorbées est beaucoup plus petite que celle de la sphère centrale, la surface de la grosse sphère peut être considérée comme un plan et il existe une équation simple pour calculer la quantité maximale théorique N_T de protéines adsorbables (Eq. 3-3) avec R et r respectivement les rayons de la sphère centrale et des sphères adsorbées.

$$N_T = \frac{4\pi}{2\sqrt{3}} \left(\frac{R}{r}\right)^2 \quad (\text{Eq. 3-3})$$

L'équation 3-3 n'est valable que lorsque $\frac{r}{R} \leq 0,1$. Ceci n'est donc pas applicable pour les protéines testées ici sauf, en approximation, pour la myoglobine ($\frac{r}{R} = 0,11$). Par cette méthode le nombre maximale N_T pour la myoglobine est de 313 protéines par NPs LUDOX. Dans le cas des hémoglobines (lorsque $\frac{r}{R} > 0,1$) l'équation 3-3 n'est plus valable et il n'existe pas à l'heure actuelle de résolution analytique de ce problème. Toutefois une estimation peut être trouvée par la simulation. La quantité maximale de sphères adsorbables sur une autre sphère a ainsi été modélisée pour l'étude de la nucléation par Thill *et al.* (2012). Les valeurs de N_T sont données dans le tableau 3-2 et des représentations de la simulation sont indiquées dans la figure 3-2.

Tableau 3-2 : Nombre maximal d'hémoprotéines adsorbables N_T calculé sur une sphère de la taille des LUDOX en considérant les protéines comme des sphères de rayons égaux à leur rayon de giration.

Protéine	N_T (protéines/LUDOX)
Mb	340
Hb	150
HbC1	29
HbAm	14

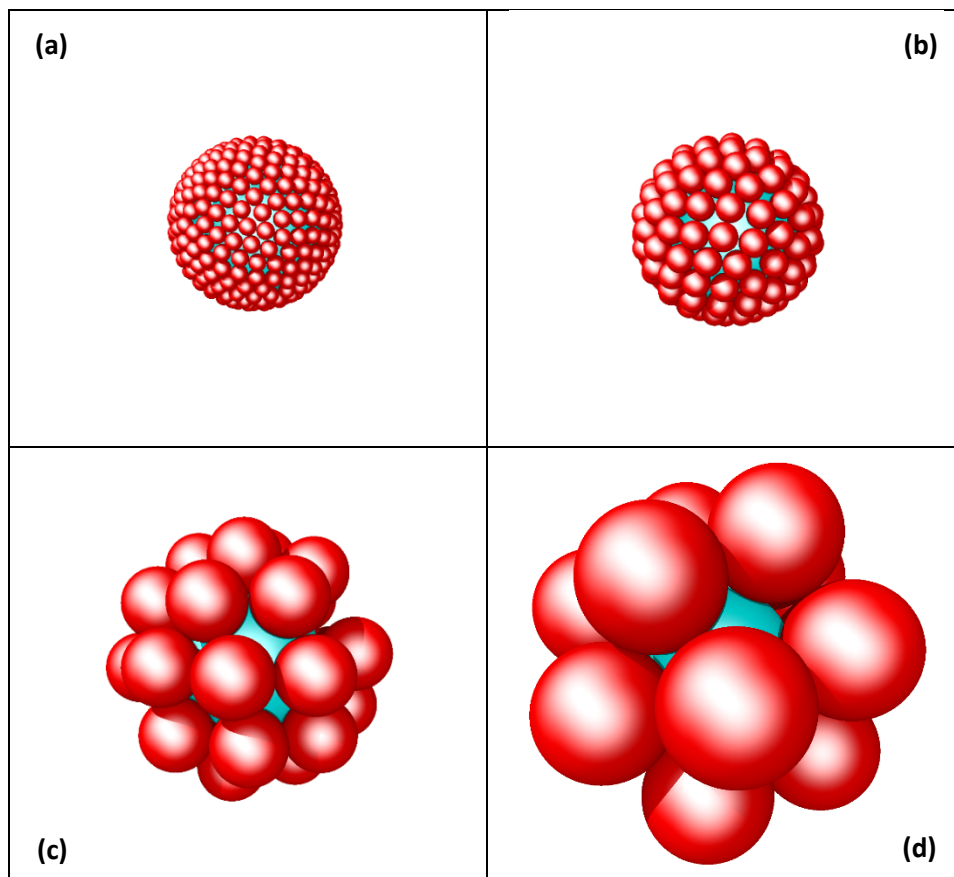


Figure 3-2 : Représentation de la simulation des assemblages de sphères de tailles équivalentes aux hémoprotéines adsorbées sur une sphère de la taille de LUDOX. (a) Mb ; (b) Hb ; (c) HbC1 ; (d) HbAm. À partir de Thill et al. (2012).

Ces simulations permettent d'établir des valeurs maximales de protéines adsorbées dans le cas de monocouches sur lesquels nous pourrions nous référer par la suite. Il faut néanmoins garder à l'esprit que la simulation de sphères sur une sphère est une simplification des systèmes hémoprotéines/LUDOX. Si les LUDOX ont une forme sphérique très proche de la simulation, leur surface n'est pas parfaitement plane et une rugosité, même faible, peut avoir un impact. En outre, les hémoprotéines sont certes des protéines globulaires, mais leur forme ellipsoïdale induit une asymétrie et donc une orientation possible des protéines à la surface ce qui n'est considéré par la simulation. Enfin la simulation considère que le contact se fait sur la surface par un point discret et n'envisage aucune déformation des sphères. Ces deux critères sont discutables pour les protéines. En effet, une

protéine peut avoir plusieurs points d'accroche et peut se déformer partiellement ou totalement le long de la surface.

1.3. Effet de la taille des protéines sur les isothermes d'adsorption

Les isothermes des quatre hémoprotéines en interaction avec les LUDOX ont été faits en suivant la méthode par déplétion dans les mêmes conditions physico-chimiques (Fig. 3-3). Les conditions opératoires sont décrites dans le chapitre 7, § 3.1.2. Vis-à-vis de la même nanoparticule, les hémoprotéines de tailles différentes ne vont pas avoir le même profil d'adsorption. On remarque en effet des différences tant au niveau de la quantité maximale adsorbable m_{∞} que de la constante d'adsorption K_{ads} . Mb et Hb présentent un profil d'adsorption correspondant à un modèle de Langmuir classique tandis que HbC1 et HbAm ont un profil d'adsorption pour lequel la quantité de protéines adsorbées n'atteint pas de maximum dans les conditions expérimentales. Nous avons essayé d'aller plus loin dans l'isotherme en augmentant la concentration de protéines (ou en diminuant celle de nanoparticules). Or, dans ces conditions, un problème de reproductibilité des mesures existe. En effet, plus on avance dans l'isotherme plus la dispersion des valeurs expérimentales augmente, à un tel point qu'aucune valeur moyenne ne peut être déduite. Seule la partie avec une dispersité acceptable a donc été prise en compte.

À partir de ces valeurs expérimentales, les constantes m_{∞} et K_{ads} peuvent être obtenues. Trois réplicas ont été faits pour chaque isotherme et les valeurs moyennes des constantes sont résumées dans le tableau 3-3. Une valeur directe du nombre de protéines adsorbées par SiNPs (N) est également indiquée. Cette valeur a le double avantage d'être plus parlante conceptuellement et de tenir compte de la taille des hémoprotéines, chose qui n'est pas faite si l'on reste en quantité massique. Les valeurs de N_T sont également indiquées à titre de comparaison.

Tableau 3-3 : Constantes calculées à partir du modèle d'isotherme de Langmuir pour les quatre systèmes hémoprotéines/LUDOX mesurées en tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹ à pH7.

** Constantes approchées pour HbC1 et HbAm du fait de l'impossibilité d'atteindre la saturation.*

Protéine	m_{∞} (mg.m ⁻²)	N (prot/SiNPs)	N_T (prot/SiNPs)	K_{ads} (L.mol ⁻¹)
Mb	0,81 ± 0,1	226 ± 18	340	1,70E+05 ± 5,9E+04
Hb	2,93 ± 0,1	212 ± 3	150	1,93E+06 ± 2,34E+05
HbC1*	0,39 ± 0,1	4,7 ± 1,1	29	1,14E+06 ± 7,04E+05
HbAm*	1,48 ± 0,4	2,0 ± 0,6	14	5,75E+06 ± 1,78E+06

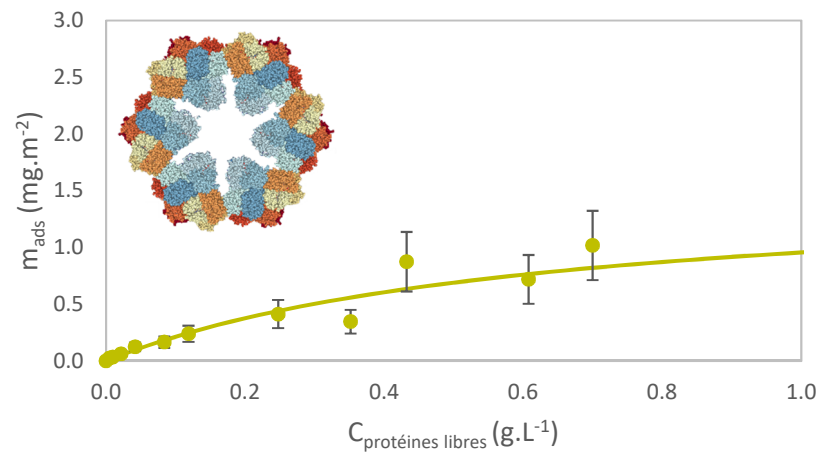
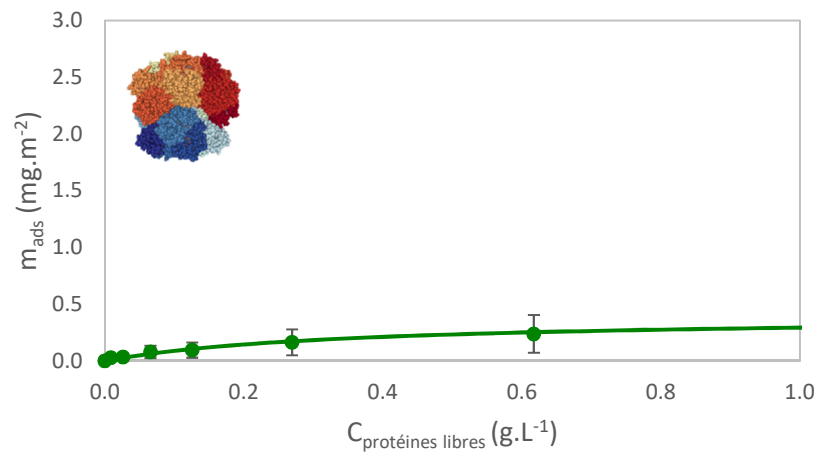
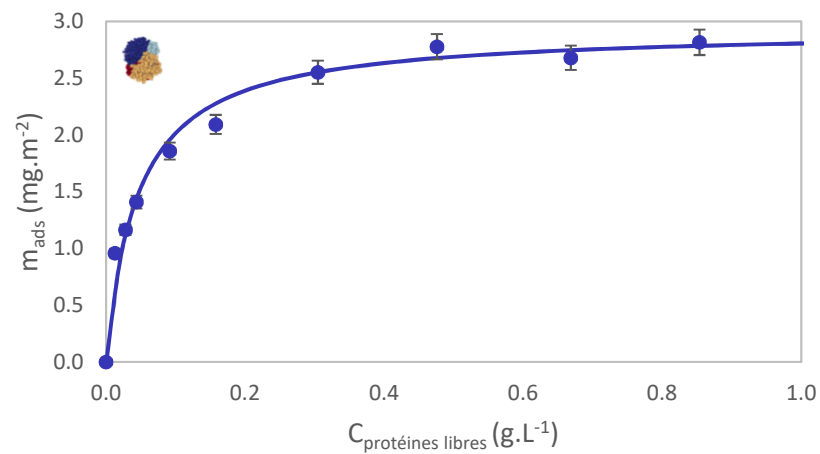
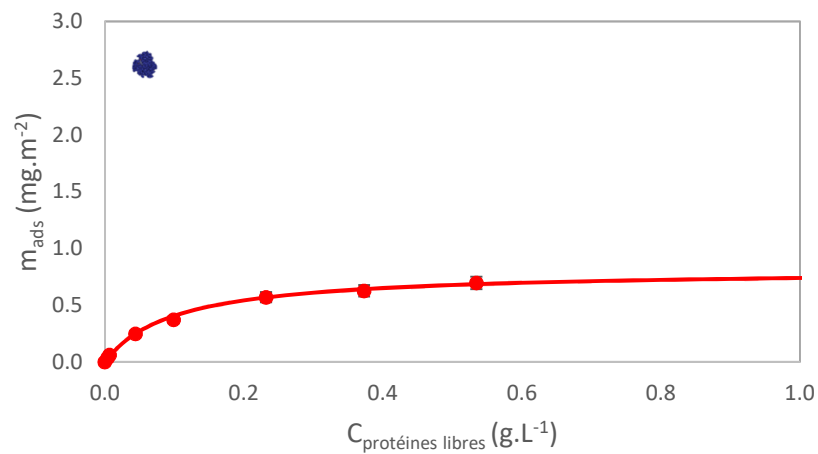


Figure 3-3 : Isothermes d'adsorption des quatre hémoprotéines en tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹ à pH7. Les points de couleur représentent différents points d'une même expérience et les courbes sont les moyennes de 3 expériences calculées selon le modèle de Langmuir. ● Mb, ● Hb, ● HbC1, ● HbAm

En comparant les constantes d'adsorption K_{ads} des quatre hémoprotéines, on constate que celles-ci varient fortement. En effet, entre la protéine la moins affine (Mb, $1,7 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) et la protéine la plus affine (HbAm, $5,8 \cdot 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) il y a un facteur 34 d'augmentation de l'affinité. Hb et HbC1 possèdent des affinités intermédiaires proches (respectivement $1,9 \cdot 10^6$ et $1,1 \cdot 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) qui sont 10 fois plus grandes que celle de Mb. La différence d'affinité entre Mb et Hb était attendue puisque des résultats similaires ont été observés par Devineau *et al.* (2013 et 2017).

Concernant les grosses protéines, aucune valeur de K_{ads} n'était connue à ce jour. L'exemple de HbC1 et HbAm nous indiquent que les protéines de taille importante ont tendance à avoir une affinité plus élevée que les petites protéines. Une explication directe peut venir du fait que les grosses hémoprotéines, qui sont des multimères de Mb, possèdent beaucoup plus de sites potentiels d'interactions. Elles ont donc une plus grande probabilité d'interaction sur la surface des SiNPs. Toutefois le fait que Hb et HbC1 possèdent la même affinité malgré leur taille nettement différente indique qu'un simple effet stochastique ne peut expliquer à lui seul cet effet de la taille des protéines.

Si l'on compare maintenant le nombre de protéines adsorbées N , on observe une forte diminution de la valeur en fonction de la taille des protéines. Il est intéressant de comparer ces valeurs avec le nombre théorique dans le cas d'un recouvrement total N_T . Pour Mb le ratio N/N_T est de 0,66 ce qui montre que, si la saturation n'est pas totale, une grande partie de la surface est recouverte. Pour Hb par contre nous observons une valeur de N supérieure à N_T ($N/N_T = 1,41$). Ceci pourrait indiquer la formation d'une multicouche. Toutefois il est plus probable que ceci soit dû aux limitations de la simulation adaptée à l'adsorption de protéines. En effet, contrairement aux objets simulés pour le calcul de N_T , Hb n'a pas une forme de sphère mais plutôt de cylindre (Lu *et al.*, 2000). Suivant l'orientation de la protéine le long de la surface, la valeur de N_T peut donc sous-estimer ou surestimer la valeur maximale réelle pour saturer la surface des SiNPs. Hb forme donc une monocouche qui sature complètement la surface.

Pour HbC1 et HbAm, le ratio N/N_T est très faible (respectivement 0,16 et 0,14) ce qui indique qu'une grande majorité de la surface n'est pas recouverte. La forte baisse de N entre les petites et les grosses protéines ne provient donc pas uniquement d'un plus fort encombrement stérique (pris en compte dans le calcul de N_T). D'autres facteurs doivent intervenir.

On observe ainsi une différence de recouvrement entre les petites et les grosses protéines. Les premières vont saturer la surface tandis que les secondes vont recouvrir la surface de façon lacunaire. Ce non recouvrement de la surface peut soulever plusieurs questions : des interactions électrostatiques répulsives inter-protéiques empêchent-elles à plus de protéines de s'adsorber ? Les

grosses protéines effectivement adsorbées parviennent-elles à recouvrir la surface de façon similaire à Mb et Hb mais au prix d'une forte déformation le long de la surface ?

1.4. Effets de la nature du tampon et du pH

Afin de mieux comprendre l'adsorption particulière de HbC1 et de HbAm, une série d'isothermes a été faite en faisant varier le milieu de mise en contact. Tous les isothermes ont été faits dans les mêmes conditions que précédemment (température ambiante, 1h d'incubation sous agitation douce) à la différence du tampon choisi. Trois conditions du milieu ont été étudiées :

- Tampon phosphate 0,1 M à pH 7 (voir § 1.3.)
- Tampon phosphate 0,1 M à pH 6
- Tampon Bis-Tris 0,1 M à pH 7

L'objectif est d'observer, ou non, un effet potentiel du pH ou de la nature du tampon utilisé sur les interactions protéines/nanoparticules. Les deux tampons comparés (tampon phosphate et tampon Bis-Tris) possèdent un pKa assez proche (respectivement 7,2 et 6,4 ; Beynon et Easterby, 1996) ce qui leur donne un pouvoir tampon dans la même gamme de pH. Ils diffèrent cependant du point de vue de leur force ionique. En effet, à concentration molaire égale, la force ionique (Eq. 3-4) du Bis-Tris est de 0,029 mol.L⁻¹ contre 0,223 mol.L⁻¹ pour le phosphate (valeurs calculées pour 100 mmol.L⁻¹, à pH 7, et à 20°C). Ainsi, bien que non considérée initialement, l'influence de la force ionique peut être étudiée en comparant les deux tampons utilisés.

$$I = \frac{1}{2} \sum_i C_i z_i^2 \quad (\text{Eq. 3-4})$$

Avec I la force ionique en mol.L⁻¹, C_i la concentration molaire de l'ion i et z_i sa valence.

Les isothermes dans les trois conditions étudiées sont représentés sur les figures 3-4, 3-5, 3-6, et 3-7 ; chaque figure se concentrant sur une hémoprotéine. Les points de couleur représentent différents points d'une même expérience et les courbes sont les moyennes de trois expériences ajustées selon le modèle de Langmuir. Les constantes calculées à partir de ces isothermes sont résumées dans le tableau 3-4.

Si l'on s'intéresse à Mb (Fig. 3-4 et Tab. 3-4), on observe à la fois un effet du pH et de la nature du tampon. On peut en effet observer que le K_{ads} augmente en passant du tampon phosphate pH7 à pH 6 (K_{ads} multiplié par 3,2) mais qu'il reste stable selon la nature du tampon. À l'inverse, N ne varie pas significativement avec le pH mais augmente nettement en passant du tampon phosphate au tampon

Bis-Tris (respectivement 226 et 297 protéines/LUDOX). Il est donc possible d'augmenter le taux de recouvrement N/N_T de Mb avec un maximum à 0,87, soit une quasi saturation.

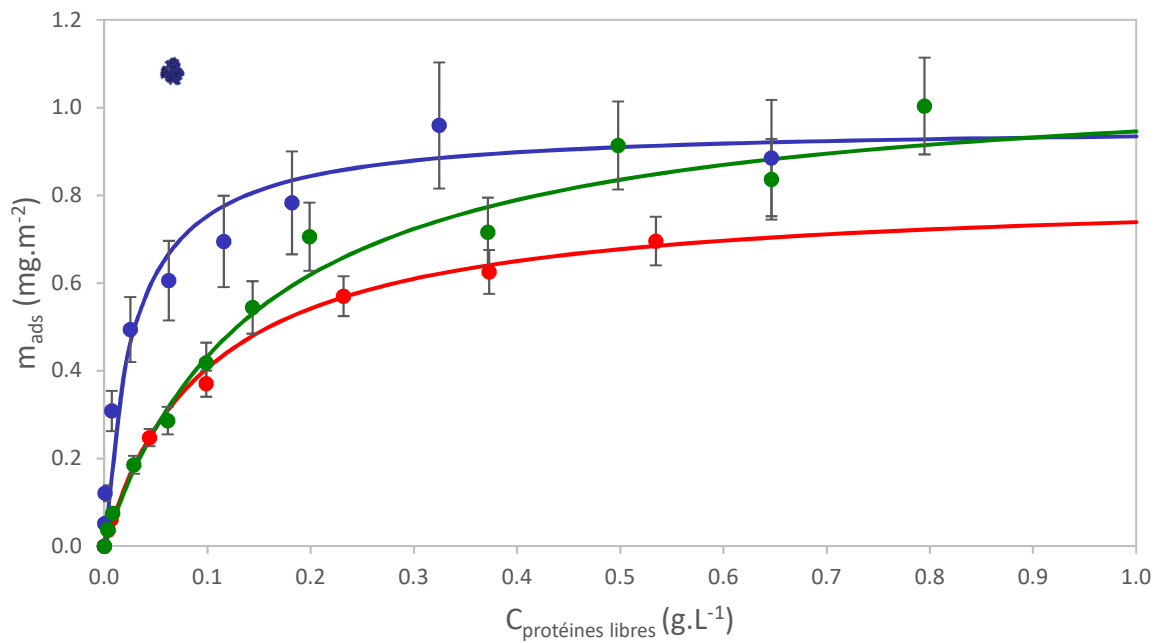


Figure 3-4 : Isothermes d'adsorption de Mb sur LUDOX TM-50.
 ● Phosphate pH 7, ● Phosphate pH 6, ● Bis-Tris pH 7

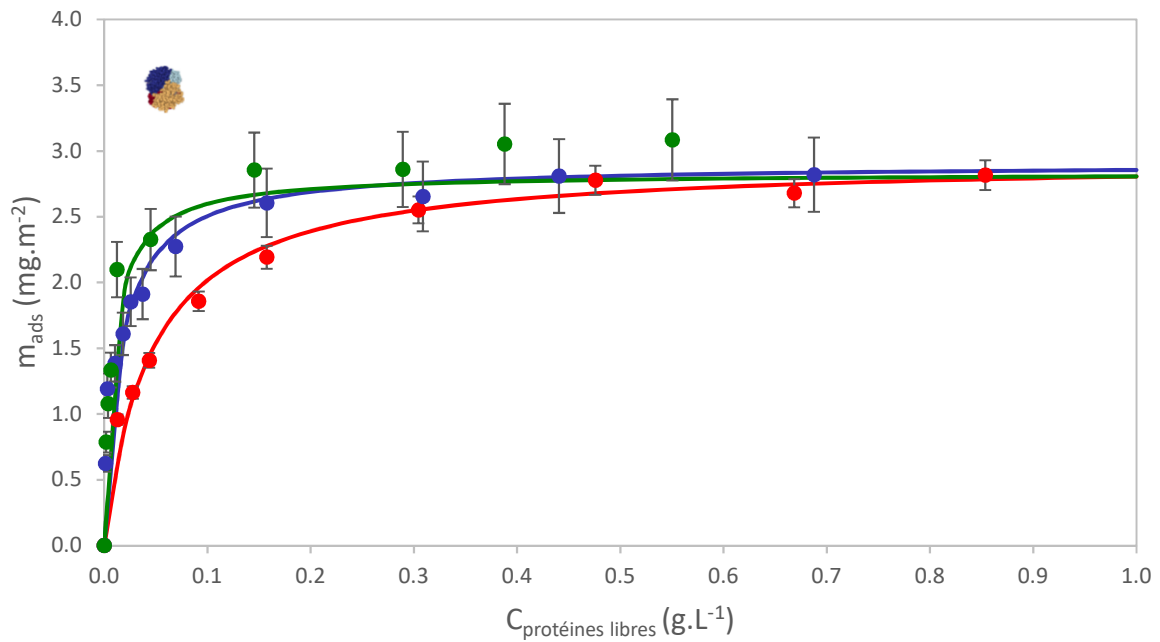


Figure 3-5 : Isothermes d'adsorption de Hb sur LUDOX TM-50.
 ● Phosphate pH 7, ● Phosphate pH 6, ● Bis-Tris pH 7

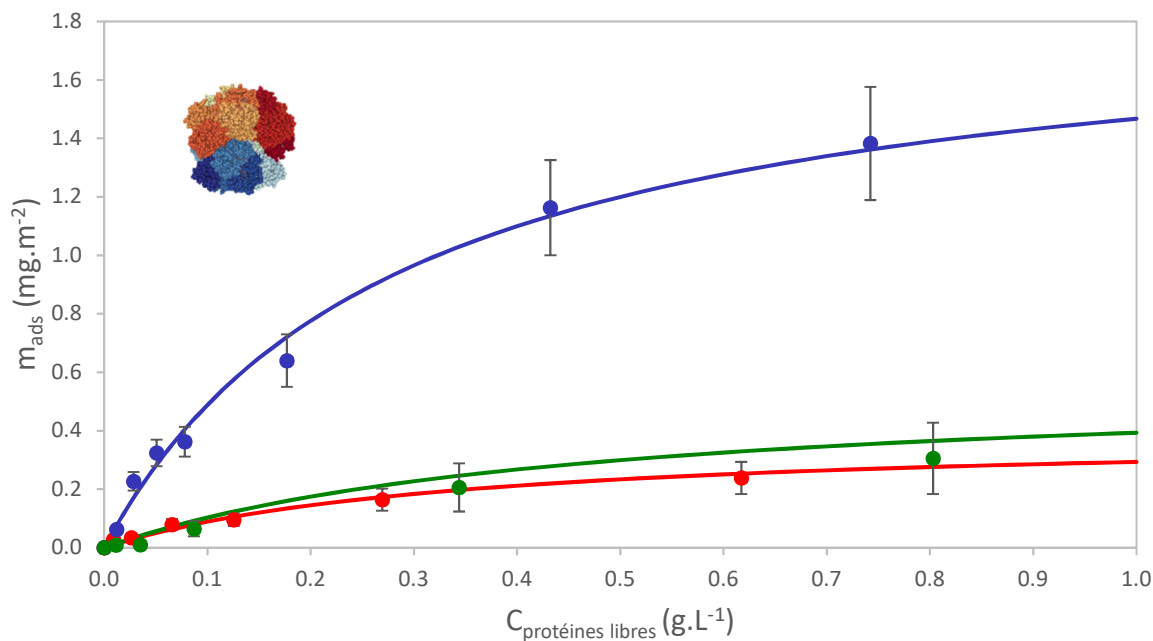


Figure 3-6 : Isothermes d'adsorption de HbC1 sur LUDOX TM-50.

● Phosphate pH 7, ● Phosphate pH 6, ● Bis-Tris pH 7

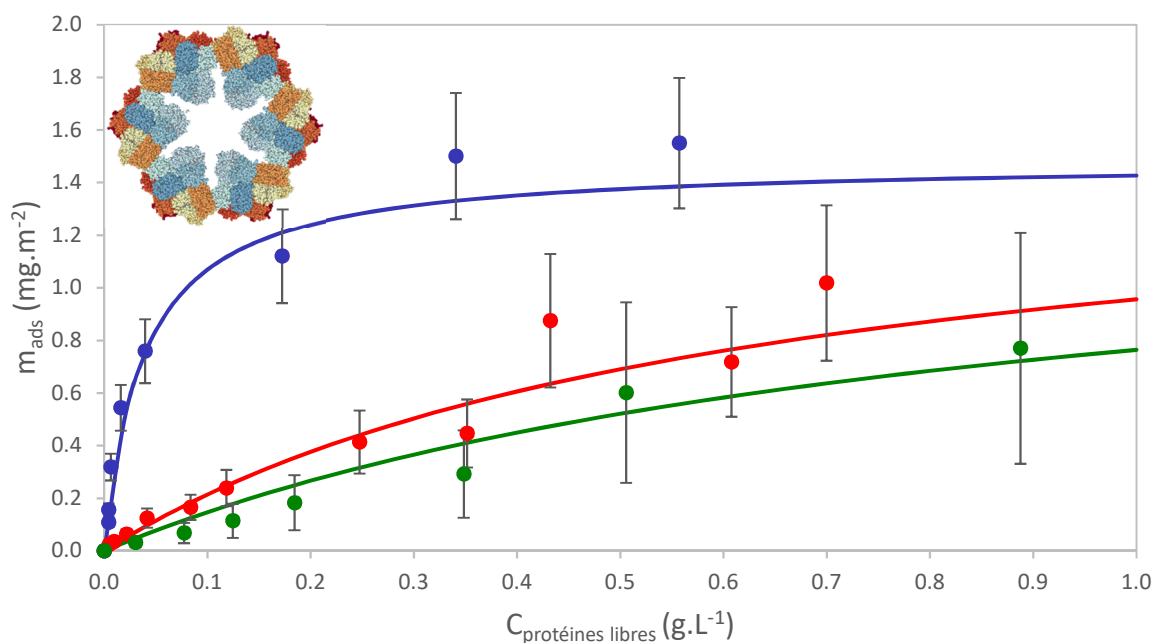


Figure 3-7 : Isothermes d'adsorption de HbAm sur LUDOX TM-50.

● Phosphate pH 7, ● Phosphate pH 6, ● Bis-Tris pH 7

Concernant Hb (Fig. 3-5 et Tab. 3-4), on ne constate aucune différence de N selon les conditions ; ceci confirme que la surface est bien saturée à environ 210 protéines/LUDOX. On observe par contre une différence au niveau du K_{ads} . En effet, la baisse du pH comme le passage en tampon Bis-Tris induisent une augmentation du K_{ads} (K_{ads} multiplié par 2,7 et 3,7 respectivement).

Tableau 3-4 : Constantes calculées à partir du modèle d'isotherme de Langmuir issues des quatre hémoprotéines étudiées dans 3 conditions de milieu.

		m_{∞} (mg.m ⁻²)	K_{ads} (L.mol ⁻¹)	N (prot/SiNPs)
Mb	Phosphate pH7	0,81 ± 0,06	1,7E+05 ± 5,9E+04	226 ± 18
	Phosphate pH 6	0,96 ± 0,14	5,4E+05 ± 1,4E+05	265 ± 40
	Bis-Tris pH 7	1,1 ± 0,12	1,2E+05 ± 1,9E+04	297 ± 32
Hb	Phosphate pH7	2,93 ± 0,05	1,9E+06 ± 2,3E+05	212 ± 3
	Phosphate pH 6	2,90 ± 0,29	4,0E+06 ± 8,4E+05	210 ± 21
	Bis-Tris pH 7	2,83 ± 0,31	7,0E+06 ± 1,8E+06	207 ± 23
HbC1	Phosphate pH7	0,39 ± 0,09	1,1E+06 ± 7,0E+05	4,7 ± 1,1
	Phosphate pH 6	1,89 ± 0,21	2,4E+06 ± 3,2E+05	22,3 ± 2,4
	Bis-Tris pH 7	0,35 ± 0,14	1,2E+06 ± 4,5E+05	9,9 ± 3,9
HbAm	Phosphate pH7	1,48 ± 0,44	5,7E+06 ± 1,8E+06	2,0 ± 0,60
	Phosphate pH 6	1,56 ± 0,24	8,3E+07 ± 1,1E+07	2,2 ± 0,32
	Bis-Tris pH 7	1,43 ± 0,82	4,1E+06 ± 2,2E+06	1,9 ± 1,07

Concernant HbC1 et HbAm (Fig. 3-6 et 3-7), aucune différence n'est observable entre les deux tampons étudiés (N et K_{ads} identiques). Les deux protéines ont par contre des profils d'adsorption très différents en fonction du pH. Pour HbC1 le passage de pH 7 à pH 6 induit un profil d'isotherme radicalement différent avec à la fois une augmentation de N et de K_{ads} . N passe ainsi de 4,7 protéines/LUDOX à pH 7 à 22,3 protéines/LUDOX à pH 6. Cette dernière valeur est proche de la quantité maximale théorique N_T qui est de 29 protéines/LUDOX. À pH 6, HbC1 est donc capable de recouvrir fortement la surface des SiNPs ($N/N_T = 0,77$). Concernant HbAm, on observe également une augmentation du K_{ads} avec la baisse du pH. Par contre, la valeur de N n'évolue pas entre le pH 7 et le pH 6 ($N \approx 2$ protéines/LUDOX) et est toujours beaucoup plus faible que la quantité théorique N_T qui est de 14.

On peut déduire de ces isothermes que le pH a un rôle considérable sur l'interaction hémoprotéines/SiNPs. Or, à pH 7 comme à pH 6, la surface des SiNPs reste chargée négativement (surface légèrement moins chargée toutefois à pH 6). Pour les protéines par contre, ces conditions de pH peuvent induire des variations électrostatiques plus importantes. En effet, bien que la charge globale des protéines soit proche de la neutralité à pH 6 et 7 (à l'exception de HbAm, chapitre 2, § 3.5.) des charges locales peuvent être présentes. En passant à pH 6, l'histidine, qui est le seul groupement ayant un pK_a situé dans cette zone de pH, passe de la forme déprotonée à la forme protonée, chargée positivement. Il s'agit cependant d'une protonation partielle des résidus histidine. En effet, selon son environnement, le pK_a du résidu histidine peut être compris entre 5 et 8 (Ohe et Kajita, 1980). Dans le cas de la aquamétyoglobine par exemple (Cocco *et al.*, 1992), sur les onze résidus histidine, six ont un pK_a compris entre 5,5 et 7. Aussi, la diminution du pH peut avoir un effet plus global sur les protéines en réorganisant le réseau électrostatique ainsi que le réseau des liaisons hydrogène (Sire *et al.*, 1997).

Cette réorganisation peut donc induire la création de zones chargées positivement à la surface des protéines et donc une meilleure adsorption sur la silice.

Néanmoins la diminution du pH ne suffit pas pour que HbAm puisse recouvrir la surface des LUDOX. Ceci s'explique par son pI particulier situé à 4,6. Ainsi, à pH 6, sa charge est encore nettement négative. Or la présence importante de charges négatives sur HbAm induit la présence de forces répulsives inter-protéiques et entre protéines et SiNPs. Afin d'obtenir un profil d'adsorption similaire aux autres protéines il aurait été nécessaire de diminuer encore le pH. Cependant, dans ce cas, des considérations liées à la stabilité des protéines ainsi qu'à la charge des SiNPs entrent en jeu.

Concernant l'effet de la nature du tampon, on peut distinguer Mb et Hb d'une part et HbC1 et HbAm d'autre part. En effet seules les premières sont impactées par cet effet. Ceci peut s'expliquer par la différence de force ionique des tampons. Il a en effet été montré que la force ionique joue un rôle dans l'adsorption des protéines sur des surfaces chargées (Strojan *et al.*, 2017). L'augmentation de la force ionique provoque une augmentation de la couche de contre-ions présents à la surface des protéines et des SiNPs. Ceci induit un écrantage qui vient s'opposer aux interactions attractives électrostatiques entre molécules de charges opposées (modèle DLVO des colloïdes chargés ; Pfeiffer *et al.*, 2014). Ici le passage en tampon Bis-Tris induit une baisse de la force ionique et donc facilite l'adsorption de Hb d'où un K_{ads} supérieur. Ces expériences montrent donc un effet probable des interactions électrostatiques sur l'adsorption de Mb et Hb.

Concernant HbC1 et HbAm par contre, aucun effet de la nature du tampon n'a pu être observé. La force ionique semble donc ne pas jouer de rôle ici. Il est possible que des facteurs sans liens avec les interactions électrostatiques entrent en jeu lors de l'adsorption de ces grosses protéines.

2. Isothermes d'adsorption par calorimétrie

2.1. Titration calorimétrique isotherme

Afin de caractériser plus qualitativement les interactions ayant lieu entre hémoprotéines et SiNPs, des expériences de titration calorimétrique isotherme (ITC) ont été faites. L'ITC est une méthode directe d'analyse. Elle permet non seulement d'obtenir des informations sur les constantes liées à l'adsorption (équivalents de N et de K_{ads} que nous appellerons respectivement N_i et K_i) mais donne également accès aux données thermodynamiques de la réaction entre protéines et nanoparticules. La chaleur au sein du système est en effet mesurée tout au long de la titration et les variations d'enthalpie ΔH , d'enthalpie libre ΔG , et indirectement d'entropie ΔS sont ainsi déterminées. Il est important de noter que cette méthode ne permet de titrer que des événements qui induisent une variation de chaleur. Des

événements athermiques (ou dont la somme des variations de chaleur s'annule) ne seront donc pas mesurés.

L'adsorption des différentes hémoprotéines sur la surfaces des SiNPs LUDOX a donc été suivie par ITC. Comme précédemment, deux conditions de pH ont été étudiées (pH 6 et pH 7). Les données brutes des échanges de chaleur et les courbes de titration correspondantes sont représentées en figure 3-8 pour les isothermes à pH 7 et figure 3-9 pour celles à pH 6.

La première différence frappante qui existe est celle entre la titration des petites hémoprotéines (Mb et Hb) et des grosses hémoprotéines (HbC1 et HbAm). En effet, la réaction d'adsorption est exothermique (pics négatifs) pour les premières et endothermique (pics positifs) pour les secondes. Il y a toutefois une exception dans le cas des grosses hémoprotéines : HbAm en tampon phosphate pH6. On observe dans ce cas des pics exothermiques. Les témoins de dilution ont été faits et ce phénomène est causé par la dilution de la protéine. La cause la plus probable est une dissociation du dodécamère en deux hémamères voire en douze protomères (Rousselot *et al.*, 2006). Ce phénomène de dissociation exothermique est également observable pour Hb mais uniquement lors des premiers ajouts. Ceci est à relier à la dissociation du tétramère en dimère qui a lieu dans des concentrations micromolaires ($K_d = 4.10^{-6} \mu\text{mol}^{-1}$; Pin *et al.*, 1990). Dans les deux cas, une soustraction du signal des témoins de dilution permet d'éliminer l'effet de la dissociation et les constantes peuvent être calculées. Il est à noter que l'effet de la dilution sur la dissociation de HbAm est bien plus fort à pH 6 qu'à pH 7 d'où la différence qualitative de comportement observée lors de son adsorption dans les deux conditions.

Cette différence thermodynamique fondamentale se retrouve dans les valeurs de ΔH et ΔS obtenues à partir des différentes titrations (Tab. 3-5 et 3-6). On remarque ainsi que les petites protéines vont avoir des adsorptions guidées par la variation d'enthalpie (l'entropie tendant à diminuer dans le système) tandis que les grosses protéines ont au contraire un ΔH allant contre l'adsorption. Dans ces cas-ci la variation d'entropie ΔS est suffisante pour provoquer l'adsorption spontanée des grosses protéines sur les SiNPs.

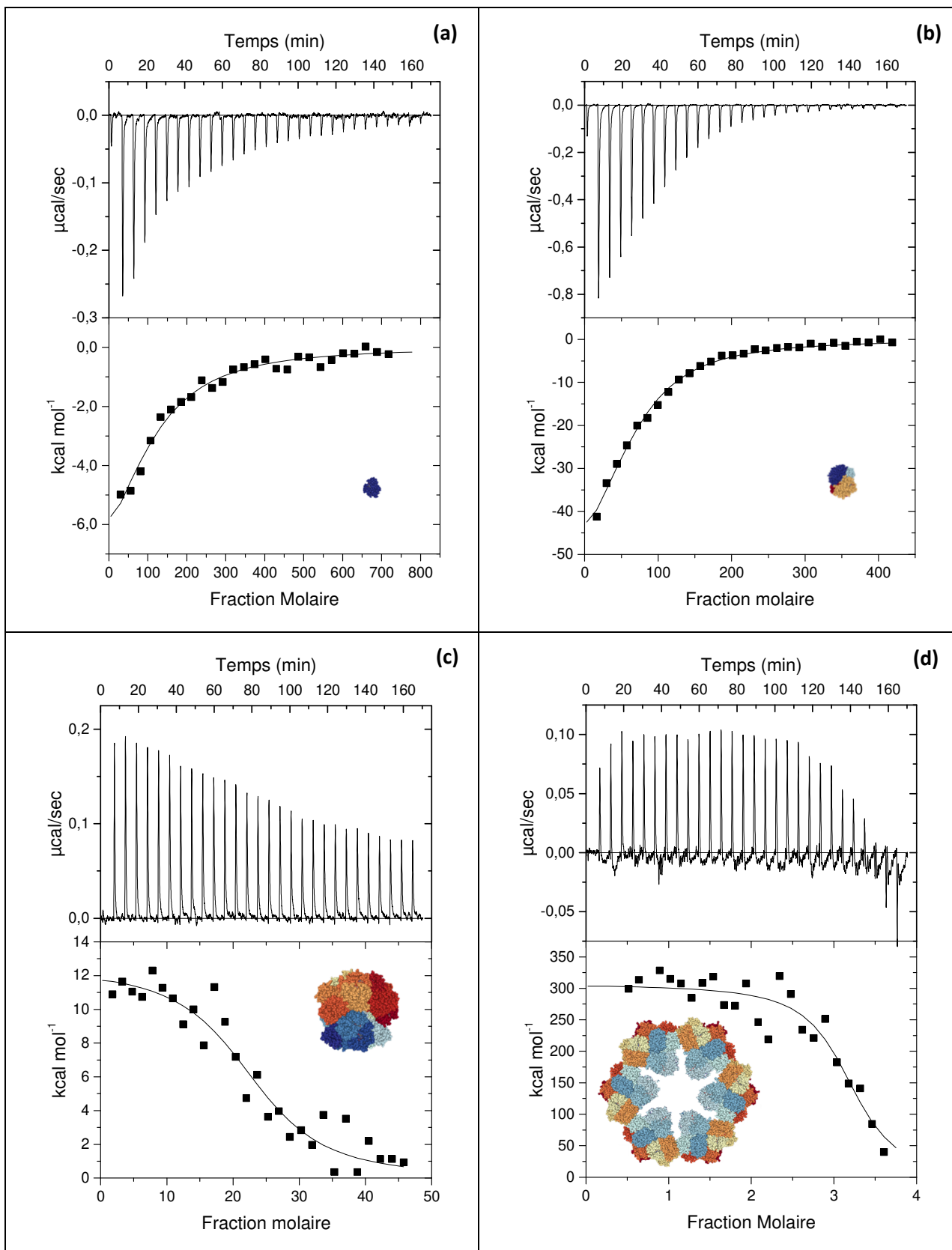


Figure 3-8 : Titration calorimétrique isotherme d'hémoprotéines dans une suspension de LUDOX TM-50 en tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7. Haut : données brutes de la variation de chaleur en fonction du temps. Bas : énergie d'interaction par mole de protéine en fonction de la fraction molaire ($[\text{protéine}]/[\text{SiNPs}]$). (a) Mb ; (b) Hb ; (c) HbC1 ; (d) HbAm.

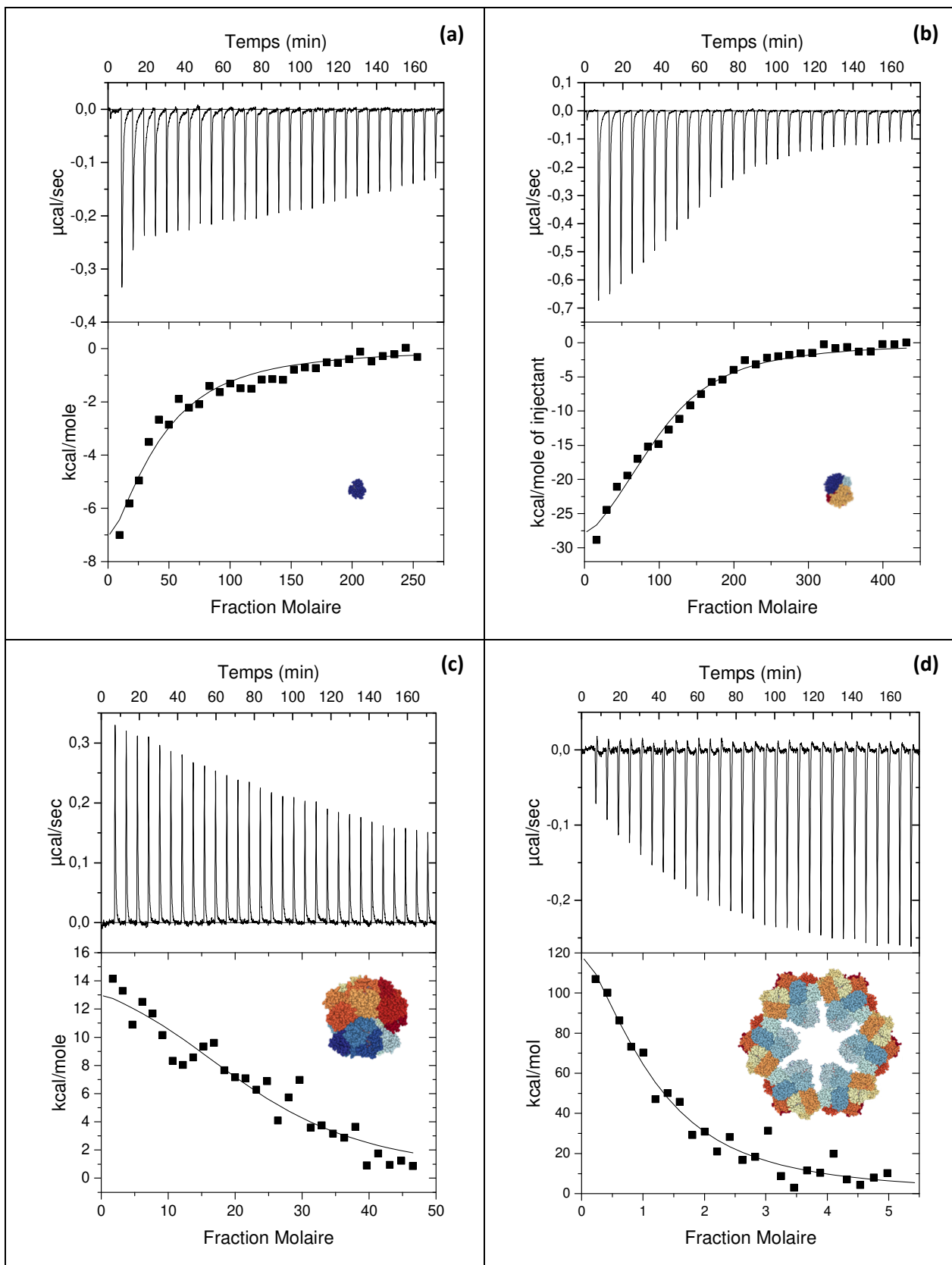


Figure 3-9 : Titration calorimétrique isotherme d'hémoprotéines dans une suspension de LUDOX TM-50 en tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6. Haut : données brutes de la variation de chaleur en fonction du temps. Bas : énergie d'interaction par mole de protéine en fonction de la fraction molaire ($[\text{protéine}]/[\text{SiNPs}]$). (a) Mb ; (b) Hb ; (c) HbC1 ; (d) HbAm.

Tableau 3-5 : Constantes thermodynamiques de la titration calorimétrique isotherme d'hémoprotéines adsorbées sur des LUDOX TM-50 en tampon phosphate pH 7. Chaque constante est la moyenne d'au moins 3 isothermes.

pH 7	N _i (prot/SiNPs)	K _i (L.mol ⁻¹)	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	-TΔS (kcal.mol ⁻¹)	ΔG (kcal.mol ⁻¹)
Mb	87,7 ± 24,1	2,9E+05 ± 1,9E+05	-30,6 ± 2,5	0,6 ± 2,8	-7,2 ± 0,4
Hb	73,4 ± 8,39	5,9E+05 ± 1,4E+05	-54,7 ± 8,2	46,9 ± 8,4	-7,7 ± 0,2
HbC1	23,0 ± 1,7	4,6E+06 ± 2,5E+06	18,7 ± 2,5	-27,6 ± 2,9	-8,9 ± 0,4
HbAm	3,2 ± 0,1	3,7E+07 ± 1,6E+07	305,9 ± 9,3	-316,4 ± 9,6	-10,5 ± 0,3

Tableau 3-6 : Constantes thermodynamiques de la titration calorimétrique isotherme d'hémoprotéines adsorbées sur des LUDOX TM-50 en tampon phosphate pH 6.

pH 6	N _i (prot/SiNPs)	K _i (L.mol ⁻¹)	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	-TΔS (kcal.mol ⁻¹)	ΔG (kcal.mol ⁻¹)
Mb	32,2 ± 9,6	1,6E+05 ± 4,9E+04	-14,9 ± 5,2	7,9 ± 5,4	-7,7 ± 0,2
Hb	95,9 ± 1,6	6,8E+05 ± 1,1E+05	-37,1 ± 2,8	29,2 ± 2,9	-7,8 ± 0,1
HbC1	23,7 ± 1,9	8,1E+05 ± 3,2E+05	16,2 ± 2,1	-24,1 ± 2,4	-7,9 ± 0,3
HbAm	1,7 ± 0,6	5,2E+06 ± 3,9E+06	238,4 ± 113,1	-247,3 ± 113,7	-9,0 ± 0,6

On considère que lorsque la réaction est guidée par des variations d'enthalpie, l'interaction qui en est à l'origine est d'ordre électrostatique. Inversement, lorsque la réaction est guidée par des variations d'entropie, le phénomène moteur de la réaction est généralement dû à des interactions hydrophobes (Atkins et De Paula, 2006). Les interactions hémoprotéines/SiNPs étudiées ne semblent donc pas être guidées par les mêmes forces. Ainsi, les petites protéines interagissent sur la surface de silice de façon classique vis-à-vis d'une surface chargée (interactions électrostatiques) tandis que les grosses protéines interagissent de façon hydrophobe.

Une première hypothèse pour expliquer ce comportement particulier serait une différence d'hydrophobicité intrinsèque aux protéines. En effet, suivant sa séquence primaire, chaque protéine possède un caractère plus ou moins hydrophobe. Une estimation de l'hydrophobicité des protéines peut d'ailleurs être faite par le calcul du nombre GRAVY (grand average of hydropathicity) à partir de la séquence primaire des protéines (Kyte et Doolittle, 1982). Les séquences de Mb, Hb, et HbC1 sont connues et sont référencées dans la PDB (références respectives de 1YMB, 1QPW, et 1YHU). Par contre, pour HbAm, les séquences des nombreuses globines et linkers ne sont pas entièrement connues. Toutefois, un séquençage de cinq globines a été fait (Chabasse, 2005).

Ces différentes séquences ont été utilisées pour calculer les nombres GRAVY de chaque protéine (calculs faits sur ExpASY). Les nombres GRAVY sont de -0,40 (Mb), -0,07 (Hb), 0,03 (HbC1), et -0,01 (HbAm). Le nombre GRAVY de la plupart de protéines est compris entre -2 et +2, les protéines les plus hydrophobes ayant un nombre positif. On remarque ainsi une différence du nombre GRAVY entre Mb et les trois hémoglobines. Ces dernières possèdent donc davantage de résidus apolaires. Or, afin de

minimiser le contact avec des molécules d'eau, ces résidus peuvent chercher à s'adsorber à la surface de la silice. Cette adsorption induit alors un fort déplacement de la couche d'eau présente sur les SiNPs, d'où l'augmentation d'entropie. Toutefois, aucune différence d'hydrophobicité entre Hb et les deux grosses hémoglobines ne peut être observée pour expliquer les différences thermodynamiques qui existent lors de leur adsorption respective. Cependant, comme les résidus hydrophobes sont généralement regroupés en cluster au sein de la structure protéiques (Callebaut *et al.*, 1997), cette augmentation de l'hydrophobicité pourrait être le signe de la présence de régions hydrophobes localisées dans la protéine qui vont interagir directement avec la surface.

Il faut également rappeler que l'entropie possède deux composantes : l'entropie du solvant et l'entropie des (macro)molécules présentes en solution. Un phénomène d'adsorption conduit généralement à un gain d'entropie des molécules du solvant dû à l'expulsion des ions et des molécules d'eau ordonnées à la surface des molécules en interaction (Sprenger et Pfaendtner, 2016). Cependant, le fait, dans le cas de Mb et Hb, que l'entropie globale du système diminue est le signe que l'entropie des protéines joue également un rôle important lors de l'adsorption. Or une diminution d'entropie durant un phénomène d'adsorption est généralement le signe d'une baisse du degré de liberté (DDL) des molécules adsorbées (Ben-Tal *et al.*, 2000). Cette baisse de DDL a pu être observée expérimentalement chez Mb en comparant la dynamique de la protéine libre et de la protéine adsorbée (Devineau *et al.*, 2013).

Une deuxième explication peut alors être donnée. Les hémoglobines sont des assemblages protéiques très structurés, avec des nombreuses liaisons entre leurs chaînes peptidiques. La structure tétramérique de l'hémoglobine humaine est par exemple assurée par des liaisons ioniques et des interactions hydrophobes (Perutz, 1970). Aussi, en plus de ces interactions inter-chaînes classiques, la structure de HbC1 et de HbAm est assurée par de multiples ponts salins formés par des cations divalents (Flores *et al.*, 2005 ; Rousselot *et al.*, 2006). Les globines de ces grosses hémoglobines possèdent donc des DDL nettement plus faibles que les globines de Mb ou de Hb. En d'autres termes, les multiples liaisons formées pour assurer la structure quaternaire de HbC1 et HbAm diminuent fortement la dynamique des globines qui la constitue. Ainsi, si l'adsorption de Mb et Hb peut induire une forte diminution de leur dynamique (ce qui peut être constaté par les valeurs positives de $-\Delta S$), HbC1 et HbAm ne montrent pas de baisse de leur dynamique qui est déjà très basse.

L'effet de la préstructuration d'une molécule présente des analogies avec l'effet chélate : pour des molécules présentant de multiples sites d'interactions (inter et intramoléculaires), la présence de liaisons préexistantes fait disparaître la pénalité entropique associée à la formation d'une nouvelle liaison. L'interaction est donc favorisée thermodynamiquement (Hunter et Tomas, 2003 ; Camara-

Campos *et al.*, 2006). L'effet chélate est vu classiquement comme étant de nature purement entropique. Toutefois, cet effet est inclus dans le cadre plus général de la coopérativité qui peut être de nature entropique comme enthalpique. Ainsi le concept d'effet chélate enthalpique a également été développé (Searle *et al.*, 1996). Appliqué ici, un effet chélate classique (entropique) de HbC1 et HbAm expliquerait à la fois leur forte affinité par rapport aux petites protéines, et la nature entropique des forces régissant l'adsorption.

Concernant les variations d'enthalpie, ΔH (Tab. 3-5 et 3-6), celles-ci correspondent aux quantités d'énergie qui sont mises en jeu lors de la réaction. Mb et Hb possèdent des valeurs négatives, signe que, globalement, des liaisons se sont formées dans le système. Il s'agit certainement de liaisons formées entre les globines et la surface. On constate ici que le ΔH de Hb est environ deux fois plus faible que celui de Mb, donc que deux fois plus de liaisons se sont formées. Or, dans l'hypothèse où Hb est un tétramère de Mb, chaque globine issue de Hb, en interaction avec la surface, possèdera la même force de liaison que Mb. On peut donc estimer que 2 des 4 globines que contient Hb interagissent avec la surface. Hb étant composé de deux sous-unités α et deux sous-unités β , ceci peut éventuellement indiquer qu'un seul type de sous-unité s'adsorbe.

Pour HbC1 et HbAm, les valeurs de ΔH sont positives. Ceci est le signe que, globalement, des liaisons ont été rompues dans le système. Or, dans notre contexte, l'adsorption de ces protéines indique que des liaisons se sont formées avec la surface de la silice. Le fait que, dans l'ensemble, plus de liaisons aient été rompues que créées indique que ces protéines subissent une déstructuration causée par l'adsorption. En effet, la déstructuration causée par la dilution a déjà été soustraite du signal calorimétrique. Les ΔH de HbC1 sont légèrement positifs (environ 17 kcal.mol⁻¹ à pH 6 comme à pH 7). Ceci signifie qu'un nombre limité de liaisons sont rompues. À l'inverse, HbAm possède un ΔH très élevé (238 et 306 kcal.mol⁻¹ à pH 6 et pH 7 respectivement). Une déstructuration forte de la protéine est envisageable. Comme dit précédemment, HbAm peut se dissocier en 2 hexamères voire en 12 protomères. Plusieurs cas de figure liés à l'adsorption sont ainsi possibles (Fig. 3-10). Cependant, aux vues des données ITC, l'adsorption des protomères peut être privilégiée. La rupture des liaisons peut être due à l'amplification de la dissociation ainsi qu'à une déstructuration des sous-unités adsorbées. Il n'est cependant pas possible en l'état d'établir la structure de HbAm adsorbée.

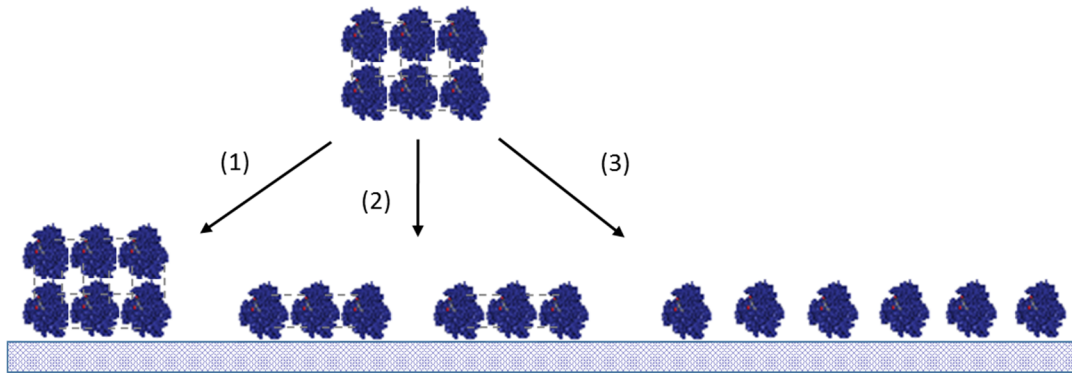


Figure 3-10 : Schéma simplifié représentant la structure de HbAm adsorbée à la surface de SiNPs. HbAm a une structure en bicouche (1) et peut se dissocier en deux hexamères (2) ou en douze protomères (3). Suivant le type de dissociation, l'adsorption peut donc se faire sous ces trois formes. Toutefois, au regard du nombre de globines en interaction, la conservation de la forme native semble peu probable.

Il est à noter que les constantes thermodynamiques obtenues ici sont très proches entre les deux conditions de pH (Fig. 3-11). On ne constate donc pas d'impact significatif du pH sur les constantes thermodynamiques de l'adsorption, ce qui n'est pas le cas des constantes N_i et K_i qui seront analysées dans le paragraphe suivant (§ 2.2.). On peut toutefois remarquer la forte augmentation de l'incertitude de valeurs de HbAm à pH 6. Ceci peut être dû à la dissociation des protéines qui rend le signal imprécis.

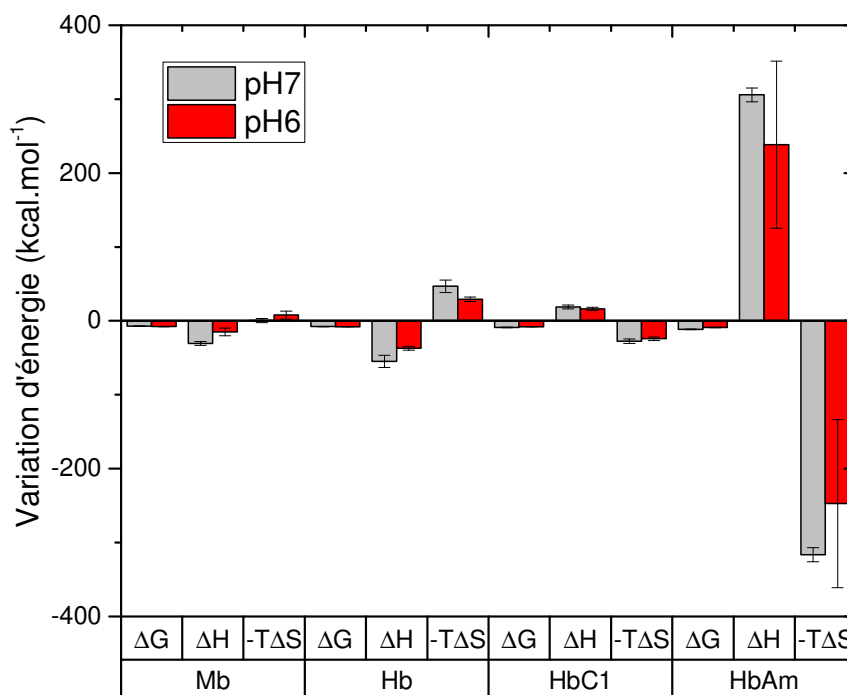


Figure 3-11 : Représentation comparant les valeurs thermodynamiques à pH 7 et à pH 6 indiquées dans les tableaux 3-5 et 3-6.

2.2. Comparaison avec les isothermes par déplétion

Toutes les adsorptions étudiées ici possèdent une enthalpie libre ΔG négative (Tab. 3-5 et 3-6). Le ΔG est directement lié à la constante d'association K_I par la relation de Gibbs-Helmoltz (Eq. 3-5).

$$\Delta G = -RT \ln(K_I) \quad (\text{Eq. 3-5})$$

Avec R la constante des gaz parfaits et T la température.

On observe ainsi, comme avec les isothermes par déplétion (Tab. 3-3), une tendance vers l'augmentation de l'affinité avec la taille des protéines. Les valeurs de K_I et de K_{ads} sont d'ailleurs remarquablement proches malgré l'utilisation de deux méthodes fondamentalement différentes. Ceci confirme donc que plus la taille d'une protéine est grande, plus son affinité vis-à-vis d'une surface de silice est élevée.

Pour ce qui est de la quantité maximale de protéines adsorbées, par contre, les différences entre N_I et N sont très fortes (Tab. 3-7). Les petites protéines Mb et Hb possèdent des valeurs de N_I correspondant à une fraction seulement de la valeur de N. En effet, en moyenne seulement 40% des protéines adsorbées sont détectées par ITC. Nous avons testé la possibilité que le mode d'ajout des protéines (multiples ajouts pour l'ITC contre ajout unique pour l'isotherme par déplétion) influence le profil de l'isotherme. Il n'en est rien pour Mb comme pour Hb (données non montrées ici). Ces différences de valeurs indiquent donc qu'une part conséquente (plus de la moitié) des hémoprotéines sont adsorbées par des phénomènes athermiques (ou thermiquement trop faibles pour être détectés). Ce phénomène a déjà été observé notamment pour l'adsorption de protéines sur de l'hydroxyapatite (Goobes et al., 2006). La raison sous-jacente pourrait être qu'il existe à la surface deux types de sites de fixation : des sites qui ont un ΔH mesurable et qui sont recouverts en premier et des sites qui n'ont pas de chaleur d'adsorption mesurable. Cette interprétation empirique permet de résoudre mathématiquement ce problème mais ne permet pas d'expliquer ce qui différencie les deux types de sites de fixation. L'interprétation physique de cette sous-estimation de la quantité de protéines adsorbées n'est donc toujours pas établie. Cependant il est intéressant de noter que ce n'est pas un cas unique.

Pour les grosses hémoglobines, HbC1 et HbAm, il n'y a pas de différence significative entre N_I et N (à l'exception de HbC1 à pH 7). Les données montrent d'ailleurs une certaine reproductibilité entre les deux méthodes. Dans le cas de HbC1 à pH 7, alors que l'isotherme par déplétion montrait une fixation en protéines très éloignée de la saturation théorique, l'isotherme par ITC indique une quantité de protéines adsorbables très proche de la quantité théorique maximale ($N < N_I \approx N_T$, Tab. 3-8). Ceci montre que la difficulté rencontrée lors des expériences d'isothermes par déplétion de HbC1 et HbAm

à pH 7 (impossibilité d'atteindre le plateau de l'isotherme due à la dispersion des valeurs mesurées) est en partie due à la méthode en elle-même. Il a ainsi déjà été observé que la centrifugation pouvait avoir un impact sur la composition de la couronne de protéines (Docter *et al.*, 2015). La centrifugation peut être trop déstabilisante pour des protéines ayant une faible force d'interaction sur la surface.

Tableau 3-7 : Comparatif des valeurs de N_i et de N des isothermes obtenus à pH 7 et à pH 6.

	pH 7			pH 6			Théorique
	N_i (prot/SiNPs)	N (prot/SiNPs)	N_i/N	N_i (prot/SiNPs)	N (prot/SiNPs)	N_i/N	N_T (prot/SiNPs)
Mb	87,7 ± 24,1	226 ± 18	0,39	32,2 ± 9,6	265 ± 40	0,12	340
Hb	73,4 ± 8,39	212 ± 3	0,35	95,9 ± 1,6	210 ± 21	0,46	150
HbC1	23,0 ± 1,7	4,7 ± 1,1	4,89	23,7 ± 1,9	22,3 ± 2,4	1,06	29
HbAm	3,2 ± 0,1	2,1 ± 0,60	1,52	1,7 ± 0,6	2,0 ± 0,32	0,85	14

Cette explication est valable pour HbC1 qui peut donc recouvrir totalement la surface de la nanoparticule même à pH 7. Pour HbAm par contre, la méthode de mesure ne semble pas être en cause dans l'impossibilité de saturer la surface. Or, dans nos conditions opératoires, HbAm semble subir une dissociation en 2 hexamères et/ou en 12 protomères. Dans ce dernier cas le nombre de protéines adsorbées (qui est d'environ 2 par SiNPs) serait alors multiplié par 12, soit environ 24 protomères de HbAm adsorbées aux LUDOX. Le poids moléculaire de ces protomères étant d'environ 200 kDa (Zal *et al.*, 1997), le nombre théorique maximal de protéines adsorbables sur les LUDOX est donc compris entre celui de HbC1 ($N_T = 29$) et celui de Hb ($N_T = 150$). Ainsi, même dans l'hypothèse d'une dissociation totale de HbAm en protomères, le recouvrement de la surface serait partiel. Il doit donc exister d'autres facteurs spécifiques à HbAm pour expliquer ce non-recouvrement apparent.

HbAm possède deux particularités par rapport aux autres hémoprotéines : son pI et sa structure quaternaire. L'impact de son pI a été traité précédemment (§ 1.4.) et, pour des raisons de stabilité protéique, il semble difficile d'approfondir l'analyse. Sa structure quaternaire est également particulière puisqu'elle possède une forme en bicouche hexagonale (Rousselot *et al.*, 2006). Cette structure, ainsi que celles des hexamères et des protomères, sont différentes de celles des autres protéines. Or il est possible que la saturation de la surface des SiNPs soit obtenus par le dépliement de ces structures le long de la surface. Afin de tester cette hypothèse, l'étude de l'impact structural de l'adsorption des hémoprotéines sur les SiNPs sera effectuée par la suite.

3. Dichroïsme circulaire

3.1. Spectres Dichroïques des SiNPs et des hémoprotéines

Afin d'estimer l'impact de l'adsorption des hémoprotéines sur leur structure, des expériences de dichroïsme circulaire (DC) ont été effectuées. Les hémoprotéines étudiées ici sont des protéines globulaires constituées majoritairement d'hélices α (Antonini et Brunori, 1971). Les spectres de DC des quatre hémoprotéines (Fig. 3-12) montrent d'ailleurs des profils très similaires entre eux et caractéristiques de structures en hélices α .

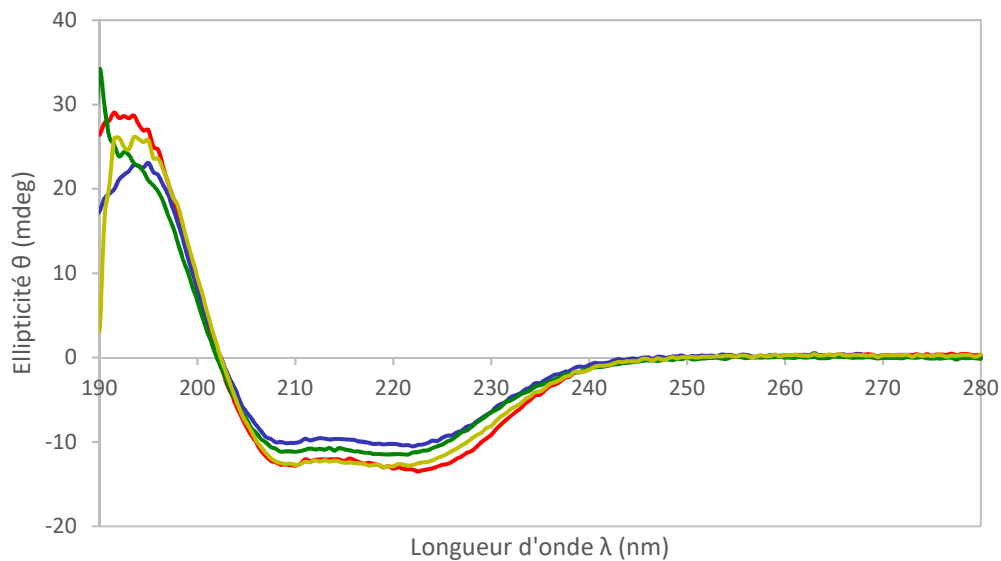


Figure 3-12 : Spectres de DC des 4 hémoprotéines diluées en tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ à pH 7. $C_{\text{globines}} = 3 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$. ● Mb, ● Hb, ● HbC1, ● HbAm.

Il existe en effet trois bandes caractéristiques des hélices α . Pour les hémoprotéines étudiées ici, ces bandes sont centrées respectivement à 192, 208 et 222 nm. Les bandes à 192 et 208 nm correspondent aux deux voies possibles de la transition électronique $\pi \rightarrow \pi^*$ impliquée dans les liaisons peptidiques (respectivement polarisation perpendiculaire et polarisation parallèle) tandis que la bande à 222 nm correspond à la transition $n \rightarrow \pi^*$ (Holzwarth et Doty, 1965 ; Cooper et Woody, 1990).

Si, au-delà de 200 nm, l'ellipticité mesurée est stable et reproductible, ceci n'est pas le cas entre 190 et 200 nm. La limite technique du dichrographe utilisé semble ici atteinte (hauts voltages à saturation, chapitre 7, § 3.4.). Ainsi, la bande à 192 nm est trop variable pour pouvoir être analysée. Des mesures plus poussées en synchrotron auraient pu être utilisées pour réellement quantifier l'intensité de ce pic. Nous nous concentrerons donc par la suite sur les bandes à 208 et 222 nm.

L'intensité du signal de DC dépend de la quantité de structures secondaires présentes dans l'échantillon. Ainsi, afin d'être homogène, la concentration protéique est rapportée ici en mole de globines et non pas en mole de protéines. Pour rappel, il y a 1 globine dans Mb, 4 dans Hb, 24 dans HbC1 et 144 dans HbAm. On obtient ainsi des spectres d'intensités proches (Fig. 3-12). Toutefois, du fait des incertitudes sur les concentrations protéiques (chapitre 2, § 3.6.) ainsi que de la présence de légères différences structurales, les spectres de DC ne sont pas superposables. Ceci n'est pas un problème car on cherche à comparer, pour une même protéine, sa forme libre en solution et sa forme adsorbée sur des SiNPs.

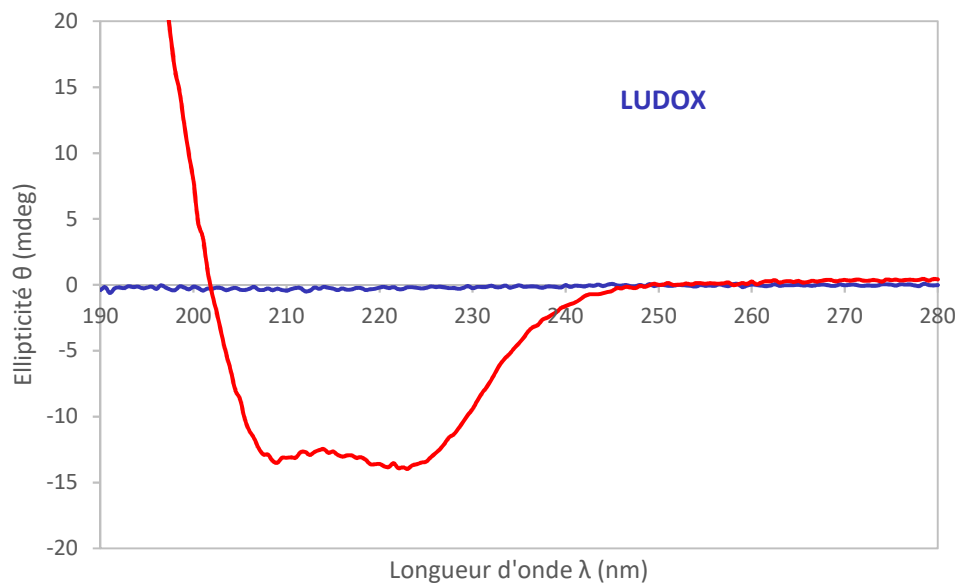


Figure 3-13 : Spectres de DC des LUDOX seules ($C_{SiNPs} = 10 \text{ g.L}^{-1}$) et de deux échantillons intercalés (LUDOX seules et Mb seules, $C_{Mb} = 3 \mu\text{mol.L}^{-1}$) en milieu tamponné (phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7).

Lorsque des techniques de spectroscopie sont utilisées, la diffusion de la lumière par des NPs en solution peut altérer la mesure (chapitre 4, § 1.2.). Pour s'assurer qu'aucun effet de ce type n'affecte la mesure, des tests ont été entrepris : mesure de l'ellipticité des LUDOX seules (Fig. 3-13), mesure de deux échantillons intercalés (un de Mb seules et un de LUDOX seules, Fig. 3-13) et mesure d'un mélange Hb/SiNPs (Sigma) dans des conditions où aucune protéine n'est adsorbée (Devineau, 2013). Aucun de ces témoins n'a montré d'interférence des SiNPs sur le spectre des protéines libres en solution.

3.2. Spectres de DC des mélanges hémoprotéines/LUDOX

Après avoir mesuré les signaux dichroïques des hémoprotéines et des LUDOX pris séparément, des spectres de DC de mélanges ont été mesurés. La concentration en monomères d'hémoprotéine reste constante à $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et la concentration en LUDOX est calculée à partir des isothermes d'adsorption

propres à chaque système. La condition souhaitée étant d'avoir une nette majorité de protéines adsorbées, un excès de SiNPs a été utilisé à des concentrations allant de 1 à 20 g.L⁻¹. *In fine*, les pourcentages de protéines adsorbées estimés furent les suivants : Mb : 80%, Hb : 90%, HbC1 : 70%, HbAm : 70%. Les spectres de DC de tous les systèmes étudiés sont représentés sur la figure 3-14. Chaque spectre représenté ici a été sélectionné pour être le plus représentatif des répliques effectués.

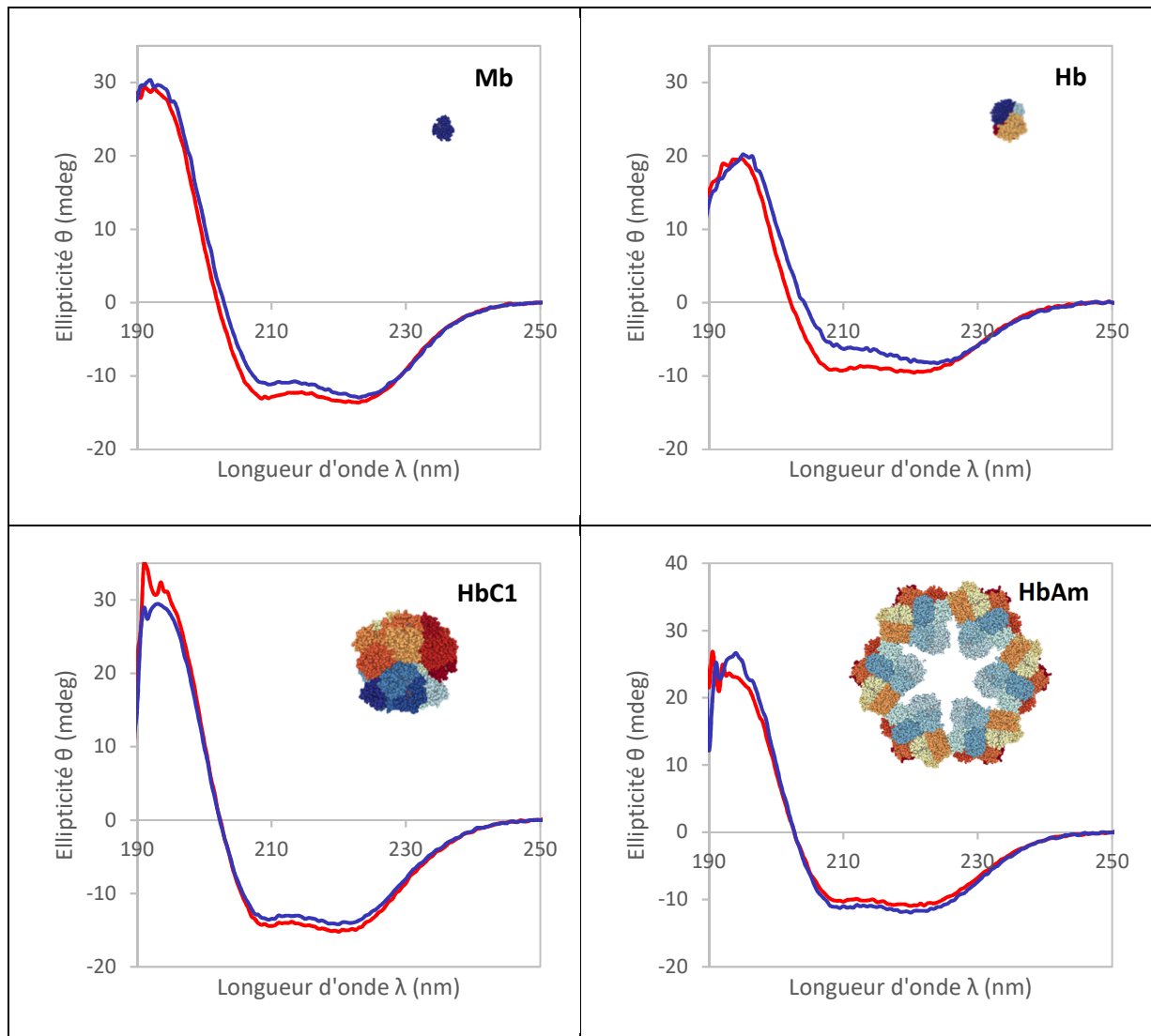


Figure 3-14 : Spectres de DC des quatre hémoprotéines adsorbées sur des LUDOX en tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pH 7. $C_{\text{globines}} = 3 \mu\text{mol.L}^{-1}$. C_{SiNPs} variable. — protéines libres, — protéines adsorbées sur LUDOX.

On remarque immédiatement que l'allure du spectre de DC ne change pas avec l'adsorption des hémoprotéines sur des LUDOX et que le spectre caractéristique de la présence d'hélices α est globalement conservé. Toutefois on peut constater des évolutions différentes selon la protéine étudiée. Ainsi Mb et Hb adsorbées possèdent un spectre de DC de plus faible intensité, en particulier autour de la bande à 208 nm. En prenant en compte tous les spectres acquis, on peut dire que HbC1 ne possède pas de variation significative selon qu'elle soit adsorbée ou libre en solution. *A contrario*,

pour HbAm, on peut observer une tendance vers une faible augmentation du signal dichroïque après adsorption.

Afin d'analyser ces différentes évolutions, deux approches vont être entreprises. Dans un premier temps, la déconvolution des spectres va permettre de comparer la structure secondaire globale des protéines libres ou adsorbées. Ensuite, une comparaison des pics à 222 nm et 208 nm va être faite afin de préciser l'impact de l'adsorption sur la structure tertiaire.

3.3. Impact de l'adsorption sur la structure secondaire

La déconvolution des spectres a été faite en utilisant la méthode de prédiction de structures "β-structure selection" (BeStSel) disponible en libre accès sur <http://bestsel.elte.hu/>. Cette méthode d'analyse empirique compare les spectres de DC d'échantillons inconnus à une base de données de spectres de DC de protéines à la structure parfaitement connue (Micsonai *et al.*, 2015). Les pourcentages d'hélices α, feuillets β, coudes, et autres structures secondaires (en particulier les structures non organisées) des quatre hémoprotéines avant et après adsorption sur des LUDOX sont indiqués dans le tableau 3-8.

*Tableau 3-8 : Répartitions des principales structures secondaires au sein des quatre hémoprotéines avant et après adsorption des LUDOX. Modélisation faite par <http://bestsel.elte.hu/> (Micsonai *et al.*, 2015). La colonne "feuillets β" regroupe les feuillets parallèles et antiparallèles.*

	Hélices α (%)	Feuillets β (%)	Coudes (%)	Autres(%)
Mb	79,6	0	8,6	11,8
Mb + LUDOX	78,3	2	10,7	9
Hb	73,9	0	7,4	18,6
Hb + LUDOX	55,3	6,5	8,7	29,4
HbC1	90,1	3,8	3,6	2,5
HbC1 + LUDOX	79,7	5,2	3,8	11,3
HbAm	50,2	9,9	6,7	33,3
HbAm + LUDOX	55,3	6,5	8,7	29,4

Concernant les hémoprotéines libres, celles-ci sont, dans tous les cas, constituées majoritairement d'hélices α. Cependant, les proportions d'hélices α mesurées sont variables. Mb possède quasiment 80% d'hélices α dans sa structure ce qui est en accord avec les données de cristallographie (Evans et Brayer, 1990). Hb semble posséder proportionnellement moins d'hélices α (74% des structures secondaires). Ceci n'est pas totalement en accord avec les données cristallographiques qui indiquent 83% d'hélices α (Lu *et al.*, 2000) indiquant une imprécision dans la déconvolution des spectres.

Concernant HbC1, on constate que la protéine est constituée quasi intégralement d'hélices α (90%), ce qui confirme sa nette similitude structurale avec la myoglobine. Enfin, HbAm possède la moitié de sa structure sous forme d'hélices α , ce qui est nettement plus faible que les autres hémoprotéines. Ceci est à corréliser avec le fait que les 36 linkers de la protéine possèdent une faible proportion d'hélices α (uniquement la partie ne se trouvant pas dans le protomère, Royer *et al.*, 2007) ce qui diminue la proportion globale d'hélices α . En effet, les linkers ne sont pas particulièrement structurés mais forment plutôt des liens entre les globines du protomère (1/12^{ème} de la protéine, voir chapitre 2, § 2.8.). Ceci se remarque par la forte présence d'autres structures (33%) dans la protéine. Il peut s'agir de régions intrinsèquement désordonnées par exemple.

La comparaison entre protéines libres et protéines adsorbées montre ensuite une nette tendance qui se retrouve dans tous les systèmes, sauf avec HbAm. On observe ainsi une diminution de la quantité d'hélices α après adsorption. Cette diminution est par ailleurs compensée par une augmentation de la quantité de feuillets β et d'autres structures. L'interprétation la plus simple serait de penser que certaines hélices α se désorganisent pour ensuite former de nouvelles structures secondaires. Ceci semble pourtant peu probable ou d'une ampleur très limitée car les globines sont déjà très structurées et ne se déforment pas lors de l'adsorption (voir § 4.). Il n'est donc pas possible d'affirmer une telle chose et on peut penser qu'il s'agit d'une limite de la méthode Bestsel. En effet, bien qu'étant aussi, voire plus efficient que d'autres méthodes prédictives (Micsonai *et al.*, 2015), Bestsel se base, comme les autres, sur des protéines standards, généralement cristallisées et l'interaction avec d'autres macromolécules n'est pas du tout considérée.

En outre, le cas de HbAm semble particulier. On observe en effet une augmentation globale de l'ellipticité après adsorption. Ceci semble donc indiquer une structuration de ces protéines avec une augmentation de la quantité d'hélices α et de coudes. L'explication pourrait provenir du fait qu'à cette concentration en protéines (3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de globine soit $2,1 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ de HbAm), HbAm est en partie dissociée en hexamères voire en protomères. La présence de SiNPs pourrait alors provoquer la réassociation des sous-unités ce qui induit une structuration des linkers. Toutefois en absence de tests complémentaires il ne s'agit que d'une hypothèse. D'autres techniques analytiques telles que la spectroscopie infrarouge ou la cryo-microscopie électronique seraient nécessaires pour expliquer ce phénomène.

3.4. Impact de l'adsorption sur la structure secondaire et tertiaire

On observe des différences sensibles d'ellipticité entre les hémoprotéines libres et adsorbées mais également des différences entre petites et grosses protéines. Pour quantifier ces différences, le

ratio entre les deux pics négatifs $r_\alpha = \epsilon_{222}/\epsilon_{208}$ a été calculé pour tous les systèmes (Tab. 3-9). Ce rapport de pic permet de s'affranchir des variations d'intensités ainsi que des différences de tailles entre protéines. Il constitue donc un étalon interne permettant d'estimer l'évolution structurale des protéines.

Tableau 3-9 : Valeurs du ratio $\epsilon_{222}/\epsilon_{208}$ issus des spectres de DC des quatre hémoprotéines seules ou liées à des LUDOX.

$r_\alpha (\epsilon_{222}/\epsilon_{208})$	Protéine seules	Protéine liée à LUDOX
Mb	1,08 ± 0,01	1,27 ± 0,17
Hb	1,04 ± 0,01	1,51 ± 0,1
HbC1	1,06 ± 0,02	1,05 ± 0,06
HbAm	1,09 ± 0,02	1,10 ± 0,03

Le ratio r_α est remarquablement proche entre les différentes hémoprotéines libres en solution, avec des valeurs comprises entre 1,04 et 1,09. Ceci montre la grande similitude structurale qui existe entre ces protéines. Concernant les hémoprotéines adsorbées par contre, on remarque que les petites et grosses protéines n'ont pas la même évolution. Le rapport r_α pour Mb et Hb augmente fortement en présence de LUDOX (+18% et +46% respectivement). Les grosses hémoglobines vont, elles, voir leur r_α rester stable, après adsorption.

Le ratio r_α est couramment utilisé dans le cas d'assemblages peptidiques afin de distinguer deux états structuraux des hélices α (Lau *et al.*, 1984 ; Graddis *et al.*, 1993 ; Mehboob *et al.*, 2001 ; Zheng *et al.*, 2015) :

- Lorsque $r_\alpha < 1$, les hélices α présentes sont isolées et n'interagissent pas entre elles ;
- Lorsque $r_\alpha > 1$, il y a de fortes interactions intra- et inter-hélicoïdales qui peuvent aller jusqu'à la présence de structures "coiled-coil" (deux hélices ou plus s'enroulant entre elles et formant une structure tertiaire propre).

Appliqué aux protéines, l'évolution de ce ratio est interprétée par la littérature de différentes façons :

- En présence de membranes cellulaires, l'augmentation de r_α peut être un artéfact dû à la diffusion d'objets de taille micrométrique et/ou à la présence de fluorochromes absorbants aux longueurs d'onde d'intérêt (Gordon et Holzwarth, 1971). Ce point sera largement abordé dans le chapitre 4, § 1.2. concernant l'effet de la diffusion sur les spectres de DC.
- Dans le système de classification développé par Manavalan and Johnson (1983), les structures secondaires sont divisées en 5 classes : tout α (présence essentiellement d'hélices α), tout β (présence essentiellement de feuillets β), $\alpha + \beta$ (régions séparées d'hélices α et de feuillets β), α/β (régions mélangeant hélices α feuillets β) et désordonné (régions majoritairement

désordonnées). Selon eux, le ratio r_α peut distinguer les régions $\alpha + \beta$ ($r_\alpha < 1$) des régions α/β ($r_\alpha > 1$). Dans le cas des hémoprotéines ce cas n'est pas à considérer.

- Comme précédemment pour les peptides, l'augmentation de r_α peut indiquer le passage d'hélices α indépendantes les unes des autres à celui d'hélices α interagissant entre elles pour former des structures "coiled-coil" (Choy *et al.*, 2003). Dans cette étude cependant, un r_α de 1,03 indique déjà la présence d'hélices enroulées. Cette frontière de $r_\alpha = 1$ est donc à relativiser. Il a en effet été montré que le passage hélices indépendantes/hélices enroulées pouvait être observé pour un r_α plus élevé dans le cas des protéines globulaires (frontière de r_α à 1,1 pour la tropomyosine, Greenfield et Hitchcock-DeGregori, 1993).
- La plupart des modélisations n'arrivant pas à détecter de différence théorique entre les hélices α indépendantes et les hélices α en interaction au niveau des spectres de DC (Holtzer et Holtzer, 1995 ; Bode et Applequist, 1997) certaines études interprètent très prudemment l'évolution de r_α observée comme étant due à de "subtils changements conformationnels des structures en hélices α " (Paulucci *et al.*, 2002).

Ainsi, il n'est pas possible de trancher sur l'explication physique de l'évolution du ratio $\epsilon_{222}/\epsilon_{208}$. Celui-ci semble pour le moins indiquer des variations fines de la structure secondaire (au niveau des liaisons hydrogène par exemple) qui se répercutent sur la structure tertiaire de Mb et Hb. L'hypothèse privilégiée est un réarrangement des hélices de la protéine. Appliqué à nos systèmes hémoprotéines/LUDOX, ce réarrangement peut avoir comme origine une modification des interactions hélice-hélice (Choy *et al.*, 2003) et/ou la formation d'interactions hélice-surface, afin de stabiliser l'adsorption.

Cette interprétation peut aussi expliquer les différences observées entre les petites et grosses hémoprotéines. Dans le cas des grosses protéines, le ratio r_α n'évolue pas avec l'adsorption. Si l'on considère que seule une petite partie de la protéine va être en interaction directe avec la surface de silice (voir § 2.1.) alors, dans le cas des grosses protéines, la proportion d'hélices α subissant un réarrangement est trop faible par rapport aux autres hélices α de la protéine pour influencer le signal dichroïque.

Par conséquent, la différence de signal de DC entre protéines adsorbées et protéines libres peut être interprétée comme étant due à un réarrangement local des hélices α interagissant entre elles et/ou avec la surface de la silice. Cependant, concernant Mb et Hb, des études similaires ont été faites et une forte diminution de l'ellipticité avait pu être constatée (Devineau *et al.*, 2013 ; Devineau *et al.*, 2017). Cette diminution du signal s'interprète généralement par une perte de structure secondaire de la protéine adsorbée. Cependant, au regard des expériences faites ici, il apparaît que la destructuration

ait pu être surestimée. Une analyse critique des résultats de dichroïsme circulaire appliqué aux systèmes protéines/nanoparticules sera donnée dans la chapitre 4, § 1.2.

Ainsi, les expériences faites ici sont en accord avec le modèle classique d'adsorption des protéines qui considère les protéines globulaires comme étant des protéines "dures", donc non destructurables par un phénomène d'adsorption (Mathé *et al.*, 2013). Toutefois, pour confirmer ces observations, il est nécessaire d'étudier la structure quaternaire des protéines adsorbées, ce qui a été fait par la suite.

4. Diffusion de neutrons aux petits angles

4.1. Diffusion des SiNPs et des hémoprotéines

Afin d'aller plus loin dans l'étude de l'impact structural de l'adsorption des hémoprotéines sur des SiNPs, des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles (SANS pour Small Angle Neutron Scattering) ont été effectuées. Les protéines choisies furent Mb et Hb et les SiNPs, des LUDOX. Dans un premier temps les différents mélanges ont été mis en eau 100% deutérée afin d'optimiser leur diffusion (approche 1, voir chapitre 7, §2.4.).

Les protéines et les LUDOX ont tout d'abord été étudiées séparément. Pour les LUDOX seules, le spectre SANS montre une courbe identique au spectre SAXS (Fig. 3-15) avec une modélisation par un modèle de sphère qui indique également un rayon R égal à 13,0 nm (caractérisation des SiNPs faite au chapitre 2, §1.). Le passage en D₂O n'a donc pas eu d'impact sur la structure des LUDOX.

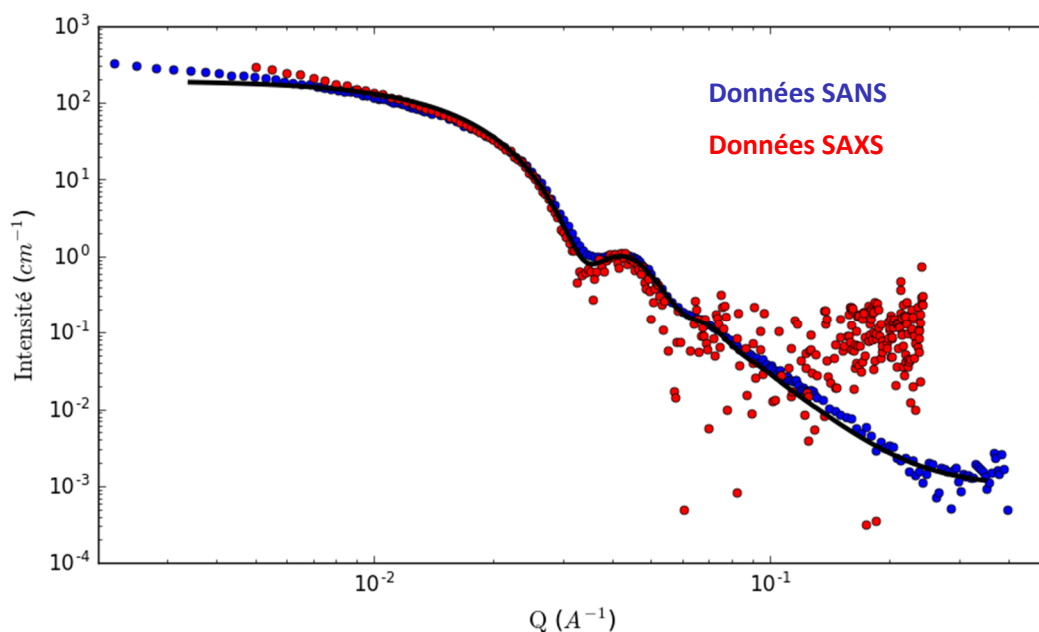


Figure 3-15 : Spectres de diffusion des neutrons (solvant D₂O) et des rayons X (solvant H₂O) des LUDOX à 50 g.L⁻¹. Le spectre SAXS a été normalisé afin de tenir compte des différences de densité de longueur de diffusion et de solvant. — Modèle de sphère appliqué au spectre SANS.

Les mesures SANS des hémoprotéines ont permis de mesurer leur rayon de giration R_g (chapitre 2, § 3.3.). Cependant cette mesure ne permet pas de déterminer la forme globale de ces protéines. Aussi, étant des protéines globulaires, leur forme peut être modélisée en les considérant comme des ellipsoïdes (Harding et Rowe, 1982). Le spectre de Mb et Hb ont ainsi été modélisés par un modèle d'ellipsoïde triaxial (Feigin et Svergun, 1987) et sont reportés sur les figures 3-16 et 3-17.

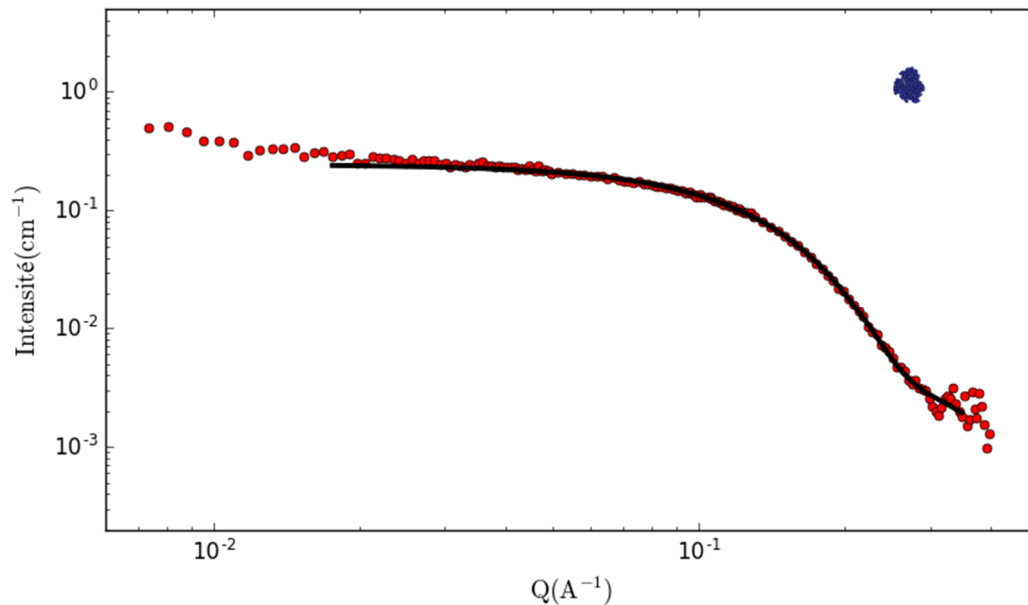


Figure 3-16 : Spectre SANS de Mb et modélisation par un ellipsoïde triaxial selon Feigin et Svergun (1987). $C_{Mb} = 10 \text{ g.L}^{-1}$ en tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pD 7,4 (100% D_2O).

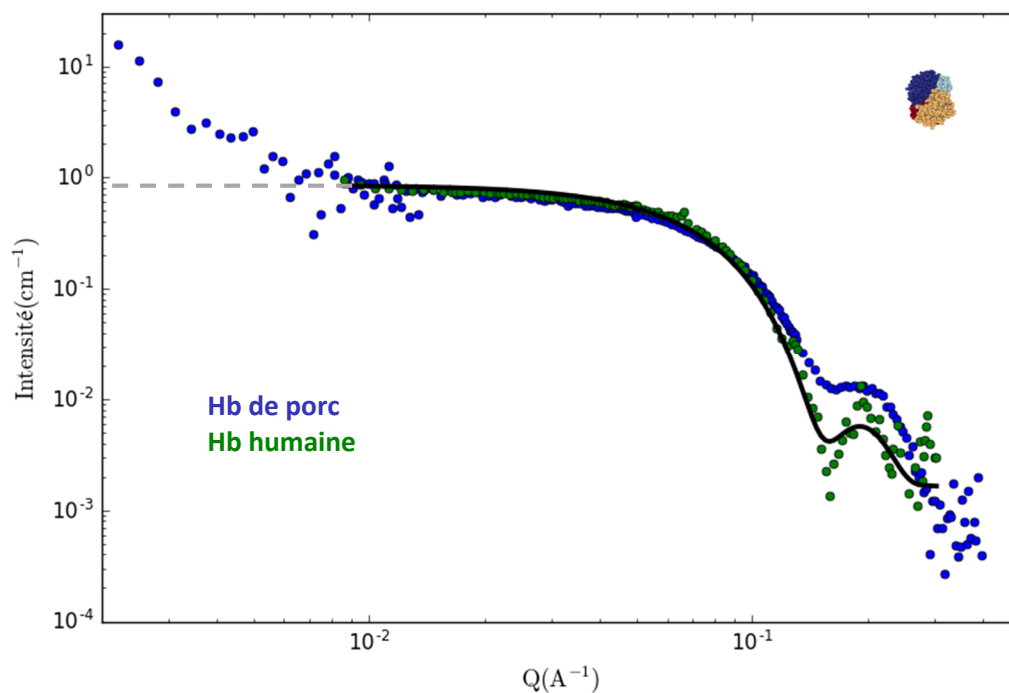


Figure 3-17 : Spectres SANS des Hb de porc et humaine et modélisation de Hb humaine par un ellipsoïde triaxial selon Feigin et Svergun (1987). Le spectre de Hb humaine a été donné par Le Cœur et al. (2015). $C_{Hb} = 10 \text{ g.L}^{-1}$ en tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pD 7,4 (100% D_2O). Tirets gris : extrapolation de la valeur de $I(0)$ à partir du facteur de forme.

La mesure de la forme de Mb selon le modèle d'ellipsoïde triaxial donne les dimensions suivantes $a = 1,10$ nm, $b = 1,95$ nm et $c = 1,78$ nm ce qui est légèrement différent des dimensions mesurées par Glandières *et al.* (1995) dans des conditions physico-chimiques similaires avec $a = 1,09$ nm, $b = 2,55$ nm et $c = 1,69$ nm. Néanmoins, ceci peut être dû à des différences d'ajustement du modèle d'ellipsoïde.

Concernant Hb par contre, l'ajustement des données expérimentales au modèle de l'ellipsoïde triaxial s'est avéré impossible. Le spectre de diffusion situé à vecteur d'onde de diffusion q supérieur à $0,1 \text{ \AA}^{-1}$ ne peut ainsi pas être modélisé par un ellipsoïde. Pour comparaison, le spectre de diffusion de l'hémoglobine humaine (Le Coeur *et al.*, 2015) ainsi que sa modélisation par un ellipsoïde triaxial de dimensions $a = 2,75$ nm, $b = 3,2$ nm et $c = 2,5$ nm (Harding et Rowe, 1982) sont indiqués dans la figure 3-17. Ainsi, si les R_g de l'Hb de porc et de l'Hb humaine sont identiques, leur facteur de forme est nettement différent.

Il est connu que l'hémoglobine (de porc ou humaine), bien que purifiée, peut être présente en solution sous plusieurs isoformes pouvant être isolées par chromatographie échangeuse d'anion (Pin *et al.*, 1990). Afin d'observer la présence d'isoformes d'Hb, des expériences d'isoélectrofocalisation ont été entreprises en collaboration avec le docteur Stéphane Mouterau (voir chapitre 7, § 2.2.). Il apparaît que l'hémoglobine fraîche (utilisée pour les expériences de SANS) possède une forme extrêmement majoritaire et que le "smear" de protéines, bien que visible, est très réduit. Ainsi on peut considérer qu'une seule forme de la protéine est présente en solution.

Afin de mieux appréhender la forme de Hb, il est pertinent de transformer les données SANS de l'espace réciproque à l'espace réel. La fonction de distribution des distances de Hb ainsi calculée (Fig. 3-18) montre la répartition des distances interatomiques de la macromolécule. Le calcul des aires sous la courbe indique que les distances inférieures à 60 \AA représentent 94,8% des toutes les distances interatomiques. Ceci est en accord avec la mesure du diamètre de giration qui est de 46 \AA . On constate cependant l'existence d'atomes situés bien au-delà du diamètre de giration (5,2% des distances sont supérieures à 60 \AA). Or ces atomes éloignés ne sont pas présents dans l'Hb humaine native (Svergun *et al.*, 2008).

Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette répartition des masses : la présence de molécules organiques (des polysaccharides par exemple) capables de se lier aux protéines et la déstructuration locale de Hb conduisant à la sortie d'une partie de la chaîne peptidique du centre de la protéine.

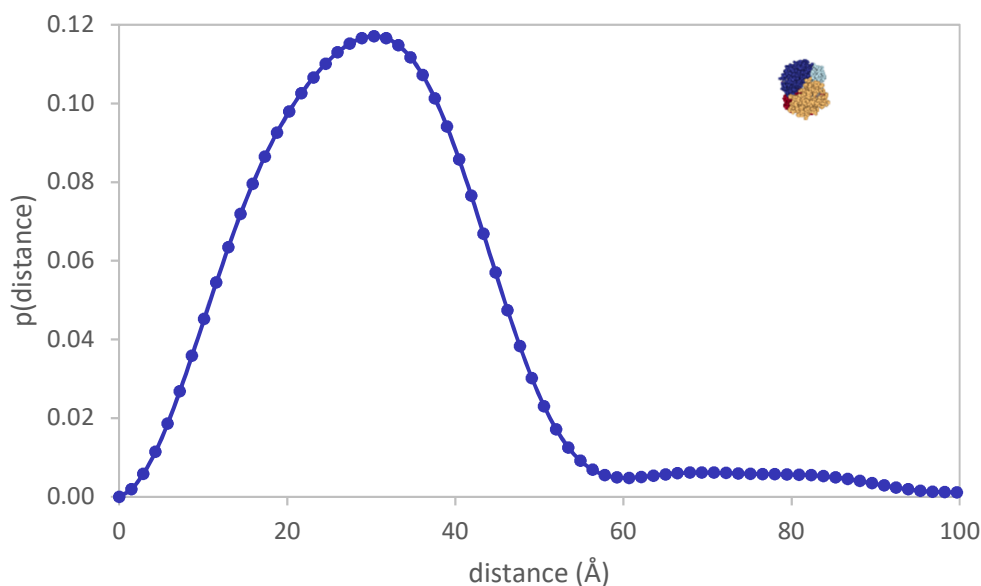


Figure 3-18 : Fonction de distribution des distances interatomiques de Hb calculée par GNOM.

La première hypothèse est légitime du fait que toute hémoglobine peut se trouver sous forme glyquée. La glycation (ou glycosylation non enzymatique) est la liaison spontanée d'un ou plusieurs sucres à la protéine qui a lieu lorsque la concentration en glucose est suffisamment élevée. Or, s'agissant de porcs d'élevage dont le métabolisme peut être défaillant, il est possible que la glycémie sanguine soit très élevée. Il a cependant été montré que l'Hb de porc ne subissait pas de glycosylation même en présence d'une forte glycémie sanguine (Rendell *et al.*, 1985). En effet, la perméabilité des hématies pour le glucose est très faible chez le porc. Il est donc très peu probable que l'hémoglobine de porc soit sous forme glycosylée.

La deuxième hypothèse est l'existence d'une déstructuration partielle de Hb. Cette hypothèse est privilégiée pour plusieurs raisons. Tout d'abord, Hb possède le même poids moléculaire (PM) que l'hémoglobine humaine native. En effet le PM peut être estimé selon l'équation suivante (Mylonas et Svergun, 2007) :

$$I(0) = \frac{(\Delta\rho \cdot V_p)^2 \cdot c \cdot PM}{N_A} \quad (\text{Eq. 3-6})$$

Où $\Delta\rho$ est le contraste (différence de longueur de diffusion) entre les objets et le solvant, V_p est le volume spécifique partiel des protéines, c est la concentration en protéines et N_A est la constante d'Avogadro.

On constate que le PM est proportionnel à l'intensité à l'angle zéro $I(0)$. $I(0)$ peut être mesurée par extrapolation en prolongeant à $q=0$ la courbe de diffusion obtenue au niveau du facteur de forme

(tirets gris, Fig. 3-17). On se rend compte que le $I(0)$, donc le PM, de Hb est identique à celui de l'hémoglobine humaine. Ceci confirme le fait qu'aucune molécule ne s'est fixée à la protéine.

Ainsi, si rien n'a été ajouté, la présence d'atomes dont la distance est supérieure à 60 Å ne peut venir que des acides aminés constituant la protéine. Les 5,2% de distances interatomiques supérieures à 60 Å correspondent donc à la proportion d'atomes située à l'extérieur de la structure centrale. Rapporté en nombre d'acides aminés, cela fait 30 résidus (sur un total de 574 dans la protéine). En outre, le diamètre maximal de Hb tiré de la fonction de répartition des distances est d'environ 90 Å, ce qui fait une longueur maximale pour le ou les motifs peptidiques sortis d'environ 30 Å.

La distance séparant les deux extrémités d'une chaîne peptidique dépend de sa conformation. Cohen *et al.* (2009) ont montré qu'elle est généralement comprise entre 1,4 Å (hélice α) et 5 Å par résidu. Une chaîne peptidique de 30 Å a donc un nombre d'acides aminés compris entre 6 et 21. Rapporté aux 30 résidus sortis cela signifie qu'entre deux et quatre hélices α (probablement une par globine) ont pu se déplier.

En outre, le spectre SANS de Hb montre une forte augmentation du signal de diffusion à très petit q (Fig. 3-17). Ce phénomène a été observé pour de nombreux systèmes protéiques et correspond à l'existence d'interactions dont la portée est bien plus grande que le diamètre de la protéine (Liu *et al.*, 2005). Il n'y a pas, à ce jour, d'explication concluante pour ce phénomène (Mandal *et al.*, 2014). Il semble cependant apparaître dans certaines conditions de purification des protéines, de vieillissement de celles-ci, ou encore de préparation des échantillons (Stradner *et al.*, 2006). Or tous ces facteurs peuvent être la cause d'une dégradation de la structure protéique.

Une déstructuration partielle peut survenir de plusieurs manières : les conditions opératoires pratiquées (faible concentration en protéine, effet des sels) jouent par exemple un rôle très important sur les interactions inter-protéiques de l'hémoglobine (Krueger et Nossal, 1988 ; Kruger *et al.*, 1990). En revanche il est très peu probable que le passage en eau deutérée en soit la cause. En effet le D_2O a tendance à structurer les protéines peu structurées ainsi qu'à stabiliser la structure de celles qui ont encore leur structure native (Cioni et Strambini, 2002 ; Efimova *et al.*, 2007). Ainsi, dans la mesure où les échantillons d'hémoglobine de porc et d'hémoglobine humaine ont été purifiés et préparés de la même façon, une cause expérimentale peut être écartée. La "dégradation" apparente de Hb semble donc être présente naturellement et une déstructuration native peut en être la cause.

Cette hypothèse d'une déstructuration partielle native de Hb est rendue crédible par de précédentes observations montrant une certaine labilité des hélices α contenues dans les hémoglobines. Katz *et al.* (1994) ont ainsi montré que les hélices B et E des sous-unités β de l'hémoglobine de porc davantage

dépliées par rapport à celles de l'hémoglobine humaine. L'hélice F semble également être particulièrement instable puisque celle des sous-unités β de l'hémoglobine bovine (Griffith et Kaltashov, 2003) comme celle de l'apomyoglobine de cheval (Fontana *et al.*, 1997) sont facilement dépliables.

S'il s'agit de l'hypothèse la plus probable, il est impossible de confirmer formellement la présence d'hélices α dépliées dans nos échantillons. Cependant ce phénomène expliquerait la relativement faible proportion d'hélices α calculée à partir de données de dichroïsme circulaire par rapport à la structure Hb de la PDB (§ 3.3.). Enfin certaines études SANS ont déjà pu constater des profils de distribution des distances similaires pour de l'hémoglobine humaine (Mandal *et al.*, 2014) et ont interprété cela comme étant dû à un dépliement partiel de la protéine.

4.2. Etude des mélanges hémoprotéines/LUDOX en 100% D₂O

En suivant la première approche (100% D₂O, voir chapitre 7, § 2.4. pour plus de détails) des échantillons mélangeant hémoprotéines et LUDOX ont été préparés. Pour chacun des deux couples Mb/LUDOX et Hb/LUDOX, trois échantillons préparés dans des conditions d'isotherme différentes ont été étudiées. Ces conditions d'isothermes, représentant différents degrés de saturation des LUDOX (Tab. 3-10), ont été calculées selon les isothermes d'adsorption préalablement mesurées (voir § 1.3.). En effet, des tests ont été faits indiquant et les isothermes en milieu deutéré présentent le même profil d'adsorption que les isothermes en milieu hydrogéné (données non montrées ici).

Tableau 3-10 : Conditions de préparation des mélanges hémoprotéines/LUDOX des six échantillons étudiés en SANS. Pour une C_{LUDOX} constante à 50 g.L⁻¹ différentes C_{Mb} et C_{Hb} ont été utilisées afin de saturer ou non la surface des LUDOX. Les pourcentages de protéines adsorbées par rapport aux quantités totales de protéines en solution sont également indiqués.

Echantillon	Mb			Hb		
	C_{Prot} (g/L)	Saturation de la surface (%)	Protéines adsorbées (%)	C_{Prot} (g/L)	Saturation de la surface (%)	Protéines adsorbées (%)
(1)	2,3	85%	80%	8,1	97%	90%
(2)	3,4	96%	60%	10,7	99%	70%
(3)	5,4	100%	40%	15,1	100%	50%

On remarque que les conditions d'isothermes choisies pour les échantillons de Mb correspondent à des degrés de saturation de la surface variables allant de 85% à 100% de saturation (pourcentages relatifs calculé par rapport à la quantité maximale de protéines adsorbables). Les spectres SANS de couronnes protéiques complètes et lacunaires pourront ainsi être comparées. Pour Hb par contre, la surface des LUDOX est saturée dans les trois conditions d'isotherme (saturation comprise entre 97% et 100%). Ceci est dû au fait que les calculs n'ont pas été fait initialement en pourcentage de saturation

de la surface mais en pourcentage de protéines adsorbées. Il ne sera donc pas possible de comparer entre un recouvrement lacunaire et un recouvrement complet.

Après mélange, les échantillons de ces différentes conditions ont été mesurés par SANS (Fig. 3-19 et 3-20). Plusieurs observations peuvent être faites à partir de ces spectres. Tout d'abord pour tous les échantillons, on observe la présence à la fois des nanosphères LUDOX avec leur facteur de forme caractéristique autour de $0,04 \text{ \AA}^{-1}$ ainsi que des protéines Mb ou Hb avec leur facteur de forme caractéristique à $q > 0,07 \text{ \AA}^{-1}$. On peut également observer l'augmentation de l'intensité de diffusion à grand q proportionnelle à l'augmentation de la concentration en protéines entre les différents échantillons. Il est à noter qu'à cette gamme de q le signal est la somme des signaux des protéines libres et des protéines adsorbées. Il faudra donc tenir compte de la présence inévitable de protéines libres. Enfin, quel que soit l'échantillon, on observe une très forte augmentation du signal de diffusion à très petit q . Cette augmentation est le signe d'un phénomène d'agrégation causé par l'interaction hémoprotéines/LUDOX.

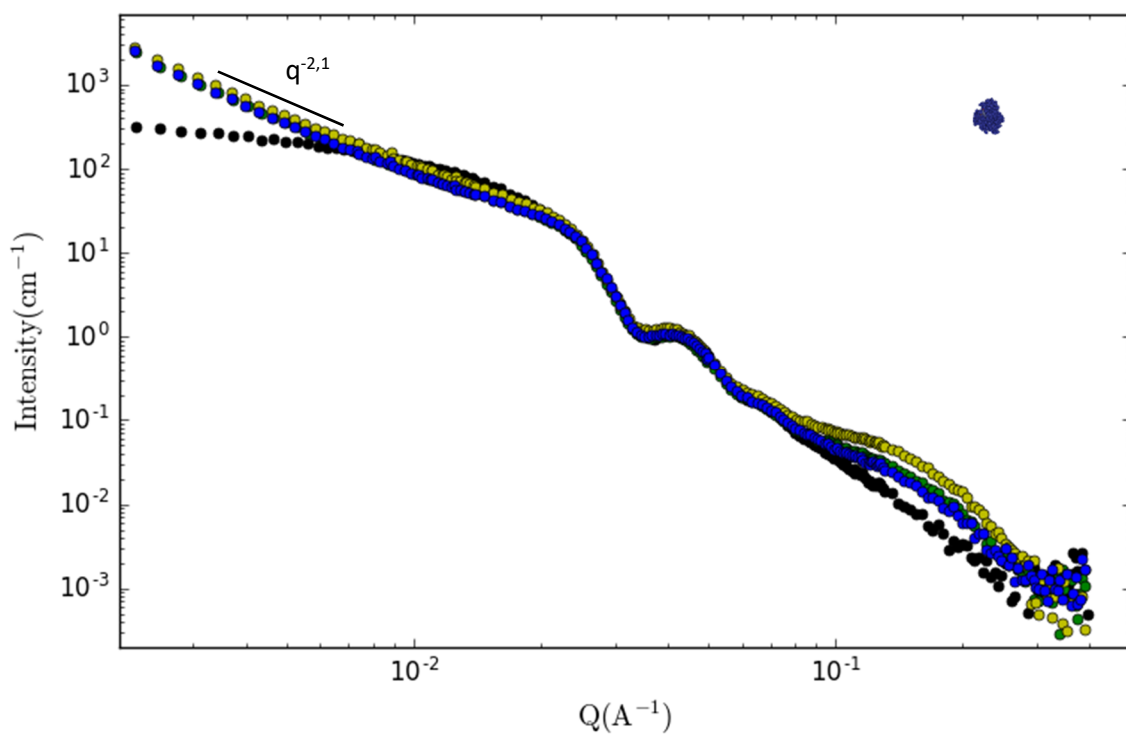


Figure 3-19 : Spectres SANS des mélanges Mb/LUDOX en tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $pD 7,4$ ($100\% D_2O$). ● échantillon (1) ; ● échantillon (2) ; ● échantillon (3) ; ● LUDOX. Pour les mélanges, la pente des courbes à petit q suit une loi de puissance d'ordre 2,1.

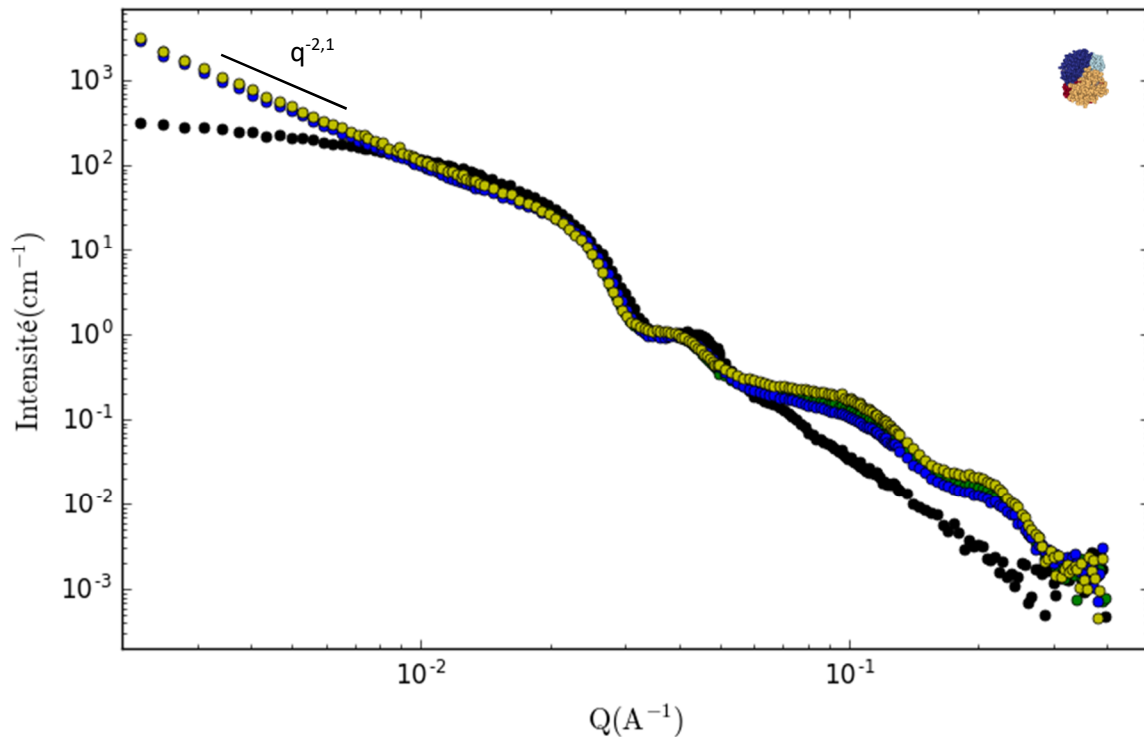


Figure 3-20 : Spectres SANS des mélanges Hb/LUDOX en tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pD 7,4 (100% D₂O). ● échantillon (1) ; ● échantillon (2) ; ● échantillon (3) ; ● LUDOX. Pour les mélanges, la pente des courbes à petit q suit une loi de puissance d'ordre 2,1.

Il existe deux régimes distincts d'agrégation colloïdale qui possèdent des cinétiques de formation différentes (Weitz *et al.*, 1985). Le premier régime a lieu lorsque le seul facteur limitant la vitesse d'agrégation est la diffusion des particules. Ce régime se nomme d'ailleurs régime d'agrégation limitée par la diffusion (ALD). Le second régime a lieu lorsque la vitesse d'agrégation de deux particules est bien plus lente par rapport à leur vitesse de diffusion. Ceci signifie donc qu'un grand nombre de collisions est nécessaire pour que deux particules puissent s'accrocher. Le ralentissement de l'agrégation est généralement dû à l'existence de répulsions entre particules. Ce régime est appelé régime d'agrégation limitée par la réaction (ALR). Ces deux phénomènes conduisent à des structures différentes avec le premier formant des agrégats épars et ramifiés tandis que le second forme des agrégats beaucoup plus compacts (Cherhal *et al.*, 2015).

L'identification du type d'agrégation peut se faire en calculant la dimension fractale D_f du facteur de structure. D_f correspond à la pente de la courbe de diffusion à très petit q . Ici la valeur de D_f est de 2,1 ce qui correspond un phénomène d'ALR (Lin *et al.*, 1990). L'adsorption des protéines observée ici n'est pas limitée par la diffusion. Il n'existe aucune donnée explicite dans la littérature concernant la vitesse d'adsorption de mélanges protéines/nanoparticules (Klein *et al.*, 2016b).

Aussi, ce phénomène d'ALR suppose l'existence d'une barrière d'activation lors de l'adsorption de protéines. Une explication peut venir du fait que les protéines globulaires s'adsorbent généralement

selon une orientation particulière. En effet, toute protéine, même globalement peu chargée comme ici (chapitre 2, § 3.5.), possède des régions chargées négativement à sa surface. Ces régions vont induire des répulsions électrostatiques empêchant une adsorption immédiate. En conséquence, pour s'adsorber, Mb et Hb doivent posséder une orientation adéquate par rapport à la surface. Ceci a déjà été montré pour Mb qui possède deux sites de fixation possibles avec la silice (Devineau *et al.*, 2014). Pour Hb en revanche, ceci n'a jamais été démontré mais sa structure en cylindre rend probable l'existence d'orientations privilégiées. La nécessité d'une orientation diminue ainsi la probabilité d'interactions efficaces donc la vitesse d'agrégation.

Pour tenir compte de la présence des protéines libres dans les échantillons, les courbes ont été soustraites par le signal de diffusion de la protéine libre, proportionnellement à sa concentration estimée (Fig. 3-21 et 3-22). Les spectres de mélanges Mb/LUDOX (Fig. 3-21) montrent ainsi des courbes assez similaires entre les différentes conditions de recouvrement avec toutefois des différences subtiles. On peut ainsi distinguer trois gammes de q pour lesquels les spectres évoluent différemment : $q < 0,01 \text{ \AA}^{-1}$, $0,01 < q < 0,1 \text{ \AA}^{-1}$, et $q > 0,1 \text{ \AA}^{-1}$.

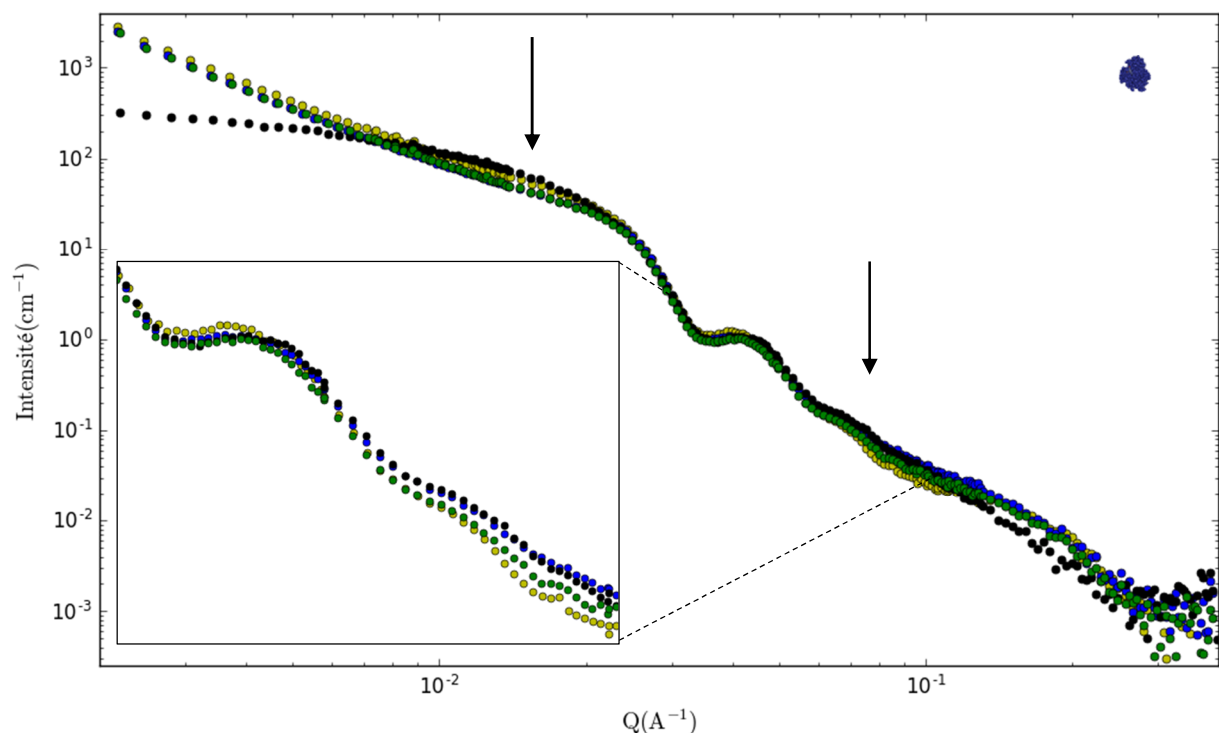


Figure 3-21 : Spectres SANS des mélanges Mb/LUDOX en tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $pD 7,4$ (100% D_2O) après soustraction du signal des protéines libres. ● échantillon (1) ; ● échantillon (2) ; ● échantillon (3) ; ● LUDOX. Les flèches montrent les zones présentant des interférences destructives.

À $q < 0,01 \text{ \AA}^{-1}$ ainsi qu'à $q > 0,1 \text{ \AA}^{-1}$ les signaux de diffusion sont identiques entre les différents mélanges et sont nettement supérieurs à celui des LUDOX seules. À grand q , le signal est dû essentiellement au

facteur de forme de Mb adsorbé tandis qu'à petit q le signal est dû au produit du facteur de forme des LUDOX (éventuellement décorées par les protéines) et d'un facteur de structure (lié à l'agrégation).

À $0,01 < q < 0,1 \text{ \AA}^{-1}$ par contre, on peut observer deux phénomènes. Vers $0,045 \text{ \AA}^{-1}$ on observe un léger décalage de la frange principale (incurvation du spectre due au facteur de forme de la molécule) vers les petits q en passant des LUDOX seules aux mélanges. De plus, s'il est quasi inexistant pour l'échantillon 1 (condition non saturante), ce décalage augmente dans les échantillons 2 et 3 (conditions saturantes). Il semble donc que ceci soit dû au facteur de forme de la couronne de protéines formée à la surface des SiNPs. Le deuxième phénomène observable est la présence de deux régions dont l'intensité du signal est plus faible pour les mélanges que pour les LUDOX seules (flèches Fig. 3-21). À nouveau, si le signal de l'échantillon 1 est très proche de celui des LUDOX seules, on peut observer une forte diminution du signal des deux autres échantillons. Cette baisse du signal est bien évidemment due en partie au déplacement des franges qui décale également les signaux autour. Cependant les différences spectrales semblent être trop importantes pour n'être dues qu'à l'augmentation de la taille de l'objet. En effet, la modélisation des spectres par des modèles de type "cœur-couronne" et "Raspberry" a été tentée et aucun ajustement satisfaisant n'a pu être obtenu. Aussi, une hypothèse peut être avancée pour expliquer ce phénomène.

On considère généralement que le signal de diffusion aux petits angles provient de la somme des diffusions indépendantes de chaque particule. On parle ainsi d'incohérence inter-particulaire. Ceci est valable pour des colloïdes dont les particules sont positionnées de façon aléatoire les unes par rapport aux autres (Fultz et Howe, 2003 ; Sadeghpour Dilmaghani, 2012). Or dans le cas des mélanges de Mb/LUDOX on peut observer l'existence d'interférences destructives à moyen q (signal des mélanges plus faible que le signal des LUDOX seules). Ces interférences peuvent être le signe d'une organisation des molécules Mb adsorbées sur les SiNPs.

Cette organisation peut s'expliquer par une répartition ordonnée des molécules de Mb à la surface des LUDOX. Les protéines adsorbées se positionnent donc à la même distance les unes des autres formant ainsi une sorte de pavage. Cet effet semble dépendre du degré de saturation de la surface. Ainsi pour une surface non saturée (échantillon 1) la place disponible est suffisante pour que l'adsorption se soit faite de façon non ordonnée. Par contre lorsque la surface est proche de la saturation, une nouvelle protéine ne pourra s'adsorber que sur des zones précises et réduites. La compétition occasionnée par l'encombrement locale semble donc induire l'organisation observée.

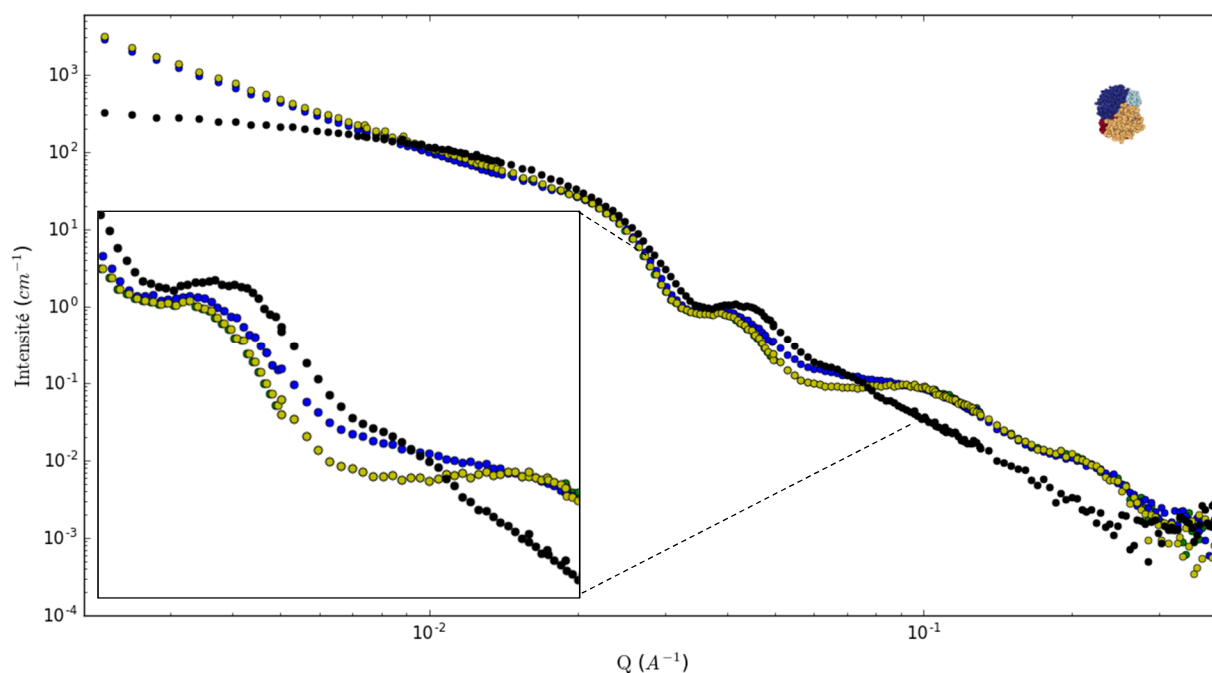


Figure 3-22 : Spectres SANS des mélanges Hb/LUDOX en tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pD 7,4 (100% D₂O) après soustraction du signal des protéines libres.

● échantillon (1) ; ● échantillon (2) ; ● échantillon (3) ; ● LUDOX.

Concernant les spectres de diffusion des mélanges Hb/LUDOX (Fig. 3-22), il y a également présence de trois régimes distincts de gammes de q : $q < 0,01 \text{ \AA}^{-1}$, $0,01 < q < 0,08 \text{ \AA}^{-1}$, et $q > 0,08 \text{ \AA}^{-1}$. On peut observer les mêmes phénomènes qu'avec les mélanges Mb/LUDOX à savoir l'agrégation à petits q et la présence du facteur de forme des protéines adsorbées à grands q .

À moyen q on constate à nouveau la présence d'interférences destructives ainsi que le décalage de la frange vers les petits q causé par la formation de la couronne protéique. Le décalage est bien plus important pour Hb que pour Mb du fait de sa taille qui conduit à former une couronne de protéines beaucoup plus grosse que celle formée par Mb. Les interférences destructives sont également beaucoup plus marquées et toute cette gamme de q moyens est maintenant concernée. La même conjecture que pour Mb peut être faite à savoir qu'une organisation de la couronne de protéines adsorbées peut être la cause de ces interférences destructives.

Cependant malgré les similitudes de conditions de saturation des surfaces entre les trois échantillons on observe que les interférences destructives sont légèrement moins marquées pour l'échantillon 1 à $q \approx 0,06 \text{ \AA}^{-1}$. À cette gamme de q le signal provenant de la protéine libre est encore suffisamment important et une imprécision dans la soustraction du signal peut en être la cause.

Ces observations montrent également que les molécules de Hb s'adsorbent sur les LUDOX selon une organisation particulière. Cependant, du fait de la présence de franges d'interférence qui diminuent

localement le signal de diffusion, il est difficile d'appliquer un modèle mathématique qui ajusterait correctement les spectres. Une seconde approche, développée par la suite, a donc été entreprise.

4.3. Etude des mélanges hémoprotéines/LUDOX en 60% D₂O

Une deuxième approche a été suivie (Fig. 3-23, voir chapitre 7, § 2.4. pour plus de détails). Cette approche vise à masquer le signal de diffusion des SiNPs en alignant la densité de longueur de diffusion (ρ) du solvant (mélange D₂O/H₂O) avec celle de la silice ($\rho = 3,48E-06 \text{ \AA}^{-2}$). Des échantillons correspondant aux mêmes concentrations que pour la première approche ont donc été préparés avec un ratio D₂O/H₂O de 60%/40%.

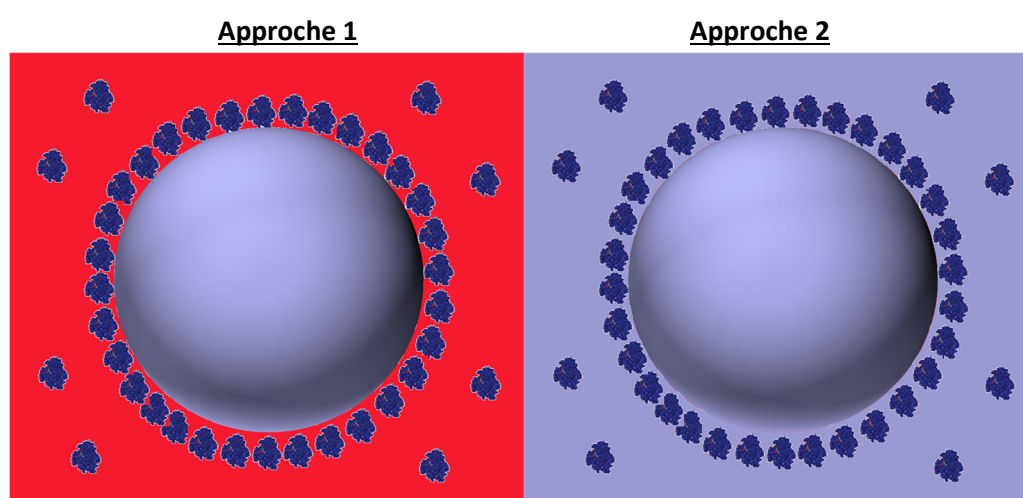


Figure 3-23 : Schéma représentant les deux approches employées en SANS. À gauche : système à trois composants (LUDOX, protéines, et solvant). À droite : système à deux composants. Avec un ratio D₂O/H₂O de 60%/40% les densités de longueur de diffusion de la silice et du solvant sont identiques et la diffusion de chacun ne peut plus être distinguée.

Tout d'abord Mb, Hb, et LUDOX ont été mesurés séparément afin d'observer leur profil de diffusion en 60% D₂O (Fig. 3-24). Le signal de diffusion de la silice a bien été complètement supprimé. Cependant les signaux de Mb et Hb sont également fortement réduits par rapport aux mesures en 100% D₂O (Fig. 3-16 et 3-17). On peut constater que la diffusion des protéines en 60% D₂O est environ 10 fois plus faible qu'en 100% D₂O. Cela est dû à la baisse du contraste entre protéines et solvant (due à la diminution du ρ du solvant). En outre, la diffusion incohérente est fortement augmentée par la présence d'H₂O ce qui diminue le rapport diffusion cohérente/diffusion incohérente (similaire à un rapport signal sur bruit). La soustraction du signal de l'incohérent est donc plus délicate.

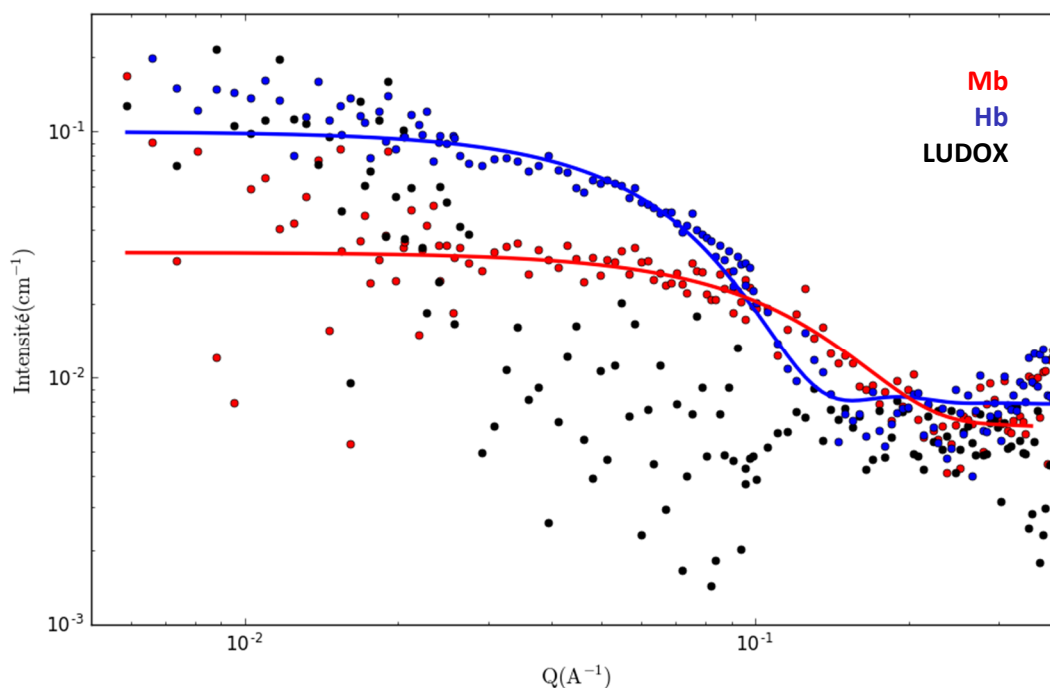


Figure 3-24 : Spectres SANS des protéines **Mb** (10 g.L^{-1}) et **Hb** (10 g.L^{-1}) ainsi que des **LUDOX** (50 g.L^{-1}) en tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pD } 7,4$ ($60\% \text{ D}_2\text{O}$). Courbes modélisant Mb et Hb (respectivement rouge et bleu) selon des ellipsoïdes triaxiales.

Les mêmes mélanges que pour la première approche ont ensuite été mesurés et la soustraction du signal des protéines libres en solution a été effectuée (Fig. 3-25 et 3-26). Pour tous les échantillons, si le facteur de forme des LUDOX a disparu, le facteur de structure des colloïdes agrégés est bien présent (forte augmentation de l'intensité à très petit q).

On remarque rapidement que les spectres de diffusion des mélanges Mb/LUDOX (Fig. 3-25) sont fortement bruités. En effet, la concentration en protéines adsorbée est ici trop faible pour avoir une intensité de diffusion suffisante. On peut toutefois observer à $q \approx 0,03 \text{ \AA}^{-1}$ la présence d'une frange (flèche noire). Or cette frange ne correspond ni au facteur de forme des LUDOX (diffusion négligeable dans ces conditions), ni à celui des Mb (qui devrait être présent à $q \approx 0,1 \text{ \AA}^{-1}$). Il s'agit donc du facteur de forme de la couronne de protéines adsorbées sur les LUDOX. La couronne est en effet suffisamment dense pour être considérée comme objet à part entière. Toutefois la frange possède ici la même intensité que le régime de Guinier des protéines (courbe rouge). Il n'est donc pas possible dans ces conditions de modéliser la forme de la couronne de protéines formée par Mb. Il a été envisagé d'augmenter les concentration en Mb mais l'augmentation équivalente de la quantité de LUDOX aurait rendu l'expérience infaisable.

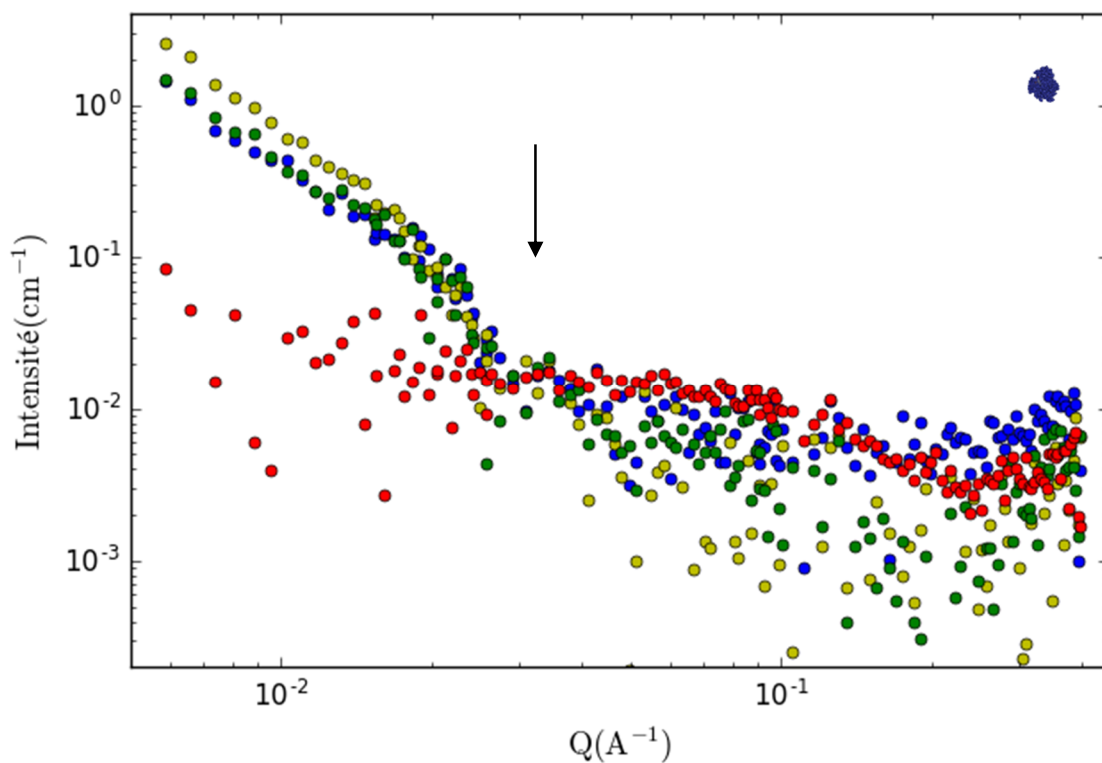


Figure 3-25 : Spectres SANS des mélanges Mb/LUDOX en tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pD 7,4 (60% D₂O) après soustraction du signal des protéines libres. ● échantillon 1 ; ● échantillon 2 ; ● échantillon 3 ; ● Mb. La flèche indique la frange formée par le facteur de forme de la couronne de protéines.

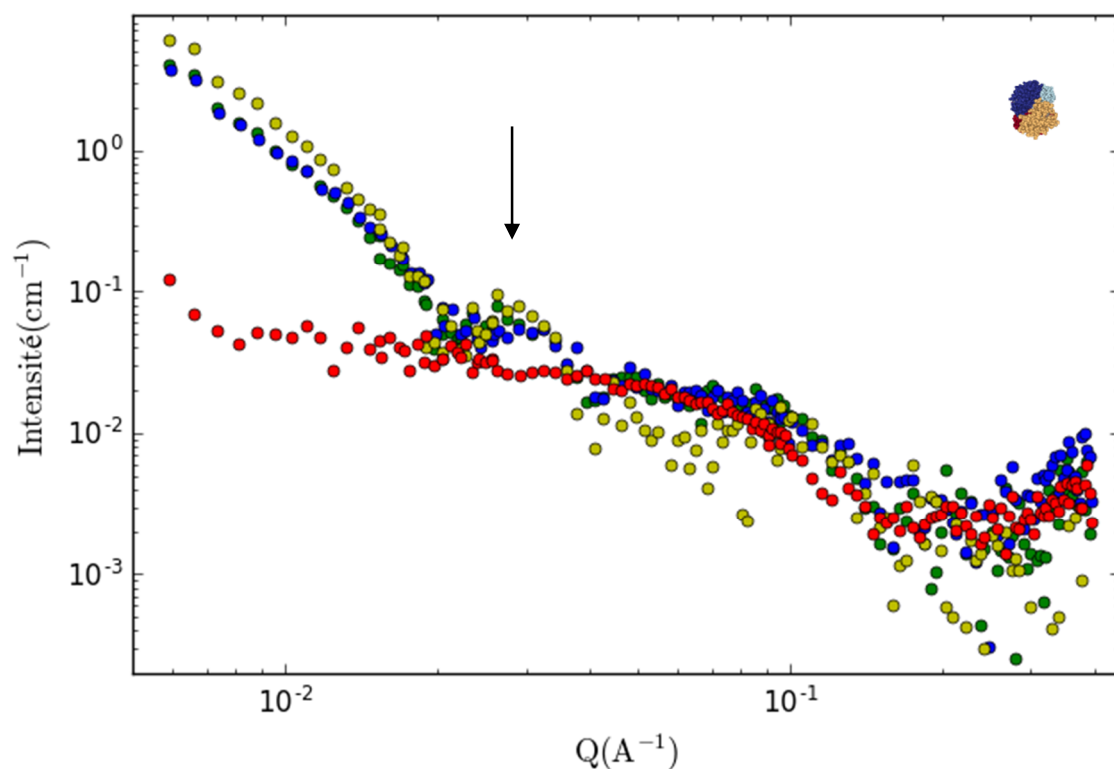


Figure 3-26 : Spectres SANS des mélanges Hb/LUDOX en tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pD 7,4 (60% D₂O) après soustraction du signal des protéines libres. ● échantillon 1 ; ● échantillon 2 ; ● échantillon 3 ; ● Hb. La flèche indique la frange formée par le facteur de forme de la couronne de protéines.

Pour les mélanges Hb/LUDOX par contre (Fig. 3-26), les spectres sont bien mieux définis. Le facteur de forme de Hb (diffusion à $q > 0,1 \text{ \AA}^{-1}$) est ici observable. On peut d'ailleurs remarquer que celui-ci est très proche du facteur de forme de la protéine libre. Ceci semble indiquer que la structure native de la protéine est conservée. On retrouve également une courbure à $q = 0,025 \text{ \AA}^{-1}$ (flèche noire). Comme pour Mb, cette courbure n'est ni le facteur de forme des LUDOX ni celui des protéines. Il ne peut correspondre qu'au facteur de forme de la couronne de protéines formée à la surface des LUDOX.

Afin de montrer que cette frange correspond au facteur de forme de la couronne protéique, une modélisation des spectres par un modèle de vésicule (Guinier et Fournet, 1955) a été appliqué (Eq. 3-7). Ce modèle est identique à une sphère creuse dont l'épaisseur de la couche extérieure peut être mesurée.

$$P(q) = \frac{\Phi}{V_{\text{couronne}}} \left[\frac{3V(\rho_{\text{solvant}} - \rho_{\text{couronne}})j_1(qR)}{qR} + \frac{3V_{\text{tot}}(\rho_{\text{couronne}} - \rho_{\text{solvant}})j_1(qR_{\text{tot}})}{qR_{\text{tot}}} \right]^2 + \text{Bruit de fond} \quad (\text{Eq. 3-7})$$

Avec ϕ la fraction volumique de la couronne, V_{couronne} , V , et V_{tot} les volumes respectifs de la couronne, des LUDOX et du total, R et R_{tot} les rayons des LUDOX et de la couronne, ρ_{solvant} et ρ_{couronne} les densités de longueur de diffusion du solvant et de la couronne, et j_1 la fonction de Bessel sphérique.

Un modèle de vésicule est bien évidemment une simplification du système. Une couronne de protéine n'est pas homogène et peut présenter des lacunes mêmes lorsque la saturation est atteinte (gènes stériques et électrostatiques). Néanmoins, dans nos conditions expérimentales (60% D₂O) le signal de diffusion à moyen q n'est dû qu'au facteur de forme de la couronne de protéines. Le calcul d'une épaisseur moyenne peut donc être effectué par ce modèle.

L'ajustement des spectres sur le modèle de vésicule est indiqué dans la figure 3-27. Pour les trois conditions, l'ajustement a été fait en prenant comme rayon R celui des LUDOX (13 nm) et comme rayon R_{tot} celui de la somme LUDOX + Hb, soit 17,6 nm, 13 + 4,6 de diamètre de giration. Le modèle de vésicule ne permet pas de tenir compte de la structure particulière de Hb. En effet, ce modèle considère la couronne comme une couche homogène de densité infinie. Ainsi il est impossible d'ajuster le modèle à $q > 0,07 \text{ \AA}^{-1}$. De plus l'agréation empêche d'ajuster la courbe à très petit q .

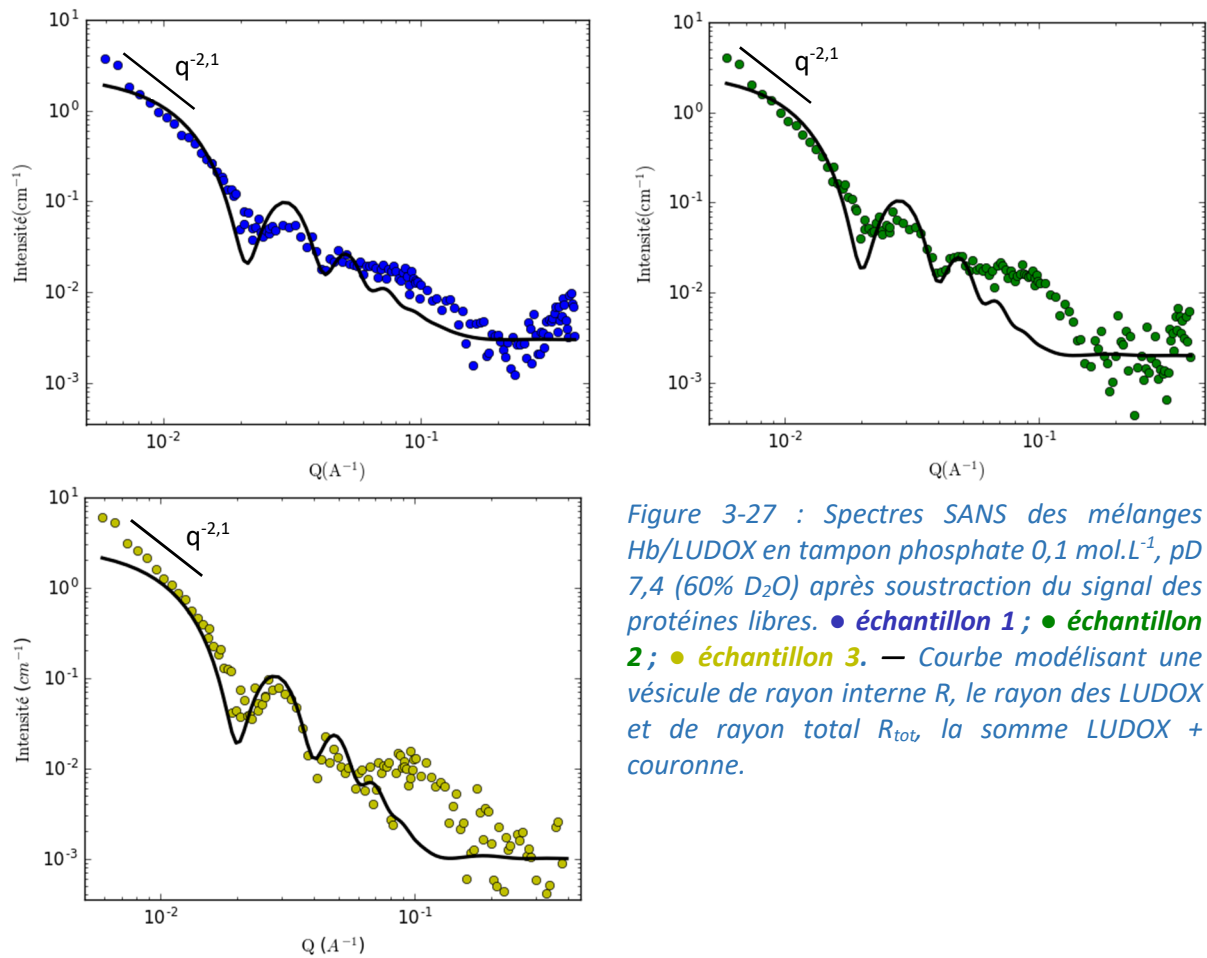


Figure 3-27 : Spectres SANS des mélanges Hb/LUDOX en tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pD 7,4 (60% D₂O) après soustraction du signal des protéines libres. ● échantillon 1 ; ● échantillon 2 ; ● échantillon 3. — Courbe modélisant une vésicule de rayon interne R, le rayon des LUDOX et de rayon total R_{tot}, la somme LUDOX + couronne.

On remarque au niveau de la frange principale un très bon ajustement entre données expérimentales et modèle de vésicule. Pour les trois échantillons, une épaisseur de la couche de protéine fixée à 4,6 nm permet un très bon ajustement. Cette épaisseur correspond exactement au diamètre de giration de Hb. L'ajustement par un modèle de vésicule montre donc clairement que l'adsorption de Hb n'induit pas de déformation de la molécule. Hb garde ainsi sa structure quaternaire lors de l'adsorption.

5. Conclusion

L'étude de l'effet de la taille des protéines sur leur adsorption sur des nanoparticules de silice a été effectuée ici. Quatre hémoprotéines de rayons de giration compris entre 1,4 nm et 11,0 nm ont été sélectionnées et leurs comportements vis-à-vis de nanosphères de silice monodisperses (R = 13,0 nm) ont été comparés.

Les isothermes d'adsorptions faites par déplétion et par calorimétrie ont permis de caractériser la formation de la couronne protéique à la fois qualitativement et quantitativement. L'adsorption de protéines sur des SiNPs suit généralement un modèle de Langmuir suggérant, entre autres, l'absence d'interactions interprotéiques et la formation d'une monocouche de protéines adsorbées. La présence

de monocouche a été confirmée par le calcul du nombre de protéines adsorbées par nanoparticule (N). Ainsi, pour les quatre protéines étudiées, il n'y a jamais plus de protéines adsorbées que ce que la surface est capable d'accepter dans le cas de monocouche.

Il a également été constaté une augmentation sensible de la constante d'adsorption K_{ads} en fonction de la taille de la protéine. Ceci indique une plus forte affinité des grosses protéines vis-à-vis d'une surface de silice. Une explication évidente pourrait venir d'une plus grande probabilité que les grosses protéines ont d'interagir avec la surface par rapport aux petites protéines. Ceci est le cas : puisque les grosses hémoprotéines sont des multimères de Mb, elles possèdent donc davantage de sites de liaison potentiel par protéine. L'augmentation d'affinité n'est toutefois pas linéaire puisque les protéines Hb et HbC1 possèdent des constantes d'adsorption très proches. Un simple effet stochastique ne permet donc pas d'expliquer à lui seul l'effet taille observé.

L'étude de la thermodynamique de l'adsorption a pu apporter une nouvelle explication. En effet, nous avons vu que les petites protéines s'adsorbent sur la silice par des interactions purement électrostatiques tandis que l'adsorption des grosses protéines s'effectue essentiellement par interactions hydrophobes. L'effet de la dilution des protéines (phénomènes de dissociation des hémoglobines) ayant été pris en compte, ceci indique des différences fondamentales dans les mécanismes d'adsorption. La réponse logique serait que l'hydrophobicité des grosses protéiques soit plus grande que celle des petites et que des interactions hydrophobes aient lieu avec la surface. Or, les différences globales d'hydrophobicité sont faibles. Aussi, d'autres explications peuvent être proposées.

Premièrement, les grosses hémoprotéines possèdent de multiples interactions inter- et intra-chaines (ponts disulfures et liaisons ioniques formées par des cations divalents notamment, Royer *et al.*, 2007) les rendant particulièrement structurées. Or, cette forte structuration induit un degré de liberté relativement plus faible pour les globines appartenant à HbC1 et HbAm par rapport à Mb ou aux globines de Hb. Lors de l'adsorption, la contribution négative de l'entropie est donc beaucoup plus faible pour les grosses que pour les petites protéines. Ceci peut expliquer une partie de l'augmentation de l'affinité. Deuxièmement, en faisant l'hypothèse que plus de liaisons avec la surface sont formées pour les grosses protéines que pour les petites, l'existence de phénomènes coopératifs positifs de type effet chélate peut être envisagée : la formation d'une première liaison fait disparaître la pénalité entropique des liaisons suivantes (Hunter et Tomas, 2003). L'effet chélate est généralement considéré comme étant de nature purement entropique. Enfin, la dissociation des hémoglobines due à la dilution a été prise en compte mais celle-ci peut potentiellement être amplifiée par la présence de SiNPs. Or, la dissociation induit généralement une augmentation de l'entropie du système qui peut

potentiellement contrebalancer la baisse d'entropie liée à l'adsorption. Ainsi, l'augmentation de l'affinité avec la taille des protéines n'est pas tant un effet taille qu'un effet de la structuration des protéines. S'il est connu que l'affinité des protéines est liée à la présence de régions désordonnées (Klein *et al.*, 2016), les résultats présentés ici indiquent clairement qu'un fort niveau de structuration peut également augmenter cette affinité.

Aussi, l'étude de l'adsorption de grosses hémoprotéines s'est avérée délicate à traiter. Deux raisons peuvent être identifiées pour expliquer cela. D'une part, la dissociation de HbC1, et surtout de HbAm, sont possibles dans les conditions de concentrations en protéines choisies. De légères différences de conditions expérimentales (tampon utilisé, concentration...) pourraient ainsi induire une forte variabilité entre les isothermes. D'autre part, les isothermes faits par déplétion nécessitent des centrifugations poussées, ce qui peut déstabiliser l'interaction protéines/SiNPs (Docter *et al.*, 2015). Ceci nous indique que les forces d'interaction sont commensurables avec les forces de cisaillement appliquées lors de la centrifugation. Des études d'interaction par ultracentrifugation analytique (AUC) permettraient d'ailleurs de mesurer ces forces d'interaction agissant entre protéines et SiNPs (Bekdemir et Sellacci, 2016).

L'adsorption des différentes hémoprotéines a également été étudiée d'un point de vue structural par dichroïsme circulaire et diffusion des neutrons aux petits angles. Pour tous les systèmes hémoprotéines/LUDOX étudiés, leur adsorption semble avoir assez peu de conséquences sur la structure secondaire des protéines. En effet, aucune déstructuration massive n'a pu être constatée en dichroïsme circulaire. D'ailleurs, concernant HbC1 et HbAm, l'absence de différence entre protéines adsorbées et protéines libres semblent indiquer que l'interaction se fait de façon locale à la surface de ces protéines. Pour Mb et Hb cependant, il a pu être observé une modulation du signal dichroïque. Cette modulation peut être interprétée comme étant due à un réarrangement local des hélices présentes à proximité de la surface de silice. Ceci confirme le modèle d'adsorption des protéines qui considère que les protéines structurées (dont font partie les hémoprotéines) ne se déstructurent pas lors de l'adsorption sur des surfaces chargées.

Les structures tertiaires et quaternaires des deux petites protéines Mb et Hb ont également été étudiées après adsorption. Il est rapidement apparu que le facteur de forme des protéines adsorbées était très similaire à celui des protéines libres. Ceci confirme la conservation de la forme globale des hémoprotéines lors de l'adsorption. Cependant la présence d'interférences destructives dans les spectres de diffusion ne permet pas de mesurer précisément la taille de ces protéines adsorbées. Des expériences de "matching" de la silice ont donc été faites. Le passage des échantillons en 60% D₂O a ainsi permis de faire disparaître le signal de la silice et donc d'éliminer les interférences destructives

observées préalablement en 100% D₂O. Si le signal de diffusion était trop faible pour Mb, pour Hb, une modélisation de l'épaisseur de la couronne de protéines a pu être effectuée. Cette épaisseur (environ 4,6 nm) indique clairement que les protéines adsorbées possèdent la même taille que les protéines libres. Il n'y a donc aucune modification de la structure quaternaire de Hb du fait de son adsorption.

À notre connaissance, l'étude de la structure quaternaire de protéines adsorbées sur des surfaces de silice n'a jamais été établie. Ce résultat confirme les données de dichroïsme circulaire qui indiquaient l'absence de déstructuration et justifie l'hypothèse émise depuis le début de ce chapitre sur le fait que les hémoprotéines conservent leur structure tertiaire et quaternaire après adsorption. Toutefois, si ceci semble également être le cas pour Mb, rien ne peut être affirmé concernant HbC1 et HbAm. De nouvelles expériences de SANS permettraient notamment de savoir si HbAm adsorbée est sous forme native, d'hexamère, ou de protomère ainsi que de savoir si une orientation particulière de ces protéines est suivie lors de l'adsorption. Il a également été considéré de tirer parti de la grande taille de HbC1 et HbAm afin d'observer leur adsorption directement en microscopie électronique. En effet, la résolution structurale de HbAm a été faite en partie par microscopie électronique à transmission (chapitre 2, § 2.8.). Il est vite apparu que la cryo-microscopie électronique était la méthode la plus indiquée ici. Elle permet en effet de visualiser des systèmes figés dans un état, sans ajout de colorant. Cependant, de nombreux tests et essais auraient été nécessaires afin d'optimiser les contrastes et d'obtenir une résolution suffisante.

En outre, un aspect important des hémoprotéines n'a pas été traité ici. Il s'agit de leur fonction de fixation du dioxygène. Il a ainsi été montré récemment que l'hémoglobine Hb possède une affinité plus grande pour l'oxygène lorsqu'elle est adsorbée que lorsqu'elle est libre (Devineau *et al.*, 2017). Ceci indique donc que l'environnement autour des hèmes est influencé par l'adsorption. Des expériences d'absorption des rayons X au seuil du fer sont donc prévues afin d'établir l'existence ou non de différences locales autour des atomes de fer.

Bibliographie – Chapitre 3

- **Antonini E.** and Brunori, M. (1971) *Hemoglobin and Myoglobin in Their Interactions with Ligands*. North Holland Publishing Company: Amsterdam. Vol. 21.
- **Atkins P.** and De Paula J. (2006) *Atkins' Physical Chemistry*, Eight Edition. ISBN: 0-7167-8759-8. EAN: 9780716787594.
- **Bang M-L.,** Centner T., Fornoff F., Geach A. J., Gotthardt M., McNabb M., Witt C. C., Labeit D., Gregorio C. C., Granzier H., and Labeit S. (2001) *The Complete Gene Sequence of Titin, Expression of an Unusual ≈700-kDa Titin Isoform, and Its Interaction With Obscurin Identify a Novel Z-Line to I-Band Linking System*. *Circulation Research*. 89, 1065-1072.
- **Bekdemir A.** and Stellacci F. (2016) *A centrifugation-based physicochemical characterization method for the interaction between proteins and nanoparticles*. *Nat. Commun.* 7, 13121.
- **Ben-Tal N.,** Honig B., Bagdassarian C. K., and Ben-Shaul A. (2000) *Association entropy in adsorption processes*. *Biophys. J.* 79, 1180-1187.
- **Beynon R. J.** and Easterby J. S. (1996) *Buffer Solution: the Basics*. IRL Press, Oxford. ISBN 0-19-963442-4.
- **Bode K. A.** and Applequist J. (1997) *Helix bundles and coiled coils in alpha-spectrin and tropomyosin: a theoretical CD study*. *Biopolymers*. 42, 855-60.
- **Callebaut I.,** Labesse G., Durand P., Poupon A., Canard L., Chomilier J., Henrissat B., and Mornon J. P. (1997) *Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives*. *Cell Mol. Life Sci.* 53, 621-645.
- **Camara-Campos A.,** Hunet C. A., and Tomas S. (2006) *Cooperativity in the self-assembly of porphyrin ladders*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103, 3034-3038.
- **Chabasse C.** (2005) *Caractérisation des familles multigéniques des globines et des linkers codant l'hémoglobine extracellulaire de *Arenicola marina*, dans le cadre de la mise au point d'un substitut sanguin humain*. Thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie, Paris VI.
- **Cioni P.** and Strambini G. B. (2002) *Effect of heavy water on protein flexibility*. *Biophys. J.* 82, 3246-3253.
- **Cherhal F.,** Cousin F., and Capron I. (2015) *Influence of charge density and ionic strength on the aggregation process of cellulose nanocrystals in aqueous suspension, as revealed by small-angle neutron scattering*. *Langmuir*. 31, 5596-5602.
- **Choy N.,** Raussens V., and Narayanaswami V. (2003) *Inter-molecular Coiled-coil Formation in Human Apolipoprotein E C-terminal Domain*. *J. Mol. Biol.* 334, 527-539.
- **Cocco M. J.,** Kao Y. H., Phillips A. T., and Lecomte J. T. *Structural comparison of apomyoglobin and metaquomyoglobin: pH titration of histidines by NMR spectroscopy*. *Biochemistry*. 31, 6481-6491.
- **Cohen M.,** Potapov V., and Schreiber G. (2009) *Four Distances between Pairs of Amino Acids Provide a Precise Description of their Interaction*. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000470.
- **Cooper T. M.** and Woody R. W. (1990) *The Effect of Conformation on the CD of Interacting Helices: A Theoretical Study of Tropomyosin*. *Biopolymers*. 30, 657-676.
- **De Gennes P. G.** (1976). *Scaling theory of polymer adsorption*. *J. Phys.-Paris*. 37, 1445-1452.
- **Devineau S.** (2013) *Adsorption des protéines sur les nanomatériaux : Biochimie et physico-chimie d'un nouveau stress*. Thèse de doctorat de l'université Paris-Sud.
- **Devineau S.,** Zanotti J. M., Loupiac C., Zargarian L., Neiers F., Pin S., and Renault J. P. (2013) *Myoglobin on silica: a case study of the impact of adsorption on protein structure and dynamics*. *Langmuir*. 29, 13465-13472.

- **Devineau S.**, Mathé C., Legros V., Gonnet F., Daniel R., Renault J. P., and Pin S. (2014) *The nano-bio interface mapped by oxidative footprinting of the adsorption sites of myoglobin*. Anal. Bioanal. Chem. 406, 8037-8040.
- **Devineau S.**, Zargarian L., Renault J. P., and Pin S. (2017) *Structure and Function of Adsorbed Hemoglobin on Silica Nanoparticles: Relationship between the Adsorption Process and the Oxygen Binding Properties*. Langmuir. 33, 3241-3252.
- **Docter D.**, Strieth S., Westmeier D., Hayden O., Gao M., Knauer S. K., and Stauber R. H. (2015) *No king without a crown--impact of the nanomaterial-protein corona on nanobiomedicine*. Nanomedicine (Lond). 10, 503-19.
- **Dubinín M. M.**, Zaverina E. D., Radushkevich L. V. (1947) Zhur. Fiz. Khim. 21, 1351.
- **Efimova Y. M.**, Haemers S., Wierczinski B., Norde W., and van Well A. A. (2007) *Stability of globular proteins in H₂O and D₂O*. Biopolymers. 85, 264-273.
- **Feigin L. A.** and Svergun D. I. (1987) *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering*. Plenum, New York.
- **Felsovalyi F.**, Mangiagalli P., Bureau C., Kumar S. K., and Banta S. (2011) *Reversibility of the Adsorption of Lysozyme on Silica*. Langmuir. 27, 11873-11882.
- **Flores J. F.**, Fisher C. R., Green B. N., Freytag J. K., Schaeffer S. W., and Royer W. E. Jr. (2005) *Sulfide binding is mediated by zinc ions discovered in the crystal structure of a hydrothermal vent tubeworm hemoglobin*. Proc. Natl. Acad. Sci. A S A. 102, 2713-2718.
- **Fontana A.**, Zambonin M., Polverino de Laureto P., De Filippis V., Clementi A., and Scaramella E. (1997) *Probing the conformational state of apomyoglobin by limited proteolysis*. J. Mol. Biol. 266, 223-230.
- **Freundlich H. Z.** (1906) *Over the adsorption in solution*. J. Phys. Chem. 57, 385-470.
- **Fultz B.** and **Howe J. M.** (2013) *Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials*. Springer. ISBN 978-3-642-29761-8.
- **Glandières J.-M.**, Calmettes P., Martel P., Zentz C., Massat A., Ramstein J., and Alpert B. (1995) *Solvent-induced structural distortions of horse metmyoglobin*. Eur. J. Biochem. 227, 241-248.
- **Goobes R.**, Goobes G., Campbell C. T., and Stayton P. S. (2006) *Thermodynamics of Statherin Adsorption onto Hydroxyapatite*. Biochem. 45, 5576-5586.
- **Graddis T. J.**, Myszka D. G., and Chaiken I. M. (1993) *Controlled Formation of Model Homo- and Heterodimer Coiled Coil Polypeptides*. Biochemistry. 32, 12664-12671.
- **Greenfield N. J.** and Hitchcock-DeGregori S. E. (1993) *Conformational intermediates in the folding of a coiled-coil model peptide of the N-terminus of tropomyosin and alpha alpha-tropomyosin*. Protein Sci. 2, 1263-1273.
- **Griffith W. P.** and Kaltashov I. A. (2003) *Highly Asymmetric Interactions between Globin Chains during Hemoglobin Assembly Revealed by Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Biochemistry. 42, 10024-10033.
- **Guinier A.** and Fournet G. (1955) *Small-Angle Scattering of X-Rays*. John Wiley and Sons, New York.
- **Halsey G.** (1948) *Physical adsorption on non-uniform surfaces*. J. Chem. Phys. 16, 931-937.
- **Harding S.** and Rowe R. J. (1982) *Modelling biological macromolecules in solution: 1. The ellipsoid of revolution*. Int. J. Biol. Macromol. 4, 160-164.
- **Hass M. A. S.** and Mulder F. A. A. (2015) *Contemporary NMR Studies of Protein Electrostatics*. Annu. Rev. Biophys. 2015. 44:53-75.

- **Hotzer** M. E. and Holtzer A. (1995) *The use of spectral decomposition via the convex constraint algorithm in interpreting the CD-observed unfolding transitions of coiled coils*. Biopolymers. 36, 365-79.
- **Holzwarth** G. and Doty P. (1965) *The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides*. J. Am. Chem. Soc. 87, 218-225.
- **Hunter** C. A. and Tomas S. (2003) *Cooperativity, Partially Bound States and Enthalpy-Entropy Compensation*. Chem. Biol. 10, 1023-1032.
- **Jeffries** S., Robbins D. J., and Capobianco A. J. (2002) *Characterization of a High-Molecular-Weight Notch Complex in the Nucleus of Notch^{IC}-Transformed RKE Cells and in a Human T-Cell Leukemia Cell Line*. Mol. Cell Biol. 11, 3927-3941.
- **Jovanovic** D. S. (1969) *Physical adsorption of gases. I. Isotherms for monolayer and multilayer adsorption*. Kolloid Z. Z. Polym. 235, 1203-1213.
- **Katz** D. S., White S. P., Huang W., Kumar R., Christianson D. W. (1994) *Structure determination of aquomet porcine hemoglobin at 2.8 Å resolution*. J. Mol. Biol. 244, 541-553.
- **Kelly** S., Jess T. J., and Price N. C. (2005) *How to study proteins by circular dichroism*. Biochimica et Biophysica Acta 1751, 119-139.
- **Klein** G., Mathé C., Biola-Clier M., Devineau S., Drouineau E., Hatem E., Marichal L., Alonso B., Gaillard J.C., Lagniel G., Armengaud J., Carrière M., Chédin S., Boulard Y., Pin S., Renault J. P., Aude J. C., and Labarre J. (2016) *RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts*. Nanotoxicology. 10, 1555-1564.
- **Klein** G., Devineau S., Aude J. C., Boulard Y., Pasquier H., Labarre J., Pin S., Renault J. P. (2016b) *Interferences of Silica Nanoparticles in Green Fluorescent Protein Folding Processes*. Langmuir. 32, 195-202.
- **Krueger** S. and Nossal R. (1988) *SANS studies of interacting hemoglobin in intact erythrocytes*. Biophys. J. 53, 97-105.
- **Krueger** S., Chen S. H., Hofrichter J., and Nossal R. (1990) *Small angle neutron scattering studies of HbA in concentrated solutions*. Biophys. J. 58, 745-757.
- **Kurz** H., Trunk H., and Weitz B. (1977) *Evaluation of methods to determine protein-binding of drugs. Equilibrium dialysis, ultrafiltration, ultracentrifugation, gel filtration*. Arzneimittelforschung. 27, 1373-1380.
- **Kyte** J. and Doolittle R. F. (1982) *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. J. Mol. Biol. 157, 105-132.
- **Langmuir** I. (1918) *Adsorption of gases on plane surface of glass, mica and platinum*. J. Am. Chem. Soc. 40, 1361-1403.
- **Lau** S. Y. M., Taneja A. K., and Hodges R. S. (1984) *Synthesis of a Model Protein of Defined Secondary and Quaternary Structure*. J. Biol. Chem. 259 13253-13261.
- **Le Cœur** C., Combet S., Carrot G., Busch P., Teixeira J., and Longeville S. (2015) *Conformation of the Poly(ethylene Glycol) Chains in DiPEGylated Hemoglobin Specifically Probed by SANS: Correlation with PEG Length and in Vivo Efficiency*. Langmuir. 31 8402-8410.
- **Lin** M. Y., Lindsay H. M., Weitz D. A., Klein R., Ball R. C., and Meakin P (1990) *Universal diffusion-limited colloid aggregation*. J. Phys.: Condens. Matter 2 3093.
- **Liu** Y., Fratini E., Baglioni P., Chen W. R., Chen S. H. (2005) *Effective long-range attraction between protein molecules in solutions studied by small angle neutron scattering*. Phys. Rev. Lett. 95, 118102.

- **Lu T. H., Panneerselvam K., Liaw Y. C. Kan F., and Lee C. J. (2000)** *Structure determination of porcine haemoglobin*. *Biol. Crystallogr.* 56, 304-312.
- **Manavalan P. and Johnson W. C. Jr (1983)** *Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class*. *Nature.* 305, 831-832.
- **Mandal S. S., Cristiglio V., Lindner P., and Bhattacharyya A. J. (2014)** *Small-angle neutron scattering studies of hemoglobin confined inside silica tubes of varying sizes*. *Chemphyschem.* 15 302-309.
- **Mathé C., Devineau S., Aude J.C., Lagniel G., Chédin S., Legros V., Mathon M.H., Renault J.P., Pin S., Boulard Y., and Labarre J. (2013)** *Structural determinants for protein adsorption/non-adsorption to silica surface*. *PLoS One.* 8, e81346.
- **Mehboob S. Luo B-H, Patel B. M., and Fung L. W.-M. (2001)** *$\alpha\beta$ Spectrin Coiled Coil Association at the Tetramerization Site*. *Biochem.* 40, 12457-12464.
- **Micsonai A., Wien F., Kernya L., Lee Y-H, Goto Y., Réfrégiers M., and Kardos J. (2015)** *Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy*. *PNAS* 112:E3095-103.
- **Mylonas E. and Dmitri I. Svergun I. (2007)** *Accuracy of molecular mass determination of proteins in solution by small-angle X-ray scattering*. *J. Appl. Cryst.* 40, 245-249.
- **Ohe M. and Kajita A. (1980)** *Changes in pK_a Values of Individual Histidine Residues of Human Hemoglobin upon Reaction with Carbon Monoxide*. *Biochem.* 19, 4443-4450.
- **Paulucci A. A., Hicks L., Machado A., Miranda M. T., Kay C. M., and Farah C. S. (2002)** *Specific Sequences Determine the Stability and Cooperativity of Folding of the C-terminal Half of Tropomyosin*. *J. Biol. Chem.* 277, 39574-39584.
- **Perutz M. F. (1970)** *Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin*. *Nature.* 228, 726-739.
- **Pfeiffer C., Rehbock C., Hühn D., Carrillo-Carrion C., de Aberasturi D. J., Merk V., Barcikowski S., and Parak W.J. (2014)** *Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles*. *J. R. Soc. Interface.* 11, 2013093.
- **Pin S., Royer C. A., Gratton E., Alpert B., and Weber G. (1990)** *Subunit interactions in hemoglobin probed by fluorescence and high-pressure techniques*. *Biochemistry.* 29, 9194-9202.
- **Redlich O. and Peterson D. L. (1959)** *A useful adsorption isotherm*. *J. Phys. Chem.* 63, 1024.
- **Rendell M., Stephen P. M., Paulsen R., Valentine J. L., Rasbold K., Hestorff T., Eastberg S., and Shint D.C. (1985)** *An interspecies comparison of normal levels of glycosylated hemoglobin and glycosylated albumin*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 81, 819-822.
- **Rousselot M., Le Guen D., Chabasse C., and Zal F. (2006)** *Novel dissociation mechanism of a polychaetous annelid extracellular haemoglobin*. *FEBS.* 273: 1582-1596.
- **Royer W. E. Jr., Omartian M. N., and Knapp J. E. (2007)** *Low resolution crystal structure of Arenicola erythrocyruorin: influence of coiled coils on the architecture of a megadalton respiratory protein*. *J. Mol. Biol.* 365, 226-236.
- **Sadeghpour Dilmaghani A. (2012)** *Effects of polyelectrolytes and their oligomers on charging and interactions of colloidal particles*. Thèse de doctorat : Univ. Genève. no. Sc. 4405.
- **Searle M. S., Sharman G. J., Groves P., Benhamu B., Beauregard D. A., Westwell M. S., Dancer R. J., Maguire A. J., Try A. C., and Williams D. H. (1996)** *Enthalpic (electrostatic) contribution to the chelate effect: a correlation between ligand binding constant and a specific hydrogen bond strength in complexes of glycopeptide antibiotics with cell wall analogues*. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* 23, 2781-2786.

- **Sire O.**, Zentz C., Pin S., Chinsky L., Turpin P. Y., Martel P., Wong P. T. T., and Alpert B. (1997) *Long-Range Effects in Liganded Hemoglobin Investigated by Neutron and UV Raman Scattering, FTIR, and CD Spectroscopies*. J. Am. Chem. Soc. 119, 12095-12099.
- **Sprenger K. G.** and Pfaendtner J. (2016) *Strong Electrostatic Interactions Lead to Entropically Favorable Binding of Peptides to Charged Surfaces*. Langmuir. 32, 5690-5701.
- **Stradner A.**, Cardinaux F., Schurtenberger P. (2006) *Comment on "Effective long-range attraction between protein molecules in solution studied by small angle neutron scattering"*. Phys. Rev. Lett. 96, 219801.
- **Strojan K.**, Leonardi A., Bregar V. B., Krizaj I., Svete J., and Pavlin M. (2017) *Dispersion of Nanoparticles in Different Media Importantly Determines the Composition of Their Protein Corona*. PLoS one, DOI:10.1371/journal.pone.0169552.
- **Svergun D. I.**, Petoukhov M. V., and Koch M. H. J. (2001) *Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering*. Biophys. J. 80, 2946-2953.
- **Svergun D. I.**, Ekström F., Vandegriff K. D., Malavalli A., Baker D. A., Nilsson C., and Winslow R. M. (2008) *Solution Structure of Poly(ethylene) Glycol-Conjugated Hemoglobin Revealed by Small-Angle X-Ray Scattering: Implications for a New Oxygen Therapeutic*. Biophys. J. 94, 173-181.
- **Temkin M.** and Pyzhev V. (1939) *Kinetics of the synthesis of ammonia on promoted iron catalysts*. Acta Physicochimica URSS, 12, 217-222.
- **Thill A.**, Désert A., Fouilloux S., Taveau J.-C., Lambert O., Lansalot M., Bourgeat-Lami E., Spalla O., Belloni L., Ravaine S., and Duguet E. (2012) *Spheres Growing on a Sphere: A Model to Predict the Morphology Yields of Colloidal Molecules Obtained through a Heterogeneous Nucleation Route*. Langmuir. 28, 11575-11583.
- **Umpleby R. J.** 2nd, Baxter S. C., Chen Y., Shah R. N., Shimizu K. D. (2001) *Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmuir-Freundlich isotherm*. Anal. Chem. 73, 4584-4591.
- **Topoglidis E.**, Campbell C. J., Cass A. E. G., and Durrant J. R. (2001) *Factors that Affect Protein Adsorption on Nanostructured Titania Films. A Novel Spectroelectrochemical Application to Sensing*. Langmuir. 17, 7899-7906.
- **Weitz D. A.**, Huang J. S., Lin M. Y., and Sung J. (1985) *Limits of the Fractal Dimension for Irreversible Kinetic Aggregation of Gold Colloids*. Phys. Rev. Lett. 54, 1416-1419.
- **Zheng T.**, Boyle A., Marsden H. R., Valdink D., Martelli G., Raap J., and Kros A. (2015) *Probing coiled-coil assembly by paramagnetic NMR spectroscopy*. Org. Biomol. Chem. 13, 1159-1168.

Chapitre 4 : Effet de la taille des nanoparticules sur l'interaction protéines/nanoparticules

« If you're incompetent, you can't know you're incompetent... the skills you need to produce a right answer are exactly the skills you need to recognize what a right answer is. »

Justin Kruger and David Dunning (2010)

Les nanoparticules possèdent une grande diversité structurale, notamment en termes de forme et de taille. Ce dernier facteur a été étudié à plusieurs reprises dans le contexte de la formation de couronnes de protéines et des différences d'adsorption ont pu être constatées (Voir Chapitre 1 § 4.2.2.). Cependant, ces études se concentrent généralement sur l'impact structural et/ou fonctionnel de l'adsorption des protéines et ne s'intéressent pas à la formation de la couronne de protéines d'un point de vue quantitatif (recouvrement de la surface, affinité des protéines...). De plus, aucune étude ne s'est intéressée à ce jour à l'impact de la taille des SiNPs sur le type de protéines adsorbées dans un mélange complexe de protéines. Ainsi l'observation de l'effet taille des nanoparticules et surtout la compréhension des mécanismes sous-jacents font encore défaut.

Ce chapitre vise donc à aborder la problématique de l'effet taille des nanoparticules en comparant la formation de couronnes protéiques sur trois nanoparticules de silice (SiNPs). Ces SiNPs, appelées MN10, MN50 et MN100, sont des nanosphères monodisperses caractérisées en profondeur dans le chapitre 2 (§ 1.). Pour rappel leurs dimensions sont indiquées dans le tableau 4-1. Les surfaces spécifiques, S_s , calculées à partir d'une sphère de rayon R sont également notées. On remarque que ces trois SiNPs couvrent une grande gamme de S_s avec un ordre de grandeur d'écart entre MN10 et MN100.

Tableau 4-1 : Valeurs des rayons physiques R , rayons hydrodynamiques R_H , et surfaces spécifiques S_s de MN10, MN50 et MN100.

SiNPs	R (nm)	R_H (nm)	S_s (m ² /g)
MN10	4,3 ± 0,3	7,5 ± 1,1	317,1
MN50	16,5 ± 0,2	40,3 ± 0,2	82,6
MN100	39,0 ± 0,4	62,5 ± 1,7	35,0

Deux approches distinctes sont entreprises ici. La première approche étudie la formation de couronnes protéiques constituées à partir de protéines modèles. Comme pour le chapitre précédent des

hémoprotéines ont été choisies. Différents isothermes d'adsorption faites par déplétion seront étudiés. L'impact structural est également étudié par dichroïsme circulaire. La deuxième approche s'intéresse à la constitution de couronnes protéiques formées à partir d'extrait de protéines de levures. Cet extrait contient des milliers de protéines différentes. L'étude entreprise vise à établir si la taille des SiNPs joue un rôle dans la composition de la couronne et, si oui, quelles différences sont observables.

1. Etude de l'effet taille des nanoparticules en présence d'hémoprotéines

L'effet taille des SiNPs est étudié ici en comparant l'adsorption d'hémoprotéines sur des SiNPs monodisperses : MN10, MN50, et MN100. Les hémoprotéines utilisées ont été caractérisées en profondeur dans le chapitre 2 (§ 3.) et leurs caractéristiques physico-chimiques sont indiquées dans le tableau 4-2.

Tableau 4-2 : Caractéristiques physico-chimiques des quatre hémoprotéines utilisées.

Protéine	Mb	Hb	HbC1	HbAm
Poids moléculaire (kDa)	17	64,5	400	3600
R_g (nm)	1,4 ± 0,1	2,3 ± 0,2	6,0 ± 0,4	11,0 ± 0,4
R_H (nm)	2,4 ± 0,1	4,1 ± 0,2	7,0 ± 0,1	17,8 ± 2,2
Nombre de globines	1	4	24	144
pH(I)	7	7,2	≈ 7	4,6

Des isothermes d'adsorption par déplétion ainsi que des expériences de dichroïsme circulaire (DC) seront analysés. Pour des raisons pratiques (difficulté de mesure des isothermes et manque de temps) l'étude se concentrera essentiellement sur les deux premières protéines, Mb et Hb.

1.1. Isothermes d'adsorption par déplétion

Afin de caractériser la formation de la couronne formée par différentes hémoprotéines, des isothermes d'adsorption par déplétion ont été faits (Fig. 4-1). Cela signifie que la mesure de la quantité de protéines adsorbées a été faite par différence entre la quantité de protéines totales et la quantité de protéines libres (voir Chapitre 7 § 3.1. pour plus de détails). En s'intéressant aux figures 4-1a et 4-1b (isothermes en présence de Mb et d'Hb), on constate que les profils d'adsorption sont assez similaires. D'une part, tous les isothermes possèdent une forme hyperbolique caractérisée par un plateau à haute concentration en protéines libres qui représente la saturation des surfaces de SiNPs. D'autre part on observe une nette différence entre les isothermes en présence de MN10 et celles en présence de MN50 et MN100. En effet, si ces dernières SiNPs ont des profils d'adsorption identiques, MN10 semble adsorber beaucoup moins de protéines à surface égale.

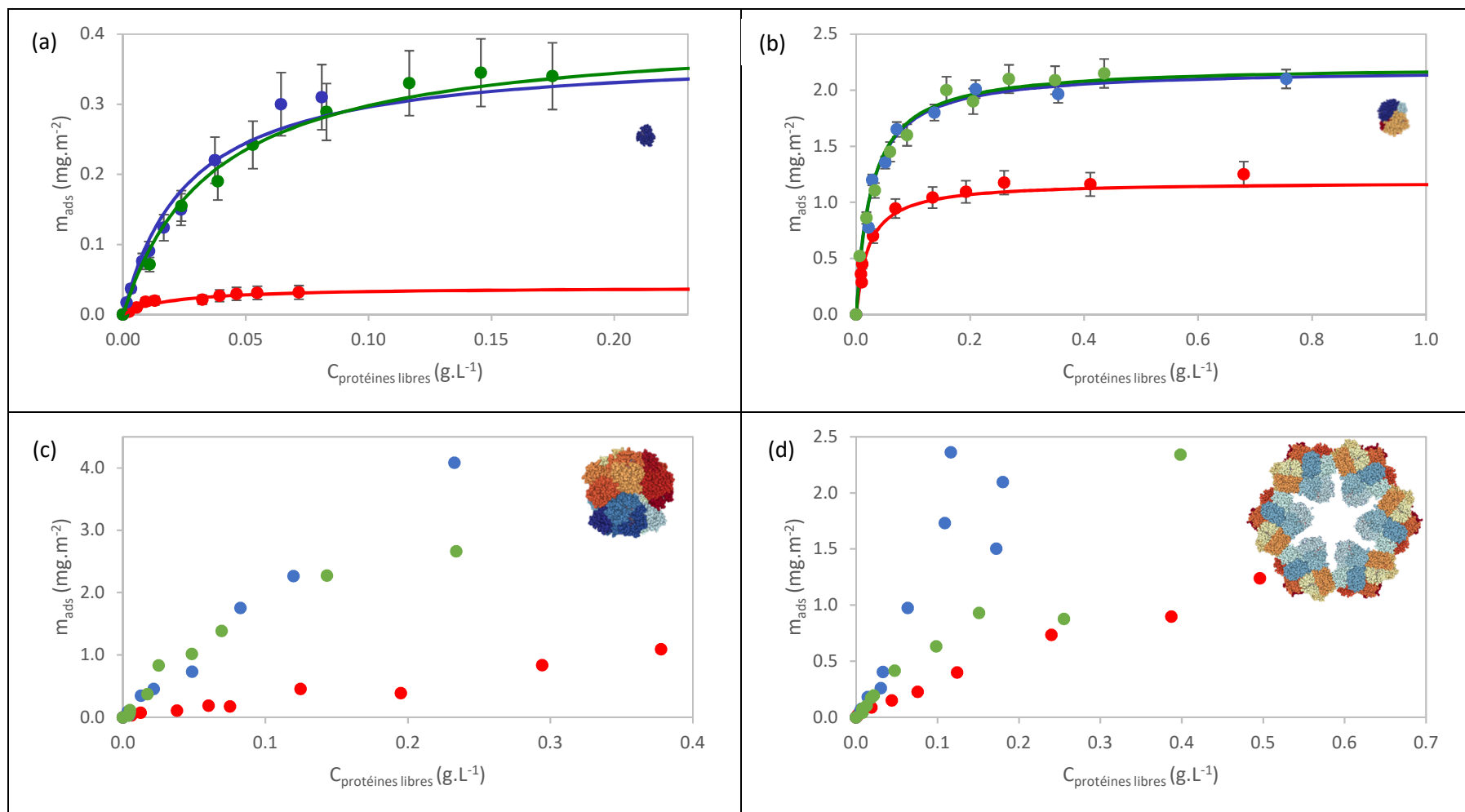


Figure 4-1 : Isothermes d'adsorption de Mb, Hb, HbC1, et HbAm adsorbées sur trois SiNPs en tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹ à pH7. Les points de couleur représentent différents points d'une même expérience et les courbes sont les moyennes de 3 expériences ajustées selon le modèle de Langmuir.

● MN10, ● MN50, ● MN100.

Concernant les grosses hémoprotéines par contre (Fig. 4-1c et 4-1d) il est plus difficile de tirer des conclusions. En effet, contrairement aux isothermes faits en présence de Mb et de Hb qui ont pu être reproduits au moins trois fois et possèdent une très bonne répétabilité, les isothermes de HbC1 et HbAm se sont révélés très difficiles à reproduire. Ceci est dû au fait que la variabilité des mesures augmente très fortement lorsque la concentration protéique augmente. Cette variabilité est si élevée qu'il est impossible d'atteindre la saturation de la surface protéique. Sur les figures 4-1c et 4-1d sont donc représentés des isothermes représentatifs de ce qui peut être observé avec une variabilité acceptable. Pour HbC1, on constate qu'il existe cette même dichotomie entre MN10 d'une part et MN50 et MN100 d'autre part. Enfin, pour HbAm une différence un peu moins nette est observable. On observe donc une nette différence de profil d'adsorption entre les plus petites SiNPs et les plus grosses. Afin d'estimer davantage ces différences observées, un calcul des constantes d'isotherme peut être fait.

Ainsi les isothermes de la figure 4-1 ont été modélisés par le modèle d'adsorption de Langmuir utilisé précédemment (Chapitre 3, § 1.1.). À partir de ce modèle, deux paramètres peuvent être déterminés : la quantité maximale de protéines adsorbables par unité de surface (m_{∞} , exprimée en g.m^{-2}) et la constante d'adsorption (K_{ads}) correspondant à l'affinité qu'une protéine a pour une surface donnée (Tab. 4-3). Si l'unité du K_{ads} reste déterminée en L.mol^{-1} comme dans le chapitre précédent, m_{∞} ne possède pas la même unité que N, utilisée précédemment. En effet, N est un nombre de protéines par SiNPs. L'unité choisie ici permet donc de tenir compte de la forte différence de surface spécifique entre les différentes SiNPs.

Tableau 4-3 : Constantes d'affinité calculées à partir du modèle d'isotherme de Langmuir pour les isothermes de Mb et Hb adsorbées sur MN10, MN50, ou MN100 mesurées en tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹ à pH7.

Protéine	SiNPs	m_{∞} (mg.m^{-2})	K_{ads} (L.mol^{-1})
Mb	MN10	$0,04 \pm 0,01$	$9,0\text{E}+05 \pm 3,7\text{E}+05$
	MN50	$0,37 \pm 0,24$	$6,0\text{E}+05 \pm 2,3\text{E}+05$
	MN100	$0,41 \pm 0,14$	$4,8\text{E}+05 \pm 2,3\text{E}+05$
Hb	MN10	$1,18 \pm 0,10$	$3,0\text{E}+06 \pm 2,9\text{E}+05$
	MN50	$2,19 \pm 0,10$	$2,5\text{E}+06 \pm 3,0\text{E}+05$
	MN100	$2,22 \pm 0,13$	$2,4\text{E}+06 \pm 4,5\text{E}+06$

La comparaison des m_{∞} confirme les observations faites précédemment à savoir qu'il existe une différence du degré de saturation des surfaces entre les petites et les grosses SiNPs. En effet, à surface égale, MN50 et MN100 peuvent adsorber la même quantité de protéine, que ce soit pour Mb ou pour Hb ($m_{\infty} \approx 0,4$ et $2,2 \text{ mg.m}^{-2}$ respectivement). Par contre MN10 ne peut adsorber à sa surface que 10%

de molécules de Mb ($0,04 \text{ mg.m}^2$) et 54% de molécules de Hb ($1,18 \text{ mg.m}^2$) par rapport à une même quantité de surface de MN50 ou MN100.

Concernant la constante d'adsorption K_{ads} , on constate ici qu'il n'y a pas de différence significative d'affinité entre les SiNPs étudiées. Ainsi, quels que soient les SiNPs, le K_{ads} de Mb est d'environ $6,0.10^5 \text{ L.mol}^{-1}$ tandis que celui de Hb est de $2,5.10^6 \text{ L.mol}^{-1}$. La différence d'affinité entre les deux protéines provient de l'effet taille des protéines étudié dans le chapitre précédent (Chapitre 3, § 1.3.). On constate donc que le m_{∞} varie selon la taille des SiNPs tandis que le K_{ads} reste constant.

Deux facteurs pourraient expliquer la variation de m_{∞} : la taille des SiNPs et la chimie de surface. La principale raison qui peut expliquer cet effet taille est la différence de courbure qui existe entre MN10 d'une part et MN50 et MN100 d'autre part (chapitre 2, § 1.2.). On remarque en effet que, vis-à-vis des protéines, la surface semble quasi plane sur les plus grosses SiNPs tandis que MN10 possède une surface très arrondie (Fig. 4-2). Ainsi il est possible que l'arc de courbure formé par ces objets induise une plus forte gêne stérique.

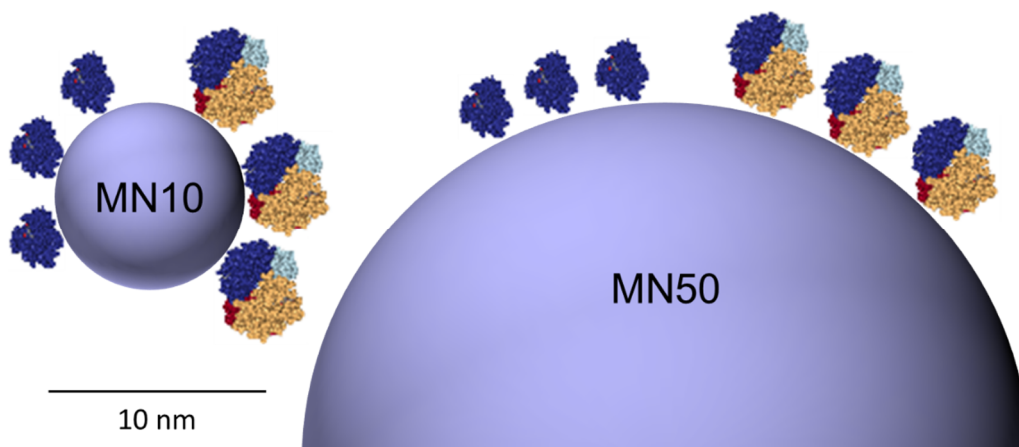


Figure 4-2 : Représentation schématique de Mb et Hb adsorbées sur MN10 et MN50.

Néanmoins, si cet encombrement stérique permet d'expliquer la diminution de m_{∞} pour Hb, elle ne suffit pas pour justifier la différence d'un facteur 10 observée pour Mb. Des facteurs autres que l'arc de courbure semblent donc intervenir ici.

Aussi, une différence de chimie de surface de MN10 par rapport aux autres SiNPs a pu être observée dans le chapitre 2 (§ 1.4.). À pH 7, MN10 est faiblement chargé négativement ($-4,6 \text{ mV}$) tandis que MN50 et MN100 sont beaucoup plus électronégatifs ($-20,1$ et $-22,9 \text{ mV}$ respectivement). Cette faible charge de surface est due à deux phénomènes : d'une part, des petites SiNPs synthétisées par la méthode de Stöber possèdent moins de groupement silanol déprotonés que de plus grosses SiNPs

(Patwardhan *et al.*, 2012). D'autre part, il a été montré que MN10 contenait des molécules d'arginine dans la nanoparticule qui peuvent neutraliser la charge des silanol de surface. Ainsi la charge de surface de MN10 se rapproche de celles de Mb et Hb qui sont également très peu chargées négativement (≈ -4 mV). L'attraction électrostatique qui est généralement le moteur des interactions protéines/surface de silice est donc ici contrebalancée par des répulsions électrostatiques. Ceci peut expliquer pourquoi moins de protéines s'adsorbent à la surface des MN10.

De plus, l'étude de l'effet pH sur l'adsorption (Chapitre 3, § 1.4.) montre que des variations dans la charge de surface des SiNPs et des protéines peut modifier le m_{∞} le K_{ads} de l'interaction. Des différences que m_{∞} ont notamment été constatées avec Mb, alors que, dans les mêmes conditions, le m_{∞} de Hb reste constant. La différence de recouvrement entre Mb et Hb (respectivement 10% et 54%) peut donc s'expliquer par des différences électrostatiques qui affectent davantage Mb que Hb.

Cependant l'absence de différence au niveau du K_{ads} est plus intrigante. En effet, l'affinité est fortement dépendant de la chimie des surfaces des protéines et des SiNPs. Or on aurait pu s'attendre à une baisse du K_{ads} en présence de MN10 du fait des conditions électrostatiques moins favorables. Ainsi, si la chimie de surface joue certainement un rôle dans les différents profils d'adsorption, le facteur de taille n'est pas à exclure.

1.2. Dichroïsme circulaire

1.2.1. Spectres dichroïques des SiNPs et des hémoprotéines

L'impact de l'adsorption des hémoprotéines sur leur structure a été étudié par dichroïsme circulaire (DC) (Voir Chapitre 7, § 3.4. pour le protocole expérimental). Ces expériences ont été faites en même temps que celles du chapitre précédent (Chapitre 3, §3.). Les quatre hémoprotéines en présence des trois SiNPs suivantes ont été étudiées : MN10, MN50 et MN100.

Afin d'étudier le signal DC des protéines adsorbées sur les SiNPs il convient de ne pas avoir de signal dichroïque provenant des nanoparticules ni du tampon aux longueurs d'onde d'intérêt. Les nanoparticules étant constituées de silice amorphe donc non structurée, le signal DC devrait être nul. Ceci est le cas pour les MN50 et MN100 (Fig. 4-3). Pour MN10 par contre, en deçà de 230 nm, les particules produisent un signal DC très fort qui sature le capteur à partir de 205 nm. Ceci est à corrélérer au fait que ces petites nanoparticules de silice ont été synthétisées sans recroissance par la méthode de Yokoi. Des molécules d'arginine sont donc certainement présentes près de leur surface (confirmée par spectroscopie IR, voir chapitre 2, § 1.5.). Ces molécules sont chirales et produisent un signal

dichroïque dans la zone d'intérêt (Amdursky et Stevens, 2015). Seules les SiNPs MN50 et MN100 seront donc analysées par la suite.

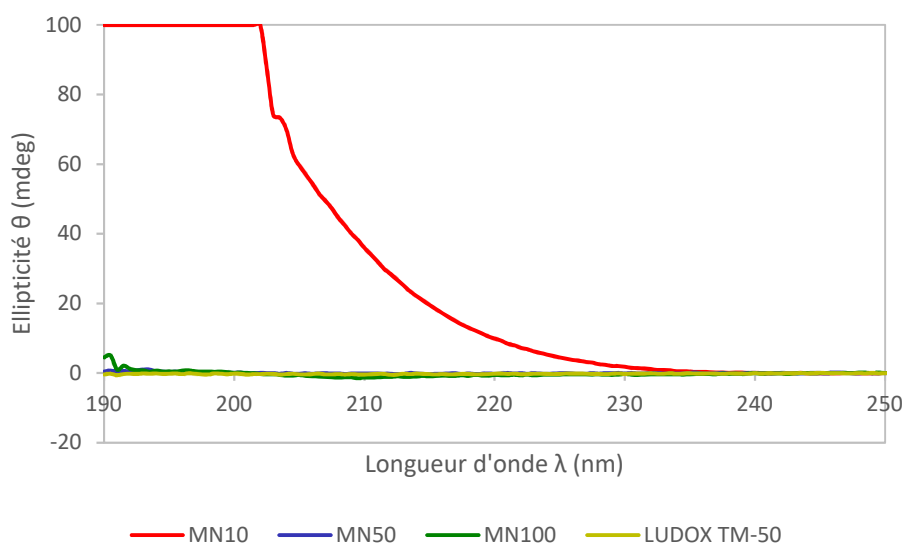


Figure 4-3 : Spectres DC des SiNPs en milieu tamponné (phosphate 0,1 mol. L⁻¹, pH 7). C_{SiNPs} = 10 g.L⁻¹. ● MN10, ● MN50, ● MN100, ● LUDOX TM-50.

Les spectres DC des quatre hémoprotéines ont été étudiées dans le chapitre 3 (§. 3.1.). Toutes ces protéines possèdent des profils d'ellipticité similaires caractérisés par des structures en hélices α.

1.2.2. Spectres DC des mélanges hémoprotéines/SiNPs

Après avoir mesuré les signaux dichroïques des hémoprotéines et des SiNPs pris séparément, des spectres DC de mélanges ont été mesurés. La concentration en monomère d'hémoprotéine reste constante à 3 μmol.L⁻¹ et la concentration en SiNPs est calculée à partir des isothermes d'adsorption propres à chaque système. La condition souhaitée étant d'avoir une nette majorité de protéines adsorbées, un excès de SiNPs a été mis avec des concentrations allant de 1 à 20 g.L⁻¹. *In fine*, les pourcentages de protéines adsorbées estimés furent les suivants : Mb : 80%, Hb : 90%, HbC1 : 70%, HbAm : 70%. Les spectres DC de tous les systèmes étudiés sont représentés sur la figure 4-4. Chaque spectre représenté ici a été sélectionné pour être le plus représentatif des 3 répliques qui ont été effectués.

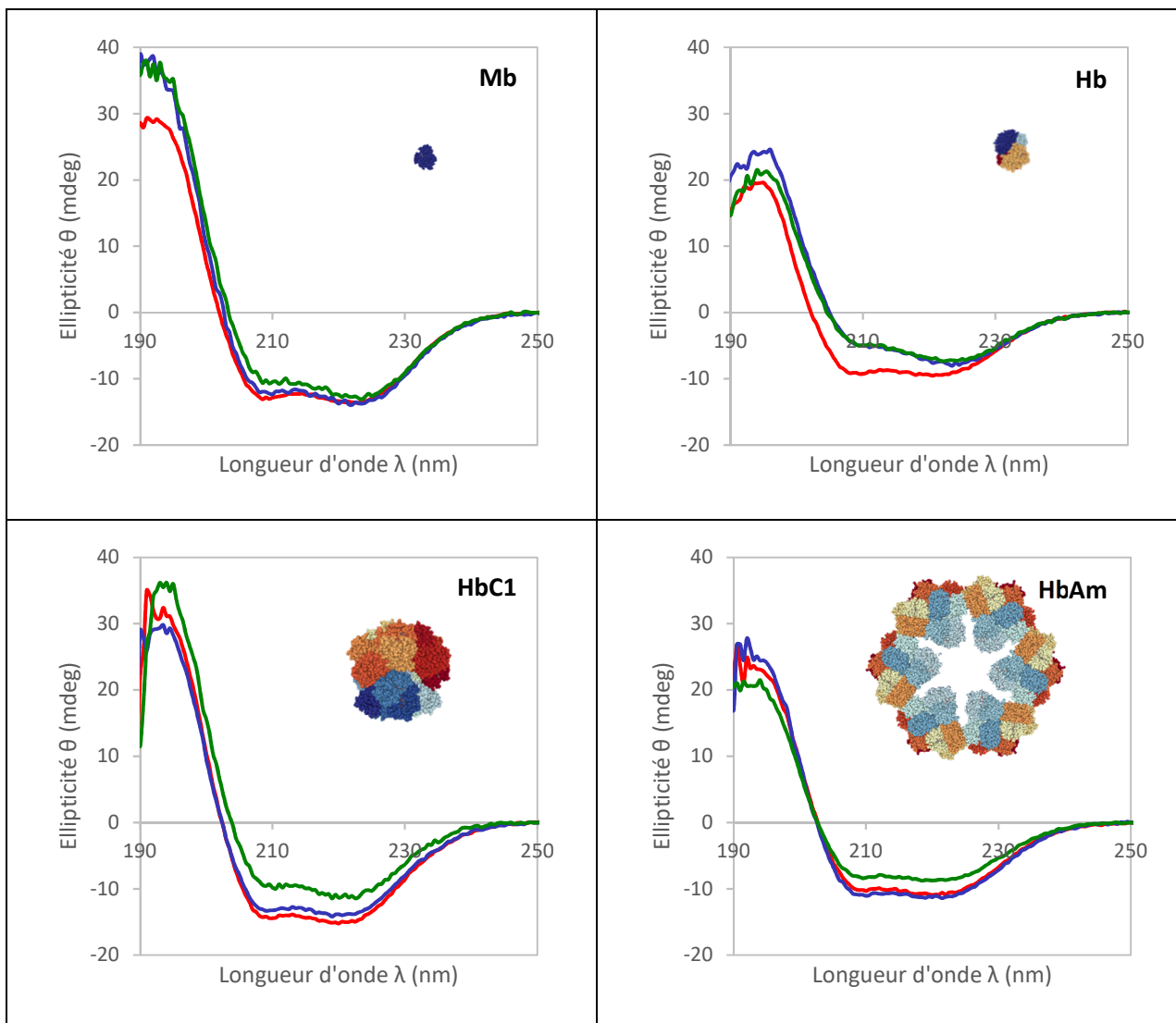


Figure 4-4 : Spectres DC des quatre hémoprotéines adsorbées sur différentes SiNPs. — **Protéines libres**, — **protéines adsorbées sur MN50**, — **protéines adsorbées sur MN100**.

On remarque immédiatement que l'allure des spectres de DC ne change pas avec l'adsorption des hémoprotéines sur des SiNPs et que le spectre caractéristique de la présence d'hélices α est globalement conservé. Toutefois des différences locales fortes d'intensité au niveau des différents pics sont observables. Ainsi, si l'on compare les spectres des différentes protéines libres et ceux de leur forme adsorbée sur les MN50 on peut constater exactement les mêmes évolutions spectrales que pour les SiNPs LUDOX (Chapitre 3, § 3.2.) : Pour les petites protéines, Mb et Hb, l'intensité du pic à 222 nm est conservée mais celui du pic à 208 est fortement diminué (Tab. 4-4). Pour les grosses protéines par contre, les spectres adsorbés et libres sont très proches. Aucune différence significative ne peut être constatée. Ces observations ont été interprétées comme étant dues à un réarrangement local des hélices interagissant avec la surface de la silice et/ou des hélices entre elles.

Tableau 4-4 : valeurs du ratio $\epsilon_{222}/\epsilon_{208}$ issus des spectres DC des quatre hémoprotéines seules ou liées à différentes SiNPs

r_{α} ($\epsilon_{222}/\epsilon_{208}$)	Protéine seules	Protéine liée à MN50	Protéine liée à MN100
Mb	$1,08 \pm 0,01$	$1,16 \pm 0,06$	$1,30 \pm 0,25$
Hb	$1,04 \pm 0,01$	$1,69 \pm 0,3$	$1,71 \pm 0,3$
HbC1	$1,06 \pm 0,02$	$1,10 \pm 0,08$	$1,35 \pm 0,08$
HbAm	$1,09 \pm 0,02$	$1,05 \pm 0,1$	$1,10 \pm 0,01$

Concernant les protéines adsorbées sur MN100 par contre, on peut observer une diminution de l'ellipticité dans les régions à 208 nm comme à 222 nm, et ce, quelle que soit la protéine étudiée. Toutefois, l'ampleur de la baisse diffère selon les protéines. Mb va voir une baisse légère de son signal DC ; Hb une baisse plus marquée avec une forte baisse autour de 208 nm et une faible baisse vers 222 nm ; HbC1 et HbAm présentent elles un signal qui diminue de façon quasi uniforme.

Cette diminution d'ellipticité semble spécifique à MN100. En effet, ni MN50 ni les LUDOX ne possèdent de telles variations de signal. De premier abord on pourrait penser qu'il s'agit là d'un effet taille. En effet, du point de vue des grosses protéines, les NPs MN50 ou LUDOX possèdent un arc de courbure important. À l'inverse, la surface des MN100 peut être considérée comme étant quasi plane (Fig. 4-5). Cependant, cet effet taille, s'il est possible pour HbC1 et HbAm, est peu probable pour Mb et Hb ; MN50 et MN100 possédant des tailles bien plus grandes que ces protéines (Fig. 4-2).

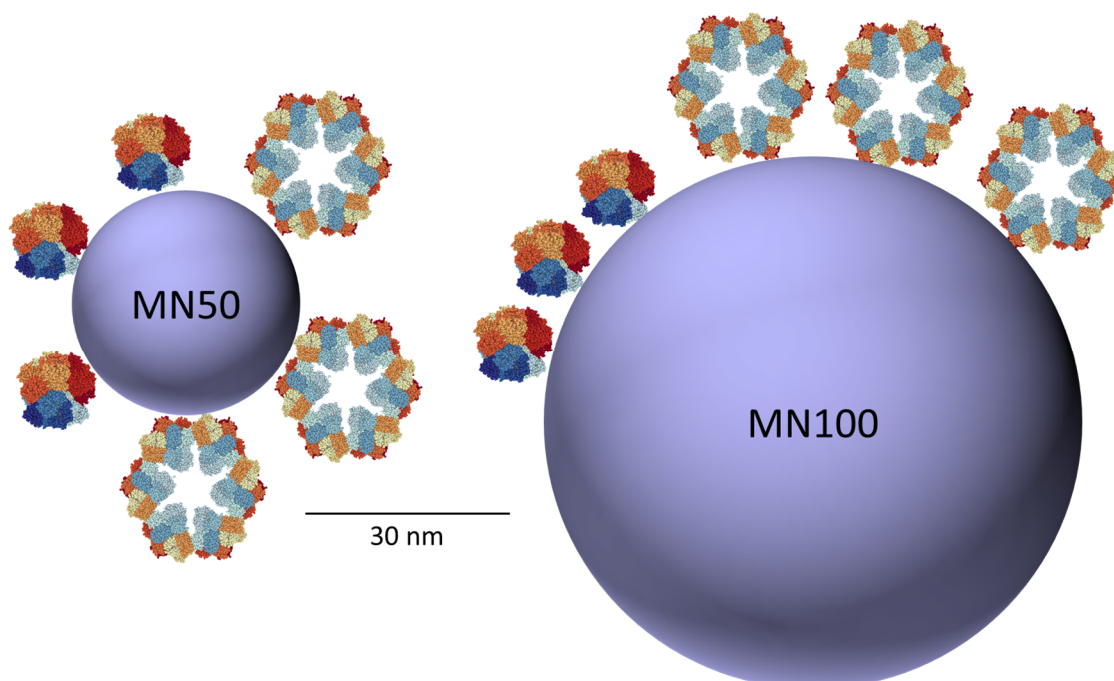


Figure 4-5 : Représentation schématique de HbC1 et HbAm adsorbées sur MN50 et MN100.

En outre, cette baisse d'ellipticité observée est très proche de ce qui a déjà été observé pour Mb et Hb adsorbé sur des SiNPs Sigma (Devineau *et al.*, 2013 ; Devineau *et al.*, 2017). Cette diminution du signal s'interprète généralement par une perte de structure secondaire de la protéine adsorbée.

Cependant, au regard des résultats concernant LUDOX et MN50, on peut s'interroger sur la pertinence des valeurs des spectres de DC. En effet, ces SiNPs possèdent des tailles très similaires à celle des SiNPs Sigma utilisées par Devineau *et al.* Un effet direct de la taille est donc à exclure. Une explication pourrait alors venir d'une propriété optique des SiNPs : leur diffusion de la lumière. On constate ainsi que les SiNPs diffusent fortement aux UV lointains et que l'intensité de diffusion est proportionnelle à la taille des SiNPs (Fig. 4-6). Cependant ceci est valable pour les SiNPs monodisperses. Les SiNPs polydisperses Sigma, bien que de tailles comprises entre 9nm et 50nm de diamètre hydrodynamique, possèdent une diffusion très importante. L'agrégation de ces nanoparticules en est certainement la cause.

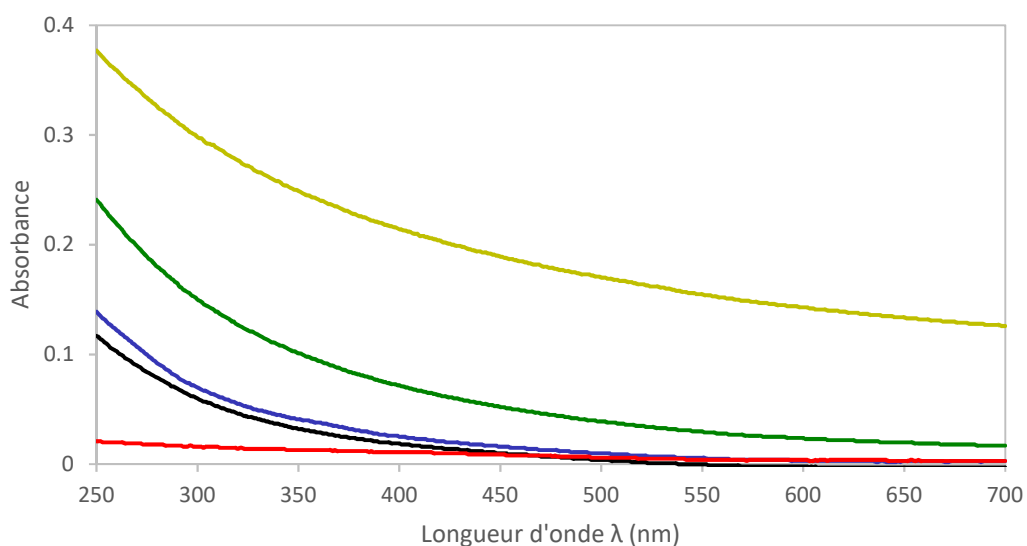


Figure 4-6 : Spectres d'absorption UV-visible de **MN10**, **MN50**, **MN100**, **LUDOX**, et des SiNPs polydisperses **Sigma** concentrées à 1 g.L⁻¹.

Ainsi, on peut constater à nouveau une dichotomie entre les SiNPs LUDOX et MN50 d'une part, et les MN100 et Sigma d'autre part. Ces dernières possèdent une très forte diffusion de la lumière aux UV lointains. Or, la diffusion de la lumière d'objets présents en solution peut avoir des conséquences sur les propriétés spectroscopiques à ces mêmes longueurs d'ondes (Duysens, 1956). L'impact de la diffusion a notamment été étudié en présence de cellules biologiques (Amesz *et al.*, 1961 ; Schneider et Harmatz, 1976). Dans ces cas-ci, deux phénomènes ont lieu conjointement : la diffusion des particules (de taille micrométrique) et l'absorption par les nombreux chromophores contenus dans les cellules. Appliqué au dichroïsme circulaire, trois phénomènes peuvent généralement être observés :

(1) un aplatissement global des spectres dichroïques ; (2) un déplacement de Stokes vers le rouge (redshift) ; (3) une augmentation du $r_\alpha = \epsilon_{222}/\epsilon_{208}$. Cependant, pour chaque phénomène, il n'est pas possible de préciser qui de la diffusion ou de l'absorption en est à l'origine.

Afin d'avancer sur ce sujet, des études sur des fragments de membranes ont été effectuées (Mao et Wallace, 1984 ; Glaeser et Jap, 1985). Il apparaît que pour des particules de tailles submicrométriques, le signal de DC est peu impacté par la diffusion dans la région allant de 200 nm à 240 nm. Une correction mathématique peut toutefois s'avérer nécessaire pour les particules dont la taille est égale ou supérieure à la longueur d'onde d'étude du fait de la diffusion de Mie (Gordon et Holzwarth, 1971). Cependant, pour des particules inférieures à 100 nm, aucune correction ne semble être nécessaire pour des longueurs d'onde allant au-delà de 190 nm (Glaeser et Jap, 1985).

Rapporté aux SiNPs, si l'absorption par des chromophores peut être écartée, la diffusion de la lumière est présente, particulièrement pour les SiNPs agrégées Sigma et les MN100. Cette diffusion peut conduire aux phénomènes précités, en particulier, à l'aplatissement des spectres de DC. La diffusion observée pour les SiNPs LUDOX et MN50, bien qu'existante, semble toutefois négligeable au regard des résultats présentés ici (pas de différence d'ellipticité constaté pour HbC1 et HbAm) et de la littérature. En outre, du fait de la surface spécifique supérieure, la quantité de petites SiNPs nécessaire afin d'atteindre le point d'isotherme souhaité est inférieur par rapport à celle des grosses SiNPs. Ceci accroît encore l'écart de diffusion qui existe entre petites et grosses SiNPs.

Ainsi l'adsorption des hémoprotéines sur les SiNPs LUDOX et MN50 semble avoir peu d'impacts sur l'ellipticité mesurée. Ceci est en contradiction avec Devineau *et al.* (2016). De plus ceci contredit également d'autres études d'adsorption de protéines globulaires sur des SiNPs (Billsten *et al.*, 1995 ; Cruz *et al.*, 2010). Dans tous ces cas, une forte perte d'ellipticité ainsi qu'une modification du ratio r_α ont pu être constatés. L'explication donnée dans ces études est que les protéines subissent une déstructuration partielle (parfois importante) lors de leur adsorption sur de la silice.

Au regard des observations sur l'impact de la diffusion de la lumière, on peut toutefois remettre en cause ces résultats. En effet, si les tailles moyennes sont comparables, les SiNPs utilisées dans ces études sont toutes des nanoparticules polydisperses (de qualité alimentaire ou produits par pyrogénéation). Ce sont donc des agrégats qui présentent des tailles et formes extrêmement diverses. Ceci va donc se traduire par une forte diffusion de la lumière dans les échantillons. Le signal de DC des SiNPs seules reste nul mais la diffusion de la lumière incidente du dichrographe peut certainement perturber la mesure du signal des protéines adsorbées.

Ainsi, la déstructuration des protéines adsorbées, observée jusqu'ici, est certainement dû en grande partie à un artefact expérimental. Il pourrait être intéressant d'étudier l'adsorption de ces mêmes protéines globulaires en présence de SiNPs monodisperses afin d'observer l'impact structural réel de l'adsorption. Plus globalement, ceci apporte une explication à la contradiction qui existait entre les études précitées et le fait que les protéines globulaires soient généralement des protéines "dures" donc non destructurables par un phénomène d'adsorption (Mathé *et al.*, 2013).

En outre, les MN10 n'étant pas analysables et les MN100 présentant une forte diffusion, il n'est pas possible de conclure sur un potentiel effet taille des SiNPs sur l'adsorption des hémoprotéines. Les données en présence de MN50 nous permettent néanmoins de confirmer les interprétations données pour les LUDOX à savoir que les hémoprotéines subissent très peu de changement de structure et que ceci peut être assimilé à des réarrangements locaux d'hélices α .

2. Protéomique appliquée à l'étude de l'effet taille des nanoparticules

Parallèlement aux études de formation de couronnes protéiques utilisant des protéines modèles, des études de protéomique ont été entreprises. Ces études visent à déterminer la composition des couronnes protéiques formées à partir d'un mélange complexe de protéines afin d'observer d'éventuelles différences selon la taille des SiNPs.

2.1. Isothermes d'adsorption sur extraits protéiques

Préalablement à toute étude de la couronne de protéines, il est nécessaire d'effectuer des isothermes d'adsorption sur le système protéines/NPs adéquat. Ici, nous étudions la couronne de protéines formée par de l'extrait protéique de levures S288c sur les SiNPs suivantes : MN10, MN50, et MN100. Trois isothermes ont donc été réalisées par la méthode par déplétion (marquage radioactif au ^{35}S , voir chapitre 7, § 3.1.3. pour plus de détails) et le résultat est indiqué sur la figure 4-7.

Contrairement aux protéines modèles, les isothermes obtenues à partir de mélanges complexes de protéines (sérum, plasma, ou extrait cellulaire généralement) possèdent la particularité de ne jamais atteindre un plateau correspondant à la saturation de la surface d'adsorption. En conséquence le modèle d'adsorption de Langmuir n'est plus tout à fait adéquat. Pour tenir compte de cela un modèle d'isotherme d'adsorption dérivé du modèle de Langmuir peut être utilisé : le modèle de Langmuir-Freundlich. Il s'agit d'un modèle empirique qui permet de tenir compte de l'hétérogénéité des surfaces (différents sites d'adsorption) et/ou de l'adsorption multicouche, caractéristiques propres au modèle de Freundlich (Freundlich, 1906 ; de Sá *et al.*, 2017).

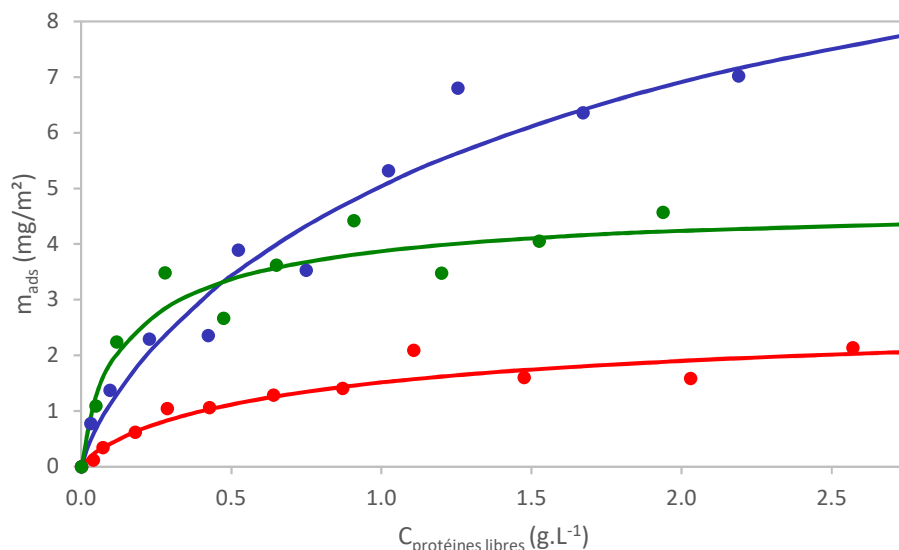


Figure 4-7 Isothermes d'adsorption de l'extrait de levures S288c adsorbé sur trois SiNPs en tampon DPBS à pH7,4. Les points de couleur représentent différents points d'une même expérience et les courbes sont les moyennes de 3 expériences calculées selon le modèle de Langmuir. ● MN10, ● MN50, ● MN100.

Ainsi, un paramètre supplémentaire par rapport au modèle de Langmuir (en plus de m_{∞} et K_{ads}), appelé n , est ajouté dans le modèle de Langmuir-Freundlich (Eq. 4-1).

$$m_{ads} = \frac{m_{\infty} \cdot K_{ads} \cdot C^n}{1 + K_{ads} \cdot C^n} \quad (\text{Eq. 4-1})$$

où m_{ads} est la quantité de protéines adsorbées ($\text{mg} \cdot \text{m}^{-2}$) et C la concentration en protéines libres (g/L).

Les coefficients n issus des trois isothermes précédents ont été calculés (Tab. 4-5) et indiquent des valeurs légèrement inférieures à 1. Le coefficient n est généralement mesuré pour indiquer le degré d'hétérogénéité de la surface considérée. Une surface homogène possède un coefficient n de 1. Lorsque $n < 1$, la surface est considérée comme hétérogène et possède alors des sites d'adsorption de différents niveaux d'énergie (Umpleby *et al.*, 2001). En outre, $n < 1$ peut aussi indiquer la formation de multicouches de molécules adsorbées (Silva *et al.*, 2017).

Tableau 4-5 : Constantes d'affinité des isothermes d'adsorption S288c/SiNPs modélisées par le modèle de Langmuir-Freundlich.

SiNPs	m_{∞} ($\text{mg} \cdot \text{m}^{-2}$)	K_{ads} ($\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$)	n
MN10	2,9	1,1	0,95
MN50	13,8	0,5	0,90
MN100	4,6	6,6	0,90

Il n'est donc pas possible d'interpréter formellement ces valeurs de n comme l'existence de multicouches. Cependant, MN10, MN50, et MN100 ont été caractérisées et sont monodisperses et sans porosité (Chapitre 2, § 1.2.). Ceci tend à éliminer le facteur d'hétérogénéité de surface. La présence de multicouches est donc la plus probable. La principale raison pour cela est la présence d'interactions protéines-protéines au niveau de la couronne de protéines. En effet, la grande diversité physico-chimique et structurale des protéines présentes dans un mélange complexe fait que nombre d'entre elles peuvent interagir. Cette possibilité d'interactions protéines-protéines est accrue au niveau de la surface des nanoparticules du fait de la très forte concentration locale en protéines (Pisani *et al.*, 2017). En outre, de nombreuses protéines forment naturellement des complexes protéiques. Tout ceci conduit à former une couronne protéique qui augmentera avec la concentration protéique totale en solution.

Au-delà d'une meilleure connaissance des systèmes protéines/SiNPs, la mesure des constantes d'affinité permet aussi de calculer les conditions adéquates d'isotherme pour les expériences ultérieures de protéomique. Pour ce faire l'équation du modèle de Langmuir (Chapitre 3, Eq. 4-1), approximant correctement le modèle de Langmuir-Freundlich lorsque n est proche de 1, peut être transformée afin de déterminer la concentration en protéines C_{prot} (Eq. 4-2) ou la concentration en nanoparticules C_{NP} (Eq. 4-3) pour une concentration de l'autre élément fixée.

$$C_{\text{prot}} = \frac{\frac{m_{\infty} * K_{\text{ads}} * S_{\text{S}} * C_{\text{NP}} * (1-x)}{x} - 1}{K_{\text{ads}}(1-x)} \quad (\text{Eq. 4-2})$$

$$C_{\text{NP}} = \frac{x(1+K_{\text{ads}}(1-x))C_{\text{prot}}}{m_{\infty} * K_{\text{ads}} * S_{\text{S}}(1-x)} \quad (\text{Eq. 4-3})$$

Le coefficient x correspond au ratio protéines adsorbées/protéines totales et permet de choisir la condition d'isotherme souhaitée. À fort coefficient x , il y a un déficit de protéines et la majorité des protéines vont pouvoir s'adsorber. À faible coefficient x , par contre, l'excès de protéines induit une compétition entre celles-ci pour s'adsorber à la surface et la couronne sera formée uniquement des protéines les plus affines (si l'on fait abstraction des cas de protéines présentes dans la couronne protéique du fait d'interactions protéines-protéines). Les conditions de compétitions seront appliquées à tous les mélanges protéines/SiNPs étudiés par la suite.

2.2. Analyse protéomique

Mon travail de thèse était partie intégrante du projet NaToM financé (2014-2017) par le Programme Transversal de Toxicologie Humaine et Environnementale du CEA. Dans ce cadre, les expériences et les analyses protéomiques ont été menées par Jean Armengaud au CEA Marcoule. Le

développement des outils d'analyse biostatistiques et les analyses elles-mêmes ont été réalisés par Jean-Christophe Aude (CEA Saclay).

Afin de caractériser la composition des couronnes de protéines formées à la surface de MN10, MN50, et MN100, nous avons entrepris des expériences de spectrométrie de masse nanoLC-MS/MS (Shotgun). Ces expériences permettent d'identifier et de quantifier un très grand nombre de protéines présentes dans des mélanges complexes (Armengaud, 2013). Ici, après mise en contact d'extraits de protéines de levures sur des SiNPs, les protéines adsorbées ont été séparées des protéines libres par centrifugation (voir chapitre 7, § 3.5 pour plus de détails sur la préparation des échantillons).

Les analyses par spectrométrie de masse ont ensuite été réalisées sur deux types d'échantillons : des extraits totaux de protéines de levures (4 échantillons indépendants) et des échantillons ne contenant que les protéines adsorbées (4 échantillons). Le nombre de peptides identifiés pour chaque protéine dans chaque échantillon permet de classer les protéines en trois catégories : les protéines enrichies dans la fraction adsorbée par un facteur supérieur à 2 (appelées protéines Ads par la suite), les protéines appauvries d'un facteur supérieur à 2 dans la fraction adsorbée (appelées NA). Les protéines n'appartenant à aucune des deux catégories sont appelées "Non classée". Il est en outre nécessaire de tenir compte des différences de concentrations protéiques entre échantillons. Ainsi, des tests statistiques ont été faits pour que seules les protéines présentant une variabilité faible soient retenues comme Ads ou NA.

Les proportions des protéines assignées dans chaque catégorie sont indiquées dans le tableau 4-6. On remarque tout d'abord que, pour chaque système, environ 2400 protéines ont pu être détectées. Au total, ce sont 2616 protéines différentes qui ont pu être identifiées dans au moins un système. Ceci correspond à un échantillonnage très important du protéome de la levure puisque les analyses les plus poussées ne permettent à ce jour d'identifier que 4600 protéines de levure (Kulak *et al.*, 2014). On remarque également que tous les échantillons présentent les mêmes proportions de protéines dans chaque catégorie, avec environ 17% pour Ads, 12% pour NA, et 71% pour Non classée. Aussi, la forte proportion de cette dernière montre qu'une majorité des protéines n'a pas de comportement particulier en présence de SiNPs. Elles auront tendance à s'adsorber proportionnellement à leurs concentrations relatives dans l'échantillon. Il faut toutefois préciser que l'attribution des protéines à une catégorie dépend du seuil statistique défini. Ici, les seuils définis pour l'attribution des catégories Ads ou NA ont été choisis de sorte que le moins possible de faux positifs soient présents dans ces catégories car la comparaison de ces deux groupes extrêmes sera exploitée dans les analyses ultérieures. En d'autres termes, rejeter un grand nombre de protéines dans le groupe "Non classée" est le prix à payer pour que les classes Ads et NA soient de bonne qualité. Ceci conduit donc à une

surestimation de la catégorie "Non classée" due à la présence dans celle-ci de protéines présentant une légère tendance vers la catégorie Ads ou NA.

Tableau 4-6 : Nombres des protéines détectées par spectrométrie de masse nanoLC-MS/MS en fonction de leur présence préférentielle dans la fraction adsorbée (Ads), non adsorbée (NA), ou sans présence préférentielle (Autres). Entre parenthèses sont indiqués les pourcentages de chaque catégorie par rapport au nombre total de protéines détectées.

	Ads	NA	Non classée	Total
MN10	375 (15,8%)	275 (11,6%)	1719 (72,6%)	2369
MN50	400 (16,7%)	299 (12,5%)	1691 (70,8%)	2390
MN100	426 (17,6%)	319 (13,2%)	1678 (69,3%)	2423

Afin d'aller plus loin, la comparaison de la composition des différents groupes selon le type de SiNPs a été faite. La comparaison des protéines NA est indiquée sur la figure 4-8. On constate que 259 protéines sur les 330 protéines identifiées au totales dans cette catégorie sont communes aux trois types de SiNPs. Ceci correspond à un taux de recouvrement de 78%. À l'inverse, les protéines présentes spécifiquement (5 + 4 + 17) pour un seul type de SiNPs ne représentent que 8% du total.

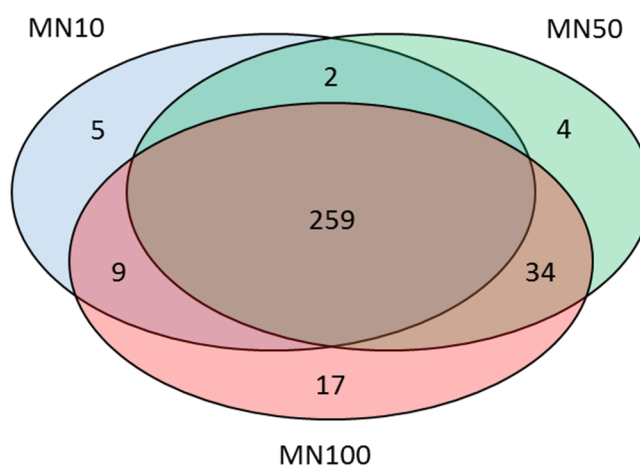


Figure 4-8 : Diagramme de Venn des protéines de la catégorie NA pour les trois SiNPs étudiées : MN10, MN50, et MN100.

Concernant les catégories Ads (protéines enrichies dans la couronne) on constate que 312 protéines sur 490 protéines présentes dans cette catégorie sont présentes chez tous les types de SiNPs, soit un recouvrement de 64% (Fig. 4-9). La proportion de protéines spécifiques à une nanoparticule donnée est de 19%. Ainsi, si une nette majorité des protéines ont des profils d'adsorption similaires quelle que soit la taille de la nanoparticule, une part non négligeable de protéines semble se comporter différemment.

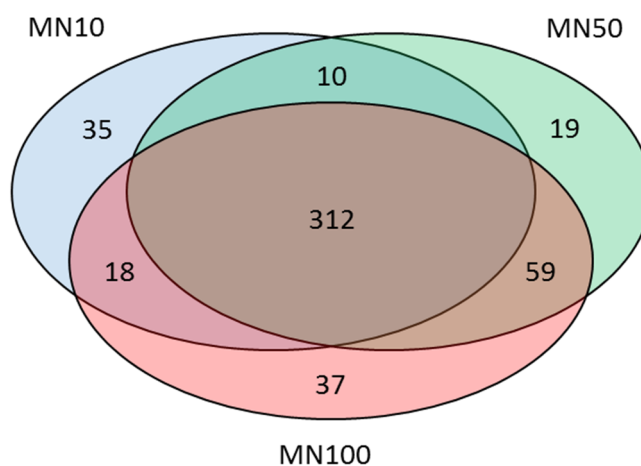


Figure 4-9 : Diagramme de Venn des protéines de la catégorie Ads pour les trois SiNPs étudiées : MN10, MN50, et MN100.

Aussi, on peut remarquer que le nombre de protéines présentes uniquement dans deux systèmes sur les trois sont différents. Alors que MN50 et MN100 partagent 59 protéines en commun, MN10 n'en partage que 10 avec MN50 et 18 avec MN100. On en conclut que la composition de la couronne de protéines formée sur MN50 est plus proche de MN100 que de MN10. Cette dichotomie peut à nouveau s'expliquer par la courbure des SiNPs étudiées qui est proche entre MN50 et MN100, mais beaucoup plus élevée entre MN10 et les deux autres (chapitre 2, §1.2.). Il s'agit cependant de différences plutôt faibles et, dans les trois cas, la composition des couronnes protéiques reste globalement similaire.

Par ailleurs, il est intéressant de connaître les caractéristiques physico-chimiques et structurales des protéines contenues dans les différentes populations (protéines adsorbées et protéines libres de MN10, MN50, et MN100). Pour ce faire, un profil de paramètres physico-chimiques est déterminé à partir de la séquence primaire de chaque protéine présente dans une population donnée. Des prédictions structurales, comme les régions intrinsèquement désordonnées, utilisant MobiDB (Di Domenico *et al.*, 2012) et PONDR (PONDR, 2016), ou comme la présence de clusters hydrophobes, utilisant SEG-HC (Faure et Callebaut, 2013) sont aussi établies à partir de la structure primaire des protéines. Ainsi, pour une population donnée (protéines Ads de MN10 par exemple) un profil physico-chimique et structural global est défini à partir de la moyenne pondérée des profils de chaque protéine présente dans l'échantillon.

Deux approches ont été entreprises. Tout d'abord, pour chaque SiNPs, une comparaison des populations de protéines Ads et NA peut être menée. La comparaison des listes de caractéristiques physico-chimiques et structurales des protéines peut alors permettre de distinguer des paramètres propres à chaque taille de nanoparticule (§ 2.2.1.). La deuxième approche consistera à comparer un

groupe de protéines Ads spécifiques à une taille de SiNPs à une population contenant l'ensemble des protéines Ads identifiées (§ 2.2.2.).

2.2.1. Comparaison des protéines adsorbées et non adsorbées

À partir des profils physico-chimiques et structuraux des différentes populations, des comparaisons ont été effectuées au moyen de tests statistiques non paramétriques de type Brunner-Munzel (Brunner et Munzel, 2000). Les listes des caractéristiques significativement différentes entre les populations de protéines adsorbées et libres sont indiquées pour chaque SiNPs (Tab. 4-7 a, b, et c).

On remarque rapidement que les listes sont très similaires entre elles et que chaque caractéristique évolue de la même façon (enrichissement ou appauvrissement dans la population de protéines adsorbées ou de protéines libres). Globalement, les mêmes conclusions que pour d'autres systèmes protéines/SiNPs déjà étudiés peuvent être tirées (Mathé *et al.*, 2013 ; Klein *et al.*, 2016). On constate notamment un net enrichissement en arginine des protéines adsorbées par rapport aux protéines libres. Il s'agit d'ailleurs du facteur le plus significatif dans les trois cas. À l'inverse les protéines adsorbées sont appauvries en acides aminés aromatiques et hydrophobes (Ala, Gly, et Trp notamment). Ceci confirme à nouveau que l'adsorption des peptides sur une surface de silice se fait essentiellement par des interactions électrostatiques et non par des interactions hydrophobes (Mathé *et al.*, 2013).

À côté des facteurs physico-chimiques, plusieurs facteurs structuraux ont une influence significative sur l'adsorption. La présence de régions désordonnées est notamment très fortement marquée pour les protéines adsorbées par rapport aux protéines libres. Ceci confirme les observations faites dans Klein *et al.* (2016) et montre à nouveau que l'absence de structure stable renforce nettement l'affinité d'une protéine pour une surface de silice. On note également que le type de structures secondaires présentes dans la protéine semble influencer son adsorption. Ainsi les protéines Ads possèdent un enrichissement en hélices α tandis que les protéines NA sont enrichies en feuillets β . Ceci avait déjà été remarqué auparavant (Mathé *et al.*, 2013). Une hypothèse pourrait être le fait que les feuillets β contiennent plus d'acides aminés hydrophobes et les hélices α plus d'acides aminés polaires.

On remarque aussi que les protéines de plus hauts poids moléculaires sont présentes davantage parmi les protéines Ads que NA. Le poids moléculaire étant directement relié à la taille des protéines (chapitre 2, § 3.1.), ceci confirme les observations faites durant le chapitre précédent (chapitre 3) d'un effet de la taille des hémoprotéines sur leur affinité pour la silice. Aussi, pour la première fois, l'influence de la taille des protéines a pu être formellement établi dans le cas d'études protéomiques.

De plus, si on peut dire que les plus grosses protéines s'adsorbent d'avantage que les petites, on ne peut pas dire pour autant que les grosses protéines s'adsorbent plus sur les grosses SiNPs et les petites protéines sur les petites SiNPs (ou inversement).

Tableau 4-7 (a) : Paramètres physico-chimiques et structuraux montrant des différences significatives entre les protéines issues des populations Ads et NA en présence de MN10. Les valeurs représentent la médiane et l'écart-type de chaque paramètre. Les p-values ont été calculées en utilisant un test de Brunner-Munzel. Les paramètres grisés ont des valeurs supérieures pour la fraction Ads par rapport à NA (le contraire pour les paramètres en blanc). Les paramètres structuraux sont indiqués en gras.

Paramètres (MN10)	Ads		NA		p-value
	%	±	%	±	
Arginine	5,0	2,2	3,7	1,3	<1E-15
AA polaires (R, K, E, D, Q, N)	36,3	5,6	32,9	4,1	<1E-15
Polarité forte (H, Q, R, K, N, E, D)	38,1	5,5	35,2	3,9	<1E-15
Feuillets β (C, F, I, T, V, W, Y)	25,9	4,2	28,6	3,0	<1E-15
AA enfouis (A, C, F, G, I, L, V, W)	39,0	5,6	42,8	3,8	<1E-15
Longues régions désordonnées (Pondr)	19,0	22,9	0,0	11,5	<1E-15
Désordre global (Pondr)	35,8	20,9	14,5	12,9	<1E-15
Désordre global (Mobidb)	15,9	22,7	3,7	11,9	<1E-15
Charges positives (K, R)	12,9	4,2	11,4	1,9	6E-15
AA aromatiques (F, H, Y, W)	9,3	2,8	10,9	2,1	4E-14
Polarité faible (L, I, F, W, C, M, V, Y)	31,8	5,3	33,9	3,0	8E-14
Sérine	7,8	2,5	6,7	1,7	3E-11
pH isoélectrique	6,7	2,0	5,8	1,2	2E-10
AA hydrophobes (C, F, I, L, M, V, W)	28,6	4,9	30,6	2,7	3E-10
Glycine	5,5	2,3	6,5	2,0	5E-10
Tryptophane	0,6	0,6	1,0	0,7	6E-09
Poids Moléculaire (kDa)	59,7	56,5	46,9	26,4	2E-08
Longueur (nombre d'acides aminés)	534	498	423	234	4E-08
Alanine	6,4	2,4	7,4	2,1	2E-07
AA non chargés (A, N, C, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V)	73,7	5,5	75,4	3,6	3E-07
AA exposés au solvant (D, E, K, N, P, Q)	35,4	5,4	33,6	3,9	1E-06
Cystéine	0,8	0,8	1,0	1,0	3E-06
Tyrosine	2,8	1,2	3,3	1,1	3E-06
Valine	5,9	1,8	6,5	1,7	2E-05
Asparagine	5,3	1,9	4,8	1,5	2E-05
Glutamine	3,9	1,6	3,4	1,3	2E-05
Isoleucine	5,9	1,6	6,3	1,4	2E-05
Hélices α (E, A, L, M, Q, K, R, H)	44,1	5,3	42,5	4,0	2E-05
AA neutres (hydrophobicité) (A, G, H, P, S, T, Y)	34,7	4,6	36,4	3,7	4E-05
Phénylalanine	3,8	1,4	4,1	1,2	7E-05
AA aliphatiques (A, I, L, V)	21,1	4,1	22,1	2,7	1E-04
AA à faibles volumes de van der Waals (G, A, S, T, P, D)	35,9	4,2	37,3	3,5	5E-04
Polarisabilité faible (G, A, S, D, T)	31,6	3,8	32,7	3,5	8E-04
Histidine	1,9	1,0	2,1	0,8	1E-03
AA à hauts volumes de van der Waals (M, H, K, F, R, Y, W)	24,7	4,1	24,2	2,7	4E-03
Haute polarisabilité (K, M, H, F, R, Y, W)	24,7	4,1	24,2	2,7	4E-03

Tableau 4-7 (b) : Paramètres physico-chimiques et structuraux montrant des différences significatives entre les protéines issues des populations Ads et NA en présence de MN50. Les valeurs représentent la médiane et l'écart-type de chaque paramètre. Les p-values ont été calculées en utilisant un test de Brunner-Munzel. Les paramètres grisés ont des valeurs supérieures pour la fraction Ads par rapport à NA (le contraire pour les paramètres en blanc). Les paramètres structuraux sont indiqués en gras.

Paramètres (MN50)	Ads		NA		p-value
	%	±	%	±	
Arginine	4,9	2,3	3,8	1,6	<1E-15
Longues régions désordonnées (Pondr)	13,7	21,4	0,0	17,0	<1E-15
Désordre global (Pondr)	33,0	20,3	15,2	17,1	<1E-15
Charges positives (K, R)	12,8	4,3	11,5	2,3	6E-13
pH isoélectrique	6,92	2,03	5,90	1,29	1E-12
Désordre global (Mobidb)	12,7	20,2	4,3	16,2	3E-11
AA enfouis (A, C, F, G, I, L, V, W)	39,7	5,3	42,5	4,2	4E-10
Alanine	6,4	2,4	7,4	2,1	3E-08
AA polaires (R, K, E, D, Q, N)	35,4	5,6	32,9	4,4	3E-08
Polarité forte (H, Q, R, K, N, E, D)	37,5	5,6	35,3	4,3	2E-07
AA à faibles volumes de van der Waals (G, A, S, T, P, D)	35,6	4,0	37,4	3,9	3E-07
Feuillets β (C, F, I, T, V, W, Y)	26,7	4,3	28,4	3,2	3E-07
Sérine	7,6	2,3	6,8	1,8	3E-07
AA aromatiques (F, H, Y, W)	9,6	2,9	10,8	2,2	4E-07
Poids Moléculaire (kDa)	59,2	62,7	47,2	26,3	9E-07
Glycine	5,5	2,4	6,4	2,1	1E-06
Longueur (nombre d'acides aminés)	532	552	428	235	2E-06
AA neutres (hydrophobicité) (A, G, H, P, S, T, Y)	34,7	4,5	36,6	3,9	2E-06
AA à hauts volumes de van der Waals (M, H, K, F, R, Y, W)	25,0	4,3	24,3	2,9	9E-06
Haute polarisabilité (K, M, H, F, R, Y, W)	25,0	4,3	24,3	2,9	9E-06
Tryptophane	0,7	0,7	0,9	0,7	3E-05
Polarisabilité faible (G, A, S, D, T)	31,5	3,8	32,7	3,8	3E-05
AA non chargés (A, N, C, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V)	74,0	5,5	75,4	3,9	4E-05
Polarité moyenne (P, A, T, G, S)	29,6	4,3	31,1	3,9	2E-04
Hélices α (E, A, L, M, Q, K, R, H)	43,9	5,4	42,5	4,2	2E-04
Acide aspartique	5,8	1,9	6,1	1,3	1E-03
Polarité faible (L, I, F, W, C, M, V, Y)	32,4	5,2	33,7	3,7	2E-03
Cystéine	0,8	0,8	1,0	1,0	3E-03
Histidine	1,8	1,1	2,0	0,9	4E-03
Proline	4,1	1,5	4,4	1,3	7E-03

Tableau 4-7 (c) : Paramètres physico-chimiques et structuraux montrant des différences significatives entre les protéines issues des populations Ads et NA en présence de MN100. Les valeurs représentent la médiane et l'écart-type de chaque paramètre. Les p-values ont été calculées en utilisant un test de Brunner-Munzel. Les paramètres grisés ont des valeurs supérieures pour la fraction Ads par rapport à NA (le contraire pour les paramètres en blanc). Les paramètres structuraux sont indiqués en gras.

Paramètres (MN100)	Ads		NA		p-value
	%	±	%	±	
Arginine	4,9	2,2	3,8	1,6	<1E-15
Longues régions désordonnées (Pondr)	15,1	21,7	0,0	16,5	<1E-15
Désordre global (Pondr)	34,0	20,5	15,2	16,7	<1E-15
Désordre global (Mobidb)	13,1	20,7	4,4	15,7	3E-15
pH isoélectrique	6,9	2,0	5,9	1,3	2E-13
AA enfouis (A, C, F, G, I, L, V, W)	39,7	5,6	42,5	4,2	1E-12
Charges positives (K, R)	12,9	4,2	11,5	2,3	2E-12
Alanine	6,3	2,3	7,4	2,1	5E-09
Feuillets β (C, F, I, T, V, W, Y)	26,5	4,4	28,4	3,2	5E-09
AA polaires (R, K, E, D, Q, N)	35,4	5,7	33,3	4,4	7E-09
Forte polarité (H, Q, R, K, N, E, D)	37,5	5,6	35,3	4,2	3E-08
Sérine	7,6	3,0	6,8	1,8	3E-08
Poids Moléculaire (kDa)	59,8	61,8	47,0	25,7	6E-08
AA aromatiques (F, H, Y, W)	9,6	2,9	10,6	2,2	9E-08
Longueur (nombre d'acides aminés)	536	544	423	228	1E-07
Glycine	5,5	2,4	6,4	2,1	6E-07
AA à faibles volumes de van der Waals (G, A, S, T, P, D)	35,6	4,4	37,3	4,0	1E-06
AA à hauts volumes de van der Waals (M, H, K, F, R, Y, W)	25,0	4,2	24,1	2,9	4E-06
Polarisabilité haute (K, M, H, F, R, Y, W)	25,0	4,2	24,1	2,9	4E-06
AA neutres (hydrophobicité) (A, G, H, P, S, T, Y)	34,7	4,6	36,4	3,8	9E-06
Polarisabilité faible (G, A, S, D, T)	31,5	4,2	32,6	3,9	3E-05
Polarité faible (L, I, F, W, C, M, V, Y)	32,3	5,4	33,7	3,6	8E-05
Hélices α (E, A, L, M, Q, K, R, H)	44,0	5,4	42,6	4,2	2E-04
Cystéine	0,8	0,8	1,0	1,0	2E-04
Tryptophane	0,7	0,7	0,8	0,7	3E-04
AA non chargés (A, N, C, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V)	74,0	5,5	75,3	3,8	3E-04
Polarité moyenne (P, A, T, G, S)	29,5	4,5	31,0	4,0	1E-03
Valine	6,0	1,9	6,5	1,7	2E-03
Acide aspartique	5,9	2,0	6,1	1,3	2E-03
AA hydrophobes (C, F, I, L, M, V, W)	29,3	5,0	30,4	3,3	2E-03
Charges négatives (D,E)	12,7	3,9	13,2	2,5	3E-03
Hystidine	1,9	1,0	2,0	0,8	3E-03
Tyrosine	2,9	1,2	3,2	1,2	7E-03

Cependant, que ce soient avec les propriétés physico-chimiques ou avec les propriétés structurales, les listes sont très similaires et aucune spécificité propre à une taille de SiNPs donnée ne peut être constatée. Ceci peut s'expliquer par le fait que la grande majorité des protéines possèdent le même profil d'adsorption selon la taille de SiNPs (§ 2.2.). Seule une minorité de protéines présentent des différences d'adsorption. Les caractéristiques éventuellement spécifiques de ces protéines sont donc masquées par la présence des autres protéines. Il n'est ainsi pas possible d'observer des différences par une comparaison indirecte. C'est pour cela que par la suite, des comparaisons directes entre les populations de protéines Ads des différents systèmes seront entrepris.

2.2.2. Comparaison entre les protéines Ads

Les profils d'adsorption des protéines sur les différentes tailles de SiNPs sont globalement proches, cependant une minorité de protéines semble se comporter différemment (Fig. 4-9). Il a également pu être remarqué que MN50 et MN100 présentent des profils très similaires tandis que MN10 se distingue légèrement. Il semble également intéressant d'identifier les protéines présentant des différences sensibles d'affinité selon la taille de la SiNPs. Ces protéines ont été identifiées en prenant comme critère que la quantité adsorbée varie d'au moins 10% d'une taille de SiNPs à une autre taille. 74 protéines ont ainsi pu être identifiées. Ces protéines sensibles à la taille des SiNPs ne représentent que 3,1 % des 2369 protéines identifiées dans les trois systèmes protéines/SiNPs. Ceci confirme le fait que, dans la grande majorité des cas, la différence de taille des SiNPs n'induit pas de différence d'adsorption.

Les protéines sensibles à la taille des SiNPs n'évoluent pas toutes de la même façon. Il y a des protéines qui perdent de l'affinité lorsque la taille des SiNPs augmente (profil décroissant), des protéines qui voient leur affinité augmenter (profil croissant), et d'autres protéines qui possèdent des variations d'affinité non proportionnelles à la taille des SiNPs (profil indéfini).

Alors que 48 protéines possèdent un profil décroissant, seules 5 protéines possèdent un profil croissant et 21 protéines un profil indéfini. On remarque ainsi, à partir de la figure 4-10, que la tendance majoritaire est vers une diminution de l'affinité des protéines entre MN10 et MN50 puis une stagnation de l'affinité entre MN50 et MN100 (profil décroissant). Ceci confirme la distinction faite auparavant entre MN10 d'une part et MN50 et MN100 d'autre part.

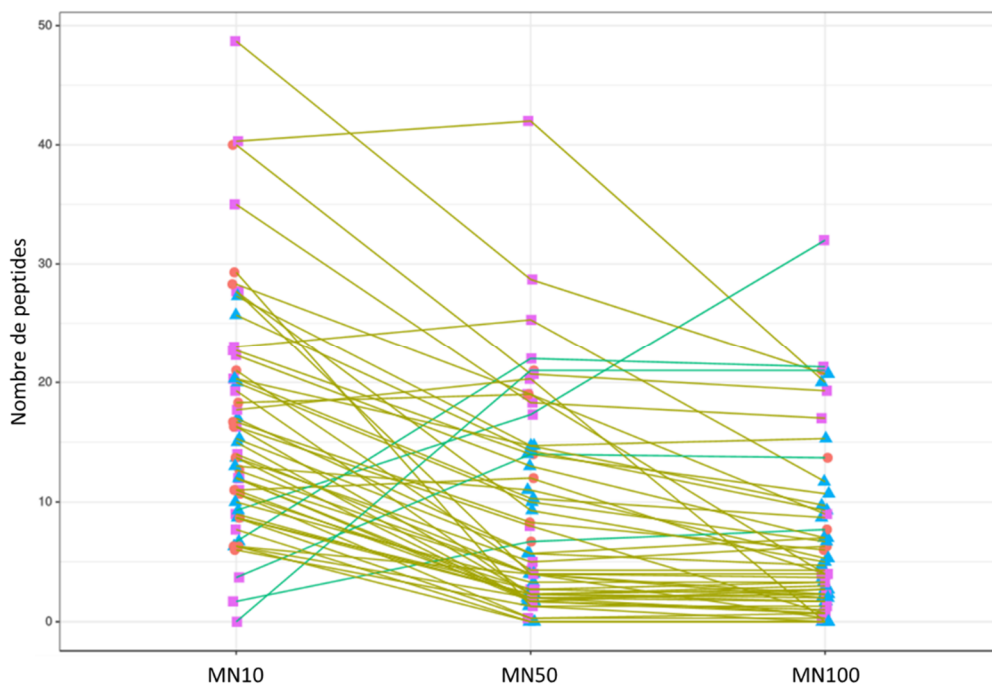


Figure 4-10 : Comptage absolu des protéines (à partir de fragments peptidiques) présentes dans les fractions adsorbées des trois SiNPs : MN10, MN50, et MN100. Seules les 53 protéines possédant un profil croissant (—) et décroissant (---) sont indiquées (par souci de clarté les profils indéfinis ne sont pas indiqués). Pour chaque échantillon, les protéines ont été assignées à la population Ads (●), NA (▲), ou Non classée (■).

Tableau 4-8 : Paramètres physico-chimiques et structuraux montrant des différences significatives entre les 18 protéines Ads de MN10 possédant un profil décroissant et les protéines Ads de toutes les SiNPs. Les valeurs représentent la médiane et l'écart-type de chaque paramètre. Les p-values ont été calculées en utilisant un test de Brunner-Munzel. Les paramètres grisés ont des valeurs supérieures pour les 18 protéines que pour l'ensemble des protéines PA (le contraire pour les paramètres en blanc). Les paramètres structuraux sont indiqués en gras.

Paramètres	Ads MN10 décroissant		Protéines Ads		p-value
	%	±	%	±	
Sérine	10,2	3,3	7,7	3,0	2E-03
AA à faibles volumes de van der Waals (G, A, S, T, P, D)	38,3	3,9	35,9	4,4	2E-03
Coil (G, N, P, S, D)	34,5	6,5	28,8	5,0	2E-03
Clusters hydrophobes (% d'AA)	69,4	14,6	87,4	13,5	2E-03
Clusters hydrophobes (> 40 AA)	56,8	20,5	84,1	19,1	2E-03
Polarité faible (L, I, F, W, C, M, V, Y)	26,3	5,2	32,1	5,5	3E-03
Asparagine	7,1	2,5	5,3	1,8	4E-03
Leucine	6,5	2,1	8,9	2,3	5E-03
AA neutres (hydrophobicité) (A, G, H, P, S, T, Y)	38,4	4,0	34,9	4,6	5E-03
AA hydrophobe (C, F, I, L, M, V, W)	23,9	5,1	29,1	5,1	5E-03
Polarité moyenne (P, A, T, G, S)	33,5	4,4	29,9	4,5	5E-03
AA enfouis (A, C, F, G, I, L, V, W)	31,2	7,0	39,4	5,8	5E-03
AA aliphatiques (G, A, V, L, I, M)	17,4	4,3	21,3	4,1	5E-03
Désordre global (Pondr)	58,9	22,3	34,4	21,1	5E-03
Glutamine	4,4	2,0	3,8	1,7	5E-03
Feuillets β (C, F, I, T, V, W, Y)	23,2	3,9	26,3	4,5	9E-03
Accessibilité moyenne au solvant (P, K, Q, E, N, D)	23,7	4,5	20,5	3,7	9E-03

Il faut également noter que les protéines sensibles à la taille des SiNPs sont retrouvées dans les différentes catégories définies précédemment (Ads, NA, ou Non classée) (Fig. 4-10). À titre d'exemple, parmi les 74 protéines, 22 sont des protéines Ads en présence de MN10. La très grande majorité de ces protéines (18 sur 22) ont un profil décroissant (affinité inférieure en présence de MN50 et de MN100). On peut donc s'intéresser à la présence éventuelle de caractéristiques particulières de ces 18 protéines comparées à l'ensemble des protéines classées comme Ads (490 protéines). On remarque ainsi (Tab. 4-8) que ces 18 protéines présentent une nette diminution de la quantité de clusters hydrophobes ainsi qu'une augmentation de la présence de régions désordonnées ("désordre globale"). De plus, des acides aminés empêchant la formation de structures secondaires définies (Ser et Asp notamment) sont nettement plus présentes. Tout ceci semble indiquer que la structure de ces protéines spécifiquement affines pour les petites SiNPs sont peu structurées et très flexibles.

3. Conclusion

L'effet de la taille des SiNPs sur leur interaction avec les protéines a généralement été étudié en présence de protéines globulaires modèles. Les études faites se concentrent essentiellement sur l'impact structural et fonctionnel des protéines adsorbées et plus rarement sur le type de couronne formée (chapitre 1, § 4.2.2.). Sauf exception, les grosses SiNPs auraient tendance à modifier davantage la structure et la fonction des protéines que les petites SiNPs. Toutefois ce phénomène est loin d'être universel. Ainsi, des protéines comme la RNase A ou le fibrinogène ont l'effet inverse (Shang *et al.*, 2007 ; Roach *et al.*, 2006).

Nous nous sommes aussi intéressés ici à l'influence de l'adsorption sur la structure des protéines. Toutefois, la technique utilisée s'est avérée être inadéquate pour étudier l'effet de la taille des SiNPs. En effet, on a pu montrer que les mesures de dichroïsme circulaire peuvent être influencées par la présence de particules de tailles importantes. Ainsi, la diffusion de la lumière induit la présence d'artéfacts qui peuvent conduire à une surestimation de la déstructuration et donc à des interprétations erronées. Aussi, il convient de moduler les observations de déstructuration apparente faites précédemment à partir de résultats de DC (Billsten *et al.*, 1995 ; Cruz *et al.*, 2010), y compris par notre équipe (Devineau *et al.*, 2013 ; Devineau *et al.*, 2017). Cependant, dans le cas présent, des SiNPs de tailles modérées (LUDOX et MN50) présentent une diffusion négligeable et aucune déstructuration massive ne peut être observée.

Néanmoins, les isothermes des différents systèmes hémoprotéines/SiNPs ont pu montrer des profils variables de saturation de la surface des SiNPs. MN10 semble notamment adsorber moins de protéines à sa surface que MN50 ou MN100. Dans l'hypothèse pour laquelle aucune déstructuration ne peut être observée, une autre explication peut être avancée. Les protéines adsorbées peuvent suivre une

orientation privilégiée. Ceci est notamment le cas de Mb (Devineau *et al.*, 2014). Il a, de plus, été montré que cette orientation peut varier en fonction de la taille des SiNPs en présence (chapitre 1, § 4.2.2.). Il est ainsi possible que les hémoprotéines suivent des orientations différentes en présence de MN10 ou de MN50/MN100 ce qui influencerait sur l'espace occupé à la surface des SiNPs.

Les raisons sous-jacentes à tous les phénomènes d'effet taille des SiNPs ne sont toujours pas clairement établies. On peut toutefois citer une étude récente étudiant l'adsorption du lysozyme sur des SiNPs de tailles différentes (Yu et Zhou, 2016). Une augmentation de la déstructuration ainsi qu'une orientation accrue des protéines adsorbées a pu être observée avec l'augmentation de la taille des SiNPs. Cette étude, faite uniquement par simulation, attribue directement cet effet taille à une différence de courbure de la particule qui induit des changements de potentiel électrostatique ainsi que de structure de la couche d'eau interfaciale. Le facteur électrostatique a pu être confirmé expérimentalement par la mesure de l'acidité des SiNPs qui est proportionnelle à leur taille (Patwardhan *et al.*, 2012). Il semble donc exister deux facteurs variant concomitamment lorsque la taille des SiNPs change : il y a une variation de la courbure et une modification de la chimie de surface. Il semble, de ce fait, difficile de distinguer l'importance relative d'un facteur sur une autre lors des phénomènes d'adsorption.

Les protéines modèles utilisées généralement pour ce type d'étude sont des cas d'espèces et toute généralisation est risquée. Aussi, une approche innovante entamée ici est l'utilisation de la protéomique et de la bioinformatique afin de caractériser la composition de couronnes protéiques issues d'extraits de protéines de levures. L'utilisation de mélanges complexes de protéines permet de créer des situations de compétition où seules les protéines les plus affines peuvent s'adsorber, comme ce fut le cas ici.

Le constat général qui peut être fait est que la composition de la couronne de protéines reste similaire quelle que soit la taille de la particule considérée. Ceci est un résultat majeur de ces expériences qui démontre que l'effet de la taille des SiNPs, s'il existe, est très minime dans le cas de mélanges de protéines. De plus, la taille des protéines qui s'adsorbe ne dépend pas de la taille des SiNPs. Aussi, la quasi absence de protéines sensibles à la taille des SiNPs, observé en protéomique, relativise fortement l'importance des observations faites dans la littérature, sur protéines modèles. Une des causes de cette différence pourrait être l'existence de phénomènes d'interactions latérales protéines-protéines, qui sont généralement inexistantes dans le cas de protéines modèles mais qui peuvent jouer un rôle majeur sur la composition de la couronne de protéines dans le cas de mélanges de protéines (Pisani *et al.*, 2017). L'utilisation d'extraits de protéines de levures permet ainsi de complexifier le système et de se rapprocher d'un modèle *in vivo*.

Toutefois, une petite fraction de protéines présente une sensibilité à la taille des SiNPs. Parmi ces protéines, aucune règle absolue ne peut être édictée. Des protéines peuvent avoir une affinité augmentée, diminuée, voire variée de façon non linéaire en présence de SiNPs de tailles croissantes. Aussi, la grande force de la technique de protéomique utilisée ici est sa profondeur d'analyse qui a permis de détecter un nombre de protéines suffisant pour former des sous-populations (ce qui aurait été impossible dans le cas d'analyses par électrophorèse 2D par exemple). Ainsi, le nombre d'individus identifiés dans ces populations permet d'envisager des analyses statistiques plus poussées.

Une sous-population semble intéressante. Il s'agit des protéines retrouvées enrichies à la surface des SiNPs (protéines Ads) qui présentent une sensibilité à la taille des SiNPs. Parmi ces protéines, une grande majorité possède une affinité supérieure pour MN10 que pour les plus grosses SiNPs. On a remarqué que ces protéines présentent des caractéristiques physico-chimiques et, surtout, structurales très spécifiques. Elles semblent posséder une grande proportion de régions désordonnées et une faible proportion de clusters hydrophobes. Ceci est d'autant plus marquant que des protéines Ads classiques sont déjà caractérisées par un fort désordre. Le désordre structural semble donc être un facteur d'autant plus important pour l'adsorption que la taille des SiNPs est faible. Une explication logique serait que, face à une surface présentant une forte courbure, les protéines ayant une flexibilité suffisante présentent un avantage pour se déformer à la surface. Ainsi, dans le cas des protéines présentant une affinité accrue pour les petites SiNPs par rapport aux plus grosses SiNPs, l'effet de la taille des SiNPs serait dû directement à la différence de courbure et non pas à une différence de chimie de surface. Cependant, il s'agit toujours de cas particuliers (18 protéines identifiées ici) et de nombreuses protéines présentent un effet taille différent. Aussi, il serait intéressant d'étudier spécifiquement des protéines appartenant aux autres sous-populations afin de comprendre les mécanismes régissant leur adsorption.

Enfin, il est connu que l'arginine et la lysine, du fait de leurs charges positives, jouent toutes deux un rôle particulièrement important dans l'adsorption des protéines (Devineau *et al.*, 2014 ; Kubiak-Ossowska *et al.*, 2016). On peut donc s'interroger sur l'absence de la lysine en tant que caractéristique physico-chimique promouvant l'adsorption des protéines alors que l'arginine est, au contraire, le facteur principal. Ce résultat paradoxal a déjà été observé à plusieurs reprises (Mathé *et al.*, 2013 ; Klein *et al.*, 2016) et aucune explication formelle n'a pu être avancée jusqu'à présent. Aussi, dans le chapitre suivant (chapitre 5) nous étudierons les raisons de l'importance toute particulière de l'arginine.

Bibliographie – Chapitre 4

- **Amdursky N.** and Stevens M. M. (2015) *Circular Dichroism of Amino Acids: Following the Structural Formation of Phenylalanine*. *Chemphyschem*. 16, 2768-2774.
- **Amesz J.**, Duysens L. N., and Brandt D. C. (1961) *Methods for measuring and correcting the absorption spectrum of scattering suspensions*. *J. Theor. Biol.* 59-74.
- **Armengaud J.** (2013) *Microbiology and proteomics, getting the best of both worlds!* *Environ. Microbiol.* 15, 12-23.
- **Billsten P.**, Wahlgren M., Arnebrant T., McGuire J., and Elwing H. (1995) *Structural Changes of T4 Lysozyme upon Adsorption to Silica Nanoparticles Measured by Circular Dichroism*. *J. Colloid Interface Sci.* 175, 77-82.
- **Brunner E.** and Munzel U. (2000) *The nonparametric Behrens-Fisher problem: asymptotic theory and a small-sample approximation*. *Biometric J.* 42, 17-25.
- **Cruz J. C.**, Pfromm P. H., Tomich J. M., and Rezac M. E. (2010) *Conformational changes and catalytic competency of hydrolases adsorbing on fumed silica nanoparticles: II. Secondary structure*. *Colloids. Surf. B, Biointerfaces.* 81, 1-10.
- **de Sá A.**, Abreu A. S., Moura I., and Machado A. V. (2017) *Polymeric materials for metal sorption from hydric resources*. *Water Purification.* 289-322.
- **Devineau S.**, Zanotti J. M., Loupiac C., Zargarian L., Neiers F., Pin S., and Renault J. P. (2013) *Myoglobin on silica: a case study of the impact of adsorption on protein structure and dynamics*. *Langmuir.* 29, 13465-13472.
- **Devineau S.**, Mathé C., Legros V., Gonnet F., Daniel R., Renault J. P., and Pin S. (2014) *The nano-bio interface mapped by oxidative footprinting of the adsorption sites of myoglobin*. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 8037-8040.
- **Devineau S.**, Zargarian L., Renault J. P., and Pin S. (2017) *Structure and Function of Adsorbed Hemoglobin on Silica Nanoparticles: Relationship between the Adsorption Process and the Oxygen Binding Properties*. *Langmuir.* 33, 3241-3252.
- **Di Domenico T.**, Walsh I., Martin A. J., and Tosatto S. C. (2012) *MobiDB: a comprehensive database of intrinsic protein disorder annotations*. *Bioinformatics.* 28, 2080-2081.
- **Duysens L. N.** (1956) *The flattening of the absorption spectrum of suspensions, as compared to that of solutions*. *Biochim. Biophys. Acta.* 19, 1-12.
- **Faure G.** and Callebaut I. (2013) *Comprehensive repertoire of foldable regions within whole genomes*. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003280.
- **Freundlich H. Z.** (1906) *Over the adsorption in solution*. *J. Phys. Chem.* 57, 385-470.
- **Glaeser R. M.** and Jap B. K. (1985) *Absorption flattening in the circular dichroism spectra of small membrane fragments*. *Biochemistry.* 24, 6398-6401.
- **Gordon D. J.** and Holzwarth G. (1971) *Optical activity of membrane suspensions: calculation of artifacts by Mie scattering theory*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 68, 2365-2369.
- **Klein G.**, Mathé C., Biola-Clier M., Devineau S., Drouineau E., Hatem E., Marichal L., Alonso B., Gaillard J.C., Lagniel G., Armengaud J., Carrière M., Chédin S., Boulard Y., Pin S., Renault J. P., Aude J. C., and Labarre J. (2016) *RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts*. *Nanotoxicology.* 10, 1555-1564.
- **Kubiak-Ossowska K.**, Jachimska B., and Mulheran P. A. (2016) *How Negatively Charged Proteins Adsorb to Negatively Charged Surfaces: A Molecular Dynamics Study of BSA Adsorption on Silica*. *J. Phys. Chem. B.* 120, 10463-10468.

- **Kulak** N. A., Pichler G., Paron I., Nagaraj N., Mann M. (2014) *Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells*. Nat Methods. 11, 319-324.
- **Mao** D. and Wallace B. A. (1984) *Differential light scattering and absorption flattening optical effects are minimal in the circular dichroism spectra of small unilamellar vesicles*. Biochemistry. 23, 2667-2673.
- **Mathé** C., Devineau S., Aude J.C., Lagniel G., Chédin S., Legros V., Mathon M.H., Renault J.P., Pin S., Boulard Y., and Labarre J. (2013) *Structural determinants for protein adsorption/non-adsorption to silica surface*. PLoS One. 8, e81346.
- **Norde** W. (2008) *My voyage of discovery to proteins in flatland ...and beyond*. Colloids Surf. B Biointerfaces. 61, 1-9.
- **Patwardhan** S. V., Emami F. S., Berry R. J., Jones S. E., Naik R. R., Deschaume O., Heinz H., and Perry C. C. (2012) *Chemistry of aqueous silica nanoparticle surfaces and the mechanism of selective peptide adsorption*. J. Am. Chem. Soc. 134, 6244-6256.
- **Pisani** C., Gaillard J. C., Odorico M., Nyalosaso J. L., Charnay C., Guari Y., Chopineau J., Devoisselle J. M., Armengaud J., and Prat O. (2017) *The timeline of corona formation around silica nanocarriers highlights the role of the protein interactome*. Nanoscale. 9, 1840-1851.
- **PONDR**, ed. 2016. *Predictor Of Naturally Disordered Regions*. Molecular Kinetics Inc., USA.
- **Roach** P., Farrar D., and Perry C. C. (2006) *Surface Tailoring for Controlled Protein Adsorption: Effect of Topography at the Nanometer Scale and Chemistry*. J. Am. Chem. Soc. 128, 3939-3945.
- **Schneider** A.S. and Harmatz D. (1976) *An experimental method correcting for absorption flattening and scattering in suspensions of absorbing particles: circular dichroism and absorption spectra of hemoglobin in situ in red blood cells*. Biochemistry. 15, 4158-4162.
- **Shang** W., Nuffer J. H., Dordick J. S., and Siegel R. W. (2007) *Unfolding of Ribonuclease A on Silica Nanoparticle Surfaces*. Nano Lett. 7, 1991-1995.
- **Silva** R. D., Stefanichen Monteiro I., Chaparro T. C., Silva Hardt R., Giudici R., Barros-Timmons A., Bourgeat-Lami E., and Martins Dos Santos A. (2017) *Investigation of the Adsorption of Amphipathic macroRAFT Agents onto Montmorillonite Clay*. Langmuir. 33, 9598-9608.
- **Umpleby** R. J., Baxter S. C., Chen Y., Shah R. N., and Shimizu K. D. (2001) *Characterization of Molecularly Imprinted Polymers with the Langmuir-Freundlich Isotherm*. Anal. Chem. 73, 4584-4591.
- **Yu** G. and Zhou J. (2016) *Understanding the curvature effect of silica nanoparticles on lysozyme adsorption orientation and conformation: a mesoscopic coarse-grained simulation study*. Phys. Chem. Chem. Phys. 18, 23500-23507.

Chapitre 5 : Importance de la méthylation sur l'interaction protéines/nanoparticules

L'adsorption de protéines sur des surfaces chargées négativement, telles que les particules de silice, se fait essentiellement par des interactions électrostatiques. Ainsi, la présence d'acides aminés chargés positivement (arginine et lysine) dans une protéine joue un rôle primordial lors de cette adsorption (Fenoglio *et al.*, 2011 ; Mathé *et al.*, 2013). Les études suggèrent que la présence de régions flexibles voire intrinsèquement désordonnées joue également un rôle important puisqu'elles permettraient à une plus grande proportion de la protéine d'interagir avec la surface de la silice (Tosaka *et al.*, 2010 ; Ikeda et Kuroda, 2011). Les régions intrinsèquement désordonnées (RID) dans une protéine sont caractérisées par une quasi-absence de résidus hydrophobes et de structures secondaires ainsi qu'un fort enrichissement en petites acides aminés et en acides aminés polaires (Uversky, 2011). Les RID cumulent donc les deux conditions qui promeuvent l'adsorption des protéines (absence de structure et présence d'arginine et de lysine).

Récemment, le laboratoire a pu confirmer la forte affinité des protéines contenant des RID pour les SiNPs (Klein *et al.*, 2016). Cette étude a également montré qu'une famille de protéines était fortement surreprésentée dans la couronne de protéines : les protéines fixant l'ARN (RBP, pour RNA Binding Protein). Généralement, les RBP contiennent de multiples sites de fixation à l'ARN, qui sont des domaines hautement structurés, séparés entre eux par des RID (Lunde *et al.*, 2007). La forte abondance de RID dans les RBP (Castello *et al.*, 2012) semble donc apporter une explication quant à leur grande affinité vis-à-vis des SiNPs. Toutefois, la corrélation n'impliquant pas la causalité, il est important de mieux comprendre le mécanisme d'adsorption de ces RBP afin de confirmer si la présence de RID est bien la cause de leur forte affinité ou si d'autres facteurs non identifiés jusqu'à maintenant entrent en jeu.

1. Affinité des protéines à ARN pour les SiNPs

1.1. Importance des motifs RGG

Il a été montré par analyse protéomique que les protéines de levure possédant des motifs RGG (Arg-Gly-Gly) se trouvent parmi les protéines les plus affines pour les SiNPs (Tab. 5-1, Klein *et al.*, 2016). Or ces protéines ont comme point commun d'être toutes des RBP. D'un point de vue fonctionnel, ces motifs sont, en effet, connus pour se lier à des molécules d'ARN simple brin sans spécificité de

séquence (Ghisolfi *et al.*, 1992 ; Kiledjan et Dreyfuss, 1992 ; Chen *et al.*, 2001) ou spécifiquement pour des structures secondaires d'ARN très particulières (Phan *et al.*, 2010). Chez l'Homme cette fonction est très présente puisque plus de 1000 protéines possédant des motifs RGG ont pu être identifiés (Thandapani *et al.*, 2013).

*Tableau 5-1 : Liste des protéines de levure contenant plus de quatre motifs RGG. Le facteur d'enrichissement protéomique est également indiqué (Klein *et al.*, 2016). Un facteur d'enrichissement supérieur à 1 signifie que la protéine est retrouvée davantage dans Ads que dans NA par rapport à une protéine standard. En gris les protéines qui n'ont pas pu être identifiées par analyse protéomique.*

Protéine	Nb de motifs RGG	Fonction	Enrichissement
GAR1	18	H/ACA ribonucleoprotein complex	5,7
NOP1	17	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin;	17,3
NPL3	15	Nucleolar protein 3; Poly(A+) RNA binding	17,0
SBP1	8	Single-stranded nucleic acid-binding	9,7
DBP2	7	ATP-dependent RNA helicase	5,3
NSR1	6	pre-RNA processing	13,0
SKI2	6	RNA helicase SKI2	nd
YDL173W	5	Uncharacterized protein	nd

Afin d'étudier le mécanisme d'adsorption des RBP à motifs RGG, une protéine modèle a été choisie : Npl3. Cette protéine présente ici un grand intérêt car sa structure et sa fonction sont connues et elle fait partie des protéines présentant la plus forte affinité pour la silice (Tab. 5-1, Klein *et al.*, 2016).

Le rôle principal de Npl3 est de transporter de l'ARNm du noyau vers le cytosol. Il a notamment été montré qu'elle faisait la navette entre les deux compartiments (Lee *et al.*, 1996). Npl3 est impliquée dans de nombreux aspects de l'expression de gènes dont la transcription, la terminaison, l'épissage, l'export des ARNm, et leur traduction (McBride *et al.*, 2009).

Structurellement, Npl3 est constituée de 414 acides aminés divisés en 3 domaines distincts (Fig. 5-1, Deka *et al.*, 2008). Le domaine N-terminal (124 AA) est intrinsèquement désordonné et riche en résidus Pro, Glu, et Gln. Le domaine central (appelé RRM par la suite) est constitué de deux régions structurées formées d'hélices α et de feuillets β (RRM-1 et RRM-2). Ces deux régions sont séparées par 8 résidus non structurés. Enfin le domaine C-terminal (134 AA), également intrinsèquement désordonné, est riche en Gly, Arg, et Ser. Ce domaine est notamment caractérisé par la présence de 15 motifs RGG (Arg-Gly-Gly), ce qui représente à 1/3 des 134 résidus.

(a)

1	MSEAQETHVE	QLPESVVDAP	VEEQHQEPPQ	APDAPQEPQV	PQESAPQESA	PQEPPAPQEQ
61	NDVPPPSNAP	IYEGEESHVS	QDYQEAHQHH	QPPEPQPYYP	PPPPGEHMHG	RPPMHHRQEG
121	ELSNTRLFVR	PFPLDVQESE	LNEIFGPFGP	MKEVKILNGF	AFVEFEEAES	AAKAIEEVHG
181	KSFANQPLEV	VYSKLPAKRY	RITMKNLPEG	CSWQDLKDLA	RENSLETTFS	SVNTRDFDGT
241	GALEFPSEEI	LVEALERLNN	IEFRGSVITV	ERDDNPPPIR	RSNRGGFRGR	GGFRGGFRGG
301	FRGGFSRGGF	GGFRGGFGGP	RGGYGGYSRG	GYGGYSRGGY	GGSRGGYDSP	RGGYDSPRGG
361	YSRGGYGGPR	NDYGPPRGSY	GGSRGGYDGP	RGDYGPPrDA	YRTRDAPRER	SPTR*

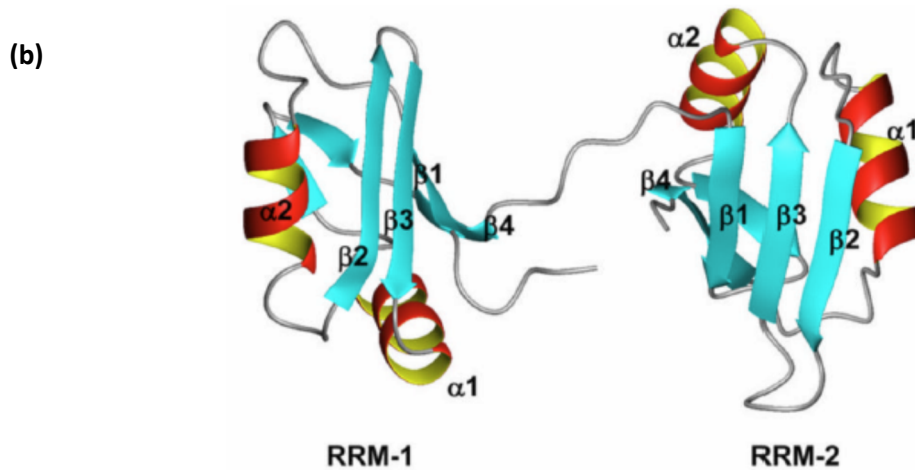


Figure 5-1 : (a) Séquence primaire de Npl3 : régions non structurées ; régions structurées. La position des 15 motifs **RGG** est indiquée en gras. (b) Représentation de la structure 3D de la région centrale de NPL3 (résidus 121-280). On peut observer la présence de deux domaines structurés appelés RRM-1 et RRM-2 séparés par 8 résidus non structurés. Tiré de Deka et al., 2008.

Afin d'expliquer la forte affinité de Npl3 vis-à-vis de la silice, l'hypothèse la plus simple est de supposer que le domaine C-terminal, qui est à la fois riche en Arg et une RID, est impliqué dans l'adsorption de Npl3 à la surface des SiNPs. Pour tester cette hypothèse, trois protéines hybrides ont été conçues (Fig. 5-2). Le premier mutant a été fourni par McBride *et al.* (2005) : GFP-Npl3. Il s'agit d'une fusion GFP (protéine fluorescente servant ici de traceur) possédant également la séquence native de Npl3. On considère que la présence de la GFP n'a pas de conséquence sur l'adsorption de la protéine de fusion car l'affinité de la GFP seule est très faible vis-à-vis de la silice (Klein *et al.*, 2016) De plus, deux autres mutants correspondant à des versions tronquées de Npl3 ont été fabriqués (Voir chapitre 7, §4.2. pour l'obtention des différents mutants). Il s'agit de la fusion ne contenant que les deux premiers domaines de Npl3 (domaines N-terminal et RRM) que l'on appellera GFP-Nter et celle ne contenant que le domaine C-terminal riche en motifs RGG (GFP-RGG).

Après construction des gènes codant pour ces différentes protéines hybrides, ceux-ci ont été insérés dans des cellules de levures BY4741 sous forme de plasmides multicopie (chapitre 7, §4.3.). Après obtention des conditions de culture adéquates, l'expression de ces gènes est assurée par l'induction du promoteur GAL puis l'ensemble des protéines solubles sont extraites (chapitre 7, §4.4.).

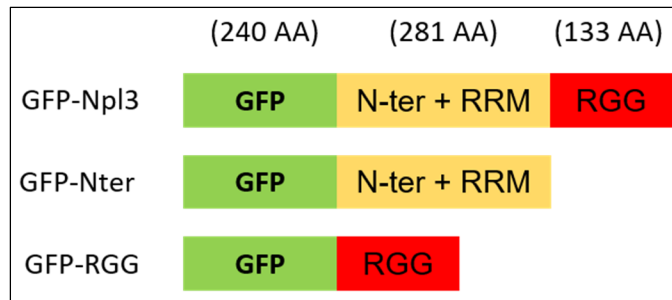


Figure 5-2 : Constitution des trois mutants de Npl3 étudiés ici. Tous les mutants possèdent la protéine fluorescente GFP du côté N-terminal. Chaque hybride possède ensuite une version tronquée ou non de Npl3.

Les différents extraits protéiques sont ensuite incubés en présence de SiNPs polydisperses Sigma (voir chapitre 2, § 1. pour la caractérisation) et en présence de tampon physiologique DPBS (§ 2.1.). Les concentrations en protéines sont calculées afin d'être en net excès de protéines par rapport à la surface des SiNPs disponible ($\approx 20\%$ de protéines adsorbées). Pour cela, les constantes d'adsorption ont été définies à partir d'isothermes d'adsorption faites par l'équipe (Fig. 5-3, Mathé *et al.*, 2013).

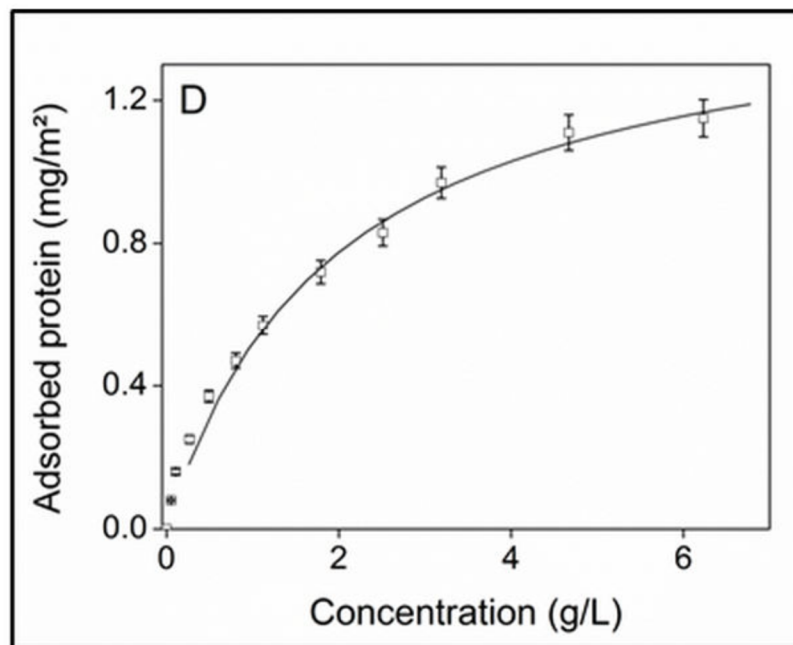


Figure 5-3 : Isotherme d'adsorption d'extrait total de protéines solubles de levures sur les SiNPs Sigma, en tampon DPBS, pH 7,4. Données expérimentales (\square) et ajustement selon le modèle de Langmuir. Tiré de Mathé *et al.*, (2013).

La mesure des quantités de protéines présentes dans les fractions de protéines adsorbées (Ads) et non adsorbées (NA) est obtenue par la méthode par déplétion (chapitre 7, §3.2.) : Deux échantillons de protéines sont incubés (un échantillon avec SiNPs et un autre sans SiNPs). Après incubation et centrifugation, les quantités de protéines totales et NA sont mesurées. La quantité de protéines Ads est ensuite calculée par différence.

La fluorescence de chaque échantillon est ensuite normalisée par rapport à la fluorescence totale afin de tenir compte de la variation de l'expression des gènes (Fig. 5-4). On constate ainsi des profils complètement différents selon la protéine d'intérêt. En effet, si GFP-Npl3 se retrouve quasi-intégralement dans la fraction Ads, GFP-Nter ne s'adsorbe pas du tout à la surface des SiNPs et est retrouvée dans la fraction NA. À l'inverse, la protéine tronquée GFP-RGG possède le même profil que la protéine native avec un net enrichissement dans la fraction Ads. Enfin GFP, utilisée comme témoin ici, n'est quasiment pas présente dans la fraction Ads confirmant sa faible affinité pour les SiNPs (Klein *et al.*, 2016).

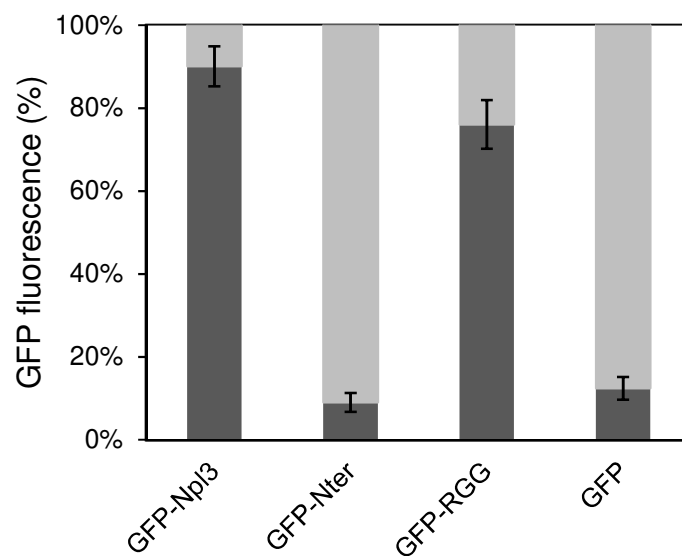


Figure 5-4 : Proportion de la fluorescence des différents mutants GFP dans la fraction adsorbée (gris foncé) ou libre en solution (gris clair). L'extrait contenant la GFP seule a été obtenu par expression bactérienne puis dilution dans de l'extrait de levure sauvage. Au moins trois réplicas ont été effectués.

Lorsque l'on utilise l'approche par fluorimétrie, il est essentiel de vérifier que les protéines de fusion souhaitées sont bien produites dans les cellules. En effet, bien que les séquences ADN des plasmides aient été vérifiées, il peut arriver que certaines protéines de fusion soient dégradées par des protéases cellulaires. Dans ce cas-ci, la fluorescence de la GFP n'est alors plus représentative de la présence de protéine fusion. Ainsi, afin de confirmer ces observations, l'expérience de mise en contact a été répétée et les fractions Ads et NA ont été étalées sur un gel SDS-PAGE. La présence des différentes fusions GFP a alors été révélée par ajout d'anticorps anti-GFP (chapitre 7, § 4.5. pour plus de détails). Le Western blot ainsi réalisé est indiqué dans la figure 5-5.

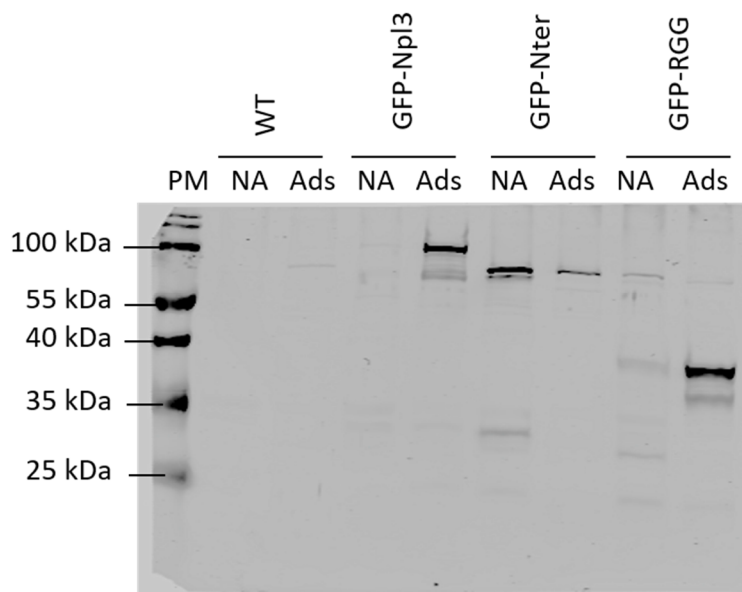


Figure 5-5 : Western blot des fractions Ads et NA d'extraits mis en contact avec des SiNPs Sigma. Les extraits étudiés sont issus de la souche sauvage de BY4741 (WT) ou des souches exprimant les protéines GFP-Npl3, GFP-Nter ou GFP-RGG. Révélation par des anticorps anti-GFP. Le premier puits est une échelle de PM.

La présence de GFP est bien constatée dans les souches exprimant les plasmides d'intérêt et non dans la souche sauvage (WT). Le Western blot permet d'estimer le poids moléculaire (PM) des protéines d'intérêt en comparant la migration de la bande majoritaire à celles de l'échelle de PM. Les PM, calculés à partir de la séquence d'acides aminés, sont estimés à 72 kDa pour GFP-Npl3, 59 kDa pour GFP-Nter, et 41 kDa pour GFP-RGG (Tab. 5-2). Globalement, les bandes d'intérêt se situent à la bonne hauteur. Il faut toutefois noter que la migration des protéines dépend principalement du PM mais également d'autres facteurs physico-chimiques. La présence de RID a notamment tendance à perturber la vitesse de migration des protéines (Alves et Castilho, 2005 ; Brocca *et al.*, 2009). Il n'est donc pas possible d'estimer précisément le PM de ces protéines par comparaison avec les marqueurs de PM qui sont habituellement des protéines globulaires. Dans le cas de GFP-RGG, le PM semble être sous-estimé.

Tableau 5-2 : Poids moléculaire des différentes fusions GFP étudiées ici. Calculs fait sur ExPASy à partir de la séquence en acides aminés.

	Nb d'AA	Poids moléculaire (kDa)
GFP-Npl3	654	72
GFP-Nter	521	59
GFP-RGG	371	41
GFP	238	27
Gar1-GFP	451	49
GFP-Nop1	567	62
GFP-Nsr1	655	72

De plus, si l'on compare les fractions Ads et NA entre elles, on retrouve la même répartition des fusions GFP à savoir un enrichissement de GFP-Npl3 et de GFP-RGG dans la fraction Ads et un enrichissement de GFP-Nter dans la fraction NA. Le Western Blot constitue donc une confirmation qualitative des différences d'affinité observées précédemment.

Rappelons que, dans l'expérience précédemment décrite, les protéines de fusion GFP sont contenues dans un extrait total de protéines solubles de levure et que toutes ces protéines sont en situation de "compétition" pour la surface disponible des SiNPs. L'adsorption d'un mélange de protéines suit un modèle d'adsorption de Langmuir-Freundlich (chapitre 4, § 2.2.) qui peut être approché par un modèle de Langmuir pour la démonstration qui suit. Une constante d'adsorption moyenne $K_{\bar{p}}$ peut donc être définie en fonction de la concentration en protéines libres moyenne $C_{\bar{p}}$ (Eq. 5-1).

$$\theta_{\bar{p}} = \frac{[n_{\bar{p}ads}]}{[n_{\infty}]} = \frac{K_{\bar{p}}C_{\bar{p}}}{1+K_{\bar{p}}C_{\bar{p}}} \quad (\text{Eq. 5-1})$$

Avec $\theta_{\bar{p}}$ la fraction de sites d'adsorption occupés par les protéines, $[n_{\bar{p}ads}]$ la concentration totale de protéines adsorbées et $[n_{\infty}]$ la concentration maximale de protéines adsorbées (en mole par m² de surface).

Avec le même formalisme l'adsorption d'une protéine minoritaire X issue du mélange peut être exprimée par un modèle de Langmuir en compétition (Wang et Ching, 2003) en ajoutant un deuxième composant au système (Eq. 5-2) :

$$\theta_X = \frac{[n_{Xads}]}{[n_{\infty}]} = \frac{K_X C_X}{1+K_X C_X + K_{\bar{p}} C_{\bar{p}}} \quad (\text{Eq. 5-2})$$

Avec K_X l'affinité de la protéine X pour la surface, C_X sa concentration en solution, et $[n_{Xads}]$ la quantité de protéine X adsorbée (en mole par m² de surface).

Dans nos conditions opératoires la surface des SiNPs est saturée en protéines. À partir de l'équation 5-1, on obtient donc $\theta_{\bar{p}} \approx 1$ et $K_{\bar{p}}C_{\bar{p}} \gg 1$. De plus, les mutants GFP ne représentent qu'un faible pourcentage par rapport à la quantité totale de protéines. Elles ne pourront donc pas saturer la surface ce qui se traduit dans l'équation 5-2 par $\theta_X \ll 1$ et $K_{\bar{p}}C_{\bar{p}} \gg K_X C_X$.

Avec ces approximations l'équation 2 devient :

$$\theta_X = \frac{[n_{Xads}]}{[n_{\infty}]} = \frac{K_X C_X}{K_{\bar{p}} C_{\bar{p}}} \quad (\text{Eq. 5-3})$$

On remarque ainsi que $[n_{Xads}] / C_X$ est proportionnel à K_X . Pour une protéine minoritaire, la variation d'enrichissement des protéines adsorbées est donc proportionnelle à l'affinité de la protéine vis-à-vis de la surface.

Il est vrai que les protéines de fusion sont surexprimées dans les cellules utilisées (induction du promoteur GAL) mais, bien que l'expression soit suffisante pour les expériences de fluorimétrie et de Western Blot, les quantités de protéines GFP produites restent compatibles avec la notion de protéines minoritaires.

Par conséquent, une autre façon plus quantitative d'observer les résultats de fluorimétrie est de calculer le rapport entre les fractions Ads/NA, directement relié à l'affinité. Dans les conditions d'isotherme pratiquées ici, une protéine standard sera retrouvée à 20% dans la fraction adsorbée, soit un ratio Ads/NA = 0,25 (Tab. 5-3). Par rapport à cette protéine standard, GFP-Npl3 possède un ratio multiplié par 36 et GFP-RGG un ratio multiplié par 13. Ceci indique un très fort enrichissement de la fraction Ads par rapport au mélange de protéines et donc une augmentation très importante de l'affinité. Inversement GFP et GFP-Nter possèdent un ratio divisé par 2 ce qui montre une plus faible affinité de ces protéines par rapport à la moyenne des protéines.

Tableau 5-3 : Pourcentages de protéines adsorbées mesurés par fluorimétrie de la GFP.

Fusions GFP	Ads %	Ads/NA
Extrait total	20	0,25
GFP	12,4 ± 3	0,14
GFP-Npl3	90,1 ± 5	9,10
GFP-Nter	9,0 ± 2	0,10
GFP-RGG	76,1 ± 6	3,18

On constate donc que le domaine C-terminal est nécessaire pour s'adsorber à la protéine avec une affinité proche de celle de Npl3 native. L'hypothèse initiale est donc confirmée : le domaine C-terminal riche en motifs RGG et intrinsèquement désordonné est responsable en grande partie de la forte affinité de Npl3 pour les surfaces de silice. La présence supplémentaire des domaines N-ter et RRM, bien que peu affine *per se*, semble cependant contribuer dans une faible mesure à la très forte affinité de Npl3. Ceci peut être dû à la présence d'une RID dans le domaine N-terminal.

1.2. Importance de la méthylation des résidus arginine

1.2.1. Cas de Npl3

Chez les cellules eucaryotes, les résidus R des motifs RGG subissent fréquemment une modification post-traductionnelle : la méthylation (Henry et Silver, 1996 ; Xu *et al.*, 2003). Il a d'ailleurs été montré que cette modification régule les fonctions biologiques des protéines contenant des motifs RGG (Bedford et Richards, 2005). Concernant Npl3, au moins 10 résidus R sur les 15 appartenant aux motifs RGG sont diméthylés et les 5 autres possèdent des degrés variables de méthylation (McBride *et al.*, 2005).

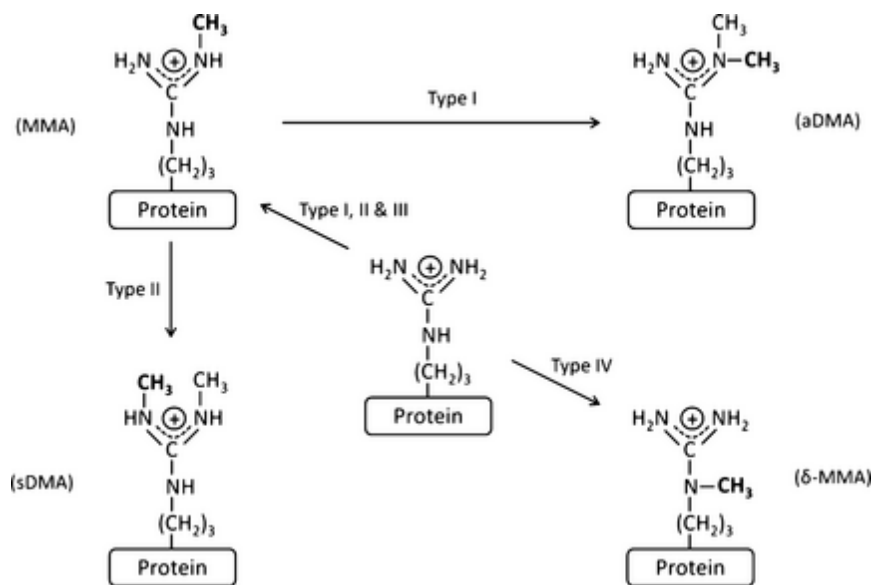


Figure 5-6 : Voies réactionnelles empruntées lors de la méthylation des résidus arginine. Chaque réaction ajoute 1 ou 2 groupements méthyle. MMA : monométhylated arginine ; DMA : dimethylated arginine ; sDMA : symmetrical DMA ; aDMA : asymmetrical DMA. D'après Low et Wilkins (2012).

La méthylation des résidus arginine n'est pas spontanée mais est catalysée par une famille d'enzymes appelées méthyltransférases à arginine (PRMT pour protein arginine methyltransferase). Les PRMT sont divisées en quatre types selon la voie réactionnelle empruntée (Fig. 5-6). Elles conduisent à une monométhylation suivie éventuellement par une diméthylation. La diméthylation peut se faire de deux façons : présence d'un groupement méthyle sur deux atomes d'azote du guanidinium (diméthylation symétrique) ou présence des deux groupements méthyle sur le même atome d'azote (diméthylation asymétrique). Quatre PRMT ont été identifiées chez *S. cerevisiae* : Hmt1, Hsl7, Sfm1, et Rmt2 (Low et Wilkins, 2012). Chacune d'elles appartient à un type différent de PRMT (respectivement aux types I, II, III, et IV). Hmt1 est la principale PRMT chez *S. cerevisiae*. Son absence induit une diminution de 70% de la monométhylation et de 85% de la diméthylation pour l'ensemble des protéines solubles (Gary et

al., 1996). D'ailleurs Npl3 n'est pas méthylée chez des souches de levures n'exprimant pas Hmt1 (McBride et al., 2005).

Afin de tester l'importance de la présence d'arginine méthylée, la protéine hybride GFP-Npl3 a été étudiée (chapitre 7, § 4.2.). La protéine a été exprimée dans une souche de levure sauvage ainsi que dans une souche $\Delta hmt1$ donc dont les protéines d'intérêt ne sont pas méthylées. Les extraits produits sont ensuite mis en excès dans des solutions de SiNPs et la fluorescence des fractions adsorbées et libres est mesurée (Fig. 5-7).

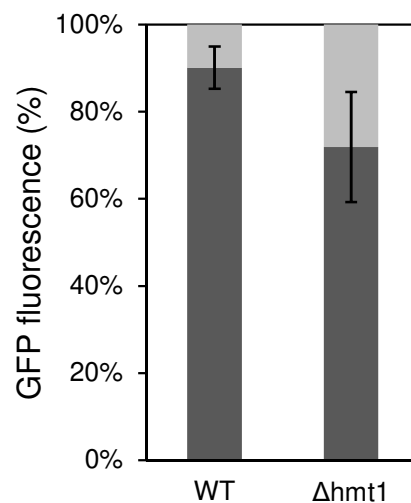


Figure 5-7 : Proportion de la fluorescence de GFP-Npl3 exprimée chez BY4741 ou chez $\Delta hmt1$. Fraction adsorbée (gris foncé) ou libre en solution (gris clair).

Globalement GFP-Npl3, méthylée et non méthylée, sont fortement enrichies dans la fraction Ads. Elles possèdent donc toutes deux une forte affinité pour la silice. On peut toutefois observer une différence. GFP-Npl3 ($\Delta hmt1$) est sensiblement moins affine que GFP-Npl3 (WT) avec des ratio Ads/NA respectifs de 2,6 et de 9,1. Les différences de ratio semblent être élevées. Cependant il faut rappeler que l'incertitude des valeurs, déjà forte pour les mesures de la fraction Ads est fortement augmentée dans le cas du ratio Ads/NA. Ainsi, bien que la différence soit nette, elle reste faible. Néanmoins, un effet de la diméthylation sur l'adsorption peut être observé.

La comparaison des affinités de GFP-Npl3 et GFP-Npl3 ($\Delta hmt1$) a également été effectuée par Western blot (Fig. 5-8). L'absence de méthylation ne semble pas perturber l'expression de la protéine ni son PM. De plus, bien que faible, on peut à nouveau constater une différence entre les deux extraits. GFP-Npl3 est présent quasi intégralement dans la fraction Ads tandis que GFP-Npl3 ($\Delta hmt1$) est présent majoritairement dans la fraction Ads mais une quantité non négligeable se trouve également dans la fraction NA. Ceci confirme donc les observations précédentes.

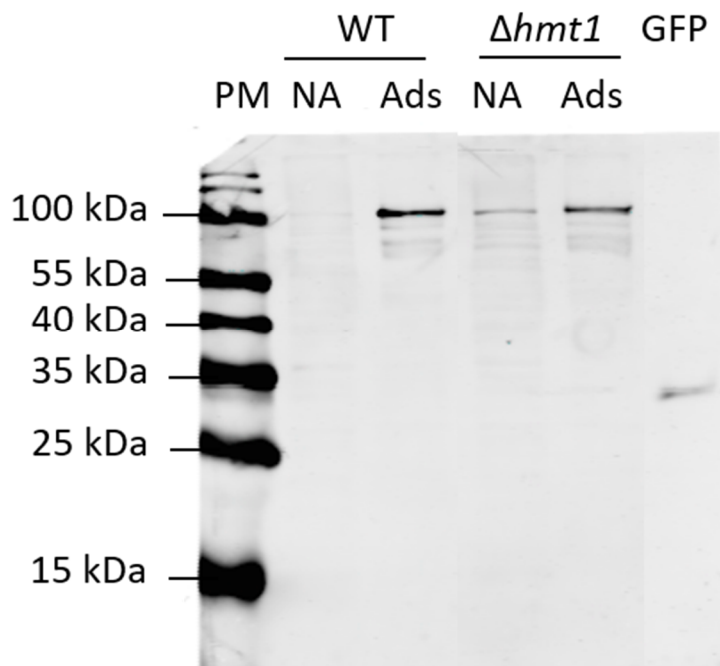


Figure 5-8 : Western blot des fractions Ads et NA de GFP-Npl3 exprimée dans une souche BY4741 (WT) ou BY4741 $\Delta hmt1$ mis en contact avec des SiNPs Sigma. Révélation par des anticorps anti-GFP. Le premier puits est une échelle de PM. Une solution pure de GFP (27 kDa) a également été déposée à titre de comparaison.

Finalement, la diméthylation des résidus arginine de Npl3 permet d'optimiser son adsorption. Il faut néanmoins préciser qu'une difficulté de reproductibilité des mesures est apparue. En effet, la reproduction des mesures de fluorimétrie a été faite quelques mois plus tard et il résultait que toutes les fusions GFP étaient retrouvées quasi intégralement dans la fraction Ads. Il est vite apparu que la condition de net excès de protéines par rapport à la surface disponible n'était plus respectée. Or cette condition d'excès a été calculée à partir d'isothermes faites par mes prédécesseurs (Mathé *et al.*, 2013). Les SiNPs utilisés ici, bien qu'appartenant à la même référence, sont issus de lots différents. Aussi, il a pu être constaté une modification très importante de l'isotherme d'adsorption avec notamment un décalage de la concentration en protéines nécessaire pour atteindre la saturation. Ceci peut s'expliquer par des différences de surfaces spécifiques dues à des degrés d'agrégation variables de ces SiNPs polydisperses. Les valeurs obtenues initialement ont pu être obtenues après avoir augmenté la quantité de protéines en solution afin de s'assurer d'être en condition de net excès. Ceci nous rappelle que les isothermes doivent être déterminées pour chaque système protéines/NPs afin de connaître précisément le degré de saturation de la surface.

1.2.2. Cas d'autres protéines à motifs RGG

Pour étendre l'observation d'un potentiel effet de la méthylation des résidus arginine, d'autres protéines ont été étudiées : Gar1, Nop1, et Nsr1. Elles ont toutes comme point commun avec Npl3 de posséder de nombreux motifs RGG. D'ailleurs Npl3, Gar1, et Nop1 sont les trois protéines de levure avec le plus de motifs RGG (Tab. 5-1). De plus, toutes ces protéines font partie du groupe de protéines fortement affines pour les SiNPs (facteur d'enrichissement protéomique > 5).

Comme pour Npl3, les résidus arginine de Gar1, Nop1 et Nsr1 sont méthylés *in vivo* et l'absence de Hmt1 élimine cette méthylation (Xu *et al.*, 2003). Ainsi, des plasmides contenant les gènes codant pour des fusions GFP de ces trois protéines nous ont été données par l'équipe de Henry (Xu *et al.*, 2003). Après avoir fait muter le gène de la GFP pour optimiser le signal de fluorescence (chapitre 7, § 4.2.), ces plasmides ont été étudiés de la même façon que précédemment : expression dans les souches sauvage (WT) et $\Delta hmt1$ de BY4741 et extraction des protéines solubles. Un Western Blot des extraits de BY4741 (contexte WT) a ensuite été produit (Fig. 5-9).

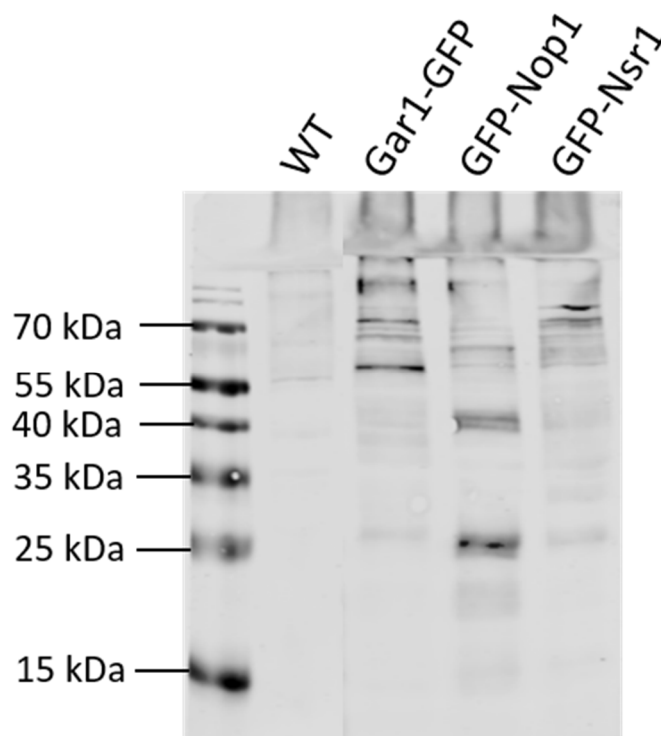


Figure 5-9 : Western blot des extraits totaux de BY4741 sans plasmide (WT) ou avec les plasmides *Gar1-GFP*, *GFP-Nop1*, ou *GFP-Nsr1* (contexte WT). Révélation par des anticorps anti-GFP. Le premier puits est une échelle de PM.

On constate, dans ces cas-ci, que la GFP est présente dans plusieurs bandes pour un même extrait. Si on retrouve bien la bande au PM attendu (Tab. 5-2), celle-ci n'est pas toujours la bande la plus intense. Par exemple, pour *GFP-Nop1*, la bande d'intérêt à 62 kDa est présente mais la bande majoritaire est à

25 kDa. La présence de bandes à des PM inférieurs est caractéristique de protéines dégradées. Aussi, la présence de bandes aux PM très élevés peut être le signe d'une agrégation des fusions GFP entre elles ou avec d'autres protéines (cas de Gar1-GFP).

La présence de protéines dégradées pour ces extraits (et non pour GFP-Npl3) peut s'expliquer par leurs modes d'expression. En effet, l'expression de la protéine GFP-Npl3 est induite sous le contrôle du promoteur GAL alors que celle de Gar1-GFP, GFP-Nop1, et GFP-Nsr1 est constitutive. Cela signifie que, pour GFP-Npl3, la protéine d'intérêt n'a été produite que durant les deux dernières heures de culture (après ajout du galactose). Pour les autres protéines par contre, une grande quantité de ces protéines a été produite durant toutes les phases de culture cellulaire. La présence de protéines dégradées est donc probablement due à la présence naturelle de protéases produites par les cellules. En effet, les protéines possédant des RID sont particulièrement sensibles à la protéolyse (Alves et Castilho, 2005 ; Brocca *et al.*, 2009).

Dans tous les cas les tests préliminaires de mise en contact avec des SiNPs ne sont pas exploitables. En effet, bien qu'un léger effet de la diméthylation ait pu être constaté, il est impossible de distinguer par fluorescence la fusion GFP des protéines dégradées. Aussi, il serait intéressant de refaire ces constructions géniques afin que l'expression soit inductive. Il serait alors possible de confirmer l'importance de la méthylation sur l'affinité des protéines.

2. Importance de la diméthylation asymétrique

Les expériences *in vivo*, faites précédemment, présentent des limitations qui empêchent d'affirmer formellement l'importance des motifs RGG et de la diméthylation. Premièrement, les protéines d'intérêt sont des protéines de fusion. Bien que la GFP ne s'adsorbe pas *per se*, il est possible que sa présence influence indirectement l'adsorption. Ensuite, la région C-ter de Npl3 (133 AA) ne contient pas que des résidus R. Les autres acides aminés peuvent éventuellement jouer un rôle. Enfin les extraits étaient étudiés dans des conditions bien spécifiques de compétition (large excès de protéines par rapport à la surface de SiNPs disponible). La forte affinité de l'arginine diméthylée est-elle observable dans d'autres conditions d'isotherme ?

Ainsi, afin d'affiner la compréhension des mécanismes d'adsorption des motifs RGG, l'adsorption de peptides contenant ces motifs a été étudiée. Ici nous nous intéressons à des solutions de peptides de synthèse. Ces solutions sont donc pures, ce qui permet de contrôler parfaitement les conditions physico-chimiques du milieu. Comme pour les hémoprotéines (chapitre 3) l'adsorption des peptides

va être comparée du point de vue quantitatif (isothermes d'adsorption), thermodynamique (titrations calorimétriques isothermes) et structural (dichroïsme circulaire et fluorescence du tryptophane).

La liste des peptides utilisés par la suite est indiquée dans le tableau 5-4. Ils sont issus de la région N-terminale de Nop1. La conception de ces peptides est précisée dans le chapitre 7 (§ 4.6.). Quatre cas ont été comparés : l'arginine non méthylée (**R**), l'arginine diméthylée asymétriquement (**R-DMA**), l'arginine diméthylée symétriquement (**R-DMS**), et la lysine (**K**).

*Tableau 5-4 : Séquence des différents peptides RGG. Les résidus qui varient sont colorés : **R** (arginine non méthylée), **R** (R-DMA), **R** (R-DMS), **K** (lysine). Le peptide CotB1p est utilisé comme référence possédant une forte affinité pour la silice (Abdelhamid et al., 2014).*

Peptide	Caractéristique	Nombre d'AA	Séquence
P1	R	25	SRGGSRGGSRGGWGGRGGSRGGARG
P2	50% R, 50% R-DMA	25	SRGGSRGGSRGGWGGRRGGSRGGARG
P3	R-DMA	25	SRGGSRGGSRGGWGGRRGGSRGGARG
P4	R-DMS	25	SRGGSRGGSRGGWGGRRGGSRGGARG
P5	K	25	SKGGSKGGSKGGWGGKGGSKGGAKG
P6	R	13	WGGRRGGSRGGARG
P7	R-DMA	13	WGGRRGGSRGGARG
P8	K	13	WGGKGGSKGGAKG
CotB1p	Référence	15	WSGRARAQRQSSRR

2.1. Isothermes d'adsorption de peptides de synthèse

Tout d'abord des isothermes d'adsorption ont été effectués. L'adsorption des différents peptides sur les SiNPs polydisperses (Sigma) (chapitre 2, § 1.) a été suivie. La technique utilisée a été la méthode par déplétion en suivant la fluorescence du tryptophane (chapitre 7, § 3.1.). Sur les figures 5-10 et 5-11 sont représentés les isothermes d'adsorption de P1 à P5 et de P6 à CotB1p respectivement. Chaque isotherme est ajusté par un modèle de Langmuir et les constantes N (quantité maximale de peptides adsorbées) et K_{ads} (constante d'adsorption) sont calculées (Tab. 5-5).

Si l'on s'intéresse aux longs peptides (Fig. 5-10, Tab. 5-5), on remarque que les profils d'adsorption sont différents. En particulier, les peptides P1 et P5, qui possèdent soit 6 résidus arginine soit 6 résidus lysine, montrent des différences au niveau des constantes N (respectivement 0,10 et 0,07 peptide.nm⁻²) comme de K_{ads} (respectivement $8,2 \cdot 10^5$ et $5,1 \cdot 10^5$ L.mol⁻¹). Le remplacement des R par des K provoque donc une baisse légère de l'affinité des peptides.

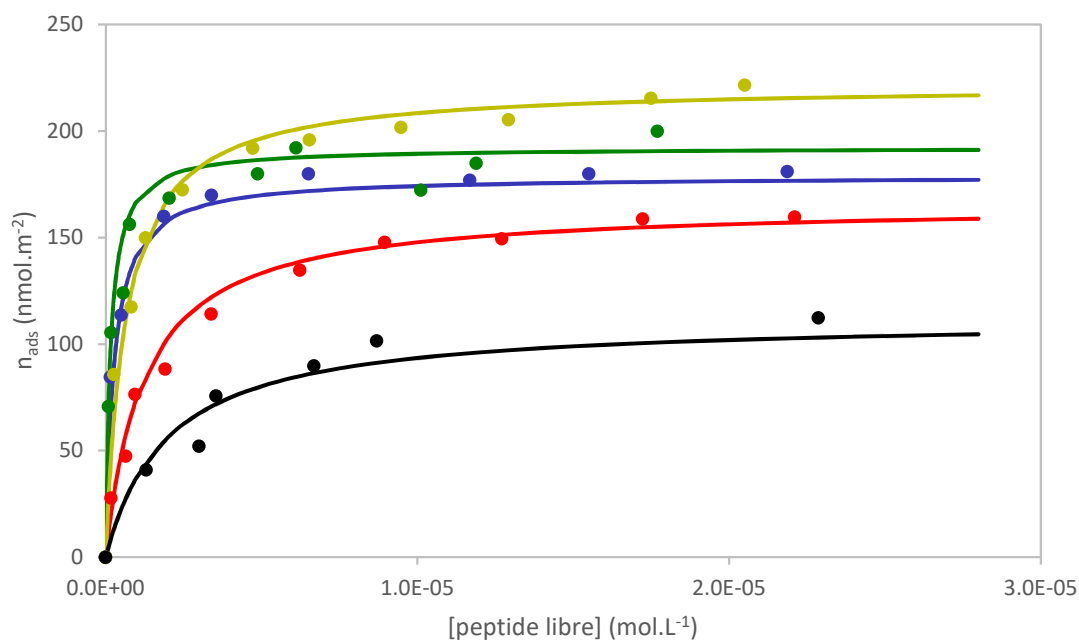


Figure 5-10 : Isothermes d'adsorption des peptides **P1 (R)**, **P2 (50% R-DMA)**, **P3 (100% R-DMA)**, **P4 (R-DMS)**, et **P5 (K)** et modèles de Langmuir correspondants. Tampon DPBS, pH 7,4.

Tableau 5-5 : Constantes calculées à partir du modèle d'isotherme de Langmuir des peptides adsorbés sur des SiNPs Sigma en tampon DPBS, pH 7,4.

Peptide	Caractéristique	N (peptide.nm ⁻²)	K _{ads} (L.mol ⁻¹)
P1	R	0,100 ± 0,006	8,2E+05 ± 1,3E+05
P2	50% R, 50% R-DMA	0,108 ± 0,014	3,8E+06 ± 3,6E+05
P3	R-DMA	0,116 ± 0,011	6,6E+06 ± 7,8E+03
P4	R-DMS	0,133 ± 0,007	1,6E+06 ± 1,1E+05
P5	K	0,067 ± 0,002	5,1E+05 ± 9,9E+04
P6	R	0,051 ± 0,024	1,3E+05 ± 5,7E+04
P7	R-DMA	0,069 ± 0,006	6,9E+05 ± 2,9E+05
P8	K	0,046 ± 0,011	1,2E+05 ± 4,4E+04
CotB1p	Référence	0,053 ± 0,004	2,4E+05 ± 6,4E+04

Concernant les quatre peptides à motifs RGG, les quantités de peptides adsorbés (N) varient peu tandis que les valeurs de K_{ads} augmentent nettement avec la diméthylation. On constate ainsi que la version non méthylée (P1) et les deux versions complètement diméthylées (P3 et P4) possèdent des K_{ads} respectifs de 8,2.10⁵, 6,6.10⁶, et 1,6.10⁶ L.mol⁻¹. Ainsi, la diméthylation symétrique permet une multiplication par 2 de l'affinité et la diméthylation asymétrique une multiplication par 8. On remarque donc une nette différence entre les deux formes de diméthylation de l'arginine. De plus, la diméthylation asymétrique joue un tel rôle sur l'affinité que la modification de seulement trois résidus arginine sur les six (peptide P2) augmente le K_{ads} d'un facteur 4,6 (K_{ads} = 3,8.10⁶ L.mol⁻¹).

Nous nous sommes ensuite intéressés aux petits peptides. L'intérêt de ces peptides est double : observer un éventuel effet du nombre de motifs RGG (passage de 6 à 3) sur les constantes d'isotherme d'adsorption et comparer ces constantes avec la référence CotB1p. Il est en effet connu que ce peptide possède une très forte affinité vis-à-vis de nanoparticules de quartz (de nature identique à la silice mais de structure cristalline). Des applications de purification protéique utilisant CotB1p comme tag peptidique ont ainsi déjà été envisagées (Abdelhamid *et al.*, 2014).

La comparaison des petits peptides entre eux (Fig. 5-11, Tab. 5-5) montre également des différences tant au niveau du K_{ads} que du N. Le passage des résidus R (P6) aux résidus K (P8) provoque une baisse de K_{ads} mais la valeur de N reste constante. Par contre, la diméthylation asymétrique des résidus arginine (P7) provoque à la fois une augmentation du K_{ads} et de N par rapport à la version non méthylée (P6).

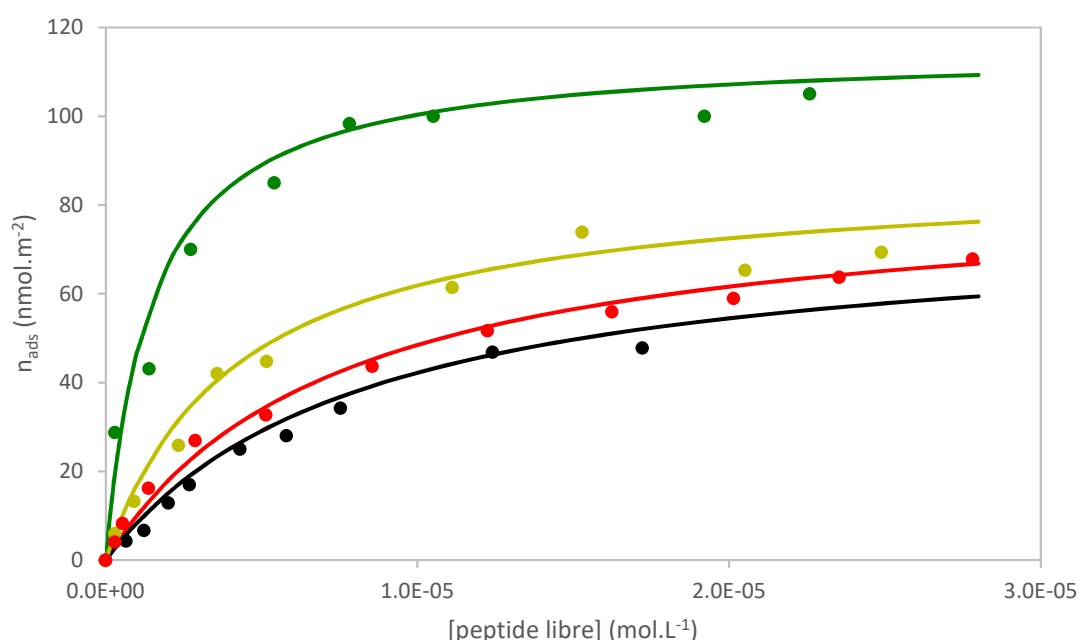


Figure 5-11 : Isothermes d'adsorption des peptides P6 (R), P7 (R-DMA), P8 (K), et CotB1p et modèles de Langmuir correspondants. Tampon DPBS, pH 7,4.

Si l'on compare maintenant ces peptides avec leurs équivalents de plus grandes tailles on constate systématiquement une baisse de N comme une baisse de K_{ads} . Ainsi, en passant de P1 à P6, N est divisé par 2 (de 0,10 à 0,05 peptide.nm⁻²) et K_{ads} est divisé par 6 (8,2.10⁵ et 1,3.10⁵ L.mol⁻¹) ; en passant de P3 à P7, N est divisé par 2 (de 0,116 à 0,069 peptide.nm⁻²) et K_{ads} est divisé par 10 (de 6,6.10⁶ et 6,9.10⁵ L.mol⁻¹) ; et en passant de P5 à P8, N baisse de 31% (de 0,07 à 0,05 peptide.nm⁻²) et K_{ads} est divisé par 4 (de 5,1.10⁵ à 1,2.10⁵ L.mol⁻¹). En l'absence de différences autres que la taille, ceci indique donc clairement que l'affinité d'un peptide pour une surface de silice est corrélée au nombre de résidus de ce peptide. Il est également intéressant de noter que les profils de P1 et P7 sont très proches. Ainsi, la

méthylation des résidus arginine peut avoir autant d'effet que le doublement du nombre de résidus arginine non méthylés.

Enfin, le peptide CotB1p possède un profil similaire à celui de P6. Toutefois, si leurs valeurs de N sont pratiquement égales (0,053 et 0,051 peptide.nm⁻² respectivement), le K_{ads} de CotB1p est légèrement supérieur à celui de P6 (2,4.10⁵ contre 1,3.10⁵ L.mol⁻¹). Cette légère augmentation peut être due à deux facteurs : d'une part le nombre d'acides aminés de CotB1p est légèrement supérieur à celui de P6 (15 contre 13), mais surtout, le nombre de résidus arginine est supérieur (5 contre 3). Ces deux facteurs peuvent induire une augmentation de la probabilité d'interaction avec les SiNPs ainsi que de la force de l'adsorption. Si CotB1p suit la même tendance que les peptides à motifs RGG, il apparaît logique que la diméthylation des résidus arginine de ce peptide pourrait considérablement augmenter son affinité. Des discussions dans ce sens ont été entreprises avec l'équipe de Kuroda (Abdelhamid *et al.*, 2014) afin d'optimiser la purification de protéines par un tag CotB1p.

On peut également s'interroger sur l'affinité de ces différents peptides par rapport à la littérature. L'adsorption de peptides sur des surfaces a, en effet, été mesurée à de multiples reprises. On peut notamment citer Fillon *et al.* (2007) et Nygren *et al.* (2008) qui ont étudié l'adsorption de peptides de tailles comparables sur des surfaces d'or et de silice respectivement. Les K_{ads} obtenus sont compris entre 10⁶ et 10⁷ L.mol⁻¹, soit du même ordre de grandeur que les peptides RGG. Toutefois, l'adsorption de peptides peut conduire à des K_{ads} beaucoup plus élevés (de l'ordre de 10⁹ mol.L⁻¹). Ceci est le cas pour un peptide de 36 acides aminés adsorbé sur de l'hydroxyapatite (Capriotti *et al.*, 2007) ainsi que pour le peptide CotB1p adsorbé sur du quartz (Abdelhamid *et al.*, 2014). Ce dernier résultat est en contradiction avec les valeurs mesurées ici puisqu'il y a 3 ordres de grandeur de différence du K_{ads} . Il ne s'agit certes pas de la même surface (silice contre quartz), ni du même tampon (DPBS 0,01 mol.L⁻¹ contre HEPES 0,025 mol.L⁻¹) cependant une telle différence reste intrigante.

Ainsi, les données de la littérature sont nombreuses mais dépendent de nombreux facteurs (système étudié, technique utilisée...). Étant donnée la disparité des valeurs de K_{ads} mesurées, il semble risqué de comparer les données obtenues ici avec d'autres études. La comparaison de l'affinité entre les différents peptides faite ici est toutefois valable puisque le même protocole a été appliqué pour tous.

Nous avons également essayé de savoir si la saturation de la surface des SiNPs était réellement atteinte. Des isothermes ont ainsi été faits dans des conditions de faible force ionique. Il est en effet connu que les ions présents en solution forment une couche à la surface des SiNPs ce qui induit un écrantage qui peut empêcher l'adsorption d'autres molécules telles que les peptides et protéines (Pfeiffer *et al.*, 2014). Or, le tampon DPBS est un milieu contenant : KCl (2 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (2 g.L⁻¹), NaCl

(80 g.L⁻¹), et Na₂HPO₄ (11,5 g.L⁻¹). Sa force ionique, calculée selon l'équation 5-3, est de 1,61 mol.L⁻¹, ce qui correspond à une force ionique forte.

$$I = \frac{1}{2} \sum_i C_i z_i^2 \quad (\text{Eq. 5-3})$$

Avec I la force ionique en mol.L⁻¹, C_i la concentration molaire de l'ion i et z_i sa valence.

Afin de diminuer cette force ionique, des isothermes ont été faits en utilisant du tampon DPBS dilué au dixième (Fig. 5-12). La force ionique du milieu se retrouve diminuée d'autant et l'adsorption des peptides est favorisée. S'agissant d'expériences exploratoires, seuls deux peptides ont été testés : P3 et CotB1p. Ces peptides ont été choisis car ils possèdent une forte affinité vis-à-vis de la silice.

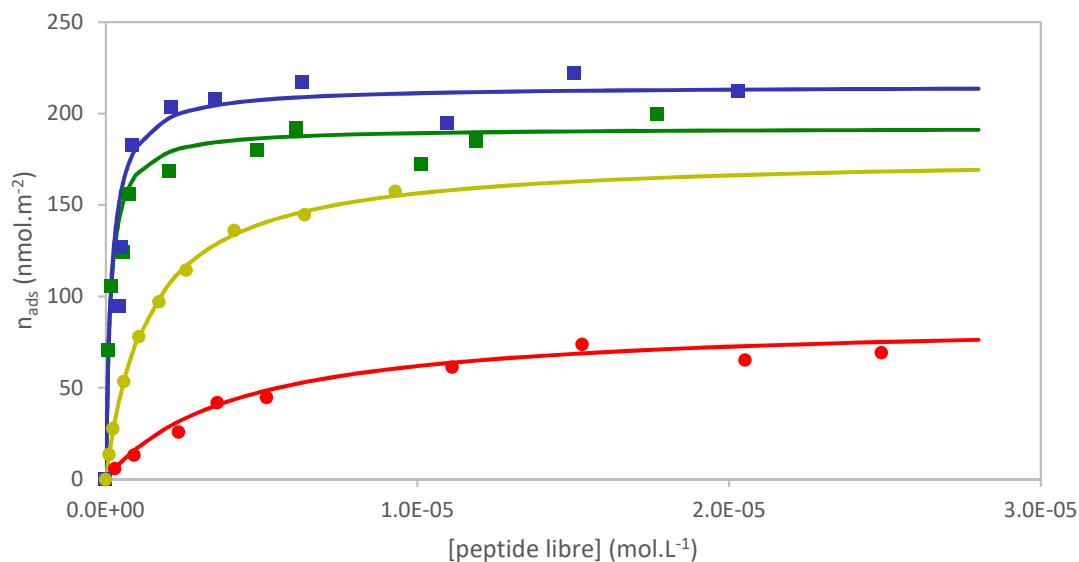


Figure 5-12 : Isothermes d'adsorption des peptides P3 et CotB1p en tampon DPBS 1X et DPBS 0,1X. P3 1X, P3 0,1X, CotB1p 1X, et CotB1p 0,1X et modèles de Langmuir correspondants.

Les constantes N et K_{ads} ont été calculées à partir du modèle de Langmuir (Tab. 5-6). Concernant P3 (R-DMA), la diminution de la force ionique semble n'avoir que peu d'effet sur ses constantes. La quantité maximale de peptides adsorbés reste constante (0,12 contre 0,13 peptide.nm⁻²) de même que le K_{ads} (6,6.10⁶ contre 5,5.10⁶ L.mol⁻¹).

Tableau 5-6 : Constantes calculées à partir du modèle d'isotherme de Langmuir des peptides P3 (R-DMA) et CotB1p adsorbés sur des SiNPs Sigma en deux conditions de tampon : DPBS 1X (tampon phosphate 10mmol.L⁻¹) et DPBS 0,1X (tampon phosphate 1 mmol.L⁻¹).

Peptide	Tampon DPBS	N (peptide.nm ⁻²)	K _{ads} (L.mol ⁻¹)
P3	1X	0,116 ± 0,011	6,6E+06 ± 7,8E+03
	0,1X	0,129	5,5E+06
CotB1p	1X	0,053 ± 0,004	2,4E+05 ± 6,4E+04
	0,1X	0,107	7,4E+05

Concernant le peptide CotB1p, on observe par contre un net effet de la diminution en sels puisque la constante N est multipliée par 2 (de 0,05 à 0,11 peptide.nm⁻²) et le K_{ads} est multiplié par 3 (2,4.10⁵ contre 7,4.10⁵ L.mol⁻¹) en passant du tampon de forte force ionique à celui de plus faible force ionique. La valeur de N de CotB1p se rapproche alors de celle de P3.

On peut donc en déduire que, pour le peptide P3, la saturation de la surface est atteinte même en présence de contre-ions. L'affinité de P3 pour la surface est donc nettement supérieure à celle des ions présents à la surface de la silice. Pour CotB1p par contre, il semble y avoir compétition pour la surface des SiNPs entre les peptides et les ions présents en solution. Ceci indique que l'affinité de CotB1p pour la surface de silice est beaucoup plus faible et commensurable à celle des contre-ions.

Il est également intéressant de constater que le nombre maximal de peptides adsorbables est identique que le peptide soit grand ou petit. Il est donc peu probable que la saturation soit causée par un encombrement stérique ou de répulsions électrostatiques entre peptides. La silice posséderait un nombre fini de sites de fixation (égal environ à 0,13 sites/nm²) répartis sur sa surface.

2.2. Titration calorimétrique isotherme des peptides RGG

La diméthylation de l'arginine semble jouer un rôle très important lors de l'adsorption des peptides. De plus, on a pu constater des différences entre diméthylation symétrique et diméthylation asymétrique ; la dernière présentant la plus forte affinité pour les surfaces de silice. Afin d'aller plus loin, des expériences de titration calorimétrique isotherme ont donc été entreprises (chapitre 7, § 3.3.). Ces expériences nous donnent accès aux paramètres thermodynamiques de l'adsorption : les variations d'enthalpie (ΔH) d'enthalpie libre (ΔG) et, indirectement, d'entropie (ΔS). Trois peptides différant seulement par leur type de méthylation ont été étudiés : P1 (R), P3 (R-DMA), et P4 (R-DMS). Des courbes représentatives de chaque titration sont représentées en figure 5-13 et les constantes thermodynamiques sont indiquées dans le tableau 5-7.

Tableau 5-7 : Constantes thermodynamiques de la titration calorimétrique isotherme de peptides adsorbées sur des SiNPs Sigma en tampon DPBS, pH 7,4.

Peptide	N _i (peptide.nm ⁻²)	K _i (L.mol ⁻¹)	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	-T ΔS (kcal.mol ⁻¹)	ΔG (kcal.mol ⁻¹)
P1	0,006 ± 0,001	7,8E+05 ± 1,9E+05	-20,8 ± 4,3	12,9 ± 4,4	-7,9 ± 0,2
P3	0,011 ± 0,001	5,1E+06 ± 1,4E+06	-12,5 ± 0,7	3,5 ± 0,8	-9,0 ± 0,2
P4	0,017 ± 0,001	1,2E+06 ± 4,9E+05	-13,4 ± 1,6	5,3 ± 1,9	-8,1 ± 0,3

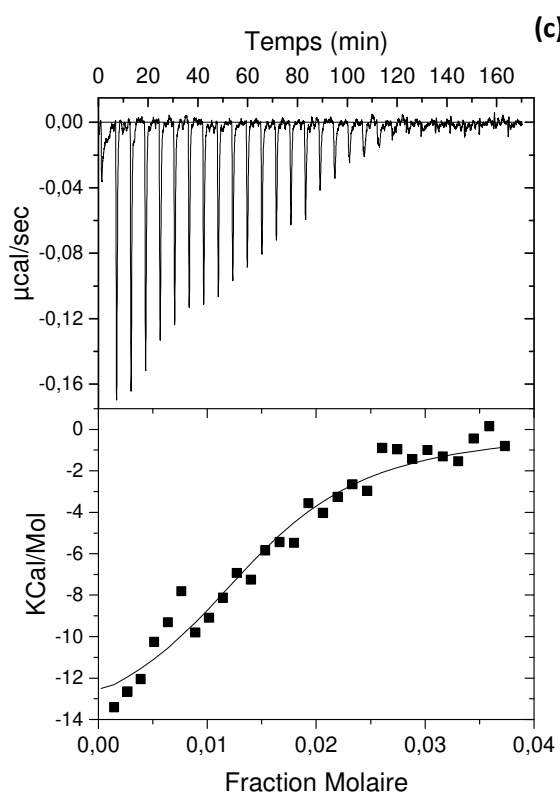
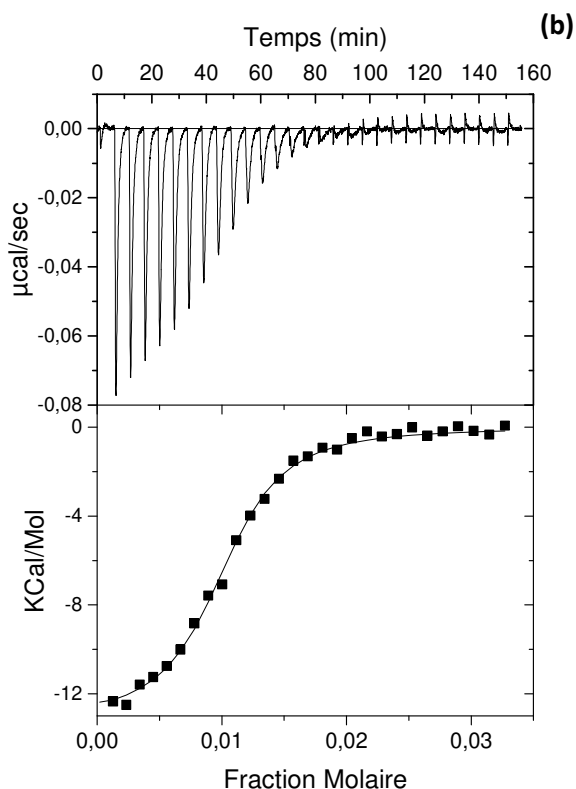
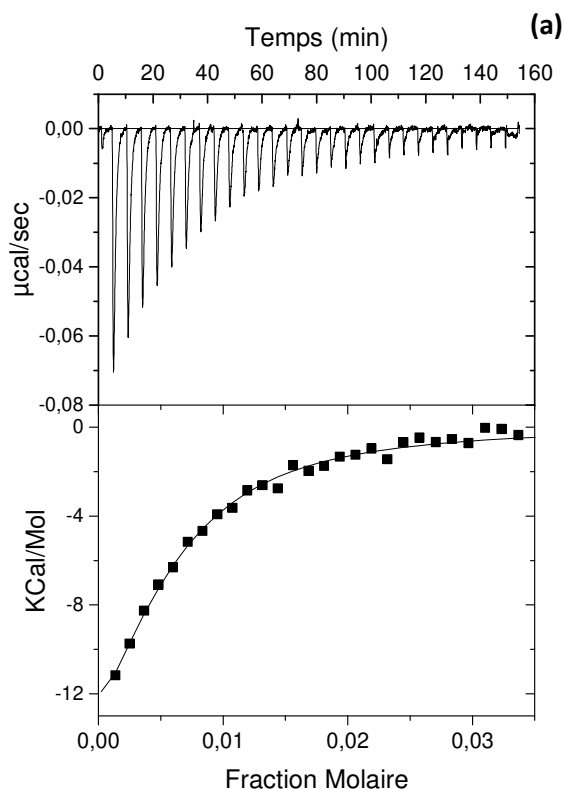
Globalement on constate que les profils sont semblables à ceux obtenus par l'adsorption de petites hémoprotéines sur des SiNPs monodisperses (chapitre 3, § 2.1.). Les mêmes commentaires peuvent ainsi être faits : dans tous les cas, l'ajout de peptides aux solutions de SiNPs Sigma crée des pics

exothermiques. Ces pics exothermiques sont révélateurs de phénomènes enthalpiques comme le confirment les valeurs des constantes thermodynamiques (Tab. 5-7). De plus, on remarque que, pour tous les peptides, les variations d'enthalpie ΔH sont favorables à la réaction d'adsorption (valeurs négatives) tandis que les variations d'entropie ($-\Delta S$) sont défavorables à la réaction (valeurs positives). Il en résulte des valeurs de ΔG nettement négatives et qui sont reliées à la constante d'affinité K_i (chapitre 3, § 2.2.). À nouveau, P1 possède la plus faible affinité ($K_i = 7,8 \cdot 10^5 \text{ L.mol}^{-1}$), P4 une affinité intermédiaire ($K_i = 1,2 \cdot 10^6 \text{ L.mol}^{-1}$) et P3 l'affinité la plus forte ($K_i = 5,1 \cdot 10^6 \text{ L.mol}^{-1}$). On remarque d'ailleurs que les valeurs de K_i (Tab. 5-7) et de K_{ads} (Tab. 5-5) sont extrêmement proches malgré l'utilisation de deux méthodes fondamentalement différentes. Ceci confirme d'autant plus les différences d'affinité observées entre les peptides.

De plus, si dans tous les cas le ΔH est le moteur de la réaction, la valeur de la variation est bien plus importante pour P1 ($-20,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$) que pour P3 et P4 ($-12,5$ et $-13,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$). À titre de comparaison l'énergie d'une liaison hydrogène est d'environ 5 kcal.mol^{-1} (Atkins et De Paula, 2006). La différence de ΔH entre les peptides diméthylés et non méthylés est donc équivalente à l'énergie de formation de deux liaisons hydrogène. Ainsi le peptide P1, bien que moins affiné, semble former plus de liaisons de nature électrostatique lors de l'adsorption par rapport aux peptides diméthylés. L'augmentation d'affinité ne peut donc pas être expliquée par le nombre de liaisons électrostatiques formées.

En outre, des différences de variations d'entropie sont également observables. Le $-\Delta S$ est négatif dans tous les cas mais on peut distinguer P1 d'une part et P3 et P4 d'autre part. La valeur $-\Delta S$ de P1 est en effet nettement plus élevée ($12,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$) que celles de P3 et P4 ($3,5$ et $5,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ respectivement). On observe donc une diminution d'entropie bien plus forte lors de l'adsorption de P1 que dans le cas de P3 et P4.

Dans tous ces systèmes, l'entropie possède deux composantes : l'entropie du solvant et l'entropie des peptides. Un phénomène d'adsorption conduit généralement à un gain d'entropie des molécules du solvant dû à l'expulsion des ions et des molécules d'eau ordonnées à la surface des SiNPs et des peptides (Sprenger et Pfaendtner, 2016). Cependant, le fait que l'entropie globale du système diminue est le signe que l'entropie du peptide joue également un rôle important lors de la réaction d'adsorption. Or une diminution d'entropie durant un phénomène d'adsorption est généralement le signe d'une baisse du degré de liberté des molécules adsorbées (Ben-Tal *et al.*, 2000). Il est donc fort probable que les peptides RGG, qui sont intrinsèquement désordonnés (§ 2.3.), voient leur degré de liberté conformationnel fortement diminuer lors de l'adsorption. Ici, les valeurs de $-\Delta S$ négatives montrent que l'entropie du peptide joue un rôle plus important que celle du solvant.



(c) *Figure 5-13 : Titration calorimétrique isotherme de peptides dans une solution de SiNPs Sigma en tampon DPBS, pH 7,4. Haut : données brutes de la variation de chaleur en fonction du temps. Bas : énergie d'interaction par mole de peptides en fonction de la fraction molaire ($[peptide]/[n^2 SiNPs]$). (a) P1 (R) ; (b) P3 (R-DMA) ; (c) P4 (R-DMS).*

Une explication simple concernant les différences de variation d'entropie observées entre les peptides serait que le niveau de degré de liberté de chacun soit différent. En effet, il semble probable que la présence de groupements méthyle induise de l'encombrement stérique et donc que la dynamique des

peptides diméthylés soit diminuée par rapport au peptide non méthylé (ce que l'étude de la fluorescence du tryptophane semble indiquer, § 2.4.). Par conséquent, en partant du principe que les degrés de liberté de peptides adsorbés sont égaux, l'adsorption de P1 induirait une plus forte diminution du degré de liberté par rapport à l'adsorption de P3 et P4. Le caractère hydrophobe des groupements méthyle est également un paramètre pouvant avoir des conséquences sur les variations d'entropie du système.

Pour ce qui est de la quantité maximale de protéines adsorbées, les différences entre N_i (titration calorimétrique) et N (isotherme d'adsorption faite par la méthode par déplétion) sont très fortes (Tab. 5-8). On constate qu'il existe en effet un rapport de 1 à 10 entre les deux constantes, quels que soient les peptides. Comme pour les hémoprotéines (chapitre 3, § 2.2.), cette différence de valeur peut être interprétée par le fait que la grande majorité des peptides s'adsorbent par des phénomènes globalement athermiques. Ce phénomène a déjà été observé pour l'adsorption de protéines sur de l'hydroxyapatite (Goobes *et al.*, 2006). La raison sous-jacente pourrait être qu'il existe à la surface deux types de sites de fixation : des sites qui ont un ΔH mesurable et qui sont recouverts en premier (d'où la mesure de la constante d'adsorption identique avec les deux techniques) et des sites qui n'ont pas de chaleur d'adsorption mesurable dans le système ITC. Ceci souligne l'intérêt d'utiliser différentes méthodes d'analyse afin d'avoir une vision complète des phénomènes d'adsorption.

Tableau 5-8 : Comparaison des valeurs de N_i et de N des isothermes de trois peptides RGG.

Peptide	Caractéristique	N_i (prot/SiNPs)	N (prot/SiNPs)	N_i/N
P1	R	$0,006 \pm 0,001$	$0,100 \pm 0,006$	0,05
P3	R-DMA	$0,011 \pm 0,001$	$0,116 \pm 0,011$	0,10
P4	R-DMS	$0,017 \pm 0,001$	$0,133 \pm 0,007$	0,13

Finalement, bien que l'adsorption de P1 soit nettement favorisée par son ΔH (par rapport à P3 et P4), la composante entropique y est fortement défavorable et contrebalance en grande partie la contribution enthalpique. Aussi, la différence d'affinité entre P3 et P4 a pu être confirmée par calorimétrie (différence de ΔG donc de K). Cependant nous sommes en présence de phénomènes très subtils et les limites de précision de la méthode sont atteintes. Rien ne peut donc être affirmé concernant l'origine enthalpique ou entropique de la différence d'affinité. D'autres expériences sont donc nécessaires pour mieux comprendre la spécificité de R-DMA.

2.3. Impact structural de l'adsorption de peptides RGG

Nous nous sommes également intéressés à l'impact structural de l'adsorption des peptides RGG. En effet, bien qu'étant intrinsèquement désordonnés, il a été avancé que les RBP et, en particulier celles possédant des motifs RGG, pouvaient se structurer lors de la liaison avec de l'ARN (Jain et Tu,

2011 ; Phan *et al.*, 2011). Par analogie, il est envisageable que les peptides RGG se structurent lors de l'adsorption sur les SiNPs.

De plus, plusieurs études ont montré que des peptides non structurés peuvent se structurer après adsorption sur des surfaces polaires telles que la silice (Lundqvist *et al.*, 2006), l'or (Fillon *et al.*, 2007) ou l'hydroxyapatite (Capriotti *et al.*, 2007). Dans ces trois cas, les peptides adoptent une structure en hélice α . Afin d'estimer la possibilité de structuration des peptides RGG et CotB1p, leur représentation sous forme d'hélice α a été faite (Fig. 5-14). Concernant les peptides RGG (exemple de P1), on remarque immédiatement que les résidus polaires (ici l'arginine et la sérine) sont répartis sur une même partie de l'hélice tandis que les résidus apolaires (glycine essentiellement) se trouvent sur la partie opposée. Cette répartition est caractéristique d'hélices amphiphiles telles que celles présentes dans la myoglobine et l'hémoglobine (Eisenberg *et al.*, 1982). Pour CotB1p par contre, aucune orientation des résidus apolaires et polaires ne peut être observé. Ceci laisse supposer qu'une structuration de CotB1p en hélice α est peu probable mais qu'elle est envisageable pour les peptides RGG.

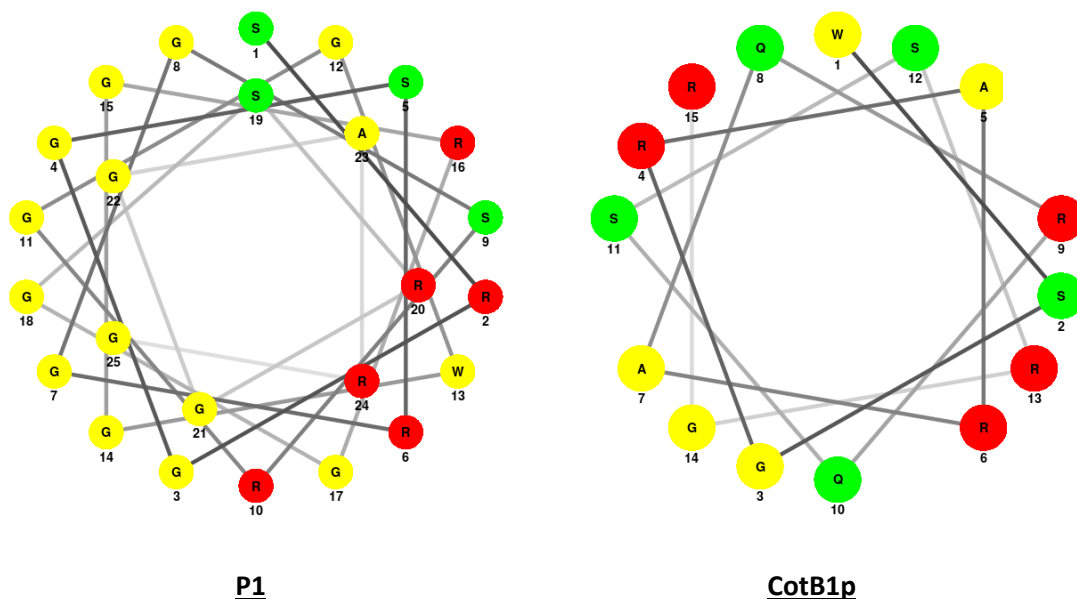


Figure 5-14 : Représentation des peptides de P1 et CotB1p en forme d'hélice α (angle de 100° entre les résidus). Rouge : résidus basiques ; vert : résidus polaires non chargés ; jaune : résidus apolaires. Schémas conçus sur NetWheels: Peptides Helical Wheel and Net projections maker (Mól *et al.*, 2016).

Afin d'observer la structure secondaire des peptides adsorbés et libres en solution, des expériences de dichroïsme circulaire (DC) ont été faites (chapitre 7, § 3.4.). Les spectres de DC des peptides libres en solution (Fig. 5-14 a) présentent tous un pic négatif aux environs de 200 nm et une absence de signal au-dessus de 210 nm. Ceci est révélateur d'une absence de structure organisée répétitive, généralement mentionné sous le terme de structure "random coil" (Greenfield, 2006 ; Chemes *et al.*,

2012). L'absence de structure est attendue puisque les séquences peptidiques contenant des motifs RGG sont connues pour être des RID (Järvelin *et al.*, 2016).

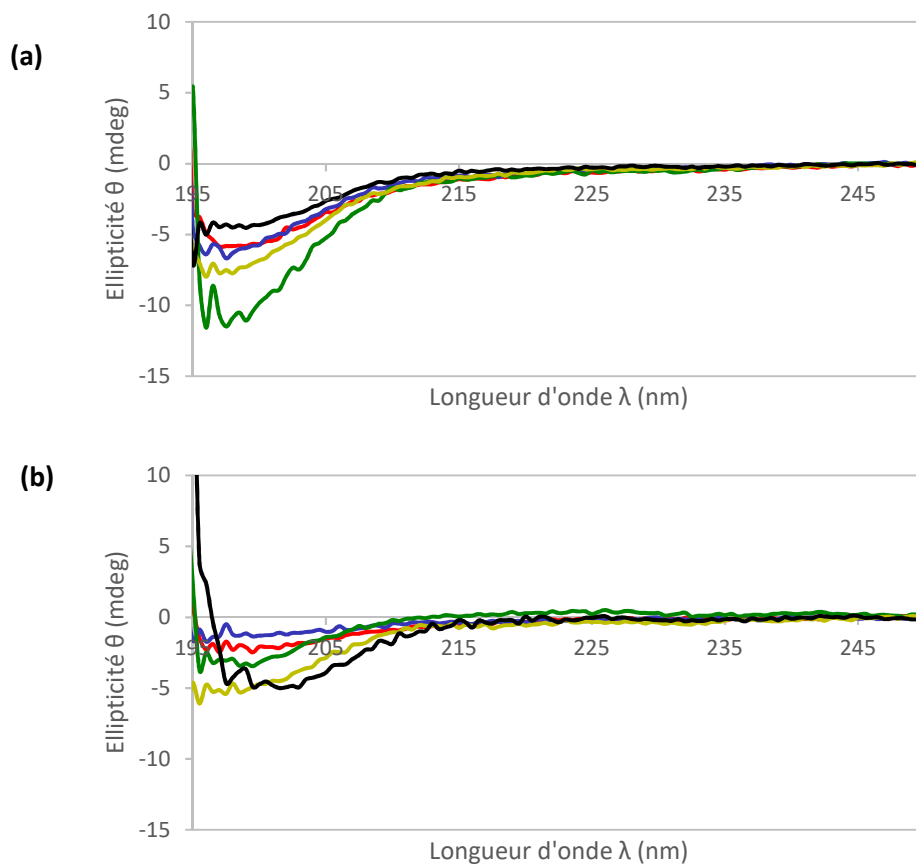


Figure 5-15 : Spectres de DC de peptides (a) libres en solution et (b) adsorbés sur des SiNPs Sigma (C_{Sigma} variables) en solution DPBS à pH 7,4. $C_{\text{peptides}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. ● P1, ● P2, ● P3, ● P5, ● CotB1p.

Les spectres de DC des peptides adsorbés (Fig. 5-14 b) montrent le même type de profil que pour les peptides libres. On observe toutefois une baisse générale de l'ellipticité mesurée vers 200 nm. Cette baisse de signal peut être attribuée à l'utilisation de SiNPs polydisperses qui diffusent la lumière à ces longueurs d'onde et qui peuvent donc atténuer l'ellipticité mesurée (chapitre 4, § 1.2.). Il a été observé par ailleurs que cette baisse d'ellipticité peut être attribuée à une modification de polarité du milieu environnant le peptide (Liu *et al.*, 2004), dans notre cas la présence de la surface de silice. Néanmoins l'adsorption des peptides ne provoque pas d'apparition de structures secondaires. En effet, les structures en hélices α ou en feuillets β sont identifiées par la présence d'une ellipticité vers 210 nm (ellipticité $\theta < 0$ pour les hélices α et $\theta > 0$ pour les feuillets β). Or aucune évolution de l'ellipticité n'est constaté dans cette zone.

L'adsorption des peptides n'induit donc aucune structuration, que ce soit pour les peptides RGG ou pour CotB1p. Afin de justifier cela nous pouvons regarder les caractéristiques de séquence qui

conditionnent la formation d'hélices lors de l'adsorption sur des surfaces de silice. En effet, à partir de peptides synthétisés à façon, des critères permettant la structuration en hélice lors de leur adsorption sur des SiNPs ont été avancés (Nygren *et al.*, 2008) :

- (1) Présence d'acides aminés chargés positivement (en particulier d'arginine) sur la partie de l'hélice qui interagit avec la silice ;
- (2) Présence d'acides aminés chargés négativement du côté opposé de l'interaction ;
- (3) Présence de résidus qui ont une forte propension à former des hélices (alanine en particulier).

Ainsi, concernant les peptides RGG, les nombreux résidus arginine sont bien tous situés sur une même partie de l'hélice. Cependant, aucun acide aminé chargé négativement n'est présent et seul un résidu alanine est présent dans la séquence. Pour CotB1p, les résidus arginine ne présentent pas d'orientation particulière et il n'y a pas non plus d'acides aminés chargés négativement. Par contre, deux résidus alanine sont présents. On constate donc que, si les peptides possèdent certaines caractéristiques promouvant la formation d'hélice, toutes les conditions ne sont pas réunies. Une autre différence par rapport aux peptides formant des hélices lors de leur adsorption est la forte présence de résidus glycine dans les peptides RGG. Or il est connu que ces résidus augmentent fortement le degré de liberté des chaînes peptidiques ce qui empêche la formation d'hélice (Pace et Scholtz, 1998). La séquence de ces peptides n'est donc pas optimale pour favoriser une structuration en hélice dans nos conditions d'adsorption. Néanmoins d'autres conditions de sels et de pH pourraient éventuellement permettre d'induire une structuration (Nygren *et al.*, 2008).

Finalement, les peptides RGG, qui sont des RID, ne se structurent pas lors de leur adsorption, que leurs résidus arginine soient méthylés ou non. La différence d'affinité ne vient donc pas d'une structuration des peptides adsorbés. Toutefois il n'est pas exclu que des différences conformationnelles plus fines soient présentes. Des études sur l'environnement autour du résidu tryptophane ont donc été entreprises.

2.4. Impact de l'adsorption sur l'environnement électrostatique du tryptophane

Le tryptophane (W) est un acide aminé aromatique dont la fluorescence est fortement sensible à la polarité autour de son groupement indole (Vivian et Callis, 2001). Les peptides RGG possèdent un résidu W au centre de la séquence, entouré par deux motifs RGG de chaque côté (SRGGSRGGSRGGWGGRRGGSRRGGARG). Afin de tester l'impact électrostatique de la diméthylation des résidus R sur leur interaction avec de la silice, deux peptides ont été testés (P1 et P3) ; P1 est la version non méthylée et P3 la version diméthylée asymétriquement. Les résultats sont reportés dans les figure 5-16 et tableau 5-9.

Tableau 5-9 : Intensité (CPS) des pics d'émission (λ_{max}) des peptides adsorbés ou libres. Moyenne de quatre mesures.

	sans SiNPs		avec SiNPs		Variation d'intensité
	λ_{max} (nm)	Intensité (CPS)	λ_{max} (nm)	Intensité (CPS)	
P1	358	186753 ± 22366	356	269310 ± 3287	+44%
P3	357	217000 ± 8450	355	285476 ± 5882	+32%

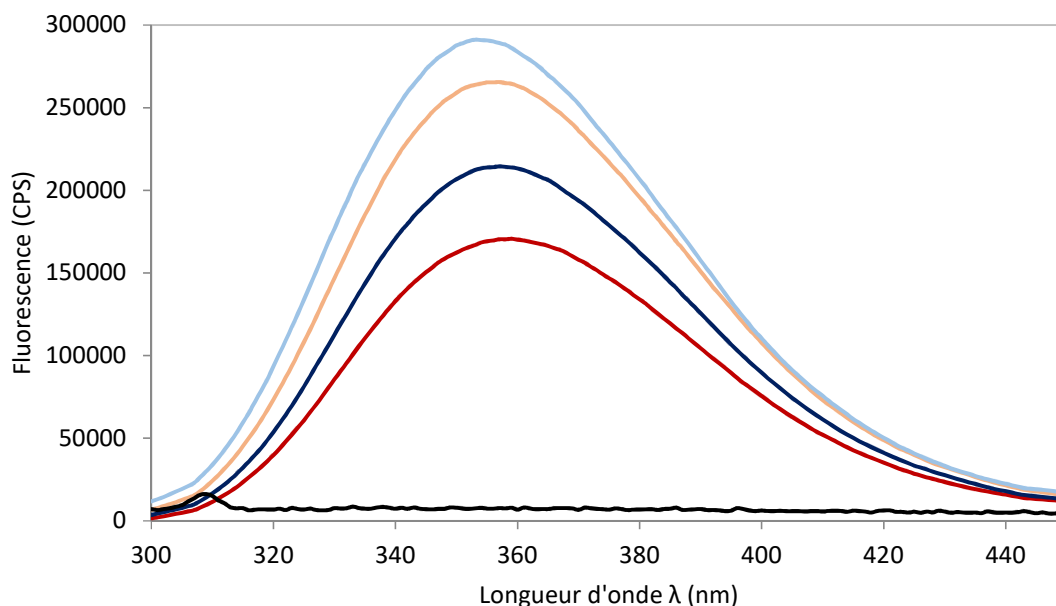


Figure 5-16 : Spectres d'émission de peptides libres et adsorbés sur des SiNPs Sigma en tampon DPBS, pH 7,4. $C_{peptide} = 0,025 \text{ g.L}^{-1}$ et $C_{sigma} = 0,5 \text{ g.L}^{-1}$. $\lambda_{excitation} = 280 \text{ nm}$. **P1 libre** ; **P1 adsorbé** ; **P3 libre** ; **P3 adsorbé** ; **Sigma seules**.

Si l'on s'intéresse aux peptides libres on constate que les allures sont relativement proches. En effet, les longueurs d'onde du maximum d'émission (λ_{max}) de P1 (358 nm) et de P3 (357 nm) sont trop proches compte tenu de la résolution spectrale de la mesure. Toutefois on peut constater une augmentation nette d'intensité pour le peptide diméthylé P3 par rapport à P1 (augmentation de 16%). Cette augmentation d'intensité d'émission de fluorescence peut être attribuée à une diminution de la dynamique moléculaire de P3 par rapport à P1 (Permyakov et Burstein, 1984 ; Haouz *et al.*, 2001). Ceci confirme donc l'hypothèse d'une perte de mobilité (donc de degré de liberté) causée par la diméthylation.

Si l'on compare la fluorescence des peptides libres et des peptides adsorbés, on constate que P1 et P3 évoluent de la même façon. Tout d'abord on observe une nette augmentation de l'intensité de fluorescence (augmentation respective de 44% et de 32% au niveau du pic de fluorescence). De plus, pour les deux peptides, on observe un décalage du pic d'émission de 2 nm après adsorption. Il y a donc un phénomène de "blueshift", assez faible toutefois.

Il est connu que l'augmentation de l'intensité de fluorescence ainsi que l'apparition d'un blueshift signifient que le résidu tryptophane se trouve dans un environnement plus hydrophobe (Udenfried, 1969). On peut donc en déduire que l'adsorption des peptides P1 comme P3 induit un changement de l'environnement du tryptophane. Ceci peut signifier que le tryptophane se trouve dans l'environnement proche de la silice qui est moins polaire que l'eau (Rimola *et al.*, 2013). Il faut toutefois préciser que, même adsorbé, le tryptophane reste exposé au solvant. En effet, dans tous les cas, le λ_{\max} de fluorescence des peptides est nettement supérieur à 330 nm. Or ceci est révélateur d'un environnement fortement polaire (Burstein *et al.*, 1973 ; Vivian et Callis, 2001). Aussi, le tryptophane étant aromatique, son interaction avec la silice est généralement de nature hydrophobe (Rimola *et al.*, 2013). Or, des interactions hydrophobes provoqueraient une expulsion de molécules d'eau de la surface qui serait caractérisée par un blueshift beaucoup plus marqué. Ainsi, s'il est proche de la surface, il est peu probable que le tryptophane soit directement en interaction avec la silice.

Ainsi, bien qu'il existe des différences fines entre P1 et P3, on peut constater que leur adsorption induit la même évolution sur l'environnement du tryptophane avec une baisse de la mobilité de la chaîne peptidique et une localisation du tryptophane à proximité de la surface. La photophysique semble donc donner des informations intéressantes sur la dynamique des peptides. Des mesures supplémentaires de durée de vie de fluorescence et de rendement quantique permettraient d'affiner la connaissance de l'environnement du tryptophane.

Toutefois, aucun effet propre à la diméthylation des résidus arginine n'a pu être constaté. C'est pour cela que l'expérience n'a pas été étendue aux autres peptides RGG.

2.5. Étude des peptides RGG par simulation de la dynamique moléculaire

Bien que les expériences d'isothermes d'adsorption et de titrations calorimétrique aient pu montrer une différence d'affinité entre l'arginine diméthylée et l'arginine non méthylée, la raison exacte n'a pu être déterminée. Aussi, une approche par simulation numérique a également été employée. La dynamique moléculaire de l'adsorption de peptides identiques à ceux utilisés ici sur une surface de silice a ainsi été modélisée par Yves Boulard (Département Biochimie, Biophysique et Biologie Structurale, CEA/I2BC). Les résultats suivants, ainsi que les principaux résultats expérimentaux, ont fait l'objet d'une publication : Marichal *et al.*, 2018, " Importance of post-translational modifications in the interaction of proteins with mineral surfaces: the case of arginine methylation and silica surfaces" (annexe).

2.5.1. Propriétés électrostatiques des acides aminés testés

Premièrement, les peptides étudiés ici présentent des variations au niveau de leur chaîne latérale. Afin de mieux comprendre les conséquences que ces changements peuvent avoir au niveau des charges locales, l'analyse de la distribution des charges a été faite pour les quatre acides aminés correspondants (R, R-DMA, R-DMS, et K, Fig. 5-17).

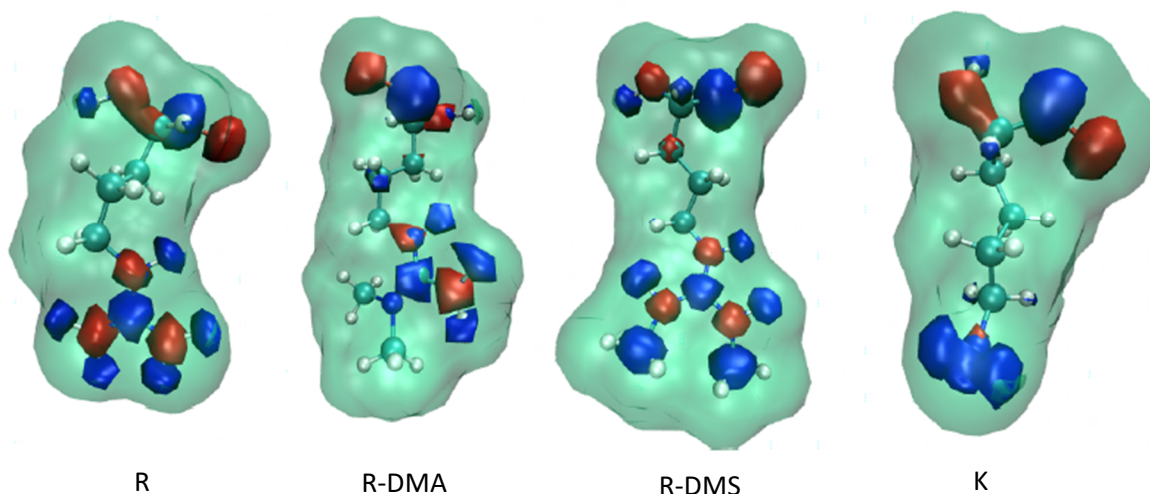


Figure 5-17 : Répartition des potentiels électrostatiques des quatre acides aminés calculés à partir du logiciel APBS, version 1.4.2.1 (Baker et al., 2001). Les surfaces positives (rouge) et négatives (bleu) sont proportionnelles à la densité des charges de chaque atome. La surface moléculaire est représentée en vert. Calculs faits par Yves Boulard.

La première différence entre les résidus concerne leur taille. L'arginine est beaucoup plus volumineuse que la lysine. Ceci se traduit, dans une chaîne peptidique, par un encombrement stérique plus fort pour l'arginine que pour la lysine. La présence de deux groupements méthyle sur l'arginine diméthylée induit également un plus fort encombrement stérique par rapport à l'arginine non méthylée. Ceci a été confirmé par d'autres simulations faites récemment (Evich et al., 2016). Il est probable que cette augmentation de l'encombrement stérique ait un impact sur le degré de liberté conformationnel des peptides.

Ensuite, quel que soit l'acide aminé, la charge globale du résidu est de +1. Il a d'ailleurs été montré que cette charge reste identique aux pH considérés puisque la méthylation n'influence pas le pK_a des résidus arginine qui est constant à environ 14,2 (Evich et al., 2016). Cependant la distribution des charges varie. Pour la lysine, sa fonction amine primaire induit une répartition des charges homogène autour de l'atome d'azote. De même pour l'arginine, la charge est répartie équitablement le long du groupement guanidinium. Cette répartition est également retrouvée pour R-DMS. Pour R-DMA par

contre, les six atomes d'hydrogène autour de l'atome d'azote diméthylé sont très peu chargés tandis que les deux atomes d'hydrogène liés l'atome d'azote situé à l'autre extrémité du groupement guanidinium concentrent la charge positive. On constate ainsi que les profils électrostatiques de R, et R-DMS sont similaires, caractérisés par une charge délocalisée, tandis que R-DMA se distingue avec une forte dissymétrie au niveau du guanidinium.

Enfin, la présence de deux groupements méthyle rend l'arginine diméthylée sensiblement plus hydrophobe par rapport à l'arginine non méthylée.

On en conclut donc que la diméthylation a des conséquences sur de nombreux facteurs physico-chimiques et chaque facteur peut être la raison de la forte affinité de l'arginine diméthylée pour la silice. Toutefois un seul facteur est spécifique à la diméthylation asymétrique : il s'agit de l'orientation particulière des charges au niveau du groupement guanidinium.

2.5.2. Simulations de l'adsorption des peptides sur une surface de silice

Afin de comprendre comment cette répartition des charges peut avoir des conséquences sur l'interaction avec la silice, des simulations de dynamique moléculaire ont été effectuées sur l'équivalent des petits peptides RGG (§ 2.). Quatre peptides ne différant que par leurs trois résidus arginine ont été étudiés : R, R-DMS, R-DMA, et K. Une boîte d'eau contenant deux peptides identiques situés de part et d'autre d'une surface de silice a été modélisée (Fig. 5-18). La surface de la silice modélisée est constituée de silanol (91%) et de siloxane (9%). La dynamique moléculaire des peptides a alors été suivie durant 50 ns. Les détails techniques sont indiqués dans la partie matériels et méthodes de la publication (annexe).

Trois résultats importants ont notamment pu être tirés de ces modélisations. Tout d'abord, quel que soit le degré de méthylation des résidus arginine, la première interaction qui a lieu est toujours de nature électrostatique. Les interactions suivantes sont ensuite principalement électrostatiques (liaisons hydrogènes et couplages ioniques) avec toutefois des interactions hydrophobes ponctuelles. Par exemple, dans le cas de R-DMS, un des deux méthyle peut être en contact direct avec la surface de silice. Ce contact est cependant intermittent, signe d'une faible force d'interaction. Ainsi, globalement, l'interaction est gouvernée par des phénomènes électrostatiques. Ceci réfute donc l'hypothèse (déjà infirmée par les données de calorimétrie) de l'existence d'interactions hydrophobes entre les groupements méthyle de l'arginine (ou le groupement indole du tryptophane) et les groupements siloxane situés à la surface de la silice. Il est en effet connu que ces groupements possèdent des propriétés hydrophobes (Rimola *et al.*, 2013).

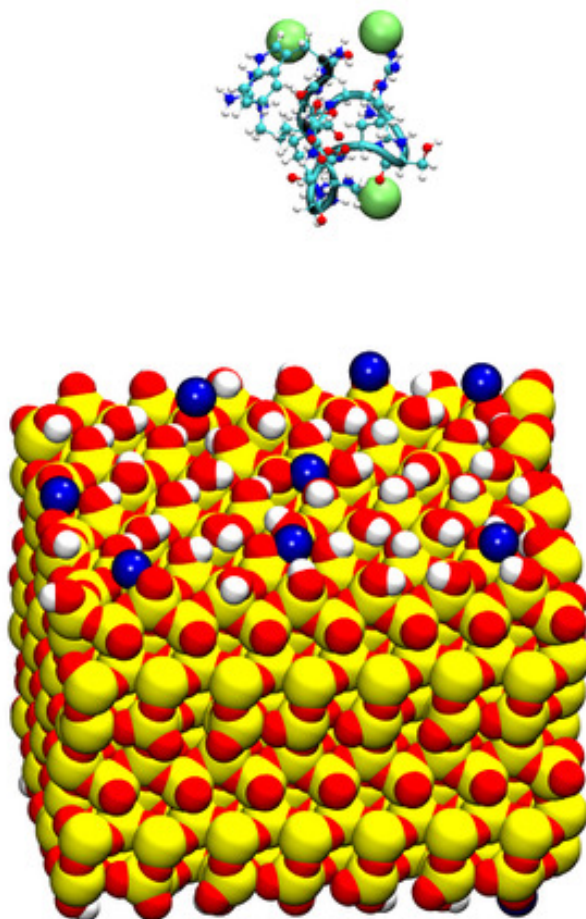


Figure 5-18 : Représentation d'un système simulé. La surface de la silice est en représentation de van der Waals avec les atomes de silicium en jaune, d'oxygène en rouge et d'hydrogène en blanc. La chaîne peptidique est en cyan et les chaînes latérales sont en représentation CPK. Le système est neutralisé par l'ajout de Cl⁻ (vert) et de Na⁺ (bleu foncé). Les molécules d'eau (non montrées ici) sont présentes jusqu'à 9Å des peptides et de la silice.

Le deuxième résultat important est le fait que l'adsorption des résidus R-DMA est la seule à avoir lieu de façon orientée. La partie du groupement guanidinium non méthylée (chargé positivement) interagit directement avec la surface de la silice (chargé négativement). À l'opposé, l'azote possédant les deux groupements méthyle se retrouve orienté vers la phase aqueuse. L'adsorption des résidus R comme R-DMS conduit au contraire à des interactions indifférenciées entre les deux parties du groupement qui peuvent osciller sur la surface. Il y a ainsi une optimisation du contact électrostatique qui provoque une orientation des groupements méthyle vers le milieu aqueux.

Enfin, il a pu être constaté, par les calculs de dynamique moléculaire, que les résidus R-DMA restent liés à la silice plus longtemps que les autres résidus. Ceci est dû au fait que plus de liaisons sont formées avec la surface de la silice. En effet, alors qu'un résidu R forme 4 à 5 liaisons avec la silice (interactions ioniques et liaisons hydrogène) un résidu R-DMA peut former jusqu'à 6 liaisons. L'interaction avec un résidu R-DMA est donc plus stable qu'avec un résidu R. Ceci explique ainsi l'observation faite avant (§

2.1.) qu'un peptide avec trois résidus R-DMA (peptide P7) possède quasiment la même affinité qu'un peptide avec six résidus R (peptide P1). Dans les deux cas les forces globales d'interaction sont proches mais les forces de chaque résidu sont différentes. La diméthylation asymétrique provoque donc des interactions plus stables et plus fortes à la surface de la silice.

3. Conclusion

Les protéines contenant des motifs RGG sont particulièrement affines vis-à-vis des SiNPs (Klein *et al.*, 2016). Nous avons pu montrer ici que la présence de la région C-terminale de Npl3 (contenant les 15 motifs RGG) était nécessaire et suffisante pour obtenir une forte affinité de la protéine. L'explication logique est que cette région est à la fois une RID et possède de nombreux résidus arginine. Cependant, un facteur supplémentaire est apparu : il s'agit de la diméthylation des résidus arginine de ces motifs RGG. En effet, *in vivo* les protéines à motifs RGG, qui se trouvent toutes dans la famille fonctionnelle des RBP (RNA Binding Protein) voient leur fonction biologique modulée par la diméthylation de leurs résidus arginine. Chez la levure, ces protéines sont en grande majorité diméthylées asymétriquement. Aussi, connaissant l'importance de l'arginine pour les interactions protéines/SiNPs, on peut s'interroger sur l'influence que peut avoir cette modification post-traductionnelle.

Dans un premier temps, les affinités de protéines à motifs RGG, diméthylées et non méthylées ont été comparées et une augmentation de l'affinité des versions diméthylées a pu être constatée. La diméthylation semble donc bien avoir un effet sur l'adsorption de ces protéines. Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes d'adsorption, des peptides synthétiques ont été étudiés. Ces peptides ont pu confirmer l'importance de la diméthylation sur l'adsorption. De plus, il est apparu que la diméthylation asymétrique conduit à un profil d'adsorption optimal (N et K_{ads} élevées) comparé à l'absence de méthylation et même à la diméthylation symétrique. Aussi, des tests supplémentaires sur les peptides ont été effectués afin de mieux comprendre cette spécificité.

La thermodynamique de l'adsorption a aussi été étudiée. Si tous les peptides forment des interactions électrostatiques, des différences fines ont pu être constatées. Il apparaît notamment que la contribution entropique négative est réduite dans le cas des peptides diméthylés. Une explication pourrait venir du fait que les peptides diméthylés possèdent une dynamique moléculaire plus faible que les peptides non méthylés. En effet l'encombrement stérique des deux groupements méthyle induit une plus faible flexibilité de la chaîne peptidique. Ceci est notamment suggéré par la comparaison de la fluorescence du tryptophane contenu dans les peptides méthylés et non méthylés. Néanmoins, l'analyse n'est pas suffisamment fine pour définir la cause de la différence d'affinité constatée entre les peptides diméthylés symétriquement et asymétriquement.

Jusqu'ici, les différentes expériences effectuées n'ont pas permis de comprendre la raison exacte causant la forte affinité des résidus arginine diméthylés asymétriquement. Or la présence de deux groupements méthyle provoque trois différences majeures par rapport au résidu non méthylé :

- (1) l'hydrophobicité est augmentée ;
- (2) l'encombrement stérique est plus important (diminution de la flexibilité de la chaîne peptidique) ;
- (3) la répartition des charges est modifiée.

Les deux premiers facteurs sont communs aux diméthylations symétriques et asymétriques et semblent jouer un rôle modéré au niveau de l'adsorption. La répartition des charges est par contre fortement différente entre les deux types de méthylation. Pour aller plus loin, il serait nécessaire d'étudier l'évolution de la dynamique des peptides lors de l'adsorption. Or, peu de techniques expérimentales (stopped-flow) peuvent étudier des phénomènes ayant lieu sur des temps si court (de l'ordre de la nanoseconde en dynamique moléculaire). Aussi, une approche par simulation numérique a également été employée. La dynamique moléculaire de l'adsorption de peptides RGG sur une surface de silice a ainsi été effectuée par Yves Boulard. Ces résultats, ainsi que les principaux résultats de ce chapitre ont fait l'objet d'une publication (annexe). Il apparaît clairement que la diméthylation asymétrique induit une orientation spécifique des groupements guanidinium en interaction avec la surface de la silice alors que plusieurs orientations sont observées dans le cas des peptides non méthylés et diméthylés symétriquement. De plus, cette orientation semble optimiser l'interaction qui peut exister avec la surface en créant des liaisons hydrogène et des interactions ioniques plus nombreuses et plus stables. Tout ceci explique donc la spécificité de l'arginine diméthylé asymétriquement.

Ainsi, toutes ces données montrent que, parmi les variations étudiées, les peptides contenant les résidus R-DMA présentent un profil d'adsorption optimal pour la silice du fait de la répartition particulière des charges au niveau de leur groupement guanidinium. Ce résultat répond à une interrogation qui est restée sans réponse dans les études précédentes : pourquoi les protéines affines pour la silice sont-elles enrichies en arginine et non en lysine (Mathé *et al.*, 2013 ; Klein *et al.*, 2016) ? En effet, sur le plan électrostatique ces deux résidus sont très proches et la lysine joue également un rôle majeur dans l'adsorption de protéines (Devineau *et al.*, 2014 ; Kubiak-Ossowska *et al.*, 2016). Le laboratoire proposait à l'époque que l'arginine soit plus affine que la lysine car le groupement guanidinium peut potentiellement établir plus de liaisons hydrogène avec la surface de la silice que le groupement amine de la lysine (Borders *et al.*, 1994). Une nouvelle explication proposée ici est que l'augmentation statistique d'affinité des protéines possédant de nombreux résidus arginine soit due à

la présence d'arginine diméthylée. Ceci est un bon exemple de l'importance de tenir compte des modifications post-traductionnelles dans toute analyse de protéomique de la couronne de protéines.

La combinaison de l'étude de l'adsorption de peptides et de mélanges complexes de protéines (extraits protéiques de levures) a permis d'obtenir ces résultats. Toutefois, des peptides de synthèse ne peuvent pas être utilisés pour prédire les mécanismes exacts d'adsorption ayant lieu pour des protéines. En effet, les motifs RGG par exemple, bien qu'étant intrinsèquement désordonnés, interagissent certainement avec d'autres molécules du milieu et peuvent potentiellement former des structures transitoires (Jain et Tu, 2011). Il serait donc intéressant d'augmenter la taille des peptides RGG, voire de travailler sur des protéines purifiées (Npl3 ou Nop1 par exemple). Cependant la purification de protéines conduit à de nombreux écueils expérimentaux (dénaturation, obtention en quantités suffisantes, vérification de la diméthylation) qui rendent difficiles ce type d'approche pour l'étude de l'adsorption sur une surface.

Bibliographie – Chapitre 5

- **Abdelhamid** M. A., Motomura K., Ikeda T., Ishida T., Hirota R., and Kuroda A. (2014) *Affinity purification of recombinant proteins using a novel silica-binding peptide as a fusion tag*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 5677-5684.
- **Alves** V. S. and Castilho B. A. (2005) *Gir2 is an intrinsically unstructured protein that is present in Saccharomyces cerevisiae as a group of heterogeneously electrophoretic migrating forms*. Biochem Biophys Res Commun. 332, 450-5.
- **Atkins** P. and De Paula J. (2006) *Atkins' Physical Chemistry, Eight Edition*. ISBN: 0-7167-8759-8. EAN: 9780716787594.
- **Baker** N. A., Sept D., Joseph S., Holst M. J., and McCammon J. A. (2001) *Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 98, 10037-10041.
- **Bedford** M. T. and Richard S. (2005) *Arginine methylation an emerging regulator of protein function*. Mol. Cell. 18, 263-272.
- **Ben-Tal** N., Honig B., Bagdassarian C. K., and Ben-Shaul A. (2000) *Association entropy in adsorption processes*. Biophys. J. 79, 1180-1187.
- **Borders** C. L. Jr., Broadwater J. A., Bekeny P. A., Salmon J. E., Lee A. S., Eldridge A. M., and Pett V. B. (1994) *A structural role for arginine in proteins: multiple hydrogen bonds to backbone carbonyl oxygens*. Protein Sci. 3, 541-548.
- **Brocca** S., Samalíková M., Uversky V. N., Lotti M., Vanoni M., Alberghina L., and Grandori R. (2009) *Order propensity of an intrinsically disordered protein, the cyclin-dependent-kinase inhibitor Sic1*. Proteins. 76, 731-746.
- **Burstein** E. A., Vedenkina N. S., and Ivkova M. N. (1973) *Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules*. Photochem. Photobiol. 18, 263-279.
- **Capriotti** L. A., Beebe T. P. Jr., and Schneider J. P. (2007) *Hydroxyapatite surface-induced peptide folding*. J. Am. Chem. Soc. 129, 5281-5297.
- **Castello** A., Fischer B., Eichelbaum K., Horos R., Beckmann B. M., Strein C., Humphreys D. T., Preiss T., Steinmetz L. M., Krijgsveld J., and Hentze M. W. (2012) *Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins*. Cell. 149, 1393-1406.
- **Chemes** L. B., Alonso L. G., Noval M. G., and de Prat-Gay G. (2012) *Circular dichroism techniques for the analysis of intrinsically disordered proteins and domains*. Methods Mol. Biol. 895, 387-404.
- **Chen** T., Côté J., Carvajal H. V., and Richard S. (2001) *Identification of Sam68 arginine glycine-rich sequences capable of conferring nonspecific RNA binding to the GSG domain*. J. Biol. Chem. 276, 30803-30811.
- **Deka** P., Bucheli M. E., Moore C., Buratowski S., and Varani G. (2008) *Structure of the yeast SR protein Npl3 and Interaction with mRNA 3'-end processing signals*. J. Mol. Biol. 375, 136-150.
- **Devineau** S., Mathé C., Legros V., Gonnet F., Daniel R., Renault J. P., and Pin S. (2014) *The nano-bio interface mapped by oxidative footprinting of the adsorption sites of myoglobin*. Anal. Bioanal. Chem. 406, 8037-8040.
- **Eisenberg** D., Weiss R. M., and Terwilliger T. C. (1982) *The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix*. Nature. 299, 371-374.
- **Evich** M., Stroeve E., Zheng Y. G., and Germann M. W. (2016) *Effect of methylation on the side-chain pKa value of arginine*. Protein Sci. 25, 479-486.

- **Fenoglio I.**, Fubini B., Ghibaudi E. M., and Turci F. (2011) *Multiple aspects of the interaction of biomacromolecules with inorganic surfaces*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 1186-1209.
- **Fillon Y.**, Verma A., Ghosh P., Ernenwein D., Rotello V. M., and Chmielewski J. (2007) *Peptide ligation catalyzed by functionalized gold nanoparticles*. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 6676-6687.
- **Gary J. D.**, Lin W. J., Yang M. C., Herschman H. R., and Clarke S. (1996) *The predominant protein-arginine methyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae**. *J. Biol. Chem.* 271, 12585-12594.
- **Ghisaidoobe A.B.** and Chung S. J. (2014) *Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques*. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 22518-22538.
- **Ghisolfi L.**, Joseph G., Amalric F., and Erard M. (1992) *The glycine-rich domain of nucleolin has an unusual supersecondary structure responsible for its RNA-helix-destabilizing properties*. *J. Biol. Chem.* 267, 2955-2959.
- **Goobes R.**, Goobes G., Campbell C. T., and Stayton P. S. (2006) *Thermodynamics of Statherin Adsorption onto Hydroxyapatite*. *Biochem.* 45, 5576-5586.
- **Greenfield N. J.** (2006) *Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure*. *Nat Protoc.* 1, 2876-2890.
- **Haouz A.**, Glandières J. M., and Alpert B. (2001) *Involvement of protein dynamics in enzyme stability. The case of glucose oxidase*. *FEBS Lett.* 506, 216-520.
- **Henríquez R.**, Blobel G., and Aris J. P. (1990) *Isolation and sequencing of NOP1. A yeast gene encoding a nucleolar protein homologous to a human autoimmune antigen*. *J. Biol. Chem.* 265, 2209-2215.
- **Henry M. F.**, Silver P. A. (1996) *A novel methyltransferase (*Hmt1p*) modifies poly(A)⁺-RNA-binding proteins*. *Mol. Cell Biol.* 16, 3668-3378.
- **Ikeda T.** and Kuroda A. (2011) *Why does the silica-binding protein "Si-tag" bind strongly to silica surfaces? Implications of conformational adaptation of the intrinsically disordered polypeptide to solid surfaces*. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 86, 359-363.
- **Jain V. P.** and Tu R. S. (2011) *Coupled folding and specific binding: fishing for amphiphilicity*. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 1431-1450.
- **Kiledjian M.** and Dreyfuss G. (1992) *Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box*. *EMBO J.* 11, 2655-2664.
- **Klein G.**, Mathé C., Biola-Clier M., Devineau S., Drouineau E., Hatem E., Marichal L., Alonso B., Gaillard J.C., Lagniel G., Armengaud J., Carrière M., Chédin S., Boulard Y., Pin S., Renault J. P., Aude J. C., and Labarre J. (2016) *RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts*. *Nanotoxicology.* 10, 1555-1564.
- **Kubiak-Ossowska K.**, Jachimska B., and Mulheran P. A. (2016) *How Negatively Charged Proteins Adsorb to Negatively Charged Surfaces: A Molecular Dynamics Study of BSA Adsorption on Silica*. *J. Phys. Chem. B.* 120, 10463-10468.
- **Lee M. S.**, Henry M., and Silver P. A. (1996) *A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export*. *Genes Dev.* 10, 1233-1246.
- **Liu Z.**, Chen K., Ng A., Shi Z., Woody R. W., and Kallenbach NR. *Solvent dependence of PII conformation in model alanine peptides*. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 15141-15150.
- **Low J. K.** and Wilkins M. R. (2012) *Protein arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae**. *FEBS J.* 279, 4423-4443.
- **Lunde B. M.**, Moore C., and Varani G. (2007) *RNA-binding proteins: modular design for efficient function*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 479-490.

- **Lundqvist M.**, Nygren P., Jonsson B. H., and Broo K. (2006) *Induction of structure and function in a designed peptide upon adsorption on a silica nanoparticle*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45, 8169-8173.
- **Marichal L.**, Renault J P, Chédin S., Lagniel G., Klein G., Aude J.-C., Tellier C., Armengaud J., Pin S., Labarre J., and Boulard Y. (2018) *Importance of post-translational modifications in the interaction of proteins with mineral surfaces: the case of arginine methylation and silica surfaces*. *Langmuir*. 34, 5312-5322.
- **Mathé C.**, Devineau S., Aude J. C., Lagniel G., Chédin S., Legros V., Mathon M. H., Renault J. P., Pin S., Boulard Y., and Labarre J. (2013) *Structural determinants for protein adsorption/non-adsorption to silica surface*. *PLoS One*. 8, e81346.
- **McBride A. E.**, Cook J. T., Stemmler E. A., Rutledge K. L., McGrath K. A., and Rubens J. A. (2005) *Arginine methylation of yeast mRNA-binding protein Npl3 directly affects its function, nuclear export, and intranuclear protein interactions*. *J. Biol. Chem.* 280, 30888-30898.
- **McBride A. E.**, Conboy A. K., Brown S. P., Ariyachet C., Rutledge K. L. (2009) *Specific sequences within arginine-glycine-rich domains affect mRNA-binding protein function*. *Nucleic Acids Res.* 37, 4322-4330.
- **Mól A. R.**, Castro M. S., and Fontes W. (2016) *NetWheels: A web application to create high quality peptide helical wheel and net projections*. <http://lbqp.unb.br/NetWheels/>.
- **Nygren P.**, Lundqvist M., Broo K., and Jonsson B. H. (2008) *Fundamental design principles that guide induction of helix upon formation of stable peptide-nanoparticle complexes*. *Nano Lett.* 8, 1844-1852.
- **Pace C. N.** and Scholtz J. M. (1998) *A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins*. *Biophys. J.* 75, 422-427.
- **Patwardhan S. V.**, Emami F. S., Berry R. J., Jones S. E., Naik R. R., Deschaume O., Heinz H., and Perry C. C. (2012) *Chemistry of aqueous silica nanoparticle surfaces and the mechanism of selective peptide adsorption*. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 6244-6256.
- **Permyakov E. A.** and Burstein E. A. (1984) *Some aspects of studies of thermal transitions in proteins by means of their intrinsic fluorescence*. *Biophys. Chem.* 19, 265-271.
- **Pfeiffer C.**, Rehbock C., Hühn D., Carrillo-Carrion C., de Aberasturi D. J., Merk V., Barcikowski S., and Parak W.J. (2014) *Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles*. *J. R. Soc. Interface.* 11, 2013093.
- **Phan A. T.**, Kuryavyi V., Darnell J. C., Serganov A., Majumdar A., Ilin S., Raslin T., Polonskaia A., Chen C., Clain D., Darnell R. B., and Patel D. J. (2011) *Structure-function studies of FMRP RGG peptide recognition of an RNA duplex-quadruplex junction*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 796-804.
- **Rimola A.**, Costa D., Sodupe M., Lambert J-F., and Ugliengo P. (2013) *Silica Surface Features and Their Role in the Adsorption of Biomolecules: Computational Modeling and Experiments*. *Chem. Rev.* 113, 4216-4313.
- **Sprenger K. G.** and Pfaendtner J. (2016) *Strong Electrostatic Interactions Lead to Entropically Favorable Binding of Peptides to Charged Surfaces*. *Langmuir*. 32, 5690-5701.
- **Thandapani P.**, O'Connor T. R., Bailey T. L., and Richard S. (2013) *Defining the RGG/RG Motif*. *Molecular Cell.* 50, 613-623.
- **Tosaka R.**, Yamamoto H., Ohdomari I., and Watanabe T. (2010) *Adsorption mechanism of ribosomal protein L2 onto a silica surface: a molecular dynamics simulation study*. *Langmuir*. 26, 9950-9955.

- **Udenfried**, S. (1969) *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*. Academic Press, New York
- **Uversky** V. N. (2011) *Intrinsically disordered proteins from A to Z*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1090-1103.
- **Vivian** J. T. and **Callis** P. R. (2001) *Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins*. *Biophys. J.* 80, 2093-2109.
- **Wang** X. and **Ching** C. B. (2003) *Determination of the Competitive Adsorption Isotherms of Nadolol Enantiomers by an Improved h-Root Method*. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 6171-6180.
- **Xu** C., **Henry** P. A., **Setya** A., and **Henry** M. F. (2003) *In vivo analysis of nucleolar proteins modified by the yeast arginine methyltransferase Hmt1/Rmt1p*. *RNA.* 9,746-759.
- **Yagoub** D., **Hart-Smith** G., **Moecking** J., **Erce** M. A., and **Wilkins** M. R. (2015) *Yeast proteins Gar1p, Nop1p, Npl3p, Nsr1p, and Rps2p are natively methylated and are substrates of the arginine methyltransferase Hmt1p*. *Proteomics.* 15, 3209-3218.

Chapitre 6 : Discussion et perspectives

« Exploring the fantastic possibilities of the very small should pay off handsomely...
and provide a lot of fun too. »

Richard P. Feynman

Popular Science Vol. 177 (1960)

1. Perspectives

Pour étudier les protéines adsorbées sur des SiNPs, de nombreux outils peuvent être utilisés. Toutefois, du fait notamment de leurs propriétés particulières, de nombreuses limitations peuvent exister. Ainsi, il est apparu que le dichroïsme circulaire aux UV lointains était très sensible à la diffusion des SiNPs. Pour la même raison, la spectroscopie UV-visible des protéines adsorbées est délicate à effectuer, même en présence d'une sphère d'intégration. À l'inverse, d'autres techniques comme la microcalorimétrie ITC ou la diffusion de neutrons aux petits angles se sont avérées particulièrement puissantes pour étudier les systèmes protéines/SiNPs. De nombreuses autres approches expérimentales d'étude de la couronne de protéines ont été envisagées durant cette thèse. Quelques-unes se sont avérées particulièrement prometteuses mais les résultats disponibles à ce jour sont encore préliminaires. Aussi, les premiers résultats obtenus seront présentés dans cette partie "perspectives".

Des mesures de TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing) et d'AFM (microscopie à force atomique) ont été entreprises. Dans la continuité de ce qui a été fait précédemment (chapitre 3, § 4.), ces expériences ont pour objectif de mesurer l'épaisseur de la couronne de protéines formée par des hémoprotéines adsorbées sur les SiNPs. Bien que de natures fondamentalement différentes, ces deux techniques ont comme point commun de pouvoir mesurer la taille d'objets individuels avec une précision de l'ordre du nanomètre. De ce fait, elles permettent d'obtenir des distributions de tailles d'objets au sein d'un mélange et non plus une valeur moyenne. Ceci peut potentiellement apporter des informations quant à un éventuel polymorphisme de la couronne formée. Une approche innovante d'étude de la nature de la couronne de protéines a également débuté en cristallisant des mélanges hémoprotéines/SiNPs puis en caractérisant la structure des cristaux formés. Comme toute approche exploratoire, ces tests ont laissé apparaître des difficultés qui nécessitent des études plus poussées comprenant de nombreuses mises au point. Néanmoins, ces expériences se sont révélées instructives quant à leur capacité à faire avancer la connaissance de la structure de la couronne de protéines.

1.1. Mesure de la taille de la couronne de protéines par TRPS

Une étude sur la faisabilité de la mesure de l'épaisseur de la couronne de protéines par TRPS a été réalisée. Le TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing) est une technique analytique permettant de déterminer la taille, le degré de dispersité et le potentiel zêta (ζ) de nano-objets en solution. Cette technique repose sur le principe du compteur Coulter. L'échantillon passe à travers un pore de taille contrôlée, immergé dans un électrolyte, et une tension est appliquée à ce dernier. Les particules traversent ce pore avec une vitesse dépendant du débit et de leur potentiel ζ . La machine utilisée ici est le qNano Gold® qui présente plusieurs avantages : un volume très faible d'échantillon ($\approx 35 \mu\text{L}$ d'échantillon à 1 mg.L^{-1}), une mesure simultanée de la taille et du potentiel ζ , une quantification précise de la polydispersité et de la concentration de chaque sous-population, et des analyses de particules uniques à haut débit (jusqu'à $3000 \text{ particules.min}^{-1}$).

Les expériences ont été effectuées au bureau français de iZon Science Ltd. à Lyon, en collaboration avec sa responsable, Camille Roesch. Des pores NP150 recouverts de polyvinylpyrrolidone (PVP, liquide hydrophobe empêchant l'adsorption des protéines sur le pore) ont été utilisés et la calibration de la taille a été faite avec des particules de polystyrène de 110 nm, appelées CPC 100. Seules les plus grosses SiNPs utilisées ici (MN100) ont été étudiées. MN100 a été mélangé avec chacune des quatre hémoprotéines dans les conditions où la surface des SiNPs est proche de la saturation. Les mélanges hémoprotéines/MN100 ont été incubés dans du tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ à pH 7 (avec ajout de MgCl_2 10 mmol.L^{-1} pour HbC1 et HbAm), pendant 30 min et à température ambiante. Les solutions ont ensuite été diluées jusqu'à obtenir une concentration finale en SiNPs de 1 mg.L^{-1} . $35 \mu\text{L}$ d'échantillon dilué est enfin placé au-dessus d'un pore 150 recouvert de PVP et la mesure d'au moins 500 événements (représentant les différents objets présents) est effectuée.

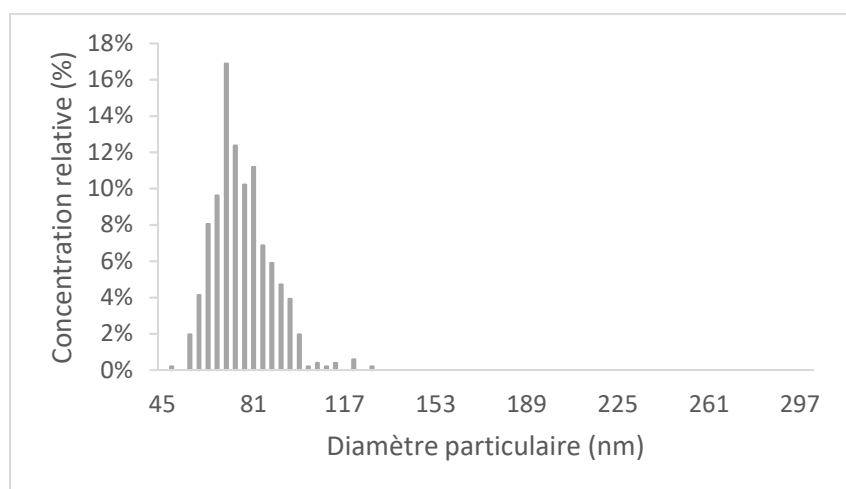


Figure 6-1 : Diagramme de distribution en tailles de MN100 mesuré par TRPS.

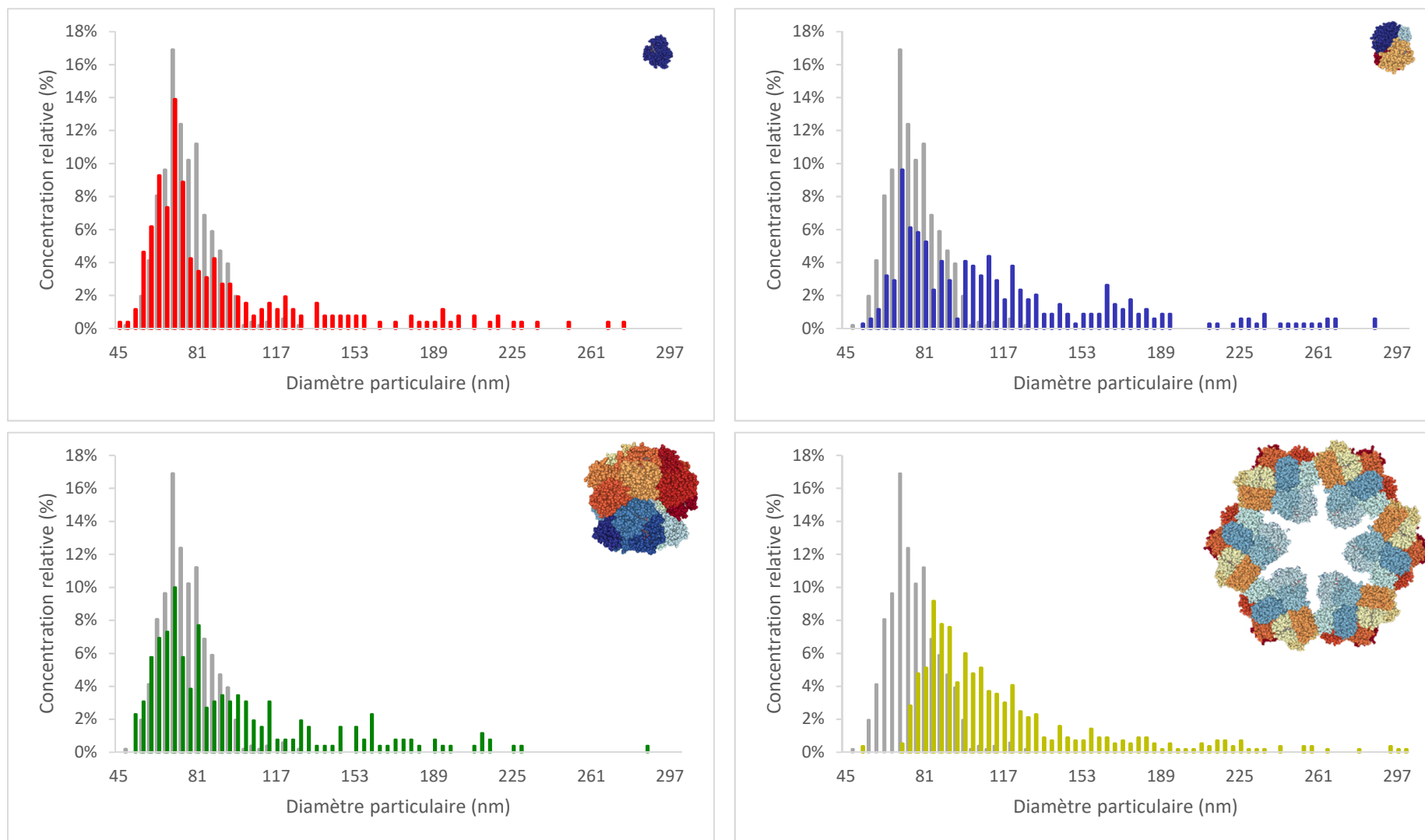


Figure 6-2 : Diagrammes de distribution en tailles des mélanges **MN100 + Mb** (a), **MN100 + Hb** (b), **MN100 + HbC1** (c), et **MN100 + HbAm** (d). Comparaison avec **MN100** seule.

La mesure de taille de MN100 (Fig. 6-1) montre une grande monodispersité de l'échantillon avec un diamètre moyen de 77 ± 12 nm. Il faut noter que le diamètre déterminé n'est pas le diamètre hydrodynamique mais bien le diamètre physique de la nanoparticule. Ceci est en accord avec le diamètre mesuré par SAXS de $78 \pm 0,8$ nm (chapitre 2 § 1.2.).

Les différents mélanges ont ensuite été mesurés au qNano. Les diagrammes de distribution en tailles sont représentés sur la figure 6-2. On constate une forte augmentation de la polydispersité avec, pour chaque système, un pic majoritaire autour de 90 nm (nanoparticule unique avec sa couronne de protéines) et des sous-populations de tailles supérieures qui correspondent à des agrégats de nanoparticules. En regardant les tailles de ces agrégats, on se rend compte qu'il s'agit essentiellement de dimères et de trimères de nanoparticules. Afin de quantifier ces différentes populations, des seuils de taille ont été placés en plusieurs points et les proportions de chaque population sont indiqués dans le tableau 6-1. Ces seuils ont été placés au niveau des zones peu denses dans le diagramme de distribution et sont différents pour chaque système (valeurs entre parenthèses).

Tableau 6-1 : Diamètres moyens et pourcentages relatifs des différentes populations contenues dans les 4 mélanges hémoprotéines/MN100. Entre parenthèses sont indiquées la gamme de taille (en nm) des objets inclus dans une même population.

	MN100 + Mb	MN100 + Hb	MN100 + HbC1	MN100 + HbAm
Diamètre moyen (nm)	93 ± 44	114 ± 49	97 ± 44	117 ± 47
Diamètre moyen population 1 (nm)	69 ± 12	76 ± 14	79 ± 17	99 ± 17
Pourcentage population 1	78% (50-110)	50% (50-110)	80% (50-120)	81% (50-140)
Pourcentage population 2	10% (110-160)	30% (110-160)	20% (> 120)	19% (> 140)
Pourcentage population 3	11% (> 160)	20% (> 160)	N/A	N/A

En regardant les diamètres moyens des différents mélanges, on constate une nette augmentation de la taille de MN100, avec sa couronne de protéines, par rapport à MN100 nue (Tab. 6-1, ligne 1). Cependant cette valeur de taille n'est pas pertinente en elle-même puisqu'elle inclut également la taille des particules agrégées présentes en solution. Un seuil a donc été appliqué pour ne s'intéresser qu'à la gamme de tailles correspondant à la population principale contenant des objets isolés (population 1). Les diamètres moyens de cette population 1 sont indiqués dans le tableau 6-1, ligne 2. Étonnamment, en présence de Mb, Hb, et HbC1, la taille de MN100 avec sa couronne est inférieure ou très proche de celle de MN100 seule (respectivement 69 ± 12 , 76 ± 14 nm, et 79 ± 17 nm contre 77 ± 12 nm pour la SiNP seule). Même si la différence de taille entre MN100 nue et MN100 + protéines n'est pas flagrante, la tendance devrait plutôt être vers une légère augmentation de la taille de l'objet. Ceci laisserait indiquer que la nanoparticule diminue de taille au contact de protéines, ce qui est en contradiction avec les mesures SANS faites précédemment qui n'indiquent aucune diminution de la

taille pour des mélanges Mb/LUDOX et Hb/LUDOX. Il faut toutefois considérer le fait que les SiNPs MN100 et LUDOX ne sont pas identiques.

Concernant HbAm par contre, la taille de la population 1 (99 ± 17 nm) est supérieure à celle de la nanoparticule nue. On peut d'ailleurs remarquer visuellement un décalage de la population principale vers les tailles supérieures (Fig. 6-2d) L'épaisseur de la couronne est donc mesurable par différence et indique une valeur de 10 nm de part et d'autre de la nanoparticule. Or une molécule de HbAm mesure 22 nm de diamètre soit 2 fois plus que l'épaisseur estimée. Deux hypothèses peuvent donc être émises : (1) la protéine native est bien adsorbée mais ne recouvre pas l'intégralité de la surface. Aussi, on peut imaginer que là où une molécule de HbAm est adsorbée, statistiquement, la surface opposée n'est pas recouverte ; (2) du fait de la forte dilution des échantillons (concentration en protéines inférieure au μM) HbAm est dissociée en protomères beaucoup plus petits et l'épaisseur mesurée correspond à la taille de ces protomères. Toutefois, l'incertitude de mesure est trop grande pour estimer précisément l'épaisseur de la couronne et donc, éventuellement, la taille des protéines adsorbées.

En outre, à l'exception de MN100 + Hb qui est très polydisperse et chez qui il y a autant d'agrégats que de particules uniques (Tab. 6-1), les autres systèmes semblent avoir une dispersité assez faible (moins de 20% de particules agrégées) et seuls des dimères et des trimères semblent se former. Ceci est intéressant car, des mesures par DLS de ces mêmes échantillons indiquent une agrégation si importante qu'il est impossible de calculer une valeur de taille moyenne (données non montrées ici). Les mélanges hémoprotéines/SiNPs semblent donc former des réseaux plutôt lâches et instables ; de légères forces de cisaillement, comme ce qui a lieu lors du passage de l'échantillon à travers le pore, permettent ainsi d'obtenir à nouveau des SiNPs séparées (ainsi que des dimères et trimères toutefois).

On peut donc conclure que le TRPS est une technique très précise pour connaître le diamètre réel d'une nanoparticule pour des suspensions monodisperses. De plus, elle permet, dans le cas de solutions polydisperses, de caractériser et de quantifier finement les différentes sous-populations. Toutefois, une information importante, et pourtant manquante ici, est de savoir si MN100 est recouverte de façon homogène en protéines ou si les protéines s'adsorbent sur des régions de plus fortes affinités en premier avant de recouvrir totalement la surface (théorie développée par Goobes et al. 2006, sur l'existence de sites de fixation d'affinités différentes). Des études plus poussées permettraient d'analyser la vraie forme de chaque objet et donc d'avoir une meilleure idée du type de recouvrement des protéines sur MN100.

À l'heure actuelle, la limitation principale de cette technique est la taille minimale de 40 nm des objets analysés. Ceci n'est pas une limite physique mais plus une limite technique due à la conception des pores au travers desquels passe l'échantillon. La conception prochaine de nouveaux pores plus étroits devrait permettre d'atteindre la même étendue de taille qu'en DLS à savoir de 10 nm à 10 μ m.

1.2. Mesure de la taille de la couronne de protéines par AFM

Des mesures de la couronne de protéines ont également été entreprises par microscopie à force atomique (AFM). Ces mesures ont été faites à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble (Jean-Marie Teulon et Jean-Luc Pellequer). Comme avec le TRPS (§ 2.1.), l'objectif est de mesurer précisément la taille des hémoprotéines adsorbées sur les SiNPs MN100 à partir de mesures faites sur des objets uniques. Concrètement, 5 μ L d'échantillon dilué est déposé sur un plan de mica fraîchement nettoyé puis laissé à l'air pendant 5 min. Durant ce temps, les molécules présentes en solution vont s'adsorber à la surface du mica. Ensuite, le liquide restant est retiré par un lavage avec 50 μ L d'eau. Le mica est ensuite mis à sécher en étuve (méthode dite "à l'air"). L'instrument utilisé est un AFM MultiMode 8 (Bruker Corporation) et un contrôleur Nanoscope V. Après calibration de la sensibilité de la photodiode ainsi que de la raideur de la pointe utilisée (type ScanAsyst Air, $k=0,4$ N/m), un échantillonnage de plusieurs centaines d'objets présents sur la plaque est effectué par une succession de zones de balayages de la surface (chaque scan couvrant une surface de 25 μ m² avec 512 pixels par ligne) en mode "PeakForce tapping" (Godon et al., 2017). Dans un premier temps, les MN100 seules ont été caractérisées par AFM avec le mode d'imagerie à l'air (Fig. 6-3 et Fig. 6-4).

Les échantillons de MN100 dilués dans de l'eau montrent bien des SiNPs monodisperses d'un diamètre moyen de $91,8 \pm 12,1$ nm. Ceci est sensiblement plus élevé que les mesures faites en SANS et en TRPS (respectivement $78 \pm 0,8$ nm et 77 ± 12 nm). Cependant, la raison de cette différence n'est à ce jour par interprétable. Ensuite, on se rend rapidement compte que la taille des objets mesurés n'est pas la même en fonction de la présence et du type de sels ajoutés lors de la dilution de la suspension de MN100. Ainsi, on constate que l'ajout de chlorure de magnésium ($MgCl_2$) n'a quasiment pas de conséquences sur le profil de distribution en tailles des SiNPs mesurées. À l'inverse, la présence de phosphate semble influencer considérablement la morphologie des SiNPs et les nanoparticules mesurées dans cette condition possèdent une grande distribution en tailles. De plus, on constate que la population majoritaire n'est plus centrée autour de 90 nm mais plutôt autour de 10 nm. Ceci est une surprise car il a toujours été considéré que la présence d'ions n'avait pas d'effet direct sur l'intégrité des SiNPs. Or le tampon phosphate présent semble "dissoudre" les SiNPs pour former de nouvelles SiNPs plus petites. À ce stade, il n'est pas possible de savoir si l'effet du tampon est dû à la nature des sels de phosphate de sodium ou bien aux conditions de force ionique et/ou de pH fixée (ici pH 7). Il

serait intéressant de comparer ces résultats à d'autres SiNPs, comme par exemple les SiNPs monodisperses de tailles inférieures, MN10 et MN50, ou encore des SiNPs LUDOX dont le mode de synthèse est différent afin de voir si ce phénomène est spécifique ou généralisable à l'ensemble des SiNPs.

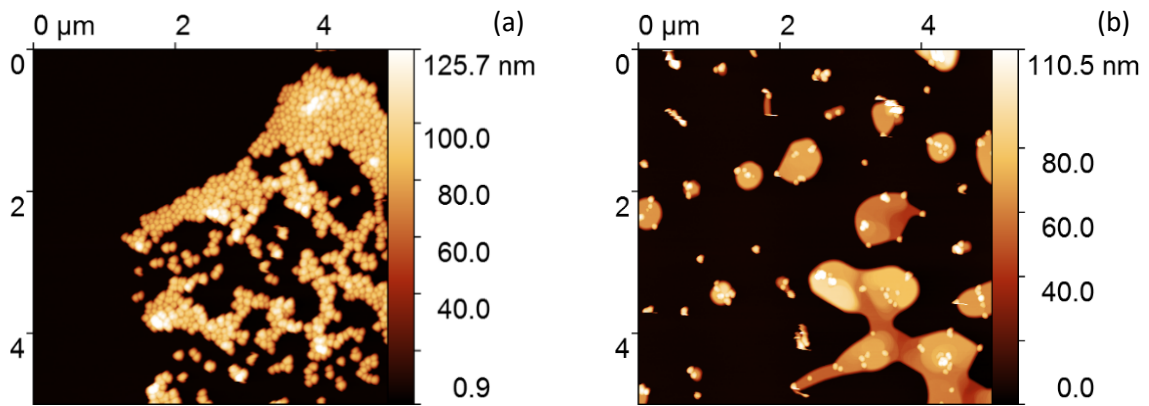


Figure 6-3 : Images AFM de suspensions de SiNPs MN100 obtenues après dépôt de 5 μL de solution concentrée à $0,075 \text{ g.L}^{-1}$ (dilution 200 fois) et étudiées à l'air. Les SiNPs ont été diluées en eau (a), en solution de MgCl_2 10 mmol.L^{-1} (b), et en tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (c).

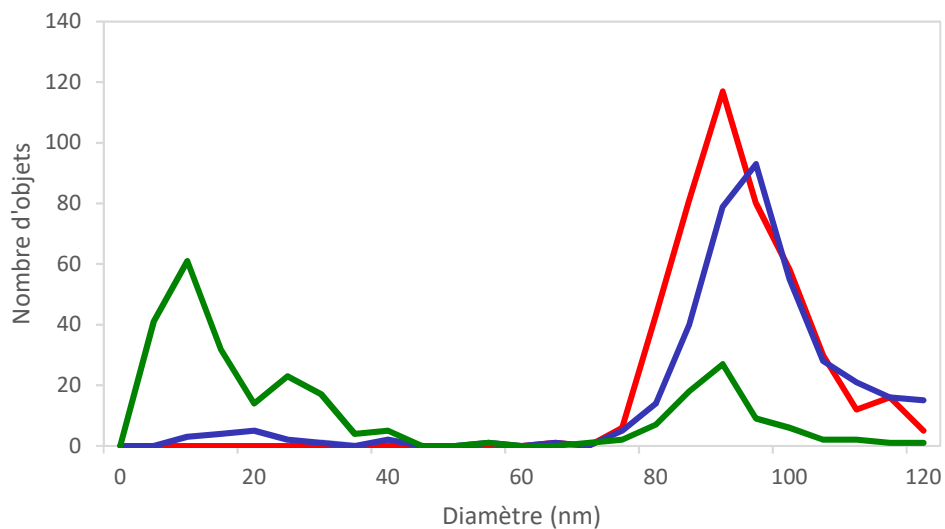
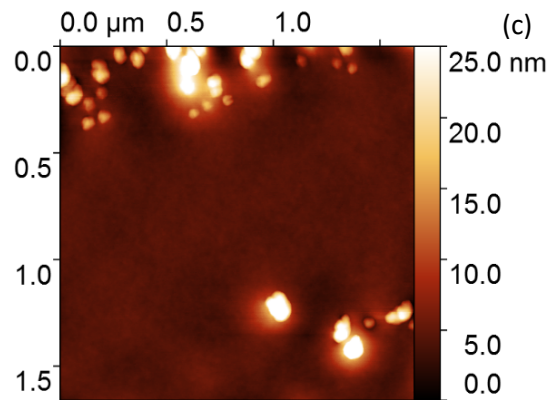


Figure 6-4 : Diagrammes de distribution en tailles des SiNPs MN100 diluées en eau (rouge), en solution de MgCl_2 10 mmol.L^{-1} (bleu), et en tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (vert).

Cependant, des tests de mesures AFM de trois mélanges hémoprotéines/MN100 ont également été tentés. Les conditions de mélanges sont les mêmes qu'avec le TRPS (§ 2.1.) et la dilution a également été faite en tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ + MgCl_2 10 mmol.L^{-1} (Fig. 6-5). À nouveau, on peut observer deux populations : une population nettement majoritaire d'objets compris entre 0 et 30 nm de diamètre et une population très minoritaire d'objets compris entre 70 et 110 nm. Pour les deux populations, la dispersité est très grande. La première population contient à la fois des protéines libres et des produits de dégradations des SiNPs observés précédemment (Fig. 6-4). La deuxième population contient des SiNPs et, éventuellement, des protéines adsorbées à leur surface.

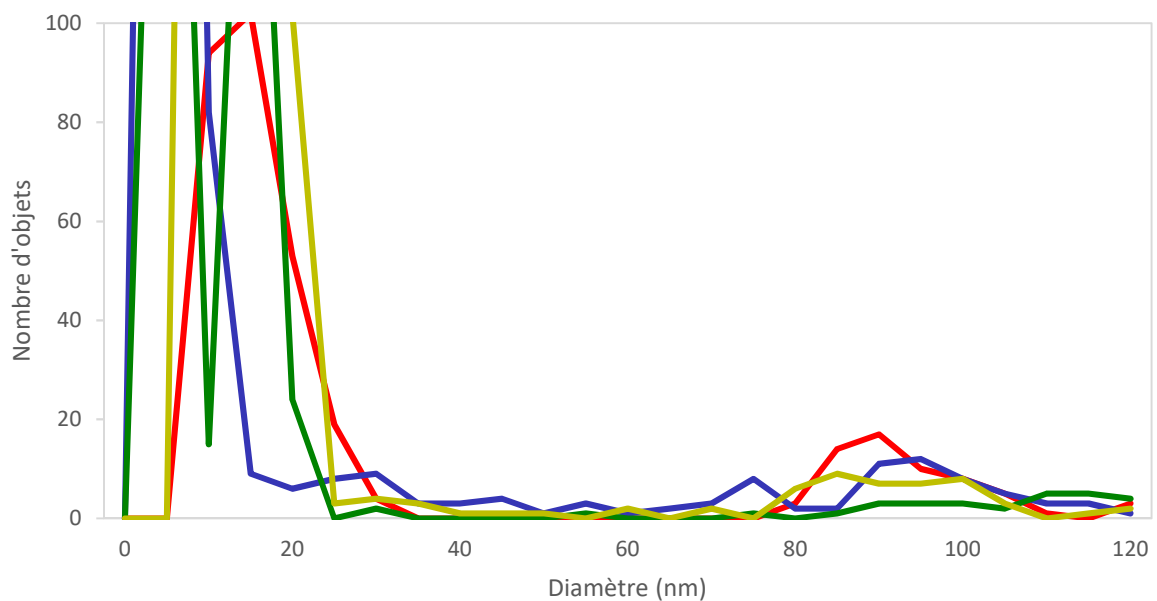


Figure 6-5 : Diagrammes de distribution en tailles des SiNPs MN100 mélangées à Mb (rouge), Hb (bleu), HbAm mesurés par AFM en air (vert) ainsi que de HbAm mesuré par AFM en liquide (jaune), en conditions d'excès de protéines. Après mélanges, les dilutions ont été faites dans du tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ avec ajout de MgCl_2 10 mmol.L^{-1} .

Comme pour les mesures par TRPS, les tailles moyennes des différentes populations de Mb/MN100 et Hb/MN100 ont été calculées (Tab. 6-2). On confirme la présence majoritaire d'objets de petites tailles. De plus, on peut noter que la taille moyenne de la population 1 de Hb/MN100 est très proche du diamètre de la protéines native (5,5 nm, contre 4,6 nm pour le diamètre de Hb). Ceci pourrait indiquer que les objets mesurés sont bien des protéines libres issues de la fraction des protéines non adsorbées. Concernant les mélanges Mb/MN100 par contre, le diamètre moyen de la population 1 est de 12,8 nm soit beaucoup plus grand que celui de la protéine native qui est de 2,8 nm. Il semble donc y avoir essentiellement des SiNPs dégradés (ainsi que la présence éventuelle d'agrégats de protéines) et relativement peu de protéines natives libres.

Tableau 6-2 : Diamètres moyens et pourcentages relatifs des différentes populations contenues dans les 4 mélanges hémoprotéines/MN100. Entre parenthèses sont indiquées la gamme de taille des objets inclus dans une même population.

	MN100 + Mb	MN100 + Hb
Diamètre moyen population 1 (nm)	12,8 ± 4,6	5,5 ± 5,7
Diamètre moyen population 2 (nm)	95,1 ± 18,9	88,9 ± 18,6
Pourcentage population 1	81% (0-50)	90% (0-50)
Pourcentage population 2	19% (50-190)	10% (50-136)

Concernant la population 2, pour ces deux mélanges, la taille moyenne est très proche de celle des SiNPs seules (91,8 ± 12,1 nm). Il ne semble donc pas possible d'observer et, encore moins, de caractériser par AFM en air la couronne de protéines formée. Il est en effet possible que l'étape de séchage induise une désorption des protéines. Aussi, l'opportunité d'utiliser une alternative à l'AFM en air a été considérée : il s'agit de l'AFM en liquide. La méthode en liquide consiste à scanner un échantillon laissé immergé. Cette méthode, qui ne nécessite pas de séchage, est moins destructive mais plus difficile à mettre en place. C'est pour cela qu'un seul échantillon a été mesuré de cette manière : le mélange HbAm/MN100. Les deux profils (mesures en air et en liquide) du mélange HbAm/MN100 ont été mesurés (Fig. 6-5) et semblent être légèrement différents. La méthode en liquide permet notamment de mieux définir la deuxième population. Toutefois, pour les méthodes en air comme en liquide, il faut préciser que les échantillonnages effectués dépendent fortement de la capacité des objets à s'adsorber à la surface de mica. Or il est probable que les hémoprotéines et les SiNPs s'adsorbent avec des affinités différentes et donc que les échantillonnages ne soient pas représentatifs des différentes populations de nano-objets présentes en solution.

Néanmoins, on peut s'interroger sur la nature des gros objets présents dans la population 2. Aussi, malgré la grande taille de HbAm, la taille des objets de la population 2 semble être très proche de celle de MN100 seule. Ainsi, même en liquide, la taille de la couronne protéique n'est pas directement mesurable. Davantage de tests et d'optimisations semblent nécessaire pour permettre de caractériser par AFM la structure de la couronne protéique.

1.3. Cristallographie d'hémoprotéines adsorbées sur des nanoparticules de silice

Des expériences de cristallogénèse ont été entreprises en collaboration avec Ahmed Haouz, responsable de la plateforme de cristallographie de l'Institut Pasteur (Paris). L'objectif ultime est de résoudre la structure cristallographique d'une protéine modèle dans son état adsorbé. Au préalable, il est nécessaire de tester la faisabilité de la cristallisation de mélanges protéines/SiNPs. Ainsi, une série de 10 mélanges hémoprotéines/SiNPs (Tab. 6-3) a été testée à l'aide de la robotique disponible sur la plateforme. Lors de cette campagne de criblage, trois hémoprotéines (Mb, Hb, et HbC1) et deux SiNPs

(MN10 et LUDOX) ont été utilisées dans deux conditions d'isothermes : grande majorité de protéines adsorbées (80%) et mélange de protéines adsorbées et de protéines libres (60%).

Le criblage à haut débit de cristallisation a été réalisé en utilisant la méthode de diffusion de vapeur à l'aide du robot MosquitoTM de chez TTP Labtech. Ce robot génère sur des plaques 96 puits (Greiner Bio-One) des gouttes de cristallisation (400nl) composées, en mélange 1:1, de l'échantillon et de solutions de cristallisation (672 conditions commerciales différentes). Ces plaques de cristallisation ont été stockées à 18 °C dans un autre robot RockImager de chez Formulatrix pour suivre l'apparition des cristaux. Une sélection de cristaux obtenus après 9 mois d'incubation est présentée sur la figure 6-3.

Tableau 6-3 : Plan d'expérience des tests de cristallogenèse. Les SiNPs LUDOX ou MN10 ont été mises en contact avec les hémoprotéines Mb, Hb, ou HbC1 dans des conditions d'isothermes d'adsorption permettant d'avoir soit 80%, soit 60% de protéines adsorbées sur les SiNPs.

Échantillon	SiNPs	Protéines	% prot. ads.
A	LUDOX	∅	n/a
B	MN10	∅	n/a
C	LUDOX	Mb	80%
D	LUDOX	Hb	80%
E	LUDOX	HbC1	80%
F	MN10	Hb	80%
G	MN10	HbC1	80%
H	LUDOX	Mb	60%
I	LUDOX	Hb	60%
J	LUDOX	HbC1	60%
K	MN10	Hb	60%
L	MN10	HbC1	60%

Il ressort de cette batterie de tests qu'aucune condition n'a permis aux échantillons ne contenant que des SiNPs (échantillons A et B du Tab. 6-3) de former des cristaux. Les SiNPs seules ne peuvent donc pas être cristallisées dans nos conditions. *A contrario*, la cristallisation de tous les mélanges testés s'est avérée possible dans certaines conditions de cristallogenèse (Fig. 6-6). Ceci répond donc à la première question : il est possible de cristalliser des protéines en présence de SiNPs. Toutefois, on a pu constater que, si un grand nombre de conditions permettent de cristalliser les échantillons en présence d'une faible quantité de SiNPs (échantillons H, I, J, K, et L), beaucoup moins de cristaux se sont formés en présence d'une forte quantité de SiNPs (échantillons C, D, E, F, et G). On peut donc supposer que, bien que la cristallisation de protéines en présence de SiNPs soit possible, ces dernières auraient tendance à empêcher la cristallogenèse.

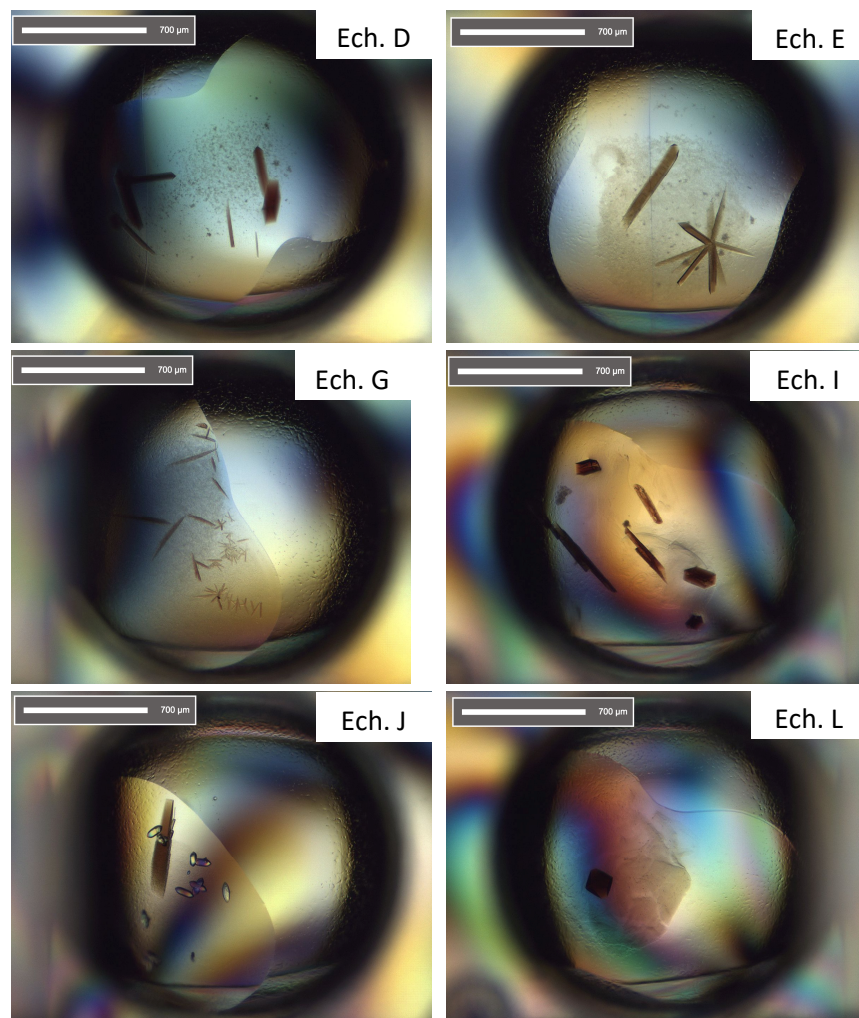


Figure 6-6 : Exemples de cristaux formés à partir des échantillons D, E, G, I, J, et L. Conditions de cristallisation : 20% m/v PEG 3350, 0,2M NaF (D) ; 0,1M Na₃ Cit, 0,05 M (NH₄)₂SO₄, 15% m/v PEG 8000 (E) ; 0,2M Na Acet 0,1M MES pH 6,5, 15 % m/v PEG 8000 (G) ; 2% v/v Tacsimate, 0,1M Bis-Tris pH 6,5, 20% m/v PEG 3350 (I) ; 0,2M MgCl₂, 0,1M MES pH 6,5, 10% m/v PEG 5000 (J) ; 0,2 M (NH₄)₃ Cit + 20% m/v PEG 3350 (L).

Pour chaque échantillon, on peut discerner dans les gouttes de cristallisation, des cristaux contenant de l'hémoprotéine. Ces cristaux apparaissent dans un liquide de cristallisation contenant aussi (sauf pour l'échantillon J) de l'hémoprotéine libre ou associée aux SiNPs. Pour la collecte des données de diffraction des rayons X, les cristaux ont été pêchés (Fig. 6-7) et congelés dans l'azote liquide en utilisant un mélange de paratone et d'huile de paraffine (50%/50%) servant de "cryoprotectant". L'étape suivante consiste à connaître la structure des cristaux formés. Pour cela des données de diffraction des rayons X ont été collectées par Ahmed Haouz sur les lignes de lumière PROXIMA-1 et PROXIMA-2A (Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin). Les images de diffraction ont été intégrées par le programme XDS et montrent que les dimensions de l'unité asymétrique du cristal sont ($a=68,29$, $b=2,38$, $c=114,32$, $\alpha=90$, $\beta=90$, $\gamma=90$) et le groupe d'espace est le $P2_12_12_1$. Les calculs cristallographiques ont été réalisés avec la suite de programmes CCP4. La structure de l'échantillon D

(Hb + LUDOX) a été résolue à 1.7 Å par remplacement moléculaire avec le programme Phaser en utilisant la structure de l'oxyhémoglobine de porc indiquée dans la PDB (1QPW) comme modèle de recherche, avec un R-work = 0,2360 et un R-free = 0,2784.

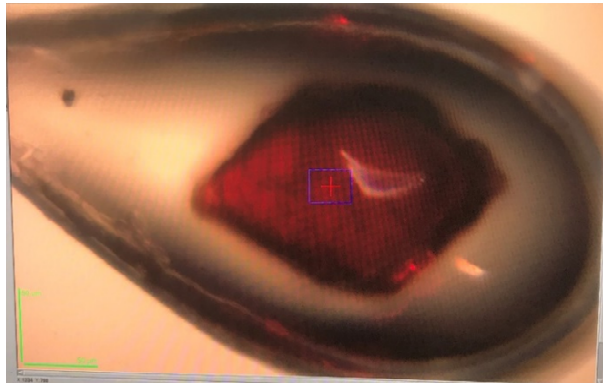


Figure 6-7 : Image d'un cristal de Hb tenu à l'intérieur d'une boucle de prélèvement en vue de la mesure de diffraction des rayons X.

La résolution de la structure cristalline indique clairement que le cristal de Hb + LUDOX est constitué uniquement de Hb et ne contient aucune densité électronique caractérisant les nanoparticules de LUDOX. De plus, la résolution de la structure a montré que l'hémoglobine n'a subi aucune modification structurale liée à la présence des nanoparticules (Fig. 6-8a). Cette structure se superpose parfaitement à celle déposée dans la PDB et, l'analyse de la densité électronique autour de l'hème (Fig. 6-8b) montre que l'hémoglobine est restée sous la forme d'oxyhémoglobine.

Sachant que les cristaux formés contiennent uniquement des protéines, deux hypothèses non exclusives peuvent être formulées : (1) les cristaux ne sont formés que de la fraction de protéines non adsorbées (20% ou 40%) ou (2) des protéines adsorbées aux SiNPs se sont désorbées lors de la cristallisation et les cristaux sont constitués de protéines désorbées. Dans ce cas, une information capitale serait qu'une protéine désorbée possède une structure identique à sa structure native avant adsorption. Des études faites sur la même hémoglobine vont dans ce sens en montrant, par dichroïsme circulaire, que la structure secondaire de la protéine désorbée est identique à celle de la protéine native (Devineau *et al.*, 2017). Cependant, en l'état actuel de nos données exploratoire, on ne peut pas conclure sur la provenance de l'hémoglobine cristallisée (protéines libres et/ou désorbées). En perspective de ce travail, nous allons tenter de tester ces deux hypothèses en cristallisant des mélanges Hb/LUDOX en conditions présentant près de 100% de protéines adsorbées.

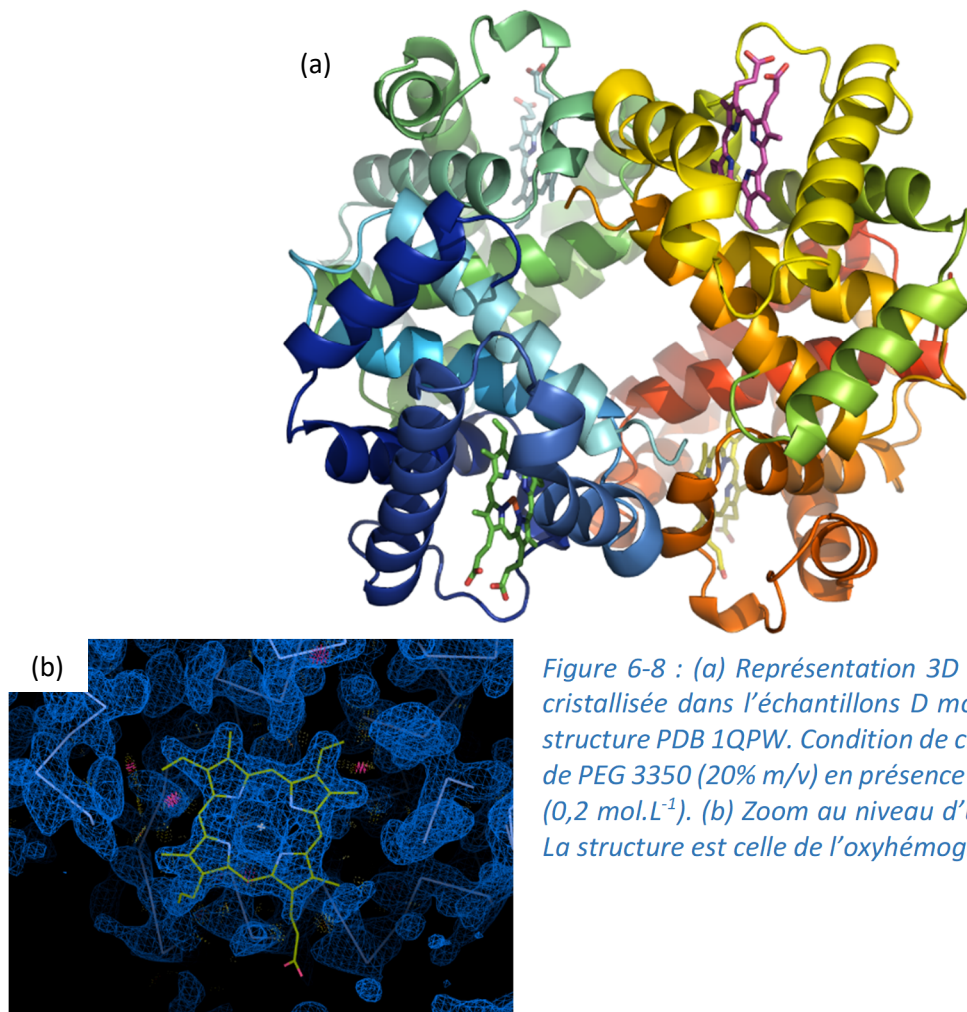


Figure 6-8 : (a) Représentation 3D de la structure de Hb cristallisée dans l'échantillon D modélisée à partir de la structure PDB 1QPW. Condition de cristallisation : solution de PEG 3350 (20% m/v) en présence de fluorure de sodium ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$). (b) Zoom au niveau d'une molécule d'hème. La structure est celle de l'oxyhémoglobine native.

2. Discussion générale

La couronne de protéines adsorbées sur une nanoparticule représente l'interface entre le matériau et le milieu biologique. Cette couronne joue un rôle important sur le devenir biologique de la nanoparticule. Elle influence notamment sa biocinétique en permettant aux nanoparticules de s'intégrer dans les tissus, voire de rentrer à l'intérieur des cellules (Monopoli *et al.*, 2012). Elle peut également avoir des conséquences physiologiques spécifiques comme l'activation du système immunitaire (Chen *et al.*, 2017). Aussi, bien que la formation d'une couronne soit inévitable, sa structure et sa composition peuvent varier selon le type de nanoparticule. Des nanoparticules fonctionnalisées par du polyéthylène glycol possèdent, par exemple, une quantité plus faible de protéines adsorbées (Orts-Gil *et al.*, 2013) ainsi qu'une composition protéique différente (Kurtz-Chalot *et al.*, 2017) par rapport à des nanoparticules non fonctionnalisées. La couronne de protéines apporte ainsi une "identité biologique" spécifique à chaque nanoparticule (Caracciolo *et al.*, 2017), ce qui a des conséquences directes en termes de nanotoxicologie comme de nanomédecine (chapitre 1, § 2.4. et §

2.5.). Dans ce contexte, l'étude de la formation de la couronne de protéines est capitale afin de mieux comprendre les conséquences biologiques de la présence de nanoparticules dans un organisme.

Paramètres déterminant l'adsorption des protéines

L'extrême diversité des nanoparticules comme des protéines rend, pour l'instant, impossible toute généralisation des mécanismes de formation d'une couronne de protéines. À l'heure actuelle, la seule façon de connaître avec précision les mécanismes d'adsorption est de s'intéresser à un système protéine/nanoparticule donné. Ainsi, durant cette thèse, nous nous sommes concentrés sur la formation de couronnes protéiques sur des nanoparticules de silice (SiNPs). Les SiNPs sont présentes en grande quantité dans les objets du quotidien (INRS, 2014). Les SiNPs ont déjà été étudiées à de multiples reprises et les principaux facteurs déterminant l'adsorption ou non d'une protéine sont maintenant connus (Klein *et al.*, 2016 ; Devineau *et al.*, 2017). Deux caractéristiques intrinsèques aux protéines comme aux nanoparticules semblent particulièrement importantes pour l'adsorption : (1) la présence de régions chargées à leurs surfaces respectives. Deux surfaces possédant une charge de même signe interagiront faiblement tandis que deux surfaces de signes opposés pourront former des interactions stables, de nature électrostatiques (Rimola *et al.*, 2013). (2) La structure des protéines comme des SiNPs joue également un rôle majeur. Ainsi, la nanomorphologie (rugosité, courbure, géométries locales...) des SiNPs influence considérablement la formation de la couronne de protéines (Catalano *et al.*, 2015). De plus, l'affinité des protéines pour une surface peut varier fortement selon leur degré de structuration. En particulier, la présence de régions flexibles voire désordonnées augmente l'affinité de la protéine pour une surface de silice (Ikeda et Kuroda, 2011 ; Klein *et al.*, 2016).

Effet taille des nanoparticules de silice et effet de taille des protéines

Cependant, si l'importance de la chimie de surface est bien établie, celle de la structure est encore discutée (Rimola *et al.*, 2013). De ce fait, nous nous sommes intéressés à l'influence de la structure des protéines et des SiNPs sur leurs interactions respectives. Nous nous sommes concentrés en particulier sur l'effet de la taille de ces objets. Pour ce faire, des hémoprotéines de tailles différentes ont été mises en contact avec des SiNPs monodisperses, elles-mêmes de tailles différentes. Nous avons pu montrer que la taille des protéines comme des SiNPs peut influencer la formation de la couronne protéique. L'augmentation de la taille des protéines induit notamment une augmentation de leur affinité pour la surface de la silice. L'augmentation de la taille de la SiNP, quant à elle, peut augmenter la quantité de protéines adsorbées (à quantité de surface égale).

Une première explication pour comprendre les raisons de ce double effet taille peut être trouvée du côté de la stochastique. En effet, l'augmentation de la taille de ces macromolécules accroît

logiquement le nombre de sites potentiels d'interaction et, de ce fait, augmente les probabilités de rencontre. Cependant, nous avons pu voir que la corrélation entre la taille des protéines et leur affinité pour les SiNPs, bien que présente, n'était pas parfaitement linéaire. De plus, en tenant compte des différences de surface spécifique, très peu d'effets de taille des SiNPs peuvent être observés que ce soit en présence d'hémoprotéines comme d'extraits protéiques de levure (à l'exception des plus petites SiNPs, MN10, qui semblent se distinguer des autres). Ainsi, un simple effet stochastique ne peut expliquer entièrement les phénomènes observés.

Dans l'étude de l'effet taille des hémoprotéines, une nouvelle hypothèse a pu être formulée : il s'agit de la présence possible d'un effet coopératif augmentant l'affinité des grosses protéines avec la formation d'un plus grand nombre de liaisons durant l'adsorption. Toutefois si elle semble probable, cette hypothèse ne peut être affirmée à ce stade. En effet les hémoprotéines étudiées (en particulier les plus grosses) se dissocient partiellement dans les conditions opératoires pratiquées (systèmes dilués) ce qui parasite les études thermodynamiques comme structurales.

Concernant l'effet taille des SiNPs, deux paramètres varient selon la taille des SiNPs utilisées ici : la courbure et la chimie de surface. Ces deux paramètres sont indissociables dans le cas de SiNPs synthétisées par la méthode de Stöber (Patwardhan *et al.*, 2012). Il semble donc difficile de distinguer l'importance relative de chacun vis-à-vis des interactions avec les protéines. Toutefois, deux cas ont été étudiés : des protéines modèles (hémoprotéines) et des mélanges de protéines (extraits protéiques de levures). Dans le premier cas, les hémoprotéines ne se déstructurent pas durant l'adsorption, il semble peu probable que la courbure des SiNPs, *per se*, soit la cause principale des différences de profils observés. La différence de chimie de surface observée entre les SiNPs permet par contre d'expliquer les différences qui ont pu être observées entre MN10 et MN50/MN100. À l'inverse, dans le cas des mélanges de protéines, l'analyse statistique des paramètres physico-chimiques indique que certaines protéines présentant un effet taille des SiNPs sont particulièrement peu structurées. Il est donc envisageable que leur flexibilité leur confère une plus grande adaptabilité d'adsorption vis-à-vis de surfaces plus courbes et donc de SiNPs plus petites.

Conséquences fonctionnelles de l'adsorption

Lors de l'étude des systèmes hémoprotéines/SiNPs nous nous sommes intéressés essentiellement à l'impact structural de l'adsorption. Des différences structurales subtiles ont ainsi pu être observées entre protéines libres et protéines adsorbées. Cependant, afin de comprendre complètement les conséquences biologiques de l'adsorption il est bien souvent nécessaire d'étudier à la fois la structure et la fonction des protéines adsorbées. Aussi, la fonction première des

hémoprotéines étant de fixer le dioxygène, la réalisation de courbes d'oxygénation permet d'estimer l'affinité d'une hémoprotéine pour le dioxygène. Le grand avantage est d'utiliser un substrat gazeux pour évaluer l'activité de ces protéines (Schrurs et Lison, 2012 ; Guadagnini *et al.*, 2015). *A contrario*, la mesure d'activité de nombreuses protéines, et en particulier des enzymes, n'est pas aisée en présence de nanoparticules du fait de l'interaction potentielle des substrats et cofacteurs avec la surface. On peut donc s'interroger sur l'existence de potentielles interférences sur les cinétiques enzymatiques.

Ainsi, les différences structurales observées lors de l'adsorption des protéines sont à mettre en perspective avec l'impact fonctionnel de l'adsorption des hémoprotéines sur des SiNPs. En effet, il a pu être constaté que des molécules d'hémoglobine adsorbées présentent une affinité accrue pour le dioxygène par rapport aux mêmes molécules libres en solution (Devineau *et al.*, 2017 ; Devineau *et al.*, 2018). Toutefois, la raison fondamentale de cette modulation de la fonction d'oxygénation n'avait pas pu être trouvée. Les résultats de cette thèse indiquent clairement que des réarrangements locaux d'hélices α interagissant entre elles et/ou avec la surface de la silice ont lieu. Le lien entre modulation fonctionnelle et modifications conformationnelles semble probable mais ne peut être affirmé en l'état. Pour ce faire, il serait nécessaire de savoir si l'environnement autour de l'hème subit bien une modification structurale. En effet, le fer situé au centre de l'hème est directement responsable de la fixation du dioxygène et son environnement influence considérablement sa capacité de fixation (Pin *et al.*, 1985). En toute logique, des modifications de la structure secondaire et tertiaire au niveau de l'hème pourraient expliquer les modulations fonctionnelles observées. Dans cet optique, une étude du fer de l'hème par spectroscopie d'absorption des rayons X a été menée (février 2018). Les rayons X permettent d'exciter les électrons de cœur de l'atome de fer donnant des informations sur son état de coordination ainsi que sur son environnement proche (jusqu'à 5 Å autour de l'atome). Des expériences similaires avaient déjà été menées précédemment (Devineau, 2013) mais la résolution s'est avérée insuffisante et la reproductibilité n'a pas été obtenue. Aussi, l'approche faite durant ma thèse a été d'analyser le fer de l'hème dans des mélanges hémoglobine/SiNPs placés en hélium liquide (20K) afin de limiter au maximum la dégradation des échantillons. À ce jour, les premiers résultats obtenus sur des échantillons d'oxyhémoglobine semblent confirmer que l'environnement du fer de l'hème est nettement modifié par l'adsorption.

Affinement du modèle d'adsorption des protéines

Ainsi, même dans le cas de protéines fortement structurées telles que les hémoprotéines, l'adsorption induit des modifications structurales. Cependant, ces modifications sont réversibles et la désorption permet à l'hémoglobine de retrouver sa structure et sa fonction native (Devineau *et al.*,

2017). Ceci nuance le modèle proposé par Willem Norde (Norde, 2008) qui classe les protéines "dures" comme étant des protéines qui s'adsorbent réversiblement sur une surface sans modification de leur structure (Fig 6-9a). Il faut ainsi préciser cette définition en signalant qu'une protéine dure peut connaître des modifications structurales et fonctionnelles lors de son adsorption mais que, une fois désorbée, celle-ci retrouve sa structure native. À l'inverse, une protéine "molle" (naturellement flexible et peu structurée) se déstructure fortement lors de l'adsorption, ce qui peut conduire à une adsorption quasi-irréversible (Fig 6-9b).

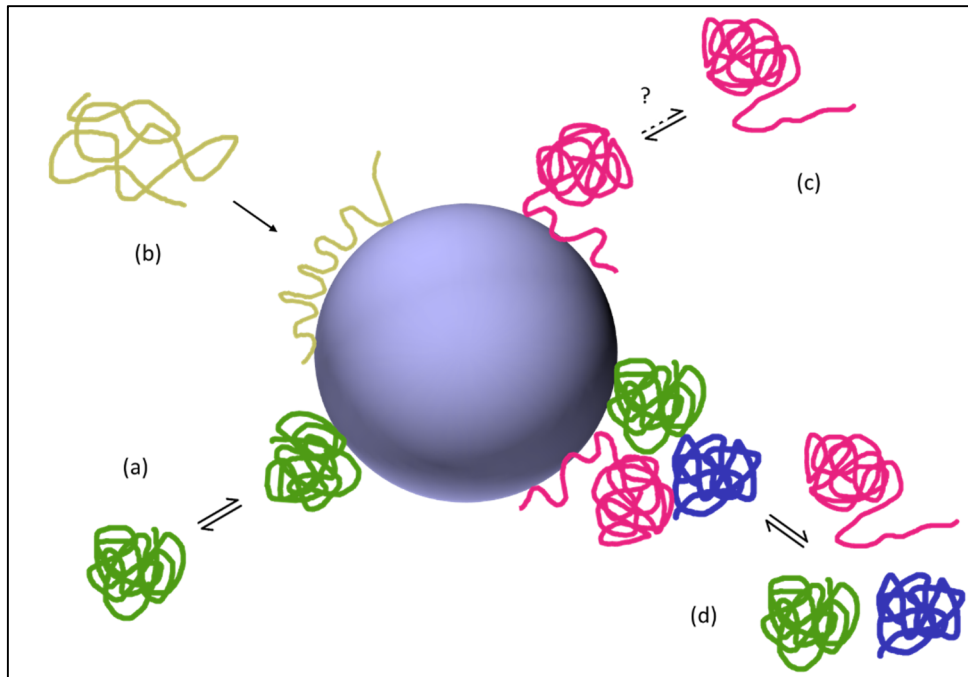


Figure 6-9 : Principaux mécanismes d'adsorption des protéines sur une surface. (a) Une protéine "dure" s'adsorbe de façon réversible et retrouve sa structure native lors de la désorption ; (b) Une protéine "molle" s'adsorbe de façon irréversible et se déstructure à la surface ; (c) Une protéine possédant une RID s'adsorbe directement via celle-ci ; (d) Une protéine peu affine pour une surface peut intégrer la couronne protéique par des interactions protéine-protéines.

Ces deux catégories représentent des cas d'école permettant d'expliquer l'impact structural et fonctionnel de l'adsorption de protéines. Toutefois, lors de la formation d'une couronne de protéines, d'autres cas de figures peuvent exister. Cette thèse a notamment permis d'étudier l'adsorption de protéines possédant des régions intrinsèquement désordonnées (RID) : les protéines à motifs RGG. Nous avons pu montrer que l'adsorption de ce type de protéines se fait directement par la RID contenant les motifs RGG (Fig. 6-9c). Dans ce cas-ci, la présence de résidus arginine et celle d'une région désordonnée agissent de concert (le remplacement de résidus R par des résidus K diminue légèrement l'affinité de la protéine mais celle-ci reste affine). Aussi, ce type de protéines représente un modèle intermédiaire entre une protéine molle et une protéine dure en combinant leurs propriétés propres. Toutefois, plusieurs questions demeurent : la structure/fonction de la partie structurée de la

protéine est-elle conservée lors de l'adsorption ? Si oui, ceci confirmerait l'hypothèse que la RID s'adsorbe de façon indépendante au reste de la protéine et peut donc agir comme un "tag peptidique" (Abdelhamid *et al.*, 2014). Il s'avère que, dans le cas des fusion GFP-Npl3 (utilisées dans le chapitre 5), la GFP conserve sa propriété de fluorescence même une fois adsorbée. Sa fonction, et surement sa structure, sont donc conservées. Par contre, rien ne peut être affirmé concernant le reste de la protéine Npl3. Aussi, l'adsorption est-elle quasi-irréversible, comme pour une protéine molle classique, ou y a-t-il un équilibre entre adsorption et désorption qui s'opère ? Il semble logique que la réponse à cette question dépende de la RID étudiée. En effet, la taille de la RID semble jouer un grand rôle sur l'adsorption comme nous avons pu le montrer à partir de peptides de tailles différentes. Pour répondre à ces questions il semble intéressant de travailler sur des versions purifiées de ces protéines puis d'appliquer la même démarche que pour les hémoprotéines.

L'étude de l'affinité des protéines à motifs RGG a également soulevé des questions fondamentales quant au mécanisme d'adsorption des protéines en milieux complexes. En effet, il est possible de faire le lien entre la forte affinité des motifs RGG pour la silice et leur forte affinité vis-à-vis de l'ARN (les protéines présentant des motifs RGG étant connues pour être des protéines fixant l'ARN ou RBP, Järvelin *et al.*, 2016). Dans les deux cas, la liaison se fait par des interactions électrostatiques entre un groupement chargé positivement (l'arginine éventuellement diméthylée) et un groupement chargé négativement (des groupements silanol déprotonés ou non pour la silice ; les groupements O- du phosphate et OH du ribose pour l'ARN). Toutefois, la spécificité des RBP pour l'ARN (par rapport à l'ADN notamment) semble indiquer que la présence de RID joue un rôle particulier. D'ailleurs, dans une démarche similaire à ce qui a été fait ici avec Npl3, il a été récemment montré que les motifs RGG (et la version dégénérée RG) contenus dans la RID de FUS étaient le moteur de sa fonction de fixation à l'ARN (Ozdilek *et al.* 2017). Ceci suggère à nouveau que, si l'arginine est primordiale pour une forte affinité l'absence de structure stable joue également un rôle. Or la principale conséquence de la présence de RID est la grande flexibilité de la chaîne peptidique. Il est connu que l'absence de structure est un des facteurs permettant d'expliquer la rapidité des cinétiques d'interactions qui existent entre RBP et ARN (Jain et Tu, 2011). En effet, les protéines désordonnées possèdent un rayon de capture potentiel plus grand par rapport aux protéines ordonnées. Ceci correspond à l'effet de capture en vol ("fly-casting effect") connu pour expliquer les cinétiques rapides de reconnaissance moléculaire ayant lieu dans des milieux complexes (Fig. 6-10, Jain et Tu, 2011).

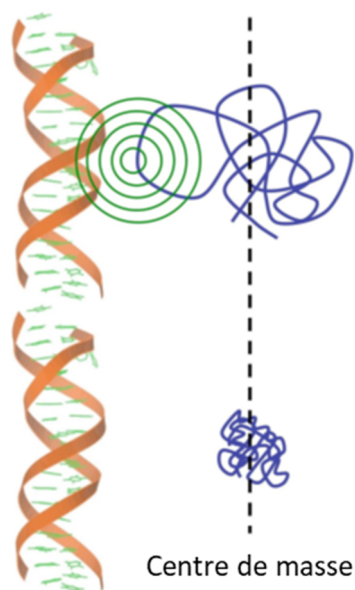


Figure 6-10 : Représentation schématique de l'augmentation des cinétiques d'interaction causées par l'effet de capture en vol. Une protéine désordonnée possède un rayon de capture plus grand qu'une protéine de même taille mais structurée. Tiré de Jain et Tu, 2011.

Ainsi, rapporté au contexte de la formation de couronne protéiques sur des nanoparticules de silice, on peut considérer que le net enrichissement en protéines contenant des RID (Klein *et al.*, 2016) peut être dû à l'effet de capture en vol. La forte affinité des protéines à motifs RGG est donc sûrement dû aux effets cumulés de l'importante force d'interaction des résidus arginine diméthylés asymétriquement et de l'absence de structure de la chaîne peptidique induisant une plus grande propension à interagir.

Des protéines non affines pour des SiNPs peuvent également être retrouvées dans la couronne de protéines (Fig. 6-9d). Ceci s'explique par l'existence d'interaction protéines-protéines. En effet, de nombreuses protéines ont naturellement tendance à former des complexes avec d'autres protéines. Ainsi, bien qu'une protéine non affine ne puisse pas interagir directement avec la surface des SiNPs, celle-ci peut quand même se retrouver au sein de la couronne de protéines. Ce phénomène se retrouve dans le concept "d'interactome" développé récemment (Pisani *et al.*, 2017). On peut s'interroger sur les différences éventuelles qui peuvent exister entre adsorption directe et adsorption indirecte. En effet, une protéine adsorbée directement aura plus de chance de perdre sa fonction (par déstructuration et/ou parce que le site actif n'est plus accessible au substrat) contrairement à une protéine reliée indirectement qui se trouvera à l'extérieur de la couronne, dont son site actif sera potentiellement toujours accessible. Il faut donc envisager la couronne protéique comme un empilement de protéines dont seules les couches externes sont en contact direct avec le milieu extérieur.

Aspect cinétique

Toutes les études ont été effectuées ici sur des mélanges protéines/SiNPs en état stationnaire, c'est-à-dire que l'état d'équilibre entre protéines adsorbées et protéines non adsorbées est atteint. Dans le cas de protéines modèles comme l'hémoglobine, l'état d'équilibre est atteint très rapidement et l'adsorption peut être considérée comme irréversible. Cependant, dans le cas de mélanges complexes de protéines, il y a une évolution de la composition de la couronne au cours du temps. Les protéines les plus abondantes dans le milieu s'adsorbent en premier par loi d'action de masse. Elles sont ensuite remplacées par des protéines moins abondantes mais plus affines pour la surface. Ce phénomène, appelé "effet Vroman", a été observé à plusieurs reprises, cependant il n'y a pas de consensus concernant la vitesse à laquelle l'équilibre est atteint qui peut aller de moins d'une minute à plusieurs heures (voir chapitre 1, § 4.3.3.).

L'effet Vroman part du principe que les protéines adsorbées peuvent se désorber. Ceci est le cas lors de changements physico-chimiques du milieu (pH par exemple, Devineau *et al.*, 2017) ou en présence de mélanges de protéines (Norde, 2008). Dans ce contexte-ci, l'utilisation d'extraits de protéines de levures est tout à fait adéquate pour étudier l'évolution de la composition de la couronne. L'utilisation de deux extraits protéiques, l'un radiomarké au ³⁵S, l'autre non, pourrait être intéressante. En effet, la compétition pour une surface pourrait être étudiée en mélangeant des protéines marquées à des SiNPs pré-incubées avec des protéines non marquées. Il serait ainsi possible de suivre au cours du temps l'apparition de protéines marquées dans la fraction adsorbée en l'analysant par électrophorèse bidimensionnelle afin de révéler la composition de ces protéines suffisamment affines pour remplacer celles déjà présentes dans la couronne. L'étude de la cinétique de formation de la couronne protéique semble particulièrement importante dans le contexte biologique où les NPs peuvent être dans différents milieux biologiques au cours de leur séjour dans l'organisme.

De la protéine modèle au protéome

Durant cette thèse, deux approches ont été utilisées : l'utilisation de protéines modèles et de mélanges complexes de protéines. Ces deux approches se sont avérées complémentaires car leurs avantages et inconvénients respectifs se compensent. Ainsi, les protéines modèles permettent de simplifier le système au maximum afin d'étudier finement l'impact structural et fonctionnel de l'adsorption. Cependant, cette simplification implique une perte de pertinence biologique et ne permet donc pas d'extrapoler aux mécanismes *in vivo* de formation de la couronne protéique. À l'inverse, les mélanges de protéines sont bien plus proches d'un milieu biologique. Toutefois, le prix à payer pour cette complexité accrue est que de multiples phénomènes peuvent avoir lieu

simultanément et que les techniques utilisées classiquement pour l'étude de protéines modèles peuvent ne plus être adaptées. Par exemple, il serait intéressant de savoir si, globalement, les protéines ont plutôt tendance à se déstructurer (perte de fonction) lors de l'adsorption ou, au contraire, comme il semble y avoir une surreprésentation de protéines peu structurées, si elles se structurent et voient potentiellement leur activité augmentée. Il faudrait donc considérer la possibilité d'utiliser le dichroïsme circulaire pour des mélanges de protéines. Toutefois, comme cette technique apporte des valeurs moyennes de degrés de structure, la présence de phénomènes opposés risque de rendre les résultats ininterprétables.

En outre, dans le cadre de l'étude de l'effet taille des protéines, une approche alternative utilisant des extraits protéiques de levures a également été envisagée. Elle consiste à obtenir des mélanges de protéines de tailles similaires en éliminant les protéines de tailles inférieures ou supérieures à un certain seuil (par dialyse notamment). L'adsorption de ces protéines pourrait ainsi être étudiée par microcalorimétrie ITC afin de confirmer (ou pas) l'augmentation d'affinité et observer d'éventuelles différences thermodynamiques liées à la taille des protéines. Cependant, là encore, il faut garder en tête que des interférences (comme la présence d'interactions protéines-protéines) peuvent être sources d'erreurs.

Il y a donc un besoin de développer des méthodes adaptées à l'étude de mélanges de protéiques. Une approche combinant spectrométrie de masse et analyse biostatistique a ainsi été développée par notre équipe (Mathé *et al.*, 2013 ; Klein *et al.*, 2016). Ceci a permis des avancées considérables dans la compréhension des facteurs physico-chimiques des protéines favorables à l'adsorption. La protéomique permet ainsi d'être biologiquement pertinente tout en effectuant des analyses approfondies. Cependant, la protéomique, à elle seule, reste encore insuffisante. En effet, les études biostatistiques ont pu montrer à plusieurs reprises que l'arginine et la lysine n'avaient pas la même importance lors de l'adsorption des protéines (Mathé *et al.*, 2013 ; Klein *et al.*, 2016) mais aucune explication satisfaisante n'avait pu être donnée. Seules des études expérimentales faites sur des peptides de synthèses, combinées à des modélisations de dynamique moléculaire, ont pu démontrer le rôle de la diméthylation asymétrique de l'arginine comme cause de cette différence (Marichal *et al.*, 2018). Au regard de ces résultats, une ré-analyse des données de protéomique, a par la suite, été entreprise et un enrichissement en arginine diméthylée dans la fraction de protéines adsorbées a bien pu être constaté. Toutefois, l'analyse protéomique ne peut pas, à ce jour, distinguer les diméthylations symétriques et asymétriques. Ainsi, bien qu'extrêmement puissantes, les analyses protéomiques doivent encore être combinées à des études physico-chimiques classiques pour comprendre précisément les mécanismes d'adsorption des protéines.

Bibliographie – Chapitre 6

- **Abdelhamid** M. A., Motomura K., Ikeda T., Ishida T., Hirota R., and Kuroda A. (2014) *Affinity purification of recombinant proteins using a novel silica-binding peptide as a fusion tag*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 5677-5684.
- **Blackwell** E. and Ceman S. (2012) *Arginine methylation of RNA-binding proteins regulates cell function and differentiation*. Mol. Reprod. Dev. 79, 163-175.
- **Caracciolo** G., Farokhzad O. C., and Mahmoudi M. (2017) *Biological Identity of Nanoparticles In Vivo: Clinical Implications of the Protein Corona*. Trends Biotechnol. 35, 257-264.
- **Catalano** F., Alberto G., Ivanchenko P., Dovbeshko G., and Martra G. (2015) *Effect of Silica Surface Properties on the Formation of Multilayer or Submonolayer Protein Hard Corona: Albumin Adsorption on Pyrolytic and Colloidal SiO₂ Nanoparticles*. J. Phys. Chem. C. 119, 26493-26505.
- **Chen** F., Wang G., Griffin J. I., Breneman B., Banda N. K., Holers V. M., Backos D. S., Wu L., Moghimi S. M., and Simberg D. (2017) *Complement proteins bind to nanoparticle protein corona and undergo dynamic exchange in vivo*. Nat. Nanotechnol. 12, 387-393.
- **Devineau** S. (2013) *Adsorption des protéines sur les nanomatériaux Biochimie et physico-chimie d'un nouveau stress*. Thèse de doctorat de l'Université Paris-Sud.
- **Devineau** S., Zargarian L., Renault J. P., and Pin S. (2017) *Structure and Function of Adsorbed Hemoglobin on Silica Nanoparticles: Relationship between the Adsorption Process and the Oxygen Binding Properties*. Langmuir. 33, 3241-3252.
- **Devineau** S., Kiger L., Galacteros F., Baudin-Creuzas V., Marden M., Renault J. P., and Pin S. (2018) *Manipulating hemoglobin oxygenation using silica nanoparticles: a novel prospect for artificial oxygen carriers*. Blood Advances. 2, 90-94.
- **Godon** C., Teulon J. M., Odorico M., Basset C., Meillan M., Vellutini L., Chen S. W., Pellequer J. L. (2017) *Conditions to minimize soft single biomolecule deformation when imaging with atomic force microscopy*. J. Struct. Biol. 197, 322-329.
- **Goobes** R., Goobes G., Campbell C. T., and Stayton P. S. (2006) *Thermodynamics of Statherin Adsorption onto Hydroxyapatite*. Biochem. 45, 5576-5586.
- **Guadagnini** R., Halamoda Kenzaoui B., Walker L., Pojana, G., Magdolenova, Z., Bilanicova D., Saunders M., Juillerat-Jeanneret L., Marcomini A., Huk A., Dusinska M, Fjellsbø L. M., Marano F., and Boland S. (2015) *Toxicity Screenings of Nanomaterials: Challenges due to Interference with Assay Processes and Components of Classic in Vitro Tests*. Nanotoxicology. 9, 13-24.
- **Hunter** C. A. and Tomas S. (2003) *Cooperativity, Partially Bound States and Enthalpy-Entropy Compensation*. Chem. Biol. 10, 1023-1032.
- **Ikeda** T. and Kuroda A. (2011) *Why does the silica-binding protein "Si-tag" bind strongly to silica surfaces? Implications of conformational adaptation of the intrinsically disordered polypeptide to solid surfaces*. Colloids Surf. B Biointerfaces. 86, 359-363.
- **INRS** (2014) *Aide au repérage des nanomatériaux en entreprise*. ED 6174.
- **Jain** V. P. and Tu R. S. (2011) *Coupled folding and specific binding: fishing for amphiphilicity*. Int. J. Mol. Sci. 12, 1431-1450.
- **Järvelin** A. I., Noerenberg M., Davis I., and Castello A. (2016) *The new (dis)order in RNA regulation*. Cell Commun. Signal. 2016; 14:9.
- **Klein** G., Mathé C., Biola-Clier M., Devineau S., Drouineau E., Hatem E., Marichal L., Alonso B., Gaillard J.C., Lagniel G., Armengaud J., Carrière M., Chédin S., Boulard Y., Pin S., Renault J. P., Aude

- J. C., and Labarre J. (2016) *RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts*. *Nanotoxicology*. 10, 1555-1564.
- **Marichal L.**, Renault J. P., Chédin S., Lagniel G., Klein G., Aude J.-C., Tellier C., Armengaud J., Pin S., Labarre J., and Boulard Y. (2018) *Importance of post-translational modifications in the interaction of proteins with mineral surfaces: the case of arginine methylation and silica surfaces*. *Langmuir*. 34, 5312-5322.
 - **Kurtz-Chalot A.**, Villiers C., Pourchez J., Boudard D., Martini M., Marche P. N., Cottier M., Forest V. (2017) *Impact of silica nanoparticle surface chemistry on protein corona formation and consequential interactions with biological cells*. *Mater Sci. Eng. C. Mater Biol. Appl.* 75, 16-24.
 - **Mathé C.**, Devineau S., Aude J.-C., Lagniel G., Chédin S., Legros V., Mathon M.-H., Renault J.-P., Pin S., Boulard Y., and Labarre J. (2013) *Structural Determinants for Protein Adsorption/Nonadsorption to Silica Surface*. *Plos One*. 8, e81346.
 - **Monopoli M. P.**, Aberg C., Salvati A., and Dawson K. A. (2012) *Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials*. *Nat. Nanotechnol.* 7, 779-786.
 - **Orts-Gil G.**, Natte K., Thiermann R., Girod M., Rades S., Kalbe, H., Thünemann A. F., Maskos M., and Österle W. (2013) *On the Role of Surface Composition and Curvature on Biointerface Formation and Colloidal Stability of Nanoparticles in a Protein-Rich Model System*. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 108, 110-119.
 - **Ozdilek B. A.**, Thompson V. F., Ahmed N. S., White C. I., Batey R. T., and Schwartz J. C. (2017) *Intrinsically disordered RGG/RG domains mediate degenerate specificity in RNA binding*. *Nucleic Acids Res.* 45, 7984-7996.
 - **Norde W.** (2008) *My voyage of discovery to proteins in flatland ...and beyond*. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 61, 1-9.
 - **Patwardhan S. V.**, Emami F. S., Berry R. J., Jones S. E., Naik R. R., Deschaume O., Heinz H., and Perry C. C. (2012) *Chemistry of aqueous silica nanoparticle surfaces and the mechanism of selective peptide adsorption*. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 6244-6256.
 - **Pin S.**, Valat P., Cortes R., Michalowicz A., and Alpert B. (1985) *Ligand binding processes in hemoglobin: Chemical reactivity of iron studied by XANES spectroscopy*. *Biophys. J.* 48, 997-1001.
 - **Pin S.**, Alpert B., Congiu-Castellano A., Della Longa S., and Bianconi A. (1994) *X-ray absorption spectroscopy of hemoglobin*. *Methods Enzymol.* 232, 266-292.
 - **Pisani C.**, Gaillard J. C., Odorico M., Nyalosaso J. L., Charnay C., Guari Y., Chopineau J., Devoisselle J. M., Armengaud J., and Prat O. (2017) *The timeline of corona formation around silica nanocarriers highlights the role of the protein interactome*. *Nanoscale*. 9, 1840-1851.
 - **Rimola A.**, Costa D., Sodupe M., Lambert J.-F., and Ugliengo P. (2013) *Silica Surface Features and Their Role in the Adsorption of Biomolecules: Computational Modeling and Experiments*. *Chem. Rev.* 113, 4216-4313.
 - **Schrurs F.** and Lison D. (2012) *Focusing the Research Efforts*. *Nat. Nanotechnol.* 7, 546-548.
 - **Tenzer S.**, Docter D., Kuharev J., Musyanovych A., Fetz V., Hecht R., Schlenk F., Fischer D., Kiouptsi K., Reinhardt C., Landfester K., Schild H., Maskos M., Knauer S. K., and Stauber R. H. (2013) *Rapid Formation of Plasma Protein Corona Critically Affects Nanoparticle Pathophysiology*. *Nat. Nanotechnol.* 8, 772-781.

Chapitre 7 : Protocoles et Méthodes d'Analyse

« Ce n'est pas le but qui est intéressant, ce sont les moyens pour y parvenir. »

George Braque

Le Jour et la Nuit : Cahiers de Georges Braque (1917-1952)

1. Synthèse et caractérisation des nanoparticules de silice

1.1. Synthèse des nanoparticules de silice

Il existe un large éventail de silices de synthèse, ces silices présentant des propriétés variées liées à la méthode de préparation employée (Iler, 1979). Dans le cadre de cette thèse des nanoparticules de silice (SiNPs) sphériques, de diamètres compris entre 10 et 120 nm, non fonctionnalisées ont été utilisées.

Les SiNPs utilisées proviennent de 3 sources :

- LUDOX[®] TM-50 (rèf : 420778, Sigma-Aldrich[®]) : colloïde de SiNPs sphériques monodisperses de 50 nm de diamètre. Le sodium (contre ion stabilisant la suspensions colloïdale) présent est éliminé par de multiples dialyses contre de l'eau déionisée. Du fait de la très haute concentration en silice (500 g/L) la suspension non stabilisée par le sodium va former un gel. Ce gel est dilué dans de l'eau peu avant les expériences puis la solution obtenue est filtrée par un filtre seringue en cellulose de 0,45 µm de porosité (réf : 146561, Dutscher Scientific[®]).
- Suspensions colloïdales de nanosphères de silice monodisperses faites sur mesure en fonction de la taille demandée (Corpuscular Inc., Etats-Unis). Trois lots ont été commandés : 10 nm, 50 nm et 100 nm de diamètre. Ces lots sont nommés MN10, MN50 et MN100. La synthèse de ces SiNPs est basée sur la méthode de Yokoi (Yokoi *et al.*, 2006). Voir ci-après pour plus de détails sur la synthèse de SiNPs.
- Nanopoudre de dioxyde de silice (99,5% de pureté, réf : 637238, Sigma-Aldrich[®]). Une fois resuspendue dans de l'eau, ce sont des nanoparticules polydisperses agrégées de taille moyenne égale à 26 ± 4 nm et de surface spécifique égale à $170 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Ces objets ont été caractérisés profondément auparavant (Mathé *et al.*, 2013).

En 1968, Stöber *et al.* (1968) mirent au point la première synthèse de nanoparticules inorganiques monodisperses, des particules de silice de quelques centaines de nanomètres de diamètre. Si cette

synthèse est encore très utilisée aujourd'hui, elle connaît tout de même certaines limitations. En effet, elle permet de préparer des sphères de silice très monodisperses, mais la taille minimale permise reste de l'ordre de 200 à 250nm. En-deçà, la polydispersité de la distribution obtenue augmente fortement.

Afin d'obtenir des nanoparticules de silice de taille inférieure, une nouvelle voie de synthèse a été développée (Yokoi *et al.* 2006). L'hydrolyse de l'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS) y est catalysée par un acide aminé, la lysine, dans un milieu diphasique. Cette synthèse a été optimisée pour permettre l'obtention de particules de tailles comprises entre 15 et 200 nm (Hartlen *et al.* 2008), grâce à une procédure en deux étapes. Les germes, d'environ 10 nm de diamètre, sont d'abord formés selon la synthèse de Yokoi, en remplaçant toutefois la lysine par un autre acide amine, l'arginine. Ceci permet une meilleure robustesse de la synthèse. Une recroissance est ensuite réalisée selon la méthode de Stöber, pour obtenir des particules de tailles supérieures (jusqu'à 500 nm), tout en conservant une excellente monodispersité.

1.2. Microscopie électronique en transmission

Des images de SiNPs ont été obtenues par microscopie électronique à transmission (TEM pour Transmission Electron Microscopy). Les dépôts d'échantillon ont été faits sur des films de carbone avec un maillage en Cuivre de 200 mailles (AGS160H, Agar Scientific Ltd, Royaume-Uni). 5 μL de solution diluée 1000 fois ($\approx 10 \text{ mg.L}^{-1}$) est déposé sur le film puis la goutte est buvardée. Les particules adsorbées sur le film sont ensuite observées sur un microscope électronique Philips CM12 (Philips, Pays-Bas) réglé à 80 kV avec un grandissement nominal de 35000.

Les images ont été traitées en utilisant le logiciel ImageJ. Pour chaque échantillon, les longueurs maximales et minimales de plusieurs dizaines de SiNPs ont été mesurées. La moyenne des longueurs de toutes les SiNPs échantillonnées a ensuite été utilisé pour le calcul du rayon moyen.

1.3. Diffusion des rayons X aux petits angles

La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS pour Small Angle X-ray Scattering) permet d'étudier les propriétés structurales des nano-objets en se basant sur l'interaction élastique des photons avec le nuage électronique. La variation d'intensité diffusée, I , est mesurée en fonction du vecteur d'onde de diffusion, q , qui est relié à l'angle de diffusion, θ , et à la longueur d'onde, λ , du faisceau incident (Eq. 7-1) :

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (\text{Eq. 7-1})$$

Les mesures ont été réalisées sur l'équipement Xeuss 2.0. du Laboratoire Léon Brillouin (CEA-CNRS) situé au CEA Saclay (France). Quatre échantillons de SiNPs ont été analysés : 3 SiNPs fournies par Corpuscular (MN10, MN50 et MN100) et les LUDOX TM-50. Pour chaque échantillon, 50 µL de solution concentrée à 2 g.L⁻¹ (dilué dans de l'eau pure) a été mis dans des capillaires en Kapton placés sur un passeur d'échantillons. Les paramètres de réglage de l'appareil ont été les suivants : distance échantillon/détecteur = 249,5 cm, longueur d'onde du faisceau incident = 1,54 Å, diamètre du faisceau = 0,6 mm, et durée d'acquisition = 10 minutes. Les contributions du capillaire vide, de l'eau, et du bruit de fond ont été soustraites par des traitements standards des spectres de diffusion afin d'obtenir des intensités absolues. Le calcul du rayon physique, R, a été fait en appliquant un modèle de facteur de forme de sphère (Guinier et Fournet, 1955). L'équation 7-2 correspond à l'intensité mesurée dans le cas du modèle d'une sphère avec V le volume de la sphère, R son rayon, et Δρ la différence entre la densité de longueur de diffusion électronique de la sphère et du solvant.

$$I(Q) = \frac{\text{fraction volumique}}{V} * \left[3V(\Delta\rho) \cdot \frac{\sin(QR) - (QR)}{(QR)^3} \right]^2 + \text{bruit de fond} \quad (\text{Eq. 7-2})$$

1.4. Diffusion de neutrons aux petits angles

La diffusion de neutrons aux petits angles (SANS pour Small Angle Neutron Scattering) permet d'étudier des structures dont les tailles sont comprises entre un et quelques centaines de nanomètres à partir de l'interaction entre des neutrons de faible énergie et les noyaux de l'échantillon. Comme pour la diffusion des rayons X (§ 1.3.) la variation d'intensité diffusée, I, est mesurée selon l'équation 7-1.

Les mesures ont été réalisées sur le spectromètre PAXY au Laboratoire Léon Brillouin (CEA-CNRS), sur le réacteur Orphée à Saclay. La longueur d'onde des neutrons incidents a été fixée à 4,6 ou 12 Å et plusieurs distances échantillon/détecteur ont été utilisées afin de couvrir une gamme de q allant de 0,0025 à 0,4 Å⁻¹.

Tous les échantillons de protéines, de SiNPs LUDOX, et de mélanges ont été dilués dans du tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹ (ajout de MgCl₂ à 10 mmol.L⁻¹ pour les protéines HbC1 et HbAm). Les échantillons de protéines seules sont concentrés à 10 g.L⁻¹ tandis que les LUDOX sont concentrés à 50 g.L⁻¹. Pour les mélanges la concentration en LUDOX est également fixée à 50 g.L⁻¹ mais la concentration en protéines varient de 2 à 20 g.L⁻¹ selon la quantité de protéines adsorbées souhaitée.

Toutes les expériences de SANS faites ici visent à étudier la structure de la couronne de protéines formée à la surface des SiNPs. Deux approches ont été effectuées pour cela. La 1^{ère} approche vise à

optimiser la diffusion des protéines et des LUDOX afin d'obtenir des spectres avec le meilleur contraste. Pour ce faire les échantillons ont été placés en solution aqueuse contenant 100% de D₂O. L'eau deutérée présente l'avantage de produire une diffusion incohérente des neutrons 40 fois inférieure à celle de l'eau hydrogénée. Le rapport signal/bruit s'en trouve donc fortement amélioré.

Les échantillons d'hémoprotéines et de LUDOX ont donc été préalablement dialysés à deux reprises pendant 3h dans 20 volumes de solution deutérée tamponnée par du phosphate 0,1 mol.L⁻¹ à pD = 7,4. Cette valeur de pD correspond à un pH de 7. La relation entre pH et pD est :

$$pD = 0,929 * pH + 0,42 \quad (\text{Eq. 7-3, Krężel et Bal, 2003})$$

Une 2^{ème} approche a été suivie. Cette approche vise à moduler le ratio D₂O/H₂O afin d'être dans la condition où la densité de longueur de diffusion neutronique (ρ) du solvant est la même que celle de la silice. Le but est de faire disparaître le signal de diffusion de la silice. Ainsi, seule la diffusion des protéines (libres en solution et adsorbées) contribue au spectre de diffusion mesuré. La longueur de diffusion (SLD) de la silice SiO₂ est de $3,48 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$. Afin d'obtenir une SLD identique le ratio D₂O/H₂O doit être de 60%/40%. Des échantillons correspondant aux mêmes concentrations que pour la 1^{ère} approche ont donc été préparés avec ce ratio D₂O/H₂O.

Les échantillons sont préparés puis placés dans des cuves en quartz Suprasil de 2 mm (800 μ L) ou 1 mm (400 μ L) utilisées respectivement pour les échantillons 100% deutérés et 60% deutérés. Ces cuves sont ensuite placées sur un passeur d'échantillon thermostaté à 20°C.

Pour chaque échantillon, quatre configurations (longueur d'onde du faisceau incident et distance échantillon/détecteur) ont été nécessaires afin de couvrir une grande gamme de q . Les données de diffusion ont ainsi été acquises pendant 1h pour chaque configuration sur un détecteur anisotrope possédant 32 tubes de détection à He³. Les données brutes ont ensuite toutes été traitées de la même façon : (1) intégration angulaire des spectres 2D à partir de la position du faisceau incident, (2) soustraction du signal d'une cuve de quartz vide et du bruit de fond, (3) normalisation des hétérogénéités de réponse du détecteur par la courbe d'un échantillon de référence (eau), (4) fusion des différentes configurations, (5) soustraction de la diffusion incohérente.

Le traitement des données brutes a été effectué sur le logiciel PASiNET tandis que l'analyse des données a été faite sur l'application SasView (<http://www.sasview.org>). Sur ce dernier logiciel le rayon de giration (R_g) des protéines a été mesuré à partir de la représentation de Guinier ($\ln(I) = f(q^2)$, Guinier et Fournet, 1955). Comme en SAXS le rayon des SiNPs LUDOX a été mesuré par le modèle de sphère (§

1.4.). Enfin la fonction de distribution des distances interatomiques de Hb a été obtenue en utilisant le logiciel GNOM (Svergun, 1992).

1.5. Diffusion dynamique de la lumière

La taille des macromolécules (ici protéines et SiNPs) a été mesurée par diffusion dynamique de la lumière (DLS pour Dynamic Light Scattering). Le principe de la DLS est de mesurer les fluctuations de la lumière diffusée par les nano-objets dues aux mouvements browniens. Le coefficient de diffusion D ainsi mesuré par DLS ne dépend que de la température du milieu et de la taille de l'objet hydraté (équation de Stokes Einstein, (Eq. 7-4). En connaissant la température T et la diffusion D , le rayon hydrodynamique R_H est accessible.

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (\text{Eq. 7-4})$$

Les mesures sont faites à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Royaume-Uni). Toutes les solutions analysées ont une concentration de 1 g.L^{-1} dans du tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ à pH 7 (ajout de MgCl_2 10 mmol.L^{-1} dans le cas de HbC1 et HbAm). Concrètement, 1 mL d'échantillon est placé dans une cuve de spectroscopie de 1 cm d'épaisseur en PMMA. Un laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$) est ensuite dirigé vers l'échantillon et l'intensité du rayon diffusé est mesurée par un capteur situé à un angle fixe (généralement 173°). L'intensité du rayon diffusé est suivie sur un intervalle de plusieurs secondes (d'où le nom de diffusion dynamique) et ce sont les fluctuations mesurées qui permettent de quantifier les mouvements browniens. Les fluctuations de la lumière diffusée sont ensuite corrélées au coefficient de diffusion (donc au rayon hydrodynamique) par la méthode des cumulants dans le cas des objets monodisperses et par la méthode des NNLS (Non-Negative Least Squares) pour des échantillons polydisperses. Le calcul de R_H nécessite de connaître l'indice de réfraction des éléments en solution. L'indice de réfraction choisi pour le tampon fut celui de l'eau à 25°C ($n = 1,33$). L'IR de la silice est de $1,475$ et l'IR des protéines est de $1,45$.

1.6. Charge de surface

Une information importante dans la caractérisation complète des nano-objets est la mesure de la charge de surface. Cette caractéristique fondamentale pour le devenir du nano-objet dans les milieux biologiques est généralement quantifiée par le potentiel Zêta (ζ). Ce potentiel ζ peut être estimé en tenant compte du fait que les nano-objets chargés se déplacent de façon contrôlée lorsqu'un champ électrique est appliqué.

Le potentiel ζ permet de connaître la charge du plan de cisaillement, c'est-à-dire de la zone située entre la couche de Stern et la couche de diffuse. Il dépend de la charge de surface, du pH, des espèces en solution et de la force ionique qui influence l'épaisseur de la couche de Stern (fig. 7-1).

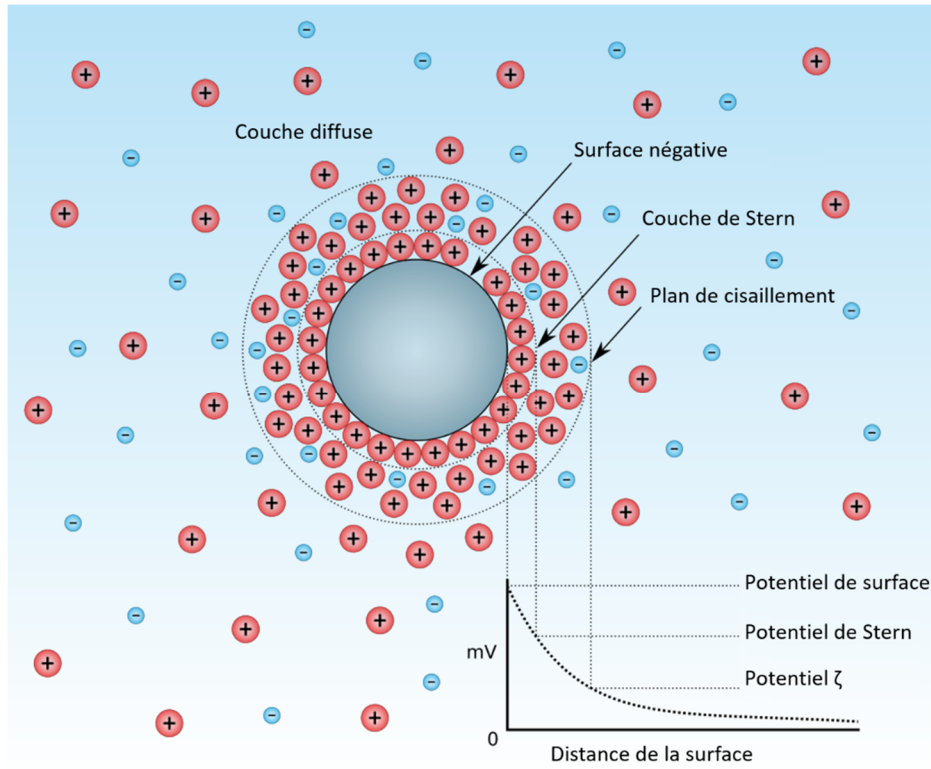


Figure 7-1 : Répartition des charges situées à la surface d'une particule sphérique négativement chargée. Les cations sont en rouge et les anions en bleu. Le potentiel ζ est la mesure du potentiel électrocinétique de la zone située entre la couche de Stern et la région diffuse contenant les ions non liés à la particule.

L'évaluation du potentiel ζ repose sur l'électrophorèse par laser Doppler. Placés sous un champ électrique, les nano-objets chargés se déplaceront dans le sens opposé à leur charge selon l'équation 7-5, avec \vec{v} la vitesse dépendant du champ électrique \vec{E} et de leur mobilité électrophorétique μ_e .

$$\vec{v} = \mu_e \cdot \vec{E} \quad (\text{Eq. 7-5})$$

La mobilité électrophorétique ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) est reliée au potentiel ζ (V) par l'approximation de l'équation de Henry valable pour des particules sphériques (Eq. 7-6). La viscosité η de la solution apparaît car, lorsqu'une particule entre en mouvement, une force de friction de sens opposé à la force électrique et dépendant de la viscosité du milieu s'applique.

$$\zeta = \frac{3 \cdot \mu_e \cdot \eta}{2 \cdot \varepsilon \cdot f(ka)} \quad (\text{Eq. 7-6})$$

Avec :

- η la viscosité de la solution (Pa.s) ($\approx 8,9.10^{-4}$ Pa.s pour l'eau à 25°C)
- ε la constante diélectrique du milieu ($\approx 80 \text{ C}^2.\text{N}^{-1}.\text{m}^{-2}$ pour l'eau à 25°C)
- $f(\kappa a)$ la fonction de Henry 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 $\kappa a \ll 1$ quand l'épaisseur de la couche diffuse est importante devant celle des particules, ce qui se traduit par $f(\kappa a) = 1$, et $\kappa a \gg 1$ lorsque l'épaisseur de la couche diffuse est négligeable devant la taille des particules, ce qui se traduit par $f(\kappa a) = 3/2$. Ces deux formes limites correspondent respectivement aux modèles de Hückel (Eq. 7-7) et de Smoluchowski (Eq. 7-8). Nous avons utilisé le modèle de Smoluchowski (ISO 13099-2:2012) qui s'applique aux solutions ayant une concentration moyenne en électrolytes (Hunter, 1981).

$$\zeta = \frac{3 \cdot \mu_e \cdot \eta}{2 \cdot \varepsilon} \quad (\text{Eq. 7-7})$$

$$\zeta = \frac{\mu_e \cdot \eta}{\varepsilon} \quad (\text{Eq. 7-8})$$

Le Zetasizer Nano ZS permet de mesurer la taille (DLS) et d'estimer le potentiel ζ (Zétamétrie) de nano-objets en solution. Les mesures sont réalisées à des concentrations comprises entre 0,01 et 1 g.L⁻¹, dans différents tampons (phosphate, Bis-Tris, à pH 6 et 7). Les valeurs données sont la moyenne de 4 mesures.

1.7. Spectroscopie infrarouge

Afin de contrôler la pureté chimique des SiNPs, des analyses de spectroscopie infrarouge ont été faites. Après dessiccation à 90°C de la suspension colloïdale étudiée, les cristaux obtenus sont broyés finement et incorporés à de la poudre de bromure de potassium (KBr) à hauteur de 1% m/m. Le KBr a été placé au préalable dans une étuve à 60°C afin d'assurer l'absence d'eau dans la poudre. Le mélange est ensuite placé sous une presse qui, avec une pression de 10 tonnes, va former une fine pastille translucide d'1 cm de diamètre. Les spectres d'absorption infrarouge sont classiquement enregistrés en transmission entre 4000 et 400 cm⁻¹ avec une résolution de 4 cm⁻¹ en accumulant 100 acquisitions, à l'aide d'un spectromètre Tensor 27 FT-IR (Bruker Optics). Le spectre d'une pastille de KBr pur est systématiquement soustrait. Les données sont ensuite traitées et exportées à l'aide du logiciel OPUS.

2. Purification et caractérisation des hémoprotéines

2.1. Myoglobine

La metmyoglobine (Mb) extraite du cœur de cheval a été acquise sous forme lyophilisée auprès de Sigma-Aldrich® (Réf : 100684-32-0). La réhydratation se fait en ajoutant, par petites quantités, 50 mg de poudre de Mb dans 1 mL d'eau désionisée. À partir de ce moment et jusqu'à l'étape expérimentale, la Mb (comme toutes les protéines utilisées) est constamment conservée à une température de 4°C. La Mb solubilisée est placée dans une membrane de dialyse Spectra/Por®3 (seuil de rétention de 3,5 kDA, Spectrum Labs). Trois dialyses successives dans 100 volumes d'eau sont effectuées en 24 h. L'objectif des dialyses est double : éliminer les sels et les conservateurs contenus dans le lyophilisat (l'azide notamment) et laisser le temps à la Mb de se replier dans sa structure native.

La solution de Mb est ensuite centrifugée (20000 g, 10 min, 4°C) afin d'éliminer les protéines encore agrégées ou précipitées. La concentration en myoglobine est finalement mesurée par spectrophotométrie. Le coefficient d'extinction molaire de la metmyoglobine que nous avons utilisé, est 3500 L.mol⁻¹.cm⁻¹ à 623 nm (Antonini et Brunori 1971).

2.2. Hémoglobine

L'oxyhémoglobine de porc (Hb) est extraite à partir de sang de porc frais provenant des Établissements Guy Harang à Houdan suivant l'autorisation d'utilisation de sang de porc à des fins de recherche délivrée par la Direction Départementale de la Protection des Personnes de l'Essonne (Courcouronnes). L'extraction et la purification de l'Hb a été effectuée selon la méthode de Perutz (Perutz, 1968) modifiée.

Directement après la collecte et pour le transport, une solution anticoagulante (acide citrique 4.8g/L, citrate de sodium 13.2g/L et glucose 14.7g/L) est ajoutée au sang de porc (1v/4v). À l'arrivée au laboratoire, le sang est immédiatement centrifugé (4000 g, 5 min, 4°C) et le surnageant contenant les lipides est éliminé par aspiration sous vide. Une solution de chlorure de sodium (9 g/L) est diluée dans le culot (1v/4v) et, après agitation manuelle et homogénéisation, le culot globulaire est centrifugé (4000 g, 5 min, 4°C). Le surnageant est aspiré sous vide et le culot globulaire est gardé. Ce lavage est répété 4 fois. Les hématies sont ensuite hémolysées par choc osmotique en ajoutant de l'eau désionisée dans le culot globulaire lavé (1v/3v). Les membranes des hématies sont précipitées par ajout de tampon phosphate 2,8 M pH 7 dans la solution d'hématies hémolysés (1v/9v). La solution est alors centrifugée (24000 g, 20 min, 4°C.) et le culot contenant les membranes est éliminé.

Le surnageant contenant l'hémoglobine est placé dans une membrane de dialyse Spectra/Por®3 (seuil de rétention de 3.5 kDA, Spectrum Labs) et mis à dialyser. Quatre dialyses successives dans 30 volumes d'eau sont effectuées en 24 h pour éliminer tous les sels en solution. La solution d'hémoglobine est alors centrifugée (20000 g, 10 min, 4°C) afin d'éliminer l'hémoglobine précipitée. Le 2,3-disphosphoglycérate, effecteur de l'hémoglobine qui diminue son affinité pour l'oxygène, est éliminé après passage de la solution d'hémoglobine sur une colonne désionisante contenant la résine AG®501-X8 (Bio-Rad) (Jelkmann et Bauer, 1976). La concentration est mesurée par spectrophotométrie. Le coefficient d'extinction molaire de l'oxyhémoglobine que nous avons utilisé est $15150 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 576 nm (Banerjee *et al.*, 1969). La solution d'hémoglobine purifiée est conservée à 4°C dans des flacons remplis et étanches afin de conserver la forme oxygénée de l'hémoglobine

Afin de vérifier la pureté des solutions d'hémoglobine de porc, trois échantillons (solutions purifiées d'hémoglobine de porc de 10 jours et de 2 mois et sang de porc de 10 jours) ont été confiés au docteur Stéphane Moutereau du Laboratoire du Globule Rouge (Département de Biochimie-Biologie Moléculaire-Pharmacologie-Génétique Médicale, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Créteil). Nos trois échantillons ont été passés en isoélectrofocalisation (Fig. 7-2 dans laquelle tous les résultats sont donnés sans post-traitement) en même temps que des échantillons sanguins de patients pour lesquels sont dépistées d'éventuelles hémoglobines anormales (Fig. 7-2). La migration de l'hémoglobine mutée C (Glu→Lys) a été donnée à titre d'exemple (échantillon 1420). Nous pouvons observer que notre solution d'Hb de 10 jours (échantillon F34) présente 2 bandes une majoritaire et une minoritaire et que notre solution d'Hb de 2 mois (échantillon V35) présente aussi ces 2 bandes mais avec la bande minoritaire plus marquée. Le sang de 10 jours (échantillon X33) présente 3 bandes, les 2 bandes observées dans les solutions d'Hb avec la bande minoritaire encore plus marquée et une troisième bande. Ce profil a aussi été observé avec un échantillon de sang de porc d'une dizaine de jours provenant de Ecole Nationale Vétérinaire de Maison-Alfort (ENVMA) (Fig. 7-2 échantillon PIG). Notre purification élimine donc complètement la troisième bande et partiellement la bande minoritaire. Notons que les praticiens hospitaliers observent classiquement ce type de profil à 2 bandes pour l'hémoglobine humaine normale (1407 et 1530)) et donnent à la bande minoritaire le nom de "*hémoglobine vieillie*".

À la vue de ces résultats, il apparaît que même si l'hémoglobine de porc est un peu plus acide que l'hémoglobine humaine, la différence de charge reste faible. Par ailleurs, nous savons qu'une solution fraîche d'hémoglobine humaine est constituée de plusieurs composantes qui peuvent être séparées par chromatographie échangeuse d'ions et que ces composantes peuvent varier avec l'âge de la

solution en termes de nombre de composantes et quantités relatives des composantes (Pin *et al.*, 1990).

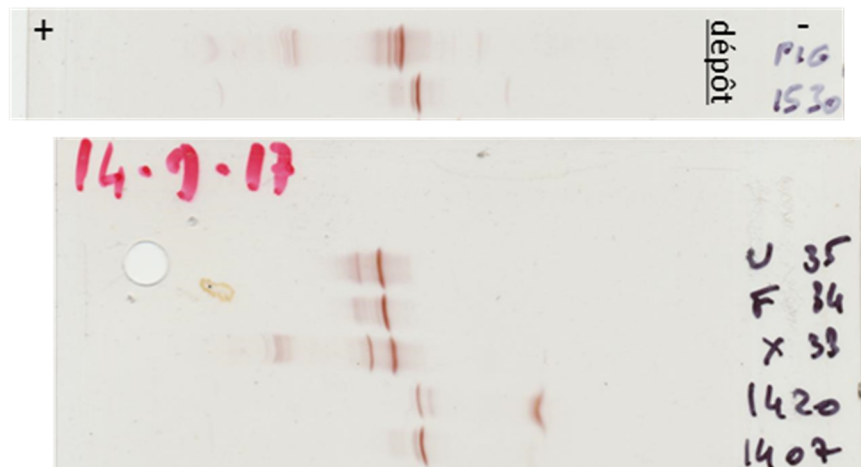


Figure 7-2 : Isoélectrofocalisation de 7 échantillons pendant 2 expériences indépendantes :

- Hémoglobine humaine normale : échantillons 1407 et 1530
- Hémoglobine humaine normale et hémoglobine mutée C : échantillon 1420
- Hb de porc de 10 jours : échantillon F34
- Hb de porc de 2 mois : échantillon V35
- Sang de porc de l'ENVMA : échantillon PIG
- Sang de porc de 10 jours : échantillons X33

Pour conclure sur ce paramètre de pureté des solutions, seules des solutions d'hémoglobine de porc fraîchement purifiées ont été utilisées et, en aucun cas, des solutions dépassant 15 jours après la purification. Cette manière de travailler a été étendue à toutes les solutions d'hémo protéines utilisées durant la thèse.

2.3. Hémoglobines extracellulaires d'annélides

Les annélides possèdent la particularité d'avoir des hémoglobines extracellulaires de très haut poids moléculaire (Zal et Rousselot, 2014). Afin de compléter la gamme des hémoglobines de tailles différentes, deux d'entre elles ont été choisies : l'hémoglobine extracellulaire cœlomique de *Riftia pachyptila* (HbC1) et l'hémoglobine extracellulaire sanguine d'*Arenicola marina* (HbAm).

Le cœlome de *Riftia pachyptila* provient d'une campagne de collecte d'échantillons menée en 2011 dans l'océan Atlantique. Il a depuis été stocké à -80°C à la Station Biologique de Roscoff. Le sang d'*Arenicola marina* provient de collectes de spécimens faites sur les plages à proximité de la Station Biologique de Roscoff en 2016 et 2017. Au laboratoire, j'ai disséqué les animaux juste après la collecte pour aspirer le sang frais dans les vaisseaux principaux.

Du fait de leur grande taille et de leur présence en grande quantité dans le sang et le coelome, la purification des protéines est grandement facilitée. En effet, après deux centrifugations (20000 g, 10 min, 4°C) effectuées afin d'éliminer les contaminants de la collecte et les déchets de dissection, le traitement des liquides par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) permet de séparer la protéine d'intérêt des protéines contaminantes. Une colonne Superose 6 Increase 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) a été utilisée dans un système FPLC ÄKTA. La colonne Superose 6 permet de séparation de protéines de très haut poids moléculaire (5 à 5000 kDa).

Sur la figure 7-3 sont représentés les profils d'élution du coelome de *R. pachyptila* et du sang d'*A. marina* contenant respectivement HbC1 et HbAm. L'absorbance à 414 nm (rouge) indique la présence d'hémoprotéines tandis que celle à 280 nm (bleu) indique la présence de toutes les protéines. On observe qu'une nette majorité des protéines présentes dans l'échantillon sont des hémoprotéines. Les pics principaux, correspondants aux protéines d'intérêt, sont compris entre 28 et 34 min pour HbC1 et entre 20 et 27 min pour HbAm. Les autres pics d'hémoprotéines présents sont des sous-unités de protéines. En particulier, pour HbAm, on peut observer un pic à 32 minutes qui correspond aux protomères de HbAm (1/12^{ème} de la protéine, voir chapitre 2, § 2.8.).

Les fractions correspondantes aux pics d'intérêts sont alors récupérées. Le passage sur colonne diluant fortement la concentration en protéines (environ 20 fois), les fractions sont réunies et mises dans des filtres à centrifuger Amicon® Ultra-4 Ultracel-30K. La centrifugation (4000 g, 4°C) provoque la concentration de la solution en retenant les protéines d'intérêt et en laissant passer l'eau (seuil de rétention de 30 kDa). La centrifugation est arrêtée quand la concentration finale de 1 mmol.L⁻¹ de globines est atteinte. Afin de vérifier la pureté de l'échantillon concentré, un aliquote de HbAm a été passé en chromatographie (Fig. 7-3 c). L'élimination des impuretés (protéines contaminantes et sous-unités de HbAm) est confirmée.

La quantification des hémoglobines HbC1 et HbAm se fait par spectrophotométrie UV-visible. D'après des mesures faites par ICP-MS (Chapitre 2, § 3.6.), il a été montré que les profils d'absorption de la lumière sont très proches au niveau du pic du Soret. Les coefficients utilisés à 414 nm sont donc 170000 L.mol⁻¹.cm⁻¹ pour HbC1 et à 160000 L.mol⁻¹.cm⁻¹ pour HbAm.

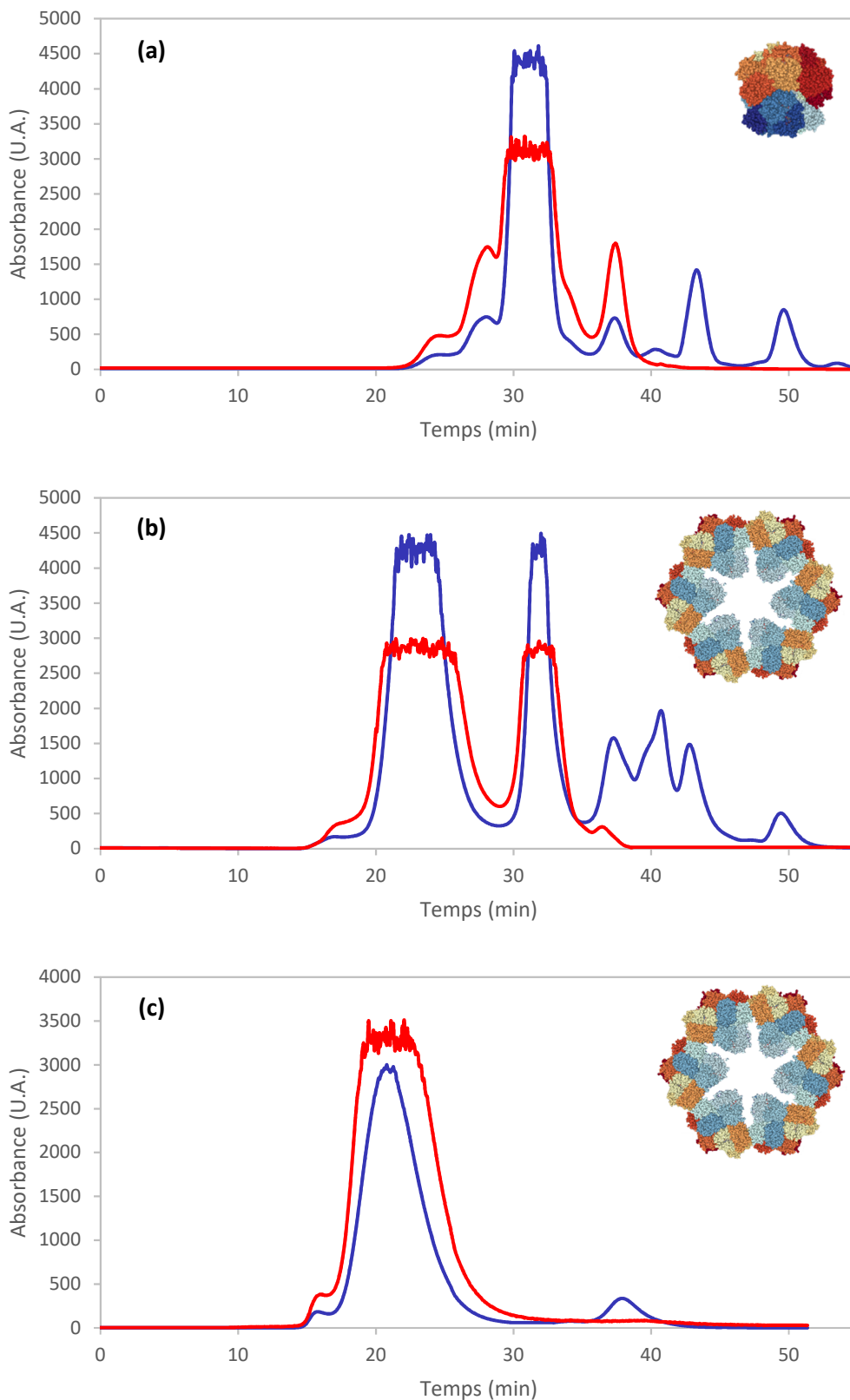


Figure 7-3 : Chromatographies d'exclusion sérique sur colonne Superose 6 faites en tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ + MgCl_2 10 mmol.L^{-1} , pH 7. Profils d'élution du cœlome de *R. pachytila* (a), du sang d'*A. marina* (b), et de la solution de HbAm issue de la purification du sang d'*A. marina* (c). Absorbance suivie à 280 nm (bleu) et à 414 nm (rouge).

2.4. Spectrophotométrie UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible des hémoprotéines ont été mesurées par un spectrophotomètre à double faisceaux UV-2600 (Shimadzu, Japon). Les spectres sont classiquement mesurés de 350 à 700 nm. Un blanc est systématiquement effectué avec le tampon utilisé pour les dilutions (phosphate 0,1 mol.L⁻¹ à pH 6 ou 7 généralement).

Le spectrophotomètre UV-visible a également été utilisé pour les dosages protéiques par la méthode de Bradford. Cette méthode consiste à suivre par colorimétrie la complexation du bleu de Coomassie sur les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) présents dans les protéines. Après 5 minutes de mise en contact d'une solution diluée de protéine et du bleu de Coomassie, l'absorbance à 595 nm est mesurée (pic du complexe formé). Pour le dosage des hémoprotéines, cette longueur d'onde ne pose pas de problème car, aux concentrations en protéines mesurées (< à 0,01 mg.mL⁻¹), l'absorption à cette longueur d'onde de la protéine est négligeable. Une gamme étalon avec une solution protéique de concentration massique connue est nécessaire. Ici la metmyoglobine Mb a été utilisée comme étalon.

2.5. ICP-MS

La spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) a été utilisée afin de déterminer la quantité de fer présent dans des solutions d'hémoprotéines. Cette quantité de fer a ensuite permis d'établir les coefficients d'extinction molaire des hémoglobines extracellulaires HbC1 et HbAm. L'ICP-MS a été faite sur un iCAP Q (Thermo Scientific™). Les solutions d'hémoprotéines ont été diluées 1000 fois avec une solution d'acide nitrique à 2 % et l'ajout d'un standard de fer (Certiprep) a été fait afin de faire un dosage par ajout dosé plus précis qu'un dosage classique.

Les échantillons sont ensuite placés dans le circuit d'ICP-MS. Ils passent d'abord dans une cellule de collision KED (Kinetic Energy Discrimination). Le KED évite la ré-association du fer qui peut se faire après ionisation. Les échantillons sont ensuite ionisés à l'aide d'une torche au plasma puis sont analysés par spectrométrie de masse. Afin de tenir compte des variations de température une calibration interne (solution de cobalt à 1 ppb) est également appliquée durant l'expérience.

3. Techniques de mesure des interactions protéines/nanoparticules

3.1. Isotherme d'adsorption par déplétion

3.1.1. Principe

Un isotherme d'adsorption représente la quantité de protéines adsorbées en fonction de la concentration de protéines libres en solution. Ici la méthode par déplétion est appliquée (Devineau *et al.* 2017). La quantité de protéines adsorbées est déterminée par la différence entre la concentration mesurée dans une solution protéique sans SiNPs et celle mesurée dans le surnageant de la solution contenant la même quantité de protéines et des SiNPs. La méthode par déplétion est plus adaptée ici car elle permet d'éliminer deux sources d'erreurs. D'une part, la quantification se fait généralement par spectroscopie (voir ci-après), dont les résultats peuvent être influencés par la présence de SiNPs. D'autre part, la séparation des fractions de protéines adsorbées et libres en solution se fait par centrifugation. Or la resuspension des SiNPs culotées peut être délicate et une partie des protéines adsorbées peut rester sur la paroi du tube.

Afin de tracer un isotherme d'adsorption, 10-12 points expérimentaux sont généralement nécessaires. Les points reliés forment classiquement une hyperbole passant par l'origine et se terminant par une asymptote. Il est convenu que l'adsorption de protéines modèles sur des surfaces peut être modélisée mathématiquement par le modèle de Langmuir (Langmuir, 1918). Le modèle d'isotherme de Langmuir est un modèle à deux paramètres, valable dans le cas d'une solution diluée, lorsque les molécules adsorbées forment une monocouche et n'interagissent pas entre elles. Les deux paramètres sont la quantité maximale de protéines adsorbables à la surface des SiNPs (m_{∞}) qui correspond à la valeur de l'asymptote, ainsi que la constante d'adsorption (K_{ads}) qui correspond à la pente à l'origine et est proportionnelle à l'affinité de la protéine pour la nanoparticule. Ces deux paramètres sont reliés mathématiquement dans le modèle de Langmuir par l'équation suivante :

$$m_{ads} = \frac{m_{\infty} \cdot K_{ads} \cdot C}{1 + K_{ads} \cdot C} \quad (\text{Eq. 7-9})$$

Avec m_{ads} la quantité de protéines adsorbées ($\text{mg} \cdot \text{m}^{-2}$) et C la concentration en protéines libres ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).

L'ajustement du modèle de Langmuir 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 du modèle de Langmuir (Eq. 7-10)
- par régression non linéaire en minimisant la somme du carré des erreurs SCE (Eq. 7-11)

- par régression non linéaire en minimisant la somme du carré des erreurs relatives SCER (Eq. 7-12)

$$\frac{c}{m_{ads}} = \frac{c}{m_{\infty}} + \frac{1}{m_{\infty} K_{ads}} \quad (\text{Eq. 7-10})$$

$$SCE = \sum_{i=1}^p (m_{ads} - m_{ads}^{calc})^2 \quad (\text{Eq. 7-11})$$

$$SCER = \sum_{i=1}^p \left[\frac{(m_{ads} - m_{ads}^{calc})^2}{m_{ads}} \right] \quad (\text{Eq. 7-12})$$

La régression non linéaire par minimisation du SCER permet généralement un meilleur ajustement comme cela a été observé pour d'autres systèmes (Ho *et al.* 2002). C'est cette dernière méthode qui a donc été choisie.

3.1.2. Hémoprotéines

Dans le cas de l'étude des interactions hémoprotéines/SiNPs, chacune de quatre hémoprotéines a été mise en contact avec des SiNPs monodisperses MN10, MN50, MN100 (Corpuscular Inc.), ou LUDOX® TM-50 (Sigma-Aldrich). La concentration en SiNPs est fixée à 1 g.L⁻¹ et la concentration en protéines varie de 0,01 à 3 g.L⁻¹. Les tampons de dilution utilisés sont du tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹ à pH 6 ou pH 7 ainsi que du tampon Bis-Tris 0,1 mol.L⁻¹ à pH 7. Pour les isothermes de HbC1 et HbAm, le tampon contient également du chlorure de magnésium (10 mmol.L⁻¹) afin de garder la stabilité structurale des protéines (Chapitre 2, § 2.9.). Après mélange, les solutions sont agitées doucement sur une roue pendant 1h à température ambiante (20-25°C) puis centrifugées à 50000 g pendant 15 min (centrifugeuse Heraeus Biofuge Stratos™) afin de séparer les NPs avec les protéines adsorbées du surnageant contenant les protéines libres. Cette vitesse de centrifugation s'est avérée nécessaire afin de faire culotter les SiNPs monodisperses qui sont extrêmement stables.

Le dosage des hémoprotéines s'effectue ensuite par dosage spectrophotométrique UV-visible à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceaux UV-2600 (Shimadzu, Japon). Les longueurs d'ondes caractéristiques et les coefficients d'extinction molaires sont indiqués dans le chapitre 2, § 3.6. La quantité de protéines adsorbées est ensuite exprimée en mg.m² de SiNPs à partir d'une surface spécifique calculée avec le rayon physique R de chaque SiNPs. La surface est plus appropriée que la masse des NPs car leur réactivité est avant tout liée à leur grande surface spécifique (Oberdörster *et al.* 2005).

3.1.3. Extraits protéiques de levure

Les isothermes d'adsorption des extraits protéiques ont été effectués par traçage radioactif. Il s'agit également d'isotherme par déplétion. Seule la méthode analytique de quantification des protéines totales et libres change. Aussi, une étape de marquage radioactif est effectuée au préalable.

La souche de levure utilisée est la souche S288c (voir § 4.1. pour le génotype). Les cellules sont cultivées sous agitation à 30°C dans 50 mL de milieu de culture minimum jusqu'à une concentration cellulaire de $2 \cdot 10^7$ cellules.mL⁻¹ (phase de croissance exponentielle). Les cellules sont ensuite isolées par centrifugation et resuspendues dans un milieu sans sulfate pendant 30 min (milieu minimum tel que décrit par Baudouin-Cornu *et al.*, 2009). Les cellules sont ensuite marquées en ajoutant 1 à 2 mCi de méthionine-³⁵S pendant 30 min. Dans ces conditions la quasi-totalité du ³⁵S est utilisée pour la synthèse protéique et la quantité de ³⁵S accumulée dans les métabolites est inférieure à 1%. L'extrait protéique est ensuite préparé de la même façon que l'extrait non marqué (§ 4.4.) mais pour un volume de 20 mL et avec un cassage des cellules utilisant des microbilles. Au final, environ 0,3 mL de solution est obtenue avec une concentration en protéines solubles de 2 g.L⁻¹ et une activité de 2 Ci.L⁻¹. Les protéines marquées au ³⁵S sont ensuite mélangées à de l'extrait non marqué afin d'obtenir la concentration en protéines et l'activité nécessaire.

L'extrait cellulaire des protéines solubles de levure ainsi marqué est ensuite dilué dans deux séries d'échantillons de concentrations protéiques finales allant de 0 à 3 g.L⁻¹. La première série ne contient que des protéines tandis que la deuxième série contient également des SiNPs (Sigma) à concentration de 1 g.L⁻¹. Les dilutions sont faites en tampon DPBS (Dulbecco et Vogt, 1954), pH 7,4 (D1408, Sigma-Aldrich) contenant : KCl (2 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (2 g.L⁻¹), NaCl (80 g.L⁻¹), et Na₂HPO₄ (11,5 g.L⁻¹)

Les solutions sont agitées doucement pendant 3h, à 20°C, puis centrifugées à 20000 g pendant 10 min (les SiNPs Sigma sont moins stables que les SiNPs monodisperses donc la vitesse de centrifugation peut être inférieure à ce qui est indiqué dans le paragraphe précédent). La radioactivité des deux séries d'échantillons est enfin mesurée par comptage en scintillation liquide à l'aide d'un scintillateur Wallac 1409 DSA. Le comptage de la première série permet de connaître la radioactivité dans chaque tube et d'en déduire leur radioactivité spécifique (quantité de radioactivité par masse de protéine). Le comptage par scintillation de la deuxième série permet ainsi d'avoir accès à la concentration en protéines libres dans chaque échantillon. La concentration en protéines adsorbées et donc l'isotherme d'adsorption peut ainsi être mesuré.

3.1.4. Peptides synthétiques

Des isothermes de peptides adsorbées sur des SiNPs Sigma ont également été effectués par la méthode par déplétion. La quantité de peptide en solution est suivie par la mesure de la fluorescence du tryptophane (§ 3.2.). La concentration en SiNPs Sigma a été fixée à 1 g.L^{-1} tandis que celle en peptides variait de $0,005$ à $0,2 \text{ g.L}^{-1}$.

Les solutions sont diluées dans du tampon phosphate DPBS (voir § 3.1.3.). Ceci correspond à du tampon phosphate 6 mmol.L^{-1} avec ajout d'une grande quantité de sels. Afin de diminuer la force ionique des solutions, du tampon DPBS dilué au dixième a également été utilisé : DPBS 0,1X. À noter que les constantes d'isothermes faits à faible force ionique n'ont été mesurés qu'à une reprise.

3.2. Fluorimétrie

Le spectrofluoromètre Fluoromax[®]-4 (Horiba Scientific) a été utilisé pour toutes les expériences de fluorimétrie. Des spectres d'émission ($\lambda_{\text{absorption}}$ fixe et $\lambda_{\text{émission}}$ variable) ainsi que des spectres 3D ($\lambda_{\text{absorption}}$ variable et $\lambda_{\text{émission}}$ variable) ont été effectués. Afin de ne pas saturer le détecteur, les deux ouvertures à la sortie du faisceau incident et de faisceau de fluorescence (orthogonal) sont fixées à 3 nm. Le temps d'acquisition pour chaque longueur d'onde est fixé à 0,5 secondes.

La fluorescence de la GFP a été suivie afin d'estimer la quantité de fusions GFP présents en solution. Des SiNPs Sigma sont ainsi mis en contact avec un excès d'extrait de protéines de levures contenant une fusion GFP. Le rapport massique entre protéines et SiNPs est de 3,6 pour 1. Pour chaque mesure, deux échantillons sont analysés. Le premier contient l'extrait de protéines de levures ($3,6 \text{ g.L}^{-1}$) dilué en tampons phosphate DPBS, pH 7,4. Le second échantillon contient la même quantité d'extrait protéique ainsi que des SiNPs Sigma à 1 g.L^{-1} de concentration finale. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 3h, à température ambiante et sous agitation douce. Après centrifugation (20000 g pendant 10 min), la fluorescence des surnageants respectifs est mesurée. La concentration relative des fractions adsorbées (Ads) et Non Adsorbées (NA) est ensuite calculée par différence avec la quantité de protéines totale.

Les mesures des pics de spectres d'émission ont été effectués avec ces paramètres : pour la wGFP, $\lambda_{\text{absorption}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 508 \text{ nm}$ et pour la eGFP, $\lambda_{\text{absorption}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 508 \text{ nm}$. Ces valeurs sont proches des pics d'absorption et d'émission (Fig. 7-4).

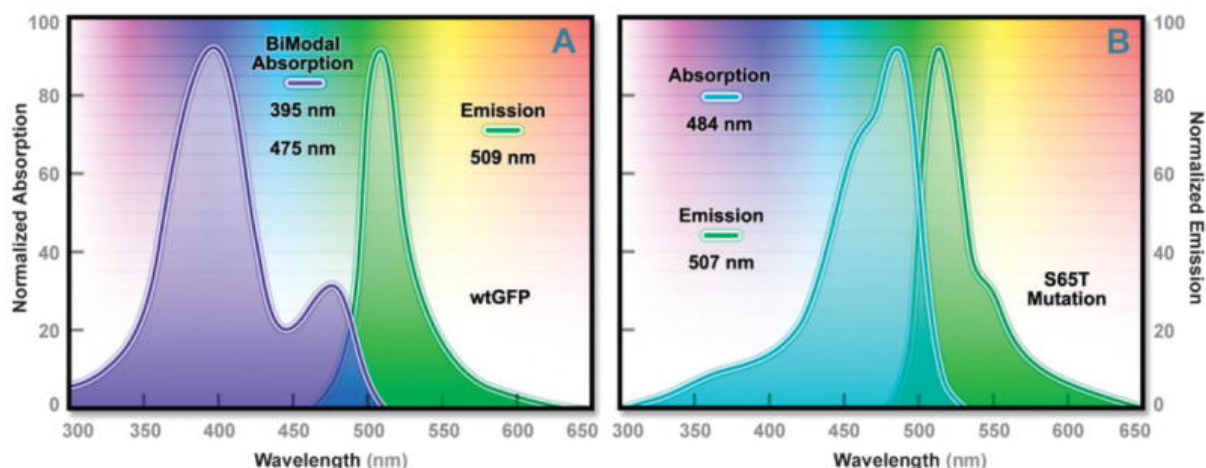


Figure 7-4 : Spectres d'absorption et d'émission de la wtGFP (A) et de l'eGFP S65T (B).
 Issu de Day et Davidson (2009).

La fluorescence des résidus tryptophane contenus dans les peptides RGG a également été mesurée. Des spectres d'émission ont été faits ($\lambda_{\text{excitation}}$ fixée à 280 nm) en mesurant l'émission de fluorescence de 300 à 350 nm. Suivant le peptide choisi (et la présence ou l'absence de SiNPs) le profil de fluorescence peut varier légèrement (voir chapitre 5, § 2.4.). Pour parer à cela les mesures d'isothermes d'adsorption ont été faites par la méthode par déplétion afin de ne mesurer que la fluorescence des peptides libres. Aussi, par commodité, pour les isothermes, la longueur d'onde d'excitation a été fixée à 280 nm et la longueur d'onde d'émission fixée à 357 nm.

3.3. Titration calorimétrique isotherme

Les interactions hémoprotéines/SiNPs ainsi que peptides RGG/SiNPs ont été étudiées par titration calorimétrique isotherme (Isothermal Titration Calorimetry ou ITC) à l'aide d'un Microcal VP-ITC (GE Healthcare) situé au CEA Saclay, bâtiment 142 (SBIgEM). Le principe général consiste à placer un des deux constituants de l'interaction (ici les SiNPs) dans une cellule adiabatique puis à ajouter une série des volumes connus du deuxième constituant (ici les hémoprotéines ou les peptides) dans la cellule à intervalle de temps régulier. Tout au long de la titration la variation de chaleur est mesurée en comparaison avec une cellule de référence contenant de l'eau. L'ajout du deuxième liquide se fait à l'aide d'une seringue de précision qui sert également d'agitateur.

Des paramètres ont été fixés pour toutes les titrations de cette thèse :

- Ajout de 30 aliquotes de 10 μL de solution protéique (ou peptidique)
- Temps d'équilibration entre les ajouts de 350 secondes
- Agitation de la seringue fixée à 307 tours/minute
- Température constante à 20°C

Les tampons de dilution utilisés pour les solutions placées dans la seringue et dans la cellule sont toujours identiques au cours d'une même expérience afin de ne pas avoir de signal parasite dû aux tampons. Pour les systèmes hémoprotéines/LUDOX, deux tampons ont été utilisés : phosphate 0,1 mol.L⁻¹ à pH 6 et à pH 7. Pour les systèmes peptides RGG/Sigma, le tampon phosphate DPBS, pH 7,4, a été utilisé. Avant expérience, les solutions sont dégazées par un passage sous vide partiel.

En outre, les variations de chaleur mesurées lors de la dilution de la solution protéique d'une part (sans SiNPs) et de la dilution des SiNPs d'autre part (sans protéine) ont été mesurées et soustraites à la mesure finale.

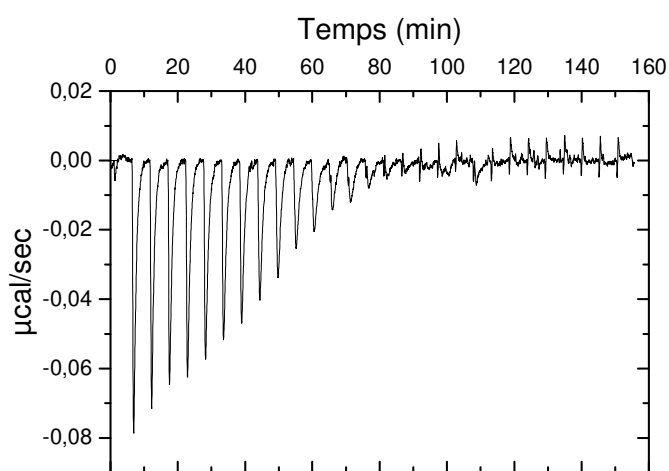


Figure 7-5 : Exemple des données intégrées et normalisées d'une ITC titrant le peptide P3 adsorbés aux SiNPs Sigma.

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 protéines en solution afin d'obtenir la quantité de chaleur ΔQ_i (Kcal/mol) pour chaque injection (fig. 7-5). L'intégration est réalisée à l'aide du logiciel ITC Data Analysis in Origin® 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 est mesurée sur les témoins et moyennée et soustraite du ΔQ_i obtenu pour le système protéine/SiNPs.

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_i . Le modèle SSIS (Single Set of Identical Sites) a été appliqué. Ce modèle suppose qu'un seul type de site de fixation intervient et que le nombre de sites est fini. Les paramètres définis pour le modèle sont les concentrations molaires en protéines et en ligand. Or dans les cas des SiNPs, la concentration molaire n'a de sens que si les particules sont parfaitement monodisperses comme dans le cas des LUDOX, MN10, MN50, et MN100. Pour l'étude peptides/SiNPs

cependant, les SiNPs utilisées ont été les Sigma, nanoparticules polydisperses. Dans ce cas-ci la concentration molaire en SiNPs a été remplacée par une concentration surfacique ($\text{m}^2 \cdot \text{L}^{-1}$).

Le modèle SSIS (Goobes *et al.* 2006) exprime la constante d'association K_i en fonction de C la concentration en protéines libres et θ la fraction de sites occupés selon l'équation 7-13. La concentration totale en protéines dans la cellule correspond à la somme de la quantité de protéines libres et de protéines liées (Équation 7-14).

$$K_i = \frac{\theta}{(1-\theta)C} \quad (\text{Eq. 7-13})$$

$$C_t = C + n\theta M_t \quad (\text{Eq. 7-14})$$

$$M'_t = N_{\max} \cdot SS \cdot C_{\text{NPs}} \quad (\text{Eq. 7-15})$$

Ici n est le nombre de protéines adsorbées par SiNPs (ou par m^2 de SiNPs dans le cas des Sigma) et M_t est la concentration molaire en sites de fixation de protéines dans la cellule. Pour le cas des Sigma, nM_t est remplacé par M'_t qui est la concentration molaire en sites de fixation de protéines par unité de surface (Eq. 7-15). N_{\max} est la quantité maximale de sites de fixation par unité de surface ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$). SS est la surface spécifique ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) et C_{NPs} est la concentration en SiNPs dans la cellule ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). L'équation 7-14 devient ainsi :

$$C_t = [C] + \theta M'_t \quad (\text{Eq. 7-16})$$

Où θ est maintenant la fraction de surface occupée par les peptides.

Les équations 7-14 et 7-16 combinées donnent :

$$\theta^2 - \theta \left(1 + \frac{C_t}{M'_t} + \frac{1}{KM'_t} \right) + \frac{C_t}{M'_t} = 0 \quad (\text{Eq. 7-17})$$

Comme discuté dans les chapitres précédents (Chapitre 3, § 2.2. et Chapitre 5, § 2.2.), seule une fraction des protéines et des peptides adsorbés montre une chaleur d'adsorption qui peut être mesurée par calorimétrie. Ceci peut être interprété par l'existence deux types de sites de fixation : des sites A qui ont une enthalpie d'adsorption ΔH mesurable et qui sont recouverts en premier et des sites B qui n'ont pas de chaleur d'adsorption mesurable. La chaleur totale mesurée Q lors de l'adsorption en fonction de la fraction de sites A, α , est donné par (Eq. 6) :

$$Q = \theta \cdot \alpha \cdot M'_t \cdot \Delta H \cdot V_0 \quad (\text{Eq. 7-18})$$

Avec V_0 le volume de la cellule ITC égale ici à 1,4322 mL.

Si l'on considère que les sites A et B sont occupés indépendamment par des isothermes d'adsorption de Langmuir et que les sites A sont saturés avant que les sites B commencent à être occupés alors l'équation 7-17 reste valable. Il suffit juste de remplacer M'_t par $\alpha M'_t$. La résolution de l'équation 7-17 et sa substitution dans l'équation 7-18 donne l'équation 7-19 :

$$Q = \frac{\alpha M'_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{C_t}{\alpha M'_t} + \frac{1}{K \alpha M'_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{C_t}{\alpha M'_t} + \frac{1}{K \alpha M'_t} \right)^2 - \frac{4C_t}{\alpha M'_t}} \right] \quad (\text{Eq. 7-19})$$

La différence de quantité de chaleur entre la fin de l'injection i-1 et la fin de l'injection i est :

$$\Delta Q(i) = Q(i) - Q(i-1) + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q(i) + Q(i-1)}{2} \right] \quad (\text{Eq. 7-20})$$

Avec dV_i le volume d'injection (10 μL). Le dernier terme corrige la perte de chaleur due à la sortie de liquide de la cellule (qui est pleine avant même la première injection).

Les valeurs de K , ΔH et α sont ainsi estimées par une méthode itérative visant à modéliser $Q(i)$ à partir de l'équation 7-19 et à trouver le modèle le plus fidèle par rapport aux données expérimentales. Les variations d'énergie de Gibbs ΔG et d'entropie ΔS sont ensuite calculées à partir de la relation de Gibbs-Helmholtz (Eq. 7-21):

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (\text{Eq. 7-21})$$

Une fois ces valeurs déterminées pour un système donné, 3 répliques sont effectués et seule la valeur moyenne est indiquée. La valeur moyenne des écart-types s qui n'est pas une moyenne arithmétique mais quadratique (Skoog *et al.*, 2015) est calculée comme suit :

$$s = \sqrt{s_a^2 + s_b^2 + s_c^2} \quad (\text{Eq. 7-22})$$

Avec s_a , s_b et s_c les écart-types des 3 répliques de chaque expérience.

3.4. Dichroïsme circulaire

L'étude de la structure secondaire des hémoprotéines et des peptides adsorbés a été faite par dichroïsme circulaire (DC). Cette technique spectroscopique se sert d'une lumière polarisée plane. Cette lumière est constituée de deux composants de même magnitude, un composant polarisé circulairement vers la droite et l'autre polarisé circulairement vers la gauche. Le signal dichroïque est la mesure de la différence d'absorption de ces deux composants lorsque la lumière polarisée traverse un échantillon.

Un échantillon possèdera un signal dichroïque s'il y a au moins un chromophore chiral. Ce chromophore chiral peut avoir plusieurs origines : (a) être intrinsèquement chiral (présence d'un atome de carbone avec 4 groupement différents ou présence d'un pont disulfure par exemple), (b) posséder une liaison covalente entre le chromophore et le centre chiral, (c) avoir une structure 3D de la molécule qui place le chromophore dans un environnement asymétrique (Kelly *et al.*, 2005).

Aux UV lointains (< 240 nm) l'absorption correspond à la transition $n \rightarrow \pi^*$ (bande large et de faible intensité à 220 nm) et à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ (bande plus intense à 190 nm) des liaisons peptidiques. Ainsi, suivant la structure secondaire formée par la chaîne peptidique, un spectre DC caractéristique est produit (Fig. 7-6). Le dichroïsme circulaire d'une protéine dans cette gamme spectrale correspond donc à la convolution des signaux issus des différentes structures secondaires la composant.

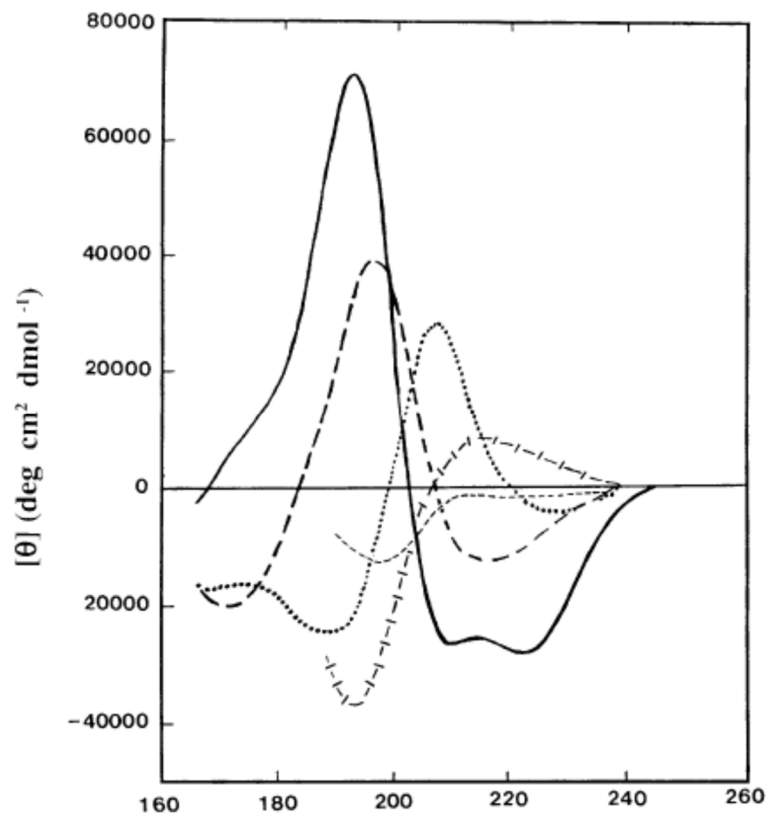


Figure 7-6 : spectres de DC caractéristiques des principales structures secondaires de protéines : trait plein : hélice α ; trait interrompu fort : feuille β ; pointillés : coude β ; trait interrompu barré : hélice PP II ; trait interrompu fin : structure "random coil" (Kelly *et al.*, 2005).

Le dichrographe Chirascan™ (Applied Photophysics, Royaume-Uni) situé au Laboratoire Léon Brillouin (CEA Saclay, France) a été utilisé. Les cuves utilisées sont des cuves en quartz de 1 mm de trajet optique (Hellma®). Le volume nécessaire pour chaque échantillon est de 400 μ L.

Les spectres sont mesurés de 180 à 280 nm avec un pas de 0,5 nm et un temps de mesure de 0,5 s par point. Les points expérimentaux ayant des valeurs de haut voltage à saturation (HV > 1000 mV) sont

éliminés des valeurs expérimentales. Seules les valeurs à partir de 190-195 nm sont donc généralement exploitables. La ligne de base est corrigée à partir du tampon utilisé puis normalisée en prenant les valeurs à 250 nm comme valeur nulle.

Les données brutes de dichroïsme circulaire sont présentées en termes d'ellipticité θ (millideg). Afin d'en déduire la structure secondaire les données sont normalisées selon la concentration en mole de monomères de protéine, le nombre de liaisons peptidiques, et la longueur du trajet optique (Kelly *et al.* 2005). La mesure de l'ellipticité molaire $[\theta]_{\lambda}$ nécessaire pour l'estimation de la structure secondaire se mesure comme suit :

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{100 \times \theta_{\lambda} \times d}{m} \quad (\text{Eq. 7-23})$$

Où θ_{λ} est l'ellipticité mesurée (degré), d est la longueur du trajet optique (cm) et m est la concentration molaire en soluté, ici en mole de monomère de protéine. L'unité de l'ellipticité molaire est le $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$.

Les calculs sont effectués directement sur l'application BeStSel (<http://bestsel.elte.hu/>). La déduction de la structure secondaire y est effectuée à partir d'un algorithme prédictif utilisant des bases de données de protéines aux structures secondaires connues. Pour plus de détails voir Micsonai *et al.* (2015).

Concernant l'étude des hémoprotéines, les échantillons sont des solutions contenant des protéines et/ou SiNPs en interaction. Pour les hémoprotéines, les solutions sont tamponnées à pH 7 avec du tampon phosphate de sodium et la concentration en hème de protéines est de $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$. La concentration héminique a été choisie afin de tenir compte des différences de tailles entre hémoprotéines. En effet, le signal dichroïque étant proportionnel à la quantité de structures secondaires, il convient d'avoir la même quantité de globines (égale au nombre d'hèmes) afin d'obtenir des signaux comparables. La concentration en SiNPs souhaitée est calculée à partir des isothermes d'adsorption de chaque système et la situation où une grande majorité de protéines sont adsorbées est utilisée (70% à 90% de protéines adsorbées selon les systèmes).

Concernant l'étude des peptides RGG, des expériences sur des peptides libres en solution ou interagissant avec des SiNPs Sigma ont été effectuées. La concentration en peptide a été fixée à $5.10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$. La concentration en SiNPs Sigma souhaitée est calculée à partir des isothermes d'adsorption de chaque système et la situation où 90% des protéines sont adsorbées est utilisée. Ceci correspond à des concentrations allant de 1,4 à 5,6 g.L^{-1} .

3.5. Spectrométrie de masse Shotgun

La spectrométrie de masse nanoLC-MS/MS (Shotgun) est une technique hybride à haut débit qui combine la séparation de peptides par chromatographie liquide et leur analyse par ionisation par électronébulisation (Armengaud, 2013). Les expériences ont été faites par Jean Armengaud et Jean-Charles Gaillard au CEA-Marcoule.

Des échantillons de mélanges de protéines et de SiNPs sont préalablement préparés. Les protéines sont issues d'extrait de levures S288c et les SiNPs sont MN10, MN50, ou MN100. Les proportions de chaque composant sont calculées à partir d'isothermes d'adsorption faits dans les mêmes conditions (chapitre 4, § 2.1.). Les solutions sont préparées afin d'être en net excès de protéines par rapport aux SiNPs, ce qui induit une situation de compétition pour la surface de ces dernières. Environ 17% des protéines forment les couronnes protéiques et 82% restent libres en solution. Les mélanges sont faits en tampons DPBS pH 7,4 et laissés sous agitation douce pendant 3h à température ambiante. Les protéines adsorbées et les SiNPs sont séparées des protéines libres par centrifugation (20000 g, 10 min, 20°C). Il est ensuite ajouté aux culots contenant les protéines adsorbées du sodium dodécyl sulfate (SDS) 1% final (Invitrogen, Waltham, MA). Un échantillon contenant un extrait total de protéine solubles de levures est également préparé. Au total trois culots (protéines adsorbées sur MN10, MN50, et MN100) et un extrait total sont étudiés.

4. Techniques de biologie moléculaire

4.1. Souches de levures et milieux de cultures utilisés

Trois souches de *Saccharomyces cerevisiae* ont été utilisées (Tab. 7-1). Elles partagent toutes la même origine génétique et ne diffèrent que par certaines auxotrophies et/ou résistance aux antibiotiques. La souche S288C est une des souches de levure les plus utilisées. Elle peut croître sur des milieux très variés tels que les milieux CASA ou SD (voir ci-dessous). Les extraits protéiques issus de cette souche ont été utilisés pour effectuer des expériences d'isothermes d'adsorption d'extraits protéiques totaux et des expériences de protéomique. La souche BY4741 dérive directement de S288C. Elle possède des délétions de gènes lui conférant une auxotrophie pour la leucine, la méthionine, l'histidine et l'uracile. BY4741 a donc servi pour l'expression des différents plasmides d'intérêt. Enfin la souche BY4741 ($\Delta hmt1$) qui l'on nommera $\Delta hmt1$ par la suite, possède le génotype de BY4741 avec, en plus, l'interruption du gène HMT1 par insertion de la cassette de sélection KanMX4. La souche $\Delta hmt1$ ne produit donc pas la méthyltransférase Hmt1 et est résistante à la Geneticin® (G418, Thermo Fisher Scientific), antibiotique utilisé pour sélectionner cette souche.

Tableau 7-1 : Caractéristiques des souches de *S. cerevisiae* utilisées dans cette thèse.

Souches	Génotypes	Milieux de culture	Référence
S288C	<i>MATα SUC2 gal2 mal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6</i>	YPD, CASA, SD	Mortimer et Johnston (1986)
BY4741 (WT)	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	YPD	Brachmann <i>et al.</i> (1998)
BY4741 (Δ <i>hmt1</i>)	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hmt1::KanX4</i>	YPD (+G418)	Euroscarf

Suivant leur génotype, les différentes souches peuvent donc être ensemencées dans des milieux plus ou moins riches (Tab. 7-1). Le milieu YPD est un milieu complet. Il contient : extrait de levure 10 g.L⁻¹, peptone 20 g.L⁻¹, glucose, 20 g.L⁻¹. Le milieu CASA est un milieu riche mais auquel il manque de l'uracile pour que les souches BY4741 et Δ *hmt1* puissent pousser. Il contient : YNB (Yeast Nitrogen Base) sans acide aminé 6,7 g.L⁻¹, glucose, 20 g.L⁻¹, hydrolysate de caséine 1 g.L⁻¹. Le milieu SD est un milieu minimum pour S288C. Il contient : YNB (Yeast Nitrogen Base) sans acide aminé 6,7 g.L⁻¹, glucose, 20 g.L⁻¹. Pour que BY4741 pousse en milieu SD il faut le supplémenter avec : leucine 2 g.L⁻¹, histidine 1 g.L⁻¹, méthionine 1 g.L⁻¹, et uracile 1 g.L⁻¹. Des boîtes de Petri contenant un des milieux utilisés sont produits par ajout d'agar à 2,5 g.L⁻¹.

4.2. Construction des plasmides

Différents mutants de Npl3 ont été construits (Fig. 7-7) à partir d'un plasmide donné par Anne McBride : pPS811 (McBride *et al.*, 2005). Il s'agit d'un plasmide multicopie répliquable à la fois chez *E. coli* et chez *S. cerevisiae*. Il possède à cet effet deux marqueurs de sélection : la résistance à l'ampicilline et la prototrophie pour l'uracile (Fig. 7-8).

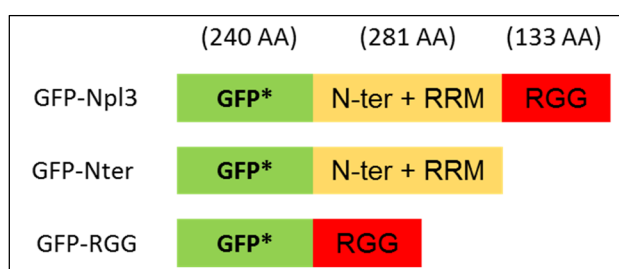


Figure 7-7 : Représentation schématique des différentes protéines de fusion dérivées de Npl3. Tous les mutants possèdent la protéine fluorescente GFP du côté N-terminal. Chaque protéine de fusion possède ensuite une version tronquée ou non de Npl3.

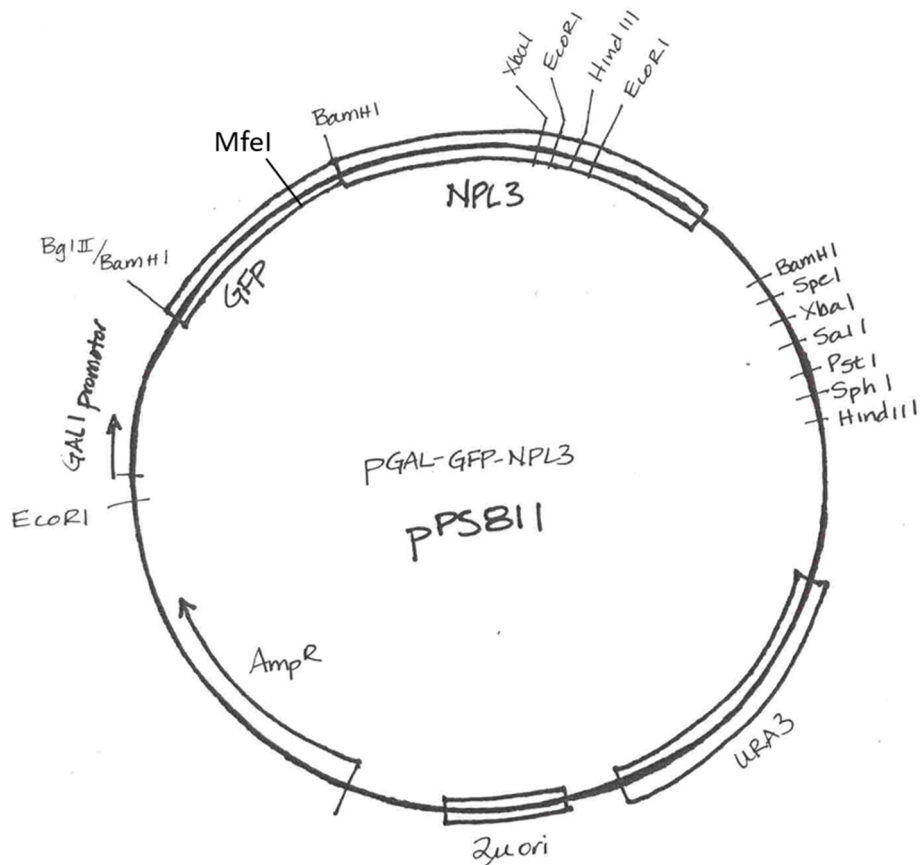


Figure 7-8 : Cartographie génique du plasmide pPS811.

La fusion GFP-Npl3 dans le plasmide pPS811 exprime la GFP sauvage (wGFP) produisant une fluorescence relativement faible. Une première modification de ce plasmide a donc été faite en transformant la wGFP en eGFP (enhanced GFP). Il s'agit du remplacement d'un seul acide aminé (S65T) réalisé par une mutation ponctuelle. Cette mutation permet de multiplier par 6 le signal de fluorescence de la protéine (Heim *et al.*, 1995).

Concrètement le plasmide a été amplifié par PCR en présence des deux primers (GFPM-S1 et GFPM-R1, voir Tab. 7-2). Le protocole du kit QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) a été suivi.

Tableau 7-2 : Liste des primers utilisés pour les mutagenèses dirigées.

Nom	Séquence
GFPM-S1	CCAACACTTGTCACTACTTTCACTTATGGTGTTCAATGC
GFPM-R1	GCATTGAACACCATAAGTGAAAGTAGTGACAAGTGTTGG
NPL3M-S1	GACAATCCTCCACCAATCAGAAGATAAGCCATTTATATAGTTGAGAAA
NPL3M-R1	TTTCTCACTATATAAATGGCTTATCTTCTGATTGGTGGAGGATTGTC
RGGM-S1	TTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATCAAATAGAGGTGGC
RGGM-R1	GCCACCTCTATTTGATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAA
RGGM-S2	CAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAG
RGGM-R2	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC

Le nouveau plasmide pPS811-GFP(S65T) contenant l'eGFP a donc été obtenu. La vérification de la mutation a été faite par séquençage partiel du plasmide et par fluorimétrie. En effet, au-delà de l'augmentation de l'intensité de fluorescence, wGFP et eGFP possèdent des pics d'absorption et d'émission à des longueurs d'onde différentes (§ 3.2., Day et Davidson, 2009).

Ensuite le plasmide pPS811-GFP(S65T) a servi à construire deux versions tronquées de GFP-Npl3 (Fig. 7-5) : (1) le plasmide qui contient eGFP et les domaines N-terminal et RRM de Npl3 (281 AA) ainsi que (2) celui qui contient eGFP et le domaine C-terminal de Npl3 (133 AA). Pour effectuer les délétions de gène, la méthode des "megaprimers" a été appliquée (Serkar et Sommer, 1990). La procédure suivie fut celle de Söderberg et Lang (2006). Cette méthode de mutagenèse dirigée consiste en deux étapes (Fig. 7-9) : d'abord, deux oligonucléotides situés de part et d'autre de la zone de délétion sont amplifiés par PCR. Ces deux oligonucléotides servent ensuite eux-mêmes de primers (les megaprimers) afin d'amplifier la portion du gène muté.

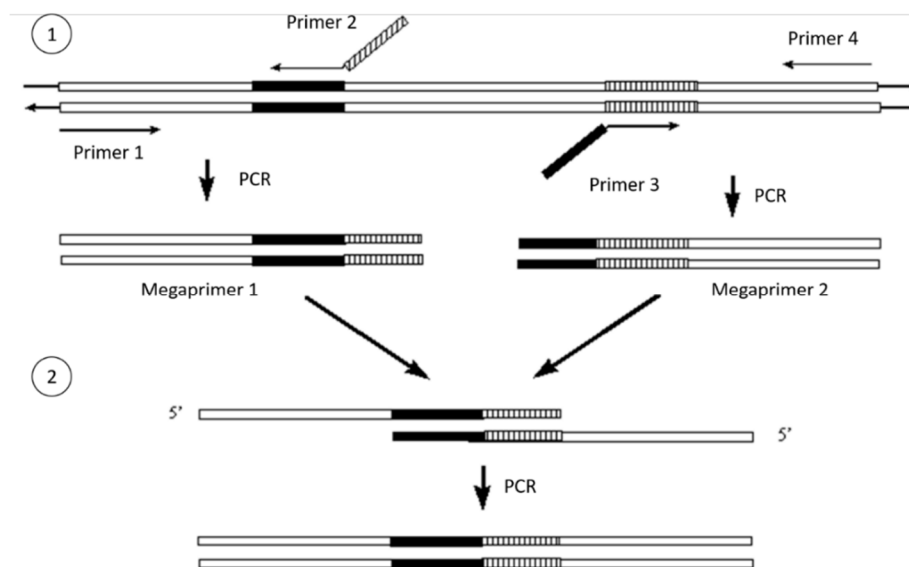


Figure 7-9 : Schéma de principe de la méthode des "megaprimers". (1) 2 megaprimers dont les séquences flanquent la séquence à supprimer sont amplifiés à partir de 4 primers. (2) Ces 2 mégaprimers sont ensuite eux-mêmes amplifiés afin d'obtenir la séquence avec la délétion.

Les primers qui ont servis pour amplifier chaque megaprimer sont indiqués dans le tableau 7-3. L'obtention des différents produits PCR a été suivie par des électrophorèses sur gel d'agarose 1%. L'agent de charge Gel Loading Dye, Purple (Biolabs®) a été utilisé. Les tailles des produits PCR ont été comparées à la gamme d'ADN GeneRuler™ 1kb plus (Thermo Fisher Scientific).

Tableau 7-3 : Primers utilisés pour l'amplification des megaprimers et taille des megaprimers. NterA et NterB ont servi à produire le plasmide pLM-NPL3-281. RGGGA et RGGGB ont servi à produire le plasmide pLM-NPL3-133.

Megaprimer	Primer 1	Primer 2	Taille (nb de bases)
NterA	RGGM-S2	NPL3M-R1	1127
NterB	NPL3M-R1	RGGM-R2	395
RGGA	RGGM-S2	RGGM-R1	269
RGGB	RGGM-S1	RGGM-R2	799

Afin d'insérer le gène muté, celui-ci et le plasmide matrice sont digérés par deux enzymes de restriction à extrémité cohésive : MfeI et SpeI (Biolabs®). Il existe un seul site de restriction pour chaque enzyme dans la séquence plasmique (Fig. 7-8). Après digestion, la ligation est effectuée par l'enzyme T4 DNA ligase (Invitrogen®). Deux nouveaux plasmides ont ainsi été créés : pLM-NPL3-281 et pLM-NPL3-133.

L'expression de trois autres protéines riches en motifs RGG (Gar1, Nop1, et Nsr1) a également été faite à partir de plasmides fournis par Michael Henry (Xu *et al.*, 2003). Ces protéines possèdent des fusions GFP en position N-terminale ou C-terminale (Tab. 7-4). Seule Gar1-GFP possède une eGFP. La même procédure que précédemment a donc été suivie afin d'obtenir l'eGFP chez pMH193 et pMH194 : pMH193-GFP(S65T) et pMH194-GFP-(S65T).

Tableau 7-4 : Caractéristiques des plasmides reçus par Henry (Xu *et al.*, 2003).

Plasmide	Protéine	Sélection	Position de la GFP	GFP
pMH207	Gar1	Ura+	C-ter	eGFP
pMH193	Nop1	Ura+	N-ter	wGFP
pMH194	Nsr1	Leu+	N-ter	wGFP

4.3. Transformation chez *S. cerevisiae*

Une fois les plasmides amplifiés chez *E. coli*, ceux-ci ont été extraits, purifiés puis transférés dans des cellules de levures par transformation. Pour la transformation des souches de levure par les plasmides d'intérêt le protocole suivant a été utilisé : les souches BY4741 ou $\Delta hmt1$ à transformer sont cultivées dans un milieu complet (YPD ou CASA + Leu) et récoltées en phase de croissance exponentielle. Pour chaque transformation, $1,2 \times 10^8$ cellules (soit 7 DO) sont récoltées, centrifugées à 4000 G pendant 5 min, lavées par 1 mL d'eau stérile, centrifugées à nouveau à 4000 RCF pendant 5 min. Le culot cellulaire est ensuite lavé avec 1 mL de tampon TE/LiAc : Tris (10 mM), EDTA (1 mM) et Acétate de lithium (100 mM).

Enfin les cellules sont resuspendues dans 100 μ L de tampon TE/LiAc. À ceci, 3 μ L d'ADN Compétiteur (« DNA carrier » 10 mg/ml; sperme de saumon ou de hareng et dénaturé par chauffage à 95°C au préalable) ainsi que 1 μ g de plasmide et 350 μ L de polyéthylène glycol (PEG 4000) sont ajoutés.

Les cellules sont incubées à 30°C pendant 30 min à 1 heure. Un choc thermique est ensuite effectué en incubant les cellules pendant 15-20 min à 42°C. Après centrifugation à 4000 RCF pendant 2 min, le culot cellulaire est resuspendu dans 100µL d'eau stérile. Les cellules sont finalement étalées sur du milieu sélectif en fonction du marqueur de sélection choisi. L'incubation se fait pendant 3 jours à 30°C.

4.4. Expression des plasmides et extraction des protéines solubles

Toutes les souches de levures, possédant ou non des plasmides, ont été cultivées dans des milieux appropriés (Tab. 7-5). Les cultures (de 400 mL) se font en fioles de 1L à 30°C et sous agitation.

Tableau 7-5 : Milieu de culture utilisé et type d'expression des plasmides transformés chez *S. cerevisiae*.

Plasmide	Milieu sélectif (BY4741)	Milieu sélectif ($\Delta hmt1$)	Expression de la protéine d'intérêt
\emptyset	CASA + Ura	CASA + Ura + G418	
pPS811-GFP(S65T)	CASA	CASA + G418	Promoteur GAL
pAM420-GFP(S65T)	CASA	CASA + G418	Promoteur GAL
pLM-NPL3-281	CASA	CASA + G418	Promoteur GAL
pLM-NPL3-133	CASA	CASA + G418	Promoteur GAL
pMH207	CASA	CASA + G418	Constitutif
pMH193-GFP(S657)	CASA	CASA + G418	Constitutif
pMH194-GFP-(S65T)	SD + His + Met + Ura	SD + His + Met + Ura + G418	Constitutif

La croissance des cellules en milieu liquide est évaluée par la mesure de leur densité optique (DO) à 600 nm. Les cellules sont toujours récoltées en phase exponentielle de croissance ce qui correspond à une $DO_{600\text{ nm}} = 0,4$. 1 mL de culture à cette DO représente une concentration cellulaire égale à $1,7 \times 10^7$ cellules / mL.

Pour les cellules à expression induite par le promoteur GAL, une première mise en culture est faite en milieu CASA. Les cellules sont ensuite centrifugées et le milieu est remplacé par du milieu constitué de YNB (Yeast Nitrogen Base) 6,7 g.L⁻¹, raffinose, 10 g.L⁻¹, leucine 2 g.L⁻¹, histidine 1 g.L⁻¹, et méthionine 1 g.L⁻¹. Une nouvelle phase de culture est alors menée jusqu'à obtenir une $DO_{600\text{ nm}} = 0,4$. Une solution concentrée de galactose est alors ajoutée au milieu afin d'obtenir une concentration finale de 20 g.L⁻¹, ce qui induit l'activation du promoteur GAL. Après 2 heures d'incubation, les cellules sont récoltées en vue de la préparation des extraits protéiques.

Les extraits protéiques totaux de levures sont produits de la façon suivante : la veille, des milieux sontensemencés avec les souches d'intérêt dans 500 mL. Les cellules (en phase exponentielle de croissance) sont récoltées par centrifugation (4000 RCF, 5 min, 4°C) puis lavées dans 50 mL d'eau distillée. Le culot est ensuite repris dans 1 mL de tampon de cassage : DPBS (tampon phosphate

Debulcco) 1X, PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyle) 1 mM, cocktail inhibiteur de protéase Halt™ 1X (Thermo Fisher Scientific).

Les cellules sont ensuite placées dans le canal d'une presse de French et le tout est refroidi à -80°C. Les cellules sont pressées et le lysat cellulaire recueilli. Plusieurs centrifugations (20000 RCF, 15 min, 4°C) permettent d'éliminer la fraction insoluble et le surnageant finalement récupéré contient les protéines solubles. La concentration en protéines est évaluée par la méthode de Bradford (Bio-Rad) avec comme gamme étalon de l'albumine sérique bovine (Sigma).

4.5. Western blotting

Les expériences ont été effectuées par Gilles Lagniel d'après le protocole suivi dans Marichal *et al.* (2018). Rapidement, les protéines contenues dans les différentes fractions (extrait total, fraction adsorbé, fraction non adsorbée) ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE (12%), transférées sur une membrane en nitrocellulose 0,2 µm NC (Amersham™ Protran®), et colorées au rouge Ponceau S (Sigma-Aldrich®). Un puits contenant une échelle de poids moléculaire a été ajouté (PageRuler™ #26616, Thermofisher Scientific). Après décoloration, des anticorps primaires anti GFP (anticorps polyclonaux A-6455 obtenus par Molecular Probes) ont été ajoutés. L'anticorps secondaire, fluorescent, a ensuite été appliqué (G680, IgG de chèvre anti-lapin, LI-COR Biosciences). Enfin les membranes ont été révélées par un système d'imagerie Odyssey (LI-COR Biosciences).

4.6. Peptides de synthèse

Tous les peptides ont été synthétisés et purifiés (pureté > 90%) par la société PepScan B.V. (Pays-Bas). Les peptides étudiés ici ont tous été conçus à partir de la région N-terminale de Nop1 (Fig. 7-10). En effet, les 17 motifs RGG de Nop1 sont tous contenus dans sa région N-terminale (Henríquez *et al.*, 1990). Une section de 25 acides aminés allant du résidu 7 au résidu 31 a donc été tirée de cette région. Cette section contient 5 motifs RGG et 1 motif RG. Les peptides étudiés ici possèdent la même séquence que cette section à l'exception du résidu 19 (F, phénylalanine) qui a été remplacé par un résidu W (tryptophane). Ce changement, considéré comme anodin du point de vue physico-chimique (remplacement d'un acide aminé aromatique par un autre), permet de renforcer fortement la fluorescence des peptides. En effet, le rendement quantique du tryptophane est beaucoup plus fort que celui de la phénylalanine (0,2 contre 0,04 ; Ghisaidoobe et Chung, 2014). La présence des peptides pourra donc être quantifiée par fluorimétrie avec une bien meilleure précision.

1 MSFRPGS**RRGG** **SRGGSRGG**FG **GRGGSRGGAR** **GGSRGG**FGGR **GGSRGGARGG** **SRGG**FGGR**RRGG**
61 **SRGGARGGSR** **GRRGGA**AGGA **RRGGAK**VVIEP HRHAGVYIAR GKEDLLVTKN MAPGESVYGE
121 KRISVEEPSK EDGVPPTKVE YRVWNPFRSK LAAGIMGGLD ELFIAPGKKV LYLGAASGTS
241 VSHVSDVVGP EGVVYAVEFS HRPGRELISM AKKRPNIIP IEDARHPQKY RMLIGMVDCV
301 FADVAQPDQA RIIALNSHMF LKDQGGVVIS IKANCIDSTV DAETVFAREV QKLREERIKP
361 LEQLTLEPYE RDHCIVVGRY MRSGLKK*

Figure 7-10 : Séquence primaire de Nop1. En gras : les 17 motifs RGG. Souligné : la séquence utilisée pour concevoir les peptides synthétiques.

Les peptides étudiés ici sont similaires mais présentent des variations au niveau de leurs résidus arginine (Tab. 7-6). Quatre conditions ont été comparées : présence d'arginine non méthylé (R), d'arginine diméthylée asymétriquement (R-DMA), d'arginine diméthylée symétriquement (R-DMS), et de lysine (K). Les 5 premiers peptides (P1 à P5) sont donc des 25-meres issus de Nop1 qui diffèrent au niveau des 6 résidus arginine. Le peptide P1 possède 6 résidus R, P2, 3 résidus R et trois résidus R-DMA, P3, 6 résidus R-DMA, P4, 6 résidus R-DMS, et P5, 6 résidus K.

Tableau 7-6 : Séquence des différents peptides RGG. Les résidus qui varient sont colorés : **R** (arginine non méthylé), **R** (R-DMA), **R** (R-DMS), **K** (lysine). Le peptide CotB1p est utilisé comme référence car il est connu pour s'adsorber sur la silice (Abdelhamid et al., 2014).

Peptide	Caractéristique	Nombre d'AA	Séquence
P1	R	25	SRGGSRGGSRGGWGGRRGGSRGGARG
P2	50% R, 50% R-DMA	25	SRGGSRGGSRGGWGGRRGGSRGGARG
P3	R-DMA	25	SRGGSRGGSRGGWGGRRGGSRGGARG
P4	R-DMS	25	SRGGSRGGSRGGWGGRRGGSRGGARG
P5	K	25	SKGGSKGGSKGGWGGKGGSKGGAKG
P6	R	13	WGG RRGGSRGGARG
P7	R-DMA	13	WGG RRGGSRGGARG
P8	K	13	WGG KGGSKGGAKG
CotB1p	Référence	15	WSG RRARAQRQSSRRGR

Des peptides plus courts de moitié ont également été construits afin d'évaluer l'impact du nombre de motifs RGG sur l'adsorption. P6, P7, et P8 sont ainsi directement dérivés de P1, P3 et P5 respectivement. Ils présentent la même séquence au niveau de 13 derniers acides aminés.

Enfin, un dernier peptide a été conçu. Il s'agit de CotB1p (Abdelhamid et al., 2014). Ce peptide est issu de CotB1, la protéine fixant la silice à la surface des spores de *Bacillus cereus*. Il a été sélectionné pour sa forte affinité pour la silice, sa taille comparable aux peptides RGG (15 acides aminés) et sa richesse en résidus arginine (5). CotB1p sera donc utilisé comme peptide de référence.

Bibliographie – Chapitre 7

- **Antonini E.** and Brunori, M. (1971) *Hemoglobin and Myoglobin in Their Interactions with Ligands*. North Holland Publishing Company: Amsterdam. Vol. 21.
- **Armengaud J.** (2013) *Microbiology and proteomics, getting the best of both worlds!* Environ. Microbiol. 15, 12-23.
- **Banerjee R.**, Alpert Y., Leterrier F., Williams R. J. P. (1969) Visible Absorption and Electron Spin Resonance Spectra of the Isolated Chains of Human Hemoglobin. Discussion of Chain-Mediated Heme-Heme Interaction. Biochem. Vol. 8, 2862-2867.
- **Baudouin-Cornu P.**, Lagniel G., Chédin S., and Labarre J. (2009) *Development of a new method for absolute protein quantification on 2-D gels*. Proteomics. 9, 4606-4615.
- **Brachmann C.B.**, Davies A., Cost G. J., Caputo E., Li J., Hieter P., Boeke J. D. (1998) *Designer deletion strains derived from Saccharomyces cerevisiae S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications*. Yeast 14, 115-32.
- **Bradford M.M.** (1976) *A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. 72, 248-254.
- **Day R. N.** and Davidson M. W. (2009) *The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging*. Chem. Soc. Rev. 38, 2887-2921.
- **Devineau S.**, Zargarian L., Renault J-P., Pin S. (2017) *Structure and Function of Adsorbed Hemoglobin on Silica Nanoparticles: Relationship between the Adsorption Process and the Oxygen Binding Properties*. Langmuir. 33, 3241-3252.
- **Dulbecco R.** and Vogt M. (1954) *Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses*. J. Exp. Med. 99, 167-182.
- **Goobes R.**, Goobes G., Campbell C. T., Stayton P. S. (2006) *Thermodynamics of Statherin Adsorption onto Hydroxyapatite*. Biochem. 45, 5576-5586.
- **Guinier A.** and Fournet G. (1955) *Small-Angle Scattering of X-rays*. Translated by Wilson C. B. and with a bibliographical appendix by Yudowitch K. L. Wiley, New York. 268 pp. J. Polym. Sci. 10.1002/pol.1956.120199326.
- **Hartlen K. D.**, Athanasopoulos A.P.T., Kitaev, V. (2008) *Facile preparation of highly monodisperse small silica spheres (15 to > 200 nm) suitable for colloidal templating and formation of ordered arrays*. Langmuir. 24, 1714-1720.
- **Heim R.**, Cubitt A. B., and Tsien R. Y. (1995) *Improved green fluorescence*. Nature. 373, 663-664.
- **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 Soil Pollut. 141, 1-33.
- **Hunter R.** (1981) *Zeta potential in colloid science*. ISBN: 978-0-12-361961-7.
- **Iler R. K.** (1979) *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry of Silica*. ISBN: 978-0-471-02404-0.
- **ISO 13099-2:2012(E)**: Colloidal systems-Methods for zeta-potential determination-Part 2: Optical methods.
- **Jelkmann W.** and Bauer C. (1976) *What is the best method to remove 2,3-diphosphoglycerate from hemoglobin*. Anal. Biochem. 75, 382-388.
- **Kelly S.**, Jess T. J., Price N. C. (2005) *How to study proteins by circular dichroism*. Biochimica et Biophysica Acta. 1751, 119-139.
- **Krężel A.** and Bal W. (2004) *A formula for correlating pK_a values determined in D₂O and H₂O*. J. Inorg. Biochem. 98, 161-166.

- **Langmuir** I. (1918) *Adsorption of gases on plane surface of glass, mica and platinum*. J. Am. Chem. Soc. 40, 1361-1403.
- **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/nonadsorption to Silica Surface*. Plos One. 8, e81346.
- **McBride** A. E., Cook J. T., Stemmler E. A., Rutledge K. L., McGrath K. A., and Rubens J. A. (2005) *Arginine methylation of yeast mRNA-binding protein Npl3 directly affects its function, nuclear export, and intranuclear protein interactions*. J. Biol. Chem. 280, 30888-30898.
- **Mortimer** R.K. and Johnston J.R. (1986) *Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center*. Genetics. 113, 35-43.
- **Micsonai** A., Wien F., Keryna L., Lee Y-H., Goto Y., Réfrégiers M., Kardos J. (2015) *Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy*. PNAS 112:E3095-103.
- **Oberdörster** G., Oberdörster E., Oberdörster J. (2005) *Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles*. Environ. Health Perspect. 113, 823-839.
- **Perutz** M.F. (1968) *Preparation of haemoglobin crystals*. J. Cryst. Growth. 2, 54-56.
- **Pin** S., Royer C. A., Gratton E., Alpert B., and Weber G. (1990) *Subunit interactions in hemoglobin probed by fluorescence and high-pressure techniques*. Biochemistry. 29, 9194-9202.
- **Rousselot** M., Le Guen D., Chabasse C., and Zal. F. (2006) *Novel dissociation mechanism of a polychaetous annelid extracellular haemoglobin*. FEBS Journal. 273, 1582-1596.
- **Sarkar** G. and Sommer S. S. (1990) *The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis*. Biotechniques. 8,404-407.
- **Skoog** D. A. and West D. W. (2015) *Chimie analytique*. Traduction de Buess-Herman C. et Dauchot J. De Boeck S.A. 9782804190712
- **Söderberg** M. and Lang M. A. (2006) *Megaprimer-based methodology for deletion of a large fragment within a repetitive polypyrimidine-rich DNA*. Mol. Biotechnol. 32, 65-71.
- **Stöber** W., Fink A., Bohn E. (1968). *Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range*. Journal of Colloid And Interface Science. 26, 62-69.
- **Svergun** D. I. (1992) *Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria*. J. Appl. Cryst. 25, 495-503
- **Xu** C., Henry P. A., Setya A., and Henry M. F. (2003) *In vivo analysis of nucleolar proteins modified by the yeast arginine methyltransferase Hmt1/Rmt1p*. RNA. 9,746-759.
- **Yokoi** T., Sakamoto Y., Terasaki O., Kubota Y., Okubo T., and Tatsumi T. (2006) *Periodic Arrangement of Silica Nanospheres Assisted by Amino Acids*. J. Am. Chem. Soc. 128, 13664-13665.
- **Zal** F. and Rousselot M. (2014) *Extracellular Hemoglobins from Annelids, and their Potential Use in Biotechnology, in Outstanding Marine Molecules: Chemistry, Biology, Analysis* (eds S. La Barre and J.-M. Kornprobst), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Annexe : Articles

- Devineau S., Anyfantakis., **Marichal** L., Kiger L., Morel M., Rudiuk S., and Baigl D. (2016) *Protein Adsorption and Reorganization on Nanoparticles Probed by the Coffee-Ring Effect: Application to Single Point Mutation Detection*. J. Am. Chem. Soc. 138, 11623-11632.
- Klein G., Mathé C., Biola-Clier M., Devineau S., Drouineau E., Hatem E., **Marichal** L., Alonso B., Gaillard J. C., Lagniel G., Armengaud J., Carrière M., Chédin S., Boulard Y., Pin S., Renault J. P., Aude J. C., and Labarre J. (2016) *RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts*. Nanotoxicology. 10, 1555-1564.
- **Marichal** L., Renault. J. P., Chédin S., Lagniel G., Klein G., Aude J.-C., Tellier-Lebegue C., Armengaud J., Pin S., Labarre J., and Boulard Y. (2018) *Importance of post-translational modifications in the interaction of proteins with mineral surfaces: the case of arginine methylation and silica surfaces*. Langmuir. 34, 5312-5322.

Importance of post-translational modifications in the interaction of proteins with mineral surfaces: the case of arginine methylation and silica surfaces

Laurent Marichal^{1,2}, Jean-Philippe Renault², Stéphane Chédin¹, Gilles Lagniel¹, Géraldine Klein^{1,2}, Jean-Christophe Aude^{1,3}, Carine Tellier¹, Jean Armengaud⁴, Serge Pin², Jean Labarre¹*, Yves Bouillard^{1*}

¹I2BC, JOLIOT, DRF, CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France,

²LIONS, IRAMIS, DRF, CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France,

³I2BC, CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, Orsay, France

⁴Laboratoire Innovations technologiques pour la Détection et le Diagnostic (Li2D), Service de Pharmacologie et Immunanalyse (SPI), CEA, INRA, F-30207 Bagnols sur Cèze, France.

KEYWORDS: *Arginine methylation, Peptide adsorption, Silica surface, RGG domain, Molecular dynamics simulation, Post-translational modification, Nanoparticles, Protein/surface interaction*

ABSTRACT: Understanding the mechanisms involved in the interaction of proteins with inorganic surfaces is of major interest for both basic research and practical applications involving nanotechnology. From the list of cellular proteins with the highest affinity for silica nanoparticles, we highlighted the group of proteins containing RGG motifs. Biochemical experiments confirmed that RGG motifs interact strongly with silica surfaces. The affinity of these motifs is further increased when the R residue is asymmetrically, but not symmetrically, dimethylated. Molecular dynamics simulations show that asymmetrical dimethylation generates electrostatic asymmetry in the guanidinium group of the R residue, orientating and stabilizing it on the silica surface. The RGG motifs (methylated or not) systematically target the siloxide groups on the silica surface through an ionic interaction, immediately strengthened by hydrogen bonds with proximal silanol and siloxane groups. Given that, *in vivo*, RGG motifs are often asymmetrically dimethylated by specific cellular methylases, our data add support to the idea that this type of methylation is a key mechanism for cells to regulate the interaction of RGG proteins with RNA with their cellular partners.

INTRODUCTION

The study of the interaction of amino acids (AAs) with mineral surfaces dates back to several decades, originally aiming to improve the separation and purification of amino acids and to better understand the adsorption of proteins or enzymes on surfaces. This research field has recently experienced a resurgence of interest for technological applications¹ such as micro and nano-electronics as well as for basic research with regards to prebiotic evolution: the adsorption of AAs on mineral surfaces and their subsequent polymerization is now considered as a possible scenario of the origin of life (for review, see²).

In addition, during the last decade, the need to understand the interactions between mineral surfaces and biological molecules such as AAs, peptides and proteins has intensified due to the dramatic increase in the production of nanoparticles (NPs) and their use in many fields (materials, textiles, electronics, cosmetics, food, medicines, etc.) and the concerns regarding their biological effects and health hazards. Nano-objects, have two major properties: (1) the ability to penetrate cells and reach toxicological or medical targets, and (2) a high surface-to-mass ratio that considerably increases the surface available

for interactions. Upon contact with a biological fluid, e.g. when entering a cell or the bloodstream, NPs are readily coated by proteins.³ This coating and the nature of the proteins adsorbed on the NPs are determining factors of the fate and biodistribution of the NPs in the organism (for review see⁴). Protein adsorption onto electronegative surfaces such as silica is known to depend on the electrostatic and flexibility properties of the protein.⁵⁻⁷ Electrostatics is considered of major importance in the adsorption process, with the predominant contribution of two basic amino acids, arginine (R) and lysine (K), which are positively charged at neutral pH. The adsorption process also apparently depends on the degree of “hardness-softness” of the proteins.⁸ Tightly structured proteins (“hard” proteins) do not deform on the surface and are not prone to adsorption, whereas proteins with weak internal cohesion (“soft” proteins) are more prone to structural rearrangements and spread on the surface. Ikeda and Kuroda⁶ even suggest that proteins with few or no structural element(s), such as the so-called intrinsically disordered (ID) proteins (or unstructured proteins), are the proteins the most amenable to adsorption. This hypothesis was largely confirmed by our recent data⁹, showing a strong enrichment of ID sequences in proteins that bind silica. We also showed that one particular functional class is highly overrepresented in the

proteins likely to adsorb to silica surfaces: RNA-binding proteins. We therefore suggested that the silica surface, mainly composed of silanol groups (Si-OH) and a minority of siloxide groups (Si-O⁻), mimic the ribose-phosphate skeleton of RNA and trap RNA-binding proteins.⁹

A typical class of RNA-binding proteins is the group of proteins rich in arginine-glycine-glycine (RGG) motifs.^{10,11} These motifs have been shown to bind single-strand RNAs without sequence specificity¹²⁻¹⁵, with a slight predilection for GC-rich sequences^{16,17} or with a high specificity for particular RNA secondary structures.¹⁸ RGG motifs are also involved in protein-protein interactions and in subcellular protein localization (for review see¹¹). The R residue of the motif is often post-translationally modified by methylation, the most frequent modification being asymmetrical dimethylation. This modification has been shown to modulate the properties of the RGG motifs and to regulate the protein functions of RGG-containing proteins.¹⁹ The RGG-rich regions often contain a shortened version of the motif, i.e. the RG motif¹¹, which is also frequently methylated and which has probably the same function as the RGG motif. The three yeast proteins with the highest number of RGG motifs are Npl3 (a poly(A) binding protein), Gar1 (a ribonucleoprotein) and Nop1 (an rRNA methyltransferase). Npl3 has 15 RGG motifs, organized in the C-terminal domain of 131 residues. Npl3 is involved in the transport of mRNA from the nucleus to the cytosol²⁰ and shuttles between the two compartments. At least 10 of the 15 RGG motifs of Npl3 are asymmetrically dimethylated.²¹ These dimethylations are absent in a strain deleted for Hmt1, the main arginine methyltransferase in yeast.²²

In this study, we demonstrate that RGG-containing proteins bind strongly to silica surfaces and then dissect the mechanism of adsorption of Npl3. We show the importance of R residues in adsorption, particularly when they are asymmetrically dimethylated, both in well-defined biochemical conditions and in complex biological samples.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid construction

Plasmid pPS811 was a gift of Anne McBride.²¹ When transferred in yeast, the plasmid pPS811 allows the expression of a wtGFP-Npl3 fusion protein under the control of a GAL promoter. By using the QuikChange® Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent) and primers GFPm-S1 and GFPm-R1 (Table S1), we introduced the S65T mutation within the wtGFP sequence to generate the eGFP-Npl3 fusion protein, improving fluorimetry measurements.²³ The resulting plasmid, called hereafter GFP-Npl3, was used to generate two truncated versions of the eGFP-NPL3 fusion: (1) the plasmid GFP-Nter that contains the eGFP sequence and the sequence that codes for the first 281 AAs out of the 414 AAs of the native Npl3 protein and (2) the plasmid GFP-RGG that contains the eGFP sequence and the sequence that codes for the last 133 AAs of the native Npl3 protein (Figure 1A). The gene deletions were done using the Megaprimer-based method²⁴ with the same procedure applied by Söderberg and Lang.²⁵ The sequence of the primers used to produce the superprimers are indicated in Table S1.

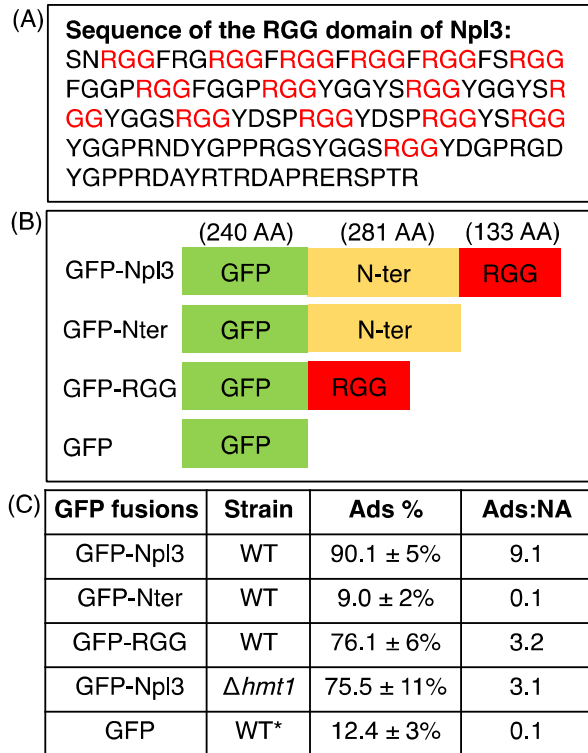


Figure 1: Npl3 protein binds to the silica surface via its RGG domain (A) Sequence of the RGG domain of the yeast protein Npl3. The RGG domain contains 15 RGG motifs (shown in red). (B) Schematic diagram of the fusion proteins GFP-Npl3, GFP-Nter and GFP-RGG. (C) Relative GFP fluorescence in the adsorbed fraction (Ads) and the fluorescence ratio. The adsorbed-to-non-adsorbed ratio of fluorescence (Ads:NA) can be considered as an estimate of the affinity of the GFP fusion protein for silica. The protein extracts were prepared from yeast strains expressing the fusion proteins GFP-Npl3, GFP-Nter and GFP-RGG in the WT strain or in the $\Delta hmt1$ mutant strain, which is defective in arginine methylation. Reported values are the averages of at least 3 independent experiments.* GFP control was produced in *E. coli* and mixed with a protein extract from the yeast wild type strain.

Yeast cultures and preparation of protein extracts

The different plasmids used in this study were expressed in the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strain BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*)²⁶ and in the isogenic mutant strain $\Delta hmt1$ (EUROSCARF). For the preparation of protein extracts from yeast cells expressing GFP fusion proteins under the control of GAL promoter (GFP-Npl3, GFP-Nter and GFP-RGG), cells were first grown in a SD yeast medium (6.7 g/L yeast nitrogen base, and 20 g/L glucose) supplemented with 20 g/L leucine, 10 g/L histidine, and 10 g/L methionine. The cells were collected by centrifugation, res-suspended in the same medium except the glucose, which was removed and replaced by raffinose and incubated overnight to obtain a concentration of 1×10^7 cells/mL. Then, galactose was added to a final concentration of 20 g/L to induce the expression of the GAL promoter and after 2h incubation, cells were collected for the preparation of the protein extracts. The yeast protein extracts were prepared

as previously described⁷. Protein lysates from A549 human lung epithelial carcinoma cells were prepared as described⁹. The protein concentration was determined by the method of Bradford.²⁷ The production of a *Escherichia coli* protein extract containing eGFP was performed as described.²⁸

Silica nanoparticle characterization

Silica nanopowder (SiO₂) of 99.5% purity was from Sigma-Aldrich (637238) (CAS Number 7631-86-9). According to the manufacturer, the NPs are 10-20 nm in size and have a specific surface area of 140-180 m²/g. NPs were prepared in Dulbecco's phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4²⁹ at the final concentration of 5 g/L and characterized by TEM, SANS, zetametry and gas adsorption isotherms.⁷ The experiments were performed with the same nanopowder batch as the one used by and by Klein et al.⁹ with the exception of the experiments with the RGG-peptides which were done with a newly purchased batch.

Fluorimetry analysis

The amount of adsorbed (Ads) and non-adsorbed (NA) eGFP-fusion proteins on SiNPs was measured by fluorimetry. The freshly prepared protein extracts were mixed with SiNPs with a mass ratio of 1.8/1 corresponding to a large excess of proteins compared to the silica surface available.⁹ For each experiment, two samples were prepared: the first one containing 1 mL of protein extract/SiNPs mixture with a final concentration of SiNPs of 1 mg/mL and the second one with the same amount of protein extract but no SiNPs. After 3h incubation at 20°C and under gentle agitation the samples were centrifuged at 11,300 g for 10 min and the supernatants (containing the non-adsorbed proteins) were collected. The eGFP fluorescence was recorded ($\lambda_{\text{excitation}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 508 \text{ nm}$) using a spectrofluorometer Fluoromax[®]-4 (Horiba Scientific). The fluorescence of the total protein solution and the non-adsorbed protein fraction was measured, allowing the determination of the relative concentration of the eGFP-fusion proteins in the Ads and NA fractions.

Adsorption isotherms of peptides

The peptides were synthesized and purified (purity > 90%) by PepScan Presto BV company. Adsorption isotherms of peptides adsorbed on SiNPs were also performed by fluorimetry based on the fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 357 \text{ nm}$) of the tryptophan residue present in each peptide. For establishing the isotherms, 12 different conditions were tested where the peptide concentration ranged from 0 to 4E-05 mol.L⁻¹ while the SiNPs concentration was kept constant at 0.4 g.L⁻¹. Affinity constants were calculated by fitting the adsorption isotherms with the Langmuir model³⁰ according to equation 1 :

$$n_{ads} = \frac{n_{\infty} * K_{ads} * C}{1 + K_{ads} * C} \quad (1)$$

where C is the protein concentration at equilibrium, n_{∞} the maximum amount of adsorbed protein and K_{ads} , the adsorption constant which reflects the affinity of the protein for the surface.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

Adsorption isotherms of peptides on SiNPs were also performed by calorimetry using a VP-ITC calorimeter (MicroCal). Before the measurements, all solutions were degassed under vacuum. The reaction cell (1.8 ml) was loaded with a SiNPs solution at 1g/L. The syringe (500 μ L) was filled with peptides at concentration 0.1g/L. Peptides and SiNPs were prepared in the same buffer (PBS at pH 7.4²⁹) to prevent any pH effect. The experiments were done in triplicate at 20°C by adding 10 μ L of peptide solution to the SiNPs solution with an equilibration interval of 350s. Control experiments were performed without peptides on one hand and without SiNPs on the other hand. The heat exchange measured were subtracted from titration data priori to curve fitting. Thermodynamic parameters enthalpy, stoichiometry of the reaction N, and association constant K_{ads} (in M⁻¹) were obtained by nonlinear least-squares fitting of the experimental data using the single set of independent binding sites (SSIS) model of the Origin software provided with the instrument.

Western blot analysis

Proteins from the different fractions were separated by SDS-PAGE (12%), transferred onto Nitrocellulose membrane (Amersham[™]Protran[™] 0.2 μ m NC) and stained with Ponceau S solution (Sigma). After destaining, the membrane was treated by standard procedures. The primary antibodies against GFP were obtained from Molecular Probes (GFP Tag Polyclonal Antibody A-6455). In the case of the specific antibodies against asymmetrical dimethylarginines (ASYM25) and symmetrical dimethylarginines (SYM10), the antibodies were obtained from Millipore. Fluorescent-conjugated secondary antibodies (G680 goat anti-rabbit IgG) were from LI-COR. The membranes were scanned on Odyssey imaging system (LI-COR).

Search of RGG proteins in yeast and human cell proteomes

RGG short linear motifs have been identified using an in-house implementation of the Boyer Moore exact pattern matching algorithm.³¹ Yeast proteins were extracted from UniprotKB release 2015_01.

Search of dimethyl-Arginine residues in mass spectrometry data

Previous MS data used to establish the lists of adsorbed and non adsorbed human proteins⁹ were re-analyzed. Peptides with mass increments corresponding to monomethylation and dimethylation of arginine residues were searched in the groups of adsorbed and non adsorbed proteins. For this, MS/MS spectra were searched using MASCOT 2.5.1 software (Matrix Science, London) against the human proteome from the SwissProt 2015_02 database (20,199 sequences). The parameters used for this search were: full-trypsin specificity, up to 2 missed cleavages allowed, static modification of carbamidomethylated cysteine, variable oxidation of methionine, variable deamidation of asparagine and glutamine, variable methylation or dimethylation of arginine, mass tolerance of 5 ppm on parent ions, and mass tolerance on MS/MS fragments of 0.02 Da. Peptides were considered at a p-value below 0.05.

Simulation

All simulations were performed with the AMBER 11 package³² using the ff99SB force field and analyzed using cpptraj module and VMD 1.9.3 program.³³ Since the 3D structure of the peptides was not available, the initial structures were created in silico. The obtained positively charged structures (+3) were neutralized with Cl⁻ anions and were hydrated with water molecules (TIP3P model) that extend 9 Å from any peptide atom. The systems were then minimized using a steepest descent algorithm and used to initiate molecular dynamics. Simulations were performed at constant temperature (300K) and pressure (1 bar). The SHAKE algorithm and PBC were used with a 2 fs time step for the integration of the equations of motions. The cut-off distance for van der Waals interactions was 10 Å and the particle mesh Ewald was used for the long-range electrostatics. The 20 ns trajectory was then clusterized with Chimera program version 1.10³⁴ and the representative frame of the most populated cluster was chosen as the starting structure for adsorption simulations in the presence of a silica surface. For these calculations, we used the silica surface model developed by Emani et al.³⁵ that was compatible with AMBER force field and tested previously.^{36,37} We chose model of even Q3 silica surface of approximately 1075 Å² with a surface density of silanol plus siloxide groups corresponding to 4.7 groups/nm² in agreement with the experimental pH of our study. The fraction of silanol groups ionized to sodium siloxide groups was 9%. The adsorption trajectories were obtained by positioning the silica surface in the middle of the water box. Because the two surfaces of the silica model in contact with water were equivalent, it allows us to simulate adsorption of two peptides with a different orientation per calculation (see Figure S1). Each simulation was repeated 2 times by changing the seed of the random number generator. The initial peptide-surface distance was set to ca. 23 Å. To avoid diffusion of the silica surfaces weak restraints were applied on the coordinates. The production period was set to 50 ns, it was chosen because it is always sufficient to simulate the adsorption of the peptide on the silica surface. Using this protocol, we produced 4 independent adsorption trajectories for each 13-mer peptides.

Parameters of methylated R residues (both symmetric and asymmetric) were obtained from Dimitris Papageorgiou web site. Potential electrostatic surfaces of peptides were calculated with APBS program version 1.4.2.1.³⁸

RESULTS

Proteins containing RGG motifs are enriched in the group of high affinity for the silica surface.

Proteins the most prone to adsorb to silica surface have been previously identified from two protein extracts prepared from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* or from human cells (alveolar cells A549)⁹. Here we re-analyzed the shotgun proteomic data provided by this previous study and spotted the presence of three RGG-containing proteins among the proteins with the highest affinity to silica, i.e. the yeast proteins Npl3, Nop1 and Gar1. To test if this association could be generalized, we systematically screened the yeast proteome for proteins with high

numbers of RGG motifs in their sequence (Table S2) and identified Gar1 (18 motifs), Nop1 (17), Npl3 (15), Sbp1 (8), Dbp2 (7) and Nsr1(6). Strikingly, they were all

present among the most affine proteins for silica (Table S2). The same search was also performed on the human proteome and similar associations were found (Table S3). The strong enrichment of proteins containing multiple RGG motifs in silica-binding proteins suggests that the RGG motif behaves as a "tag" with high affinity for silica.

Npl3 binds to the silica surface through its RGG region

The simplest explanation of such affinity was that the RGG motifs interact directly with the silica surface. To test this hypothesis, we focused on Npl3, which is one of the yeast proteins with the highest affinity for silica. In this protein, all the RGG motifs are located in a small region of 133 AAs in the C-terminal part of the protein (Figure 1A). We constructed a fusion protein consisting of the green fluorescent protein (GFP) fused to the RGG domain of Npl3 (GFP-RGG, see Figure 1B). As controls, we fused the GFP with the N-terminal part of Npl3 (GFP-Nter) and also used the complete GFP-Npl3 fusion protein.²¹ The yeast strains harboring the different constructions were grown to allow the overexpression of the fusion proteins and the soluble protein extracts containing the fusion proteins were prepared. After incubation of the different extracts with silica NPs, the adsorbed (Ads) and non-adsorbed (NA) proteins were separated by centrifugation and green fluorescence was measured for each fraction. We report in Figure 1C the percentage of fluorescence in the Ads fraction and the Ads:NA ratio, whose value can be considered proportional to the affinity of the corresponding GFP fusion for the surface (see S11). As expected, the GFP-Npl3 fusion was found in the adsorbed fraction, confirming our previous data.⁹ The GFP-RGG fusion was also enriched in the adsorbed fraction, but the GFP-Nter fusion bound very poorly to the surface as did free GFP (Figure 1C). These data thus indicate that the RGG region plays an important role in the adsorption of Npl3 onto a silica surface. Control experiments showed that the fusion proteins were produced as a discrete signal at the expected size (Figure S2A).

Importance of arginine dimethylation

We speculated that the strong affinity of the RGG motif for silica is due to electrostatic interactions between the basic R residue and the siloxide groups of the silica surface. However, given that, in vivo, most RGG motifs are asymmetrically dimethylated (especially in the case of Npl3; see Introduction and ²¹), asymmetrical dimethylation of arginine residues could be a modification that helps to enhance adsorption. Hmt1, the main arginine methyl transferase in yeast, responsible for at least 80% of asymmetrical dimethylations³⁹, can be deleted without major effects on cell growth.⁴⁰ We thus prepared and tested extracts from the BY4741 strain (WT) and from a $\Delta hmt1$ mutant strain expressing GFP-Npl3. When expressed in the mutant, the fusion protein was significantly less adsorbed on silica surface than that from the WT (Figure 1C). We checked that the fusion proteins were produced as a discrete signal (Figure S2B).

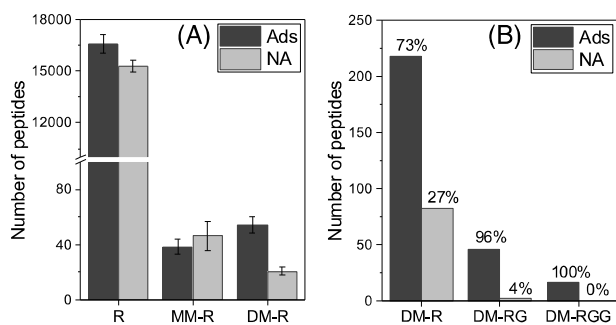


Figure 2: Arginine dimethylation is over-represented in adsorbed proteins. (A) Shotgun A549 data from²⁸ were screened for non-methylated (R), monomethylated (MM-R) and dimethylated arginine (DM-R) containing peptides. Four independent adsorbed protein fractions (Ads) as well as four non-adsorbed protein fractions (NA) were analyzed. Average values are given with their standard deviations. (B) Total number of DM-R residues in the four adsorbed (Ads) and four non-adsorbed (NA) fractions according to the peptide sequence and the presence of a glycine (G) residue in the second (DM-RG) and third (DM-RGG) positions. Note that in this experiment, the mass spectrometry technique used cannot determine whether the DM-R residues detected are symmetrically or asymmetrically methylated.

Our data thus suggested that asymmetrical dimethylation of Npl3 contributes to the strong affinity of the protein for the silica surface. Another analysis further supported this conclusion: in our previous work⁹, the lists of proteins adsorbed or not onto silica nanoparticles have been established without a specific search for mono or dimethylation of the arginine residues. Here, we re-analyzed the shotgun proteomic data of this previous study and screened for peptides possibly modified by monomethylation and dimethylation of their arginine. This analysis was not possible with the yeast data due to the limited performance of the tandem mass spectrometer used but was performed with the human data obtained with a more advanced spectrometer.⁹ Figure 2A shows that the number of peptides with a dimethylated arginine residue was markedly higher (by roughly a factor 3) in the adsorbed protein fraction than in the non-adsorbed fraction, whereas the number of monomethylated and non-methylated arginine residues was relatively similar in both fractions. We also differentiated dimethylated RG motifs and dimethylated RGG motifs amongst the dimethylated peptides (Figure 2B) and highlighted even more striking differences between the adsorbed and the non-adsorbed fractions. The strong enrichment of dimethylated arginine residues in peptides found in the adsorbed fraction thus suggested that these modified residues have higher affinity than the standard R residues.

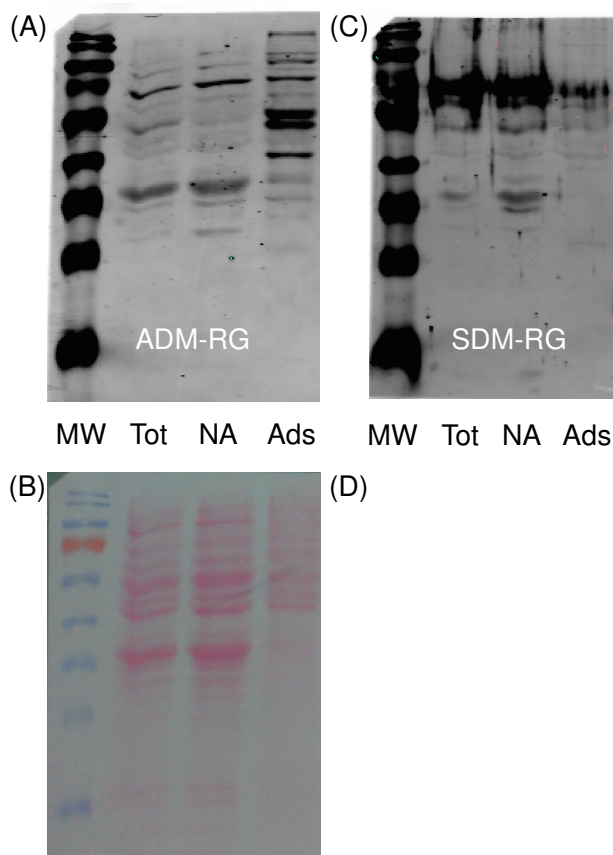


Figure 3: Enrichment of asymmetrically dimethylated RG peptides in the adsorbed fraction. Western blot analysis of A549 total cell lysate (Tot), of the non adsorbed fraction (NA) and of the adsorbed fraction (Ads), using ASYM25 (A) and SYM10 (C) antibodies to detect ADM-RG peptides and SDM-RG peptides, respectively. (B) and (D): Ponceau staining of total proteins in the corresponding gels. Positions of molecular weight standards (MW) are shown in the first lane.

This re-analysis of our previous shotgun data is limited by its inability to distinguish between symmetrically dimethylated arginine (SDM-R) and asymmetrically dimethylated arginine (ADM-R). We thus used two specific antibodies (SYM10 and ASYM25) raised respectively against SDM-RG and ADM-RG⁴¹ to detect the corresponding modifications. After incubation of a protein lysate from A549 cells with silica NPs, the total, the Ads and the NA fractions were analyzed by Western blotting using these antibodies (Figure 3). The ADM-RG peptides were detected in larger amounts in the Ads fraction than in the total lysate and NA fractions (Figure 3A). The difference was even stronger considering the lower amount of proteins present in the Ads fraction (Figure 3B). On the contrary, SDM-RG peptides were similarly detected in the Ads and NA fractions (Figure 3C and 3D). Our data thus confirm the enrichment in ADM-RG peptides and not in SDM-RG peptides in the adsorbed proteins.

Asymmetrically dimethylated RGG oligopeptides bind strongly to silica surfaces

In order to check the interaction of model molecules with silica surfaces under various conditions, we tested a series of pure synthetic peptides. We designed a set of nine 25-mer peptides containing five RGG motifs, differently methylated on the R residues, to determine the effect of methylation on silica affinity. Figure 4A shows the sequence and characteristics of the peptides. Due to the presence of 17 aromatic AAs in the RGG region of Npl3, which may complicate the analysis by fluorescence (see below), we switched to another yeast RGG protein, Nop1. Nop1 contains 17 RGG motifs in the 80 AA N-terminal part of the protein and only three aromatic AAs. Peptide P1 was chosen identical to Nop1 from residue 7 to residue 31, except for residue 19, for which phenylalanine was replaced by tryptophan (Figure 4A) to follow the fluorescence of the peptide. We designed the same peptide with two ADM-RGG among the five RGG motifs (Peptide P2) and a peptide with five ADM-RGG motifs (P3). A peptide with five SDM-RGG motifs (P4) was also synthesized, for which the R residues were symmetrically dimethylated and a peptide with KGG motifs instead of RGG (P5). Three 13-mer peptides (peptides P6 to P8) were designed to assess the influence of the number of RGG repetitions in the binding (see Figure 4A).

For each peptide, the adsorption isotherm was established and fitting the data to the Langmuir model allowed the determination of n_{∞} and K_{ads} (Figure 4A). Figure 4B shows the isotherm curve established for peptides P1 and P3 and the corresponding Langmuir fits.²⁹ A comparison of all the peptides led to the following major conclusions: (i) the longer the peptide, the stronger the affinity; (ii) the affinity constants of KGG peptides and unmethylated RGG peptides are very similar as shown by the comparison of P5 with P1 and of P8 with P6, suggesting that binding via K residues is nearly as efficient as via R; (iii) symmetric methylation does not improve significantly peptide affinity (compare P4 with P1); and (iv) on the contrary, asymmetric methylation of R residues markedly improves the affinity of the peptide for silica (compare P3 with P1 and P7 with P6). The fact that the binding via K residues was nearly as efficient as via R and that the affinity of ADM-R containing peptides was strongly enhanced gave us a new perspective on a result that remained misunderstood in previous studies.^{7,9} In these studies, using a statistical approach, the enrichment of R residues had been identified in the primary sequences of adsorbed proteins, but not K residues.^{7,9} Based on our present data, a significant proportion of the R residues in the adsorbed proteins in these studies were likely ADM-R.

The method used above to establish the adsorption isotherms does not provide access to the thermodynamic parameters

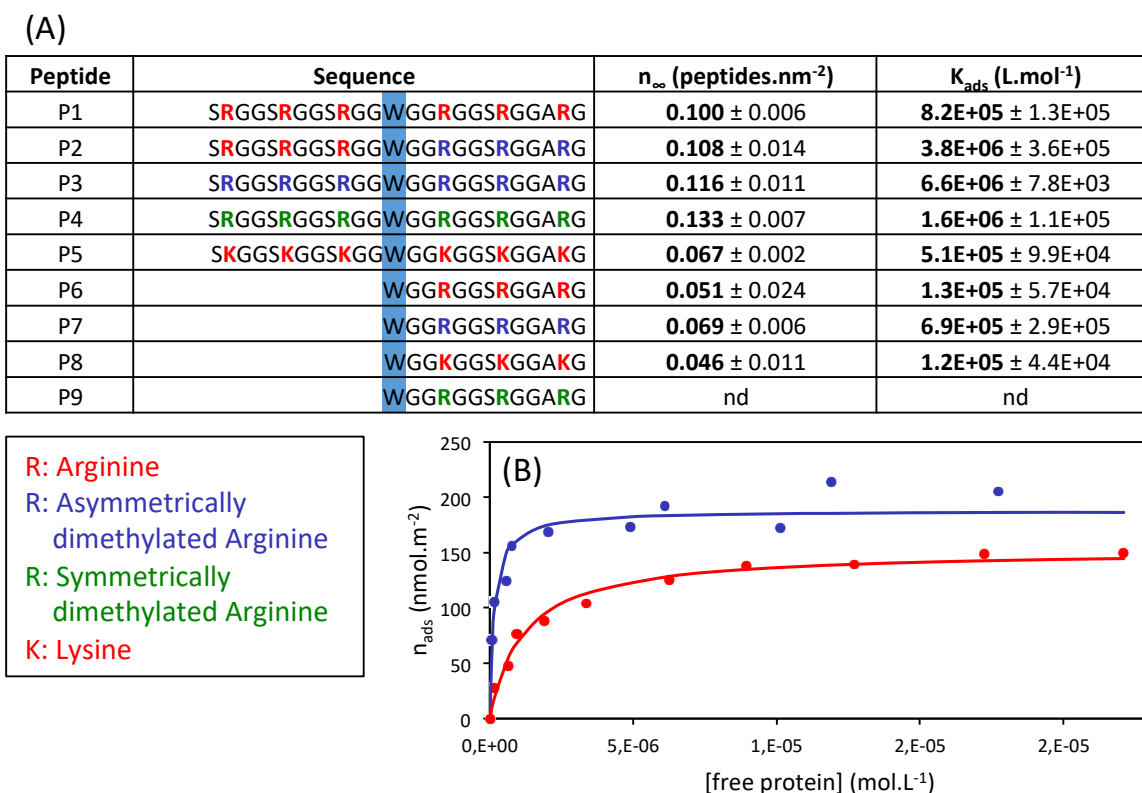


Figure 4: Adsorption constants of synthetic RGG-peptides interacting with silica nanoparticles deduced from adsorption isotherms (A) Sequences of the tested peptides and their adsorption constant values. Peptide concentrations were measured by determining tryptophan fluorescence ($\lambda_{excitation} = 280$ nm, $\lambda_{emission} = 357$ nm). The K_{ads} and n_{∞} values were deduced from adsorption isotherm curves fitted to the Langmuir model. The K_{ads} and n_{∞} values reported here are averages of at least three independent experiments. (B) Examples of isotherm curve determination for peptides P1 (red) and P3 (blue).

during adsorption, i.e. enthalpy and entropy. We thus completed the analysis for peptides P1, P3 and P4 using isothermal titration calorimetry (ITC). Figure S3 shows the ITC graphs for peptides P1 and P3 as examples. The thermodynamic data deduced from these experiments are reported in Table 1. The K_{ads} values measured by adsorption isotherms were confirmed. The adsorption was enthalpy-driven for all three peptides. In each case, entropy decreased during the interaction

and thus tended to act against adsorption. The maximum amount of peptide that can be adsorbed on the surface can be very different depending on the technique used. The n_{∞} values measured by ITC were only about 10% of the n_{∞} reported in Figure 4A. We checked that the difference was not due to adsorption kinetics (3 h for the isotherms compared with a series of 6 min incubations between each injection in the case of ITC). One possible explanation for the identity in K_{ads} and difference in n_{∞} is that part of the adsorption process — occurring at high peptide concentration — is athermic.⁴²

Table 1: Adsorption constants and thermodynamic data for synthetic RGG-peptides interacting with silica nanoparticles measured using isothermal titration calorimetry^a.

Peptide	n_{∞} (peptides .nm ²)	K_{ads} (L.mol ⁻¹)	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal.mol ⁻¹)	ΔG (kcal.mol ⁻¹)
P1	0.006 ± 0.001	7.8E+05 ± 1.9E+05	-20.8 ± 4.3	12.9 ± 4.4	-7.9 ± 0.2
P3	0.011 ± 0.001	5.1E+06 ± 1.4E+06	-12.5 ± 0.7	3.5 ± 0.8	-9.0 ± 0.2
P4	0.017 ± 0.001	1.2E+06 ± 4.9E+05	-13.4 ± 1.6	5.3 ± 1.9	-8.1 ± 0.3

^aThe table gives the average values from three independent experiments

Given that the adsorption of the peptides on the silica surface is enthalpy-driven, we strove to identify which interactions are involved. We then performed molecular dynamics (MD) simulations of the interactions between the peptides and the surface. We undertook this approach to describe, for four selected peptides, their very first interactions (50 ns) with the surface and the involvement of the different AAs in these interactions. To simplify the study and to avoid the simulation of very large systems, we used the 13-mer peptides P6 to P9 (Figure 4A) and a representative silica surface

model under conditions close to experimental conditions used for the isotherm and ITC experiments.

Electrostatic properties differ among the tested amino acids

We first analyzed the charge distribution of the four positively charged residues (R, ADM-R, SDM-R and K) present on the four peptides. The global positive charge was always +1, but the charge distribution differed (Figure 5; Figure S4).

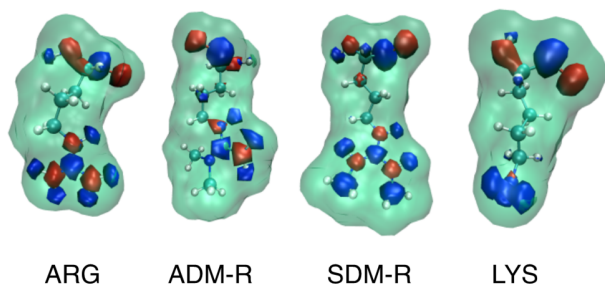


Figure 5: Electrostatic potential maps of standard arginine (ARG), asymmetrically dimethylated arginine (ADM-R), symmetrically dimethylated arginine (SDM-R) and standard lysine (LYS). Positive and negative iso-surfaces are represented with the same contour levels in blue and red, respectively. The molecular surfaces are represented in green.

Methylation of R renders it more hydrophobic and changes the charge distribution. Furthermore, the addition of methyl groups increases steric hindrance of the guanidinium side chain, which likely influenced its ability to interact. To have a spatial electrostatic view of the molecules, we calculated the electrostatic potential and the density surfaces (Figure 5). The major difference between the R, ADM-R and SDM-R involved the nitrogen atoms of the guanidinium group, which were all negatively charged in R and SDM-R, whereas there was a strong electrostatic dissymmetry in ADM-R. The nitrogen atom holding the two methyl groups was bulky and nearly uncharged, but the rest of the guanidinium group was markedly charged. Finally, the electrostatic map of SDM-R was very similar to the R map. The atom names and charges of R and methylated R (both ADM and SDM) residues are given in Figure S4.

Adsorption simulations of peptides at the silica surface

We first performed MD simulations on the 13-mer peptides in a solvated, electro-neutral system (water) to ensure that they remained unstructured as expected for peptides containing XGG motifs, where X=R (peptide P6), K (P8), ADM-R (P7), or SDM-R (P9) (Figure 4A). Analysis with the visual MD timeline module showed that secondary structure did not appear during the calculations, indicating that the considered peptides were unstructured during the entire simulation in water.

Two MD simulations were performed for each system in which two peptides were placed at ca. 23 Å from the interacting SiO₂ surface (Figure S1). The chemical composition of the SiO₂ surface was 9% siloxide and 91% silanol (see M&M). In all trajectories, the initial orientation of the first peptide was random, whereas the second was rotated by 180° according to the silica surface. We analyzed four adsorption events for each

13-mer peptide type. Direct interactions between the silica surface and the peptides were observed in all trajectories. After 50 ns production time, there was a strong interaction in 14 out of 16 simulations as shown in Figure 6. The two excep-

tions involved the SDM-R peptide P9 (dynamic 1 and dynamic 3) that did not establish strong interactions allowing anchorage of the peptide to the surface.

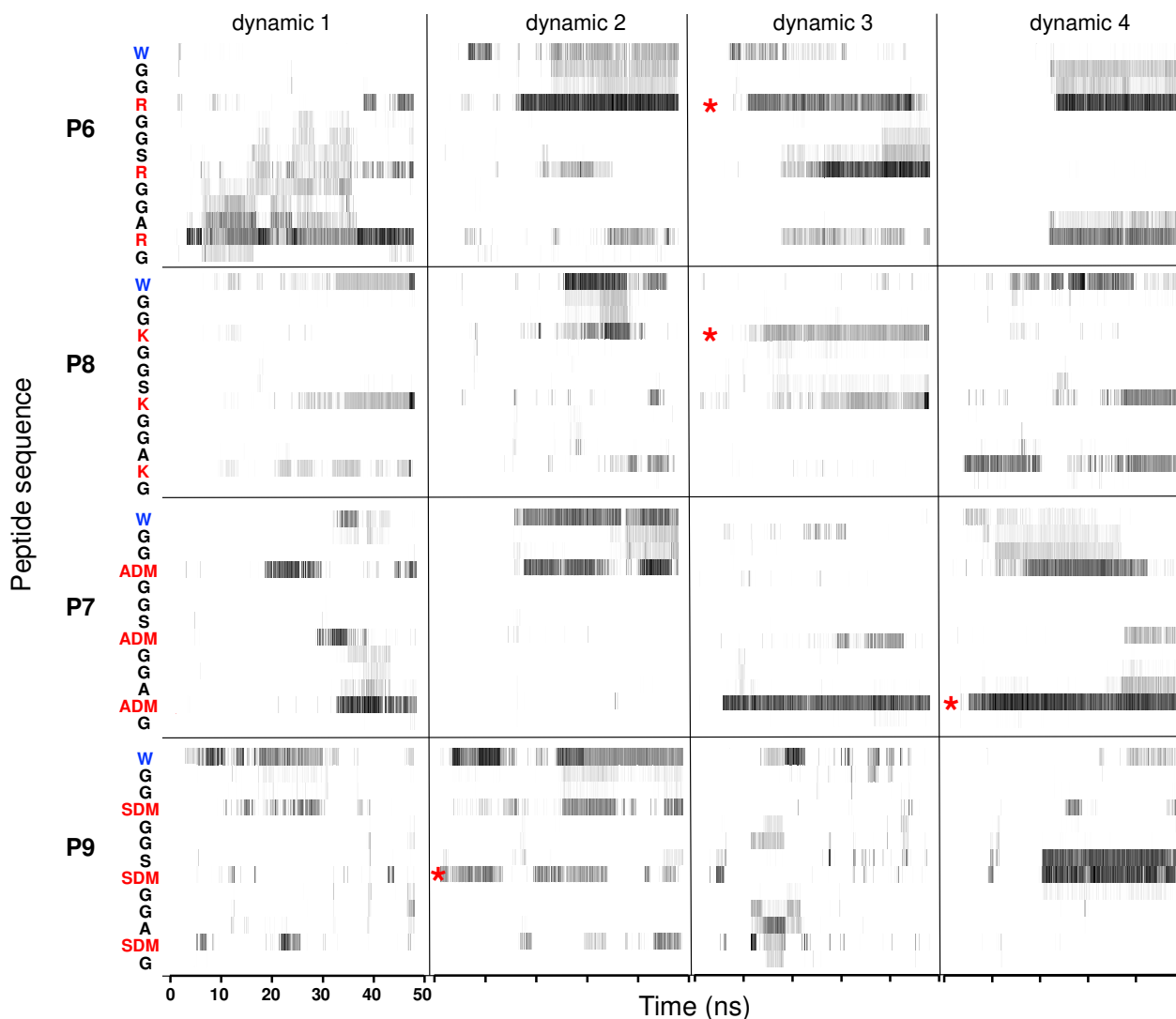


Figure 6: Timelines of peptide interactions with the silica surface for the 16 performed molecular dynamics (MD) simulations. Interactions were sampled every 500 ps for 50 ns with visual MD. The red asterisk (*) indicates the selected positive amino acids chosen for the analysis of the atomic contacts shown in Figure 7. Intensity of the gray color corresponds to the proximity between the residue and the surface (light, distant position; dark, proximal position).

At the initial stages of adsorption, only positively charged AAs were involved, demonstrating that electrostatic forces govern the first events of the adsorption process. These electrostatic forces involved the residues K, R, ADM-R or SDM-R, but also the positively charged N-terminal AAs (here, a W residue). This N-terminal residue was involved in the interaction in 8 out of 16 simulations performed (Figure 6). As a general rule, after initial contact through a specific positive AA, another positive residue interacted and sometimes showed intermittent contacts with the surface through hydrogen bonds.

Thus, the peptide explores the surface until a stronger interaction appears that maintains the peptide bound to the surface.

However, we noted one exception (one dynamic out of 16) that proves the rules (dynamic 4 of peptide P9) in which the second interaction was not mediated by a positive residue but a serine (S) (Figure 6).

Ionic interactions and hydrogen bonds

The residues K, R and ADM-R were anchored to the surface due to at least one ionic interaction between an anionic siloxide (Si-O⁻) on the surface and the cationic groups, namely the guanidinium group for R and ADM-R or the ammonium group for K (Figure 7). Once the ionic interaction had been established, relatively simultaneously, hydrogen bonds were formed with vicinal silanol (Si-OH) or siloxane (Si-O-Si). Some of them were very stable — for example, the interaction

between a silanol of the silica surface and the nitrogen NE (□□□ Nε) atom of ADM-R (Figure 7C) —, whereas some others were transient as observed for a siloxane of the silica surface and the nitrogen NH1 atom of R (Figure 7A). In this case, although NH1 and NH2 were tightly anchored to a siloxide through two ionic interactions, the guanidinium group tended to slightly oscillate to alternatively favor hydrogen bonds involving either the NH1 or the NH2 nitrogen atom (Figure 7A).

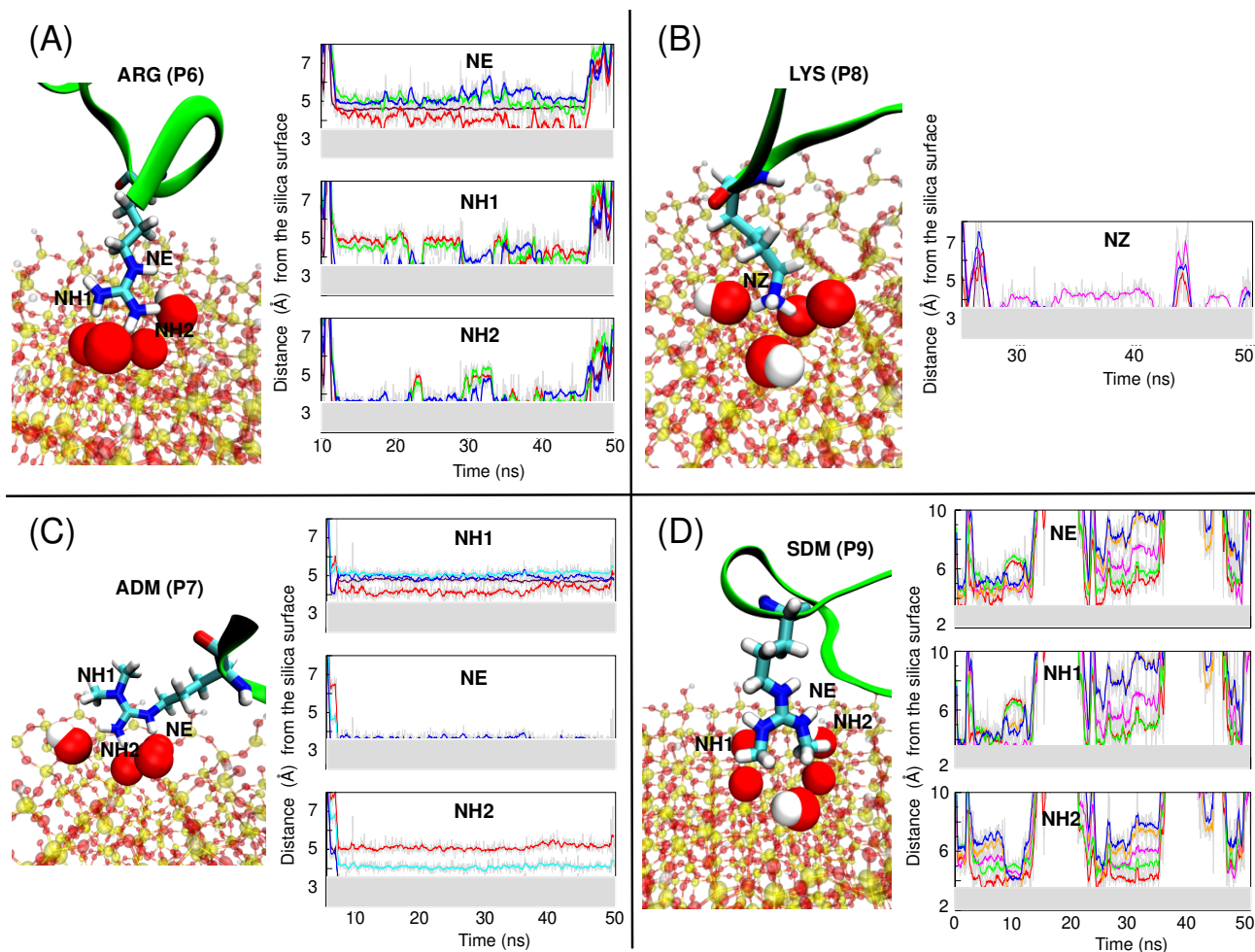


Figure 7 Positive charged amino acids interaction with silica surface. Molecular representation of contact between the silica surface and the charged amino acids and change in the distances between the nitrogen atoms of the guanidinium or ammonium groups and the oxygen atoms of the siloxide, siloxane or silanol group of the silica surface for each positive amino acid tested in this study. (A) Arginine (peptide P6) (B) Lysine (P8) (C) asymmetrically dimethylated arginine (P7) and (D) symmetrically dimethylated arginine (P9). The color code in the inset graphs indicates the considered atoms of the silica surface displayed in van der Waals representation and the gray zone shows the contact interval, from 2 to 3.5 Å, for which we considered that the interaction was established. Interactions with the siloxide group (Si-O⁻) are shown in brown, with the siloxane group (Si-O-Si) in blue, cyan or green and with the silanol group (Si-OH) in red, orange or magenta.

For R and SDM-R, which present a symmetrical charge distribution in the guanidinium group, there was no preferred interaction with NH1 over NH2. Nevertheless, due to the presence of the bulky methyl groups for SDM-R, the interaction was less favorable. In this situation, both side chains of R and SDM-R interacted orthogonal to the silica surface (Figure 7A and 7D).

In contrast, ADM-R lay flat on the silica surface. ADM-R was clearly oriented with NE with the unmethylated NH2 in interaction with the surface and the dimethylated NH1 repulsed from the surface. The interaction with the surface was thus exclusively mediated by the positive part of the guanidinium group and not by the methyl groups. This orientation excludes

the possibility of hydrophobic interactions between the methyl groups and the surface. There is a similar interaction in only one case for the R residue (P6 dynamic 1 R12 Figure 6), i.e. the NE and the NH2 atoms interact with the silica surface as shown in Figure S5.

Of the tested AAs, ADM-R had the most stable and strongest interaction with the surface. It involved two ionic interactions (one with NE and one with NH2) and three (to four) H-bonds, all of them showing marked stability.

In agreement with the stability of the binding and the adsorption constant (K_{ads}) of the peptides (Figure 4), the number of interactions differed among residues: five to six simultaneous interactions for the ADM-R residue; four to five interactions for R and three interactions for K.

The SDM-R residue showed very different behavior. Although this residue was globally positively charged, it did not interact strongly alone with the silica surface (Figure 4D). When a stable interaction occurred, it was associated with a second residue, S or N-terminal W, as observed in Figure 6 (dynamic 4, P9 and dynamic 2, P9 respectively) and shown in Figure S6. Thus, the SDM-R residue seems to never drive the interaction alone, but requires the contribution of another AA (Figure 7D). The methyl group likely causes steric hindrance that prevents strong ionic interactions between the positive charge of the SDM-R and the negative siloxides of the silica surface (Figure 7D).

DISCUSSION

Our previous study showed that proteins with long ID regions and RNA-binding domains have a high propensity to adsorb on silica surfaces.⁹ The proteins containing repetitions of the RGG motif present both characteristics. We show here that RGG motifs have high affinity for silica: (i) the high-throughput proteomic data show strong enrichment in RGG motifs in the group of proteins with the highest affinity to silica; (ii) tests with Npl3 truncations identified the RGG region as essential for binding silica; and (iii) the high affinity of RGG motifs (and particularly the ADM version of the motif) for the silica surface was confirmed by using synthetic peptides. The RGG motif could thus be considered as a kind of tag for binding silica. Logically, proteins and peptides displaying a high copy number of this motif tend to adsorb silica with the strongest affinity. Moreover, the structure of the RGG proteins with multiple motifs in tandem suggests a sequential and cooperative process where the binding of a first RGG motif enhances the chance of binding in turn other motifs.

In this study, we showed that the ADM-RGG motif has a higher affinity for silica than the unmethylated RGG motif. In vivo, the R residue of RGG motifs is often methylated. For example, in the case of Npl3, at least 10 of the 15 RGG motifs present in this protein are in fact ADM-RGG.²¹ Accordingly, our data show that the affinity of Npl3 for the silica surface improve with the dimethylation of these R residues.

Asymmetric dimethylation of an R residue has a strong asymmetric effect on charge distribution and polarity within the guanidinium group. The two hydrogen atoms of the non-methylated NH2 are markedly positive whereas the six hydrogen

atoms of the dimethylated nitrogen are only weakly charged (Figure 5). Owing to the electronegativity of the surface, this di-symmetry tends to orientate the ADM-R with the two methyl groups in the aqueous phase and the non-methylated NH2 on the surface (Figure 7). In case of non-methylated R or SDM-R, the charge distribution of the guanidinium group is symmetrical and homogeneous. This uniform symmetry causes the interactions to be more erratic due to a tendency to oscillate (case of unmethylated R), or even to be unstable (case of SDM-R). Although the guanidinium group of R predominantly stands on the surface on NH1 and NH2 atoms with slight oscillation, the guanidinium group of ADM-R lies flush on the surface (NE and NH2 atoms). The MD simulations data thus suggest that ADM-R is the most favorable amino acid to interact strongly and stably with silica surfaces, which nicely correlates with the K_{ads} data.

One hypothesis for explaining the increased affinity of ADM-R over unmethylated R for silica surfaces is a strong contribution of hydrophobic interactions between the two methyl groups and the siloxane groups (Si-O-Si) of the surface, which also have hydrophobic properties.^{43,44} However, we reject this hypothesis based on the MD simulation data, which show that the main interactions are electrostatic (ion pairing and H-bonds) and that the methyl groups are maintained away from the surface. The second reason for excluding this possibility is the fact that the interaction is enthalpy-driven as shown by the ITC experiments and not entropy-driven as it would be the case for hydrophobic interactions.⁴⁵

Surprisingly, for each peptide tested, ΔS value was negative, indicating that the entropy variation of the system acts against adsorption. The entropy of the system is composed of the solvent entropy and of the peptide entropy. As a general rule, it is considered that during the adsorption process, solvent molecules (water and ions) lead to a significant gain in entropy, corresponding to their release from the surface (at least the first water layer) into the bulk phase.⁴⁶⁻⁴⁸ However, this entropy gain can be counterbalanced by peptides that are losing entropy. The peptides used in this study were designed from a region of Nop1 with ID properties. The entropy of these peptides is high in solution and their binding to the surface very likely decreases their degree of freedom and entropy.⁴⁹ Given that the global entropy was negative upon adsorption thus suggests that, in our model, peptide configurational entropy plays a larger role than solvent entropy.

In this study, we logically focused our analysis on the R residue of the RGG motif. Another question concerns the role of the glycine (G) residues in the binding/affinity to the surface. G is the simplest AA (it has no side chain). The simulations indicate that the G residues never (or very rarely) interact with the surface. We suggest that this AA nevertheless has an indirect importance in the binding process: it contributes to the intrinsic disorder of the peptide region and has low steric hindrance that does not impede interactions of the proximal R residues with the silica surface. In support of this hypothesis, our Ramachandran analysis indicates that the degree of freedom of the R residues is higher in the RGG motif than in the RAA motif (Figure S7). Increasing the size of the side chain (CH_3 for alanine versus H for the G residue) seems sufficient to significantly reduce the potential of the RAA peptides to

scan the surface compared with RGG peptides. We thus suppose that the biological function for the presence of the two G residues following the R in RGG motifs is to optimize the flexibility of the peptide chain⁵⁰ and thus enhances the probability of interaction of vicinal R residues with the biological targets of RGG proteins.

The main biological target of the RGG motifs is RNA. Some RGG proteins have the property to bind RNA non-specifically on the phosphoribose moiety. For instance, in the case of the heterologous nuclear ribonucleoprotein hnRNP U, the 112 C-terminal AAs containing seven RGG and four RG motifs can bind ssDNA and RNA.¹³ Another example is the hamster nucleolin, which binds RNA via its RGG region.¹² However, the description of the physico-chemical mechanism of interaction between RGG motifs and RNA is lacking. It is generally supposed that RGG motifs bind RNA through electrostatic interactions between the positively charged R residue and the negatively charged phosphate backbone.¹⁵ Based on our present data, we advocate that the O- of the phosphate backbone is a strong interaction target for the RGG motif. It is also probable that the asymmetrical dimethylation of the R residues increases or modulates the strength of this interaction as previously suggested.⁵¹⁻⁵² According to this hypothesis, the methylation/demethylation of the R residue by cellular methylases/demethylases may thus be a key mechanism for cells to regulate the interaction of RGG proteins with RNA.

CONCLUSIONS

Our data show that proteins with RGG motifs have high affinity for silica surfaces, especially if the R residues are asymmetrically dimethylated, as it is often the case in vivo. The asymmetric dimethylation polarizes the guanidinium group, which orientates the positive side of the guanidinium group on the silica surface through a strong ionic interaction with a siloxide group and H bonds. Consistent with this electrostatic-based mechanism, the interaction is enthalpy driven. Our data indicate that asymmetrical dimethylation of the RGG motifs strongly influences the properties of RGG motifs, lending support to the idea that this type of post-translational modification is, in vivo, a fine point of control for regulating the interaction of RGG proteins with its cellular partners. From a methodological point of view, this study, based on a combination of biological experiments, large -omics data mining and molecular modeling helped improve the understanding of physico-chemical mechanisms, such as interface chemistry, and demonstrated that AA modifications can be of major importance in interaction chemistry.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Additional explanations (SI1) (PDF)
Tables S1-S3; Figures S1-S7 (PDF)

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*yves.boulard@cea.fr
*jean.labarre@cea.fr

Funding Sources

This research was supported by a grant from the « Programme de Toxicologie » (NaToM grant) of the CEA. ITC experiments were supported by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INBS-05. L.M. was supported by a CFR grant from the CEA.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Anne McBride for the gift of the plasmid expressing GFP-Npl3 fusion (pPS811). We thank Mathilde Biola-Clier for the preparation of A549 protein extracts and Sylvie Mariotte-Labarre for the help in the construction of GFP fusion proteins. We also acknowledge the help of Jean-Charles Gaillard for parameterizing the MASCOT software. We appreciate the help from the staff of the I2BC computing facility (I2BC/SICS) for the molecular dynamics simulations.

ABBREVIATIONS

REFERENCES

- (1) Willett, R. L.; Baldwin, K. W.; West, K. W.; Pfeiffer, L. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (22), 7817.
- (2) Lambert, J.-F. *Orig. Life Evol. Biosphere J. Int. Soc. Study Orig. Life* **2008**, *38* (3), 211.
- (3) Walkey, C. D.; Chan, W. C. W. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2780.
- (4) Aggarwal, P.; Hall, J. B.; McLeland, C. B.; Dobrovolskaia, M. A.; McNeil, S. E. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61* (6), 428.
- (5) Fenoglio, I.; Fubini, B.; Ghibaudi, E. M.; Turci, F. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63* (13), 1186.
- (6) Ikeda, T.; Kuroda, A. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *86* (2), 359.
- (7) 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. *PLoS One* **2013**, *8* (11), e81346.
- (8) Norde, W. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2008**, *61* (1), 1.
- (9) Klein, G.; Mathé, C.; Biola-Clier, M.; Devineau, S.; Drouineau, E.; Hatem, E.; Marichal, L.; Alonso, B.; Gaillard, J.-C.; Lagniel, G.; Armengaud, J.; Carrière, M.; Chédin, S.; Boulard, Y.; Pin, S.; Renault, J.-P.; Aude, J.-C.; Labarre, J. *Nanotoxicology* **2016**, *10* (10), 1555.
- (10) Castello, A.; Fischer, B.; Eichelbaum, K.; Horos, R.; Beckmann, B. M.; Strein, C.; Davey, N. E.; Humphreys, D. T.; Preiss, T.; Steinmetz, L. M.; Krijgsveld, J.; Hentze, M. W. *Cell* **2012**, *149* (6), 1393.
- (11) Thandapani, P.; O'Connor, T. R.; Bailey, T. L.; Richard, S. *Mol. Cell* **2013**, *50* (5), 613.
- (12) Ghisolfi, L.; Joseph, G.; Amalric, F.; Erard, M. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (5), 2955.
- (13) Kiledjian, M.; Dreyfuss, G. *EMBO J.* **1992**, *11* (7), 2655.
- (14) Chen, T.; Côté, J.; Carvajal, H. V.; Richard, S. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (33), 30803.
- (15) Ozdilek, B. A.; Thompson, V. F.; Ahmed, N. S.; White, C. I.; Batey, R. T.; Schwartz, J. C. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45* (13), 7984.

- (16) Mears, W. E.; Rice, S. A. *J. Virol.* **1996**, *70* (11), 7445.
- (17) Corbin-Lickfett, K. A.; Chen, I.-H. B.; Cocco, M. J.; Sandri-Goldin, R. M. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37* (21), 7290.
- (18) Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Darnell, J. C.; Serganov, A.; Majumdar, A.; Ilin, S.; Raslin, T.; Polonskaia, A.; Chen, C.; Clain, D.; Darnell, R. B.; Patel, D. J. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18* (7), 796.
- (19) Bedford, M. T.; Richard, S. *Mol. Cell* **2005**, *18* (3), 263.
- (20) Lee, M. S.; Henry, M.; Silver, P. A. *Genes Dev.* **1996**, *10* (10), 1233.
- (21) McBride, A. E.; Cook, J. T.; Stemmler, E. A.; Rutledge, K. L.; McGrath, K. A.; Rubens, J. A. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (35), 30888.
- (22) Xu, C.; Henry, P. A.; Setya, A.; Henry, M. F. *RNA N. Y. N.* **2003**, *9* (6), 746.
- (23) Rizzuto, R.; Brini, M.; De Giorgi, F.; Rossi, R.; Heim, R.; Tsien, R. Y.; Pozzan, T. *Curr. Biol.* **1996**, *6* (2), 183.
- (24) Sarkar, G.; Sommer, S. S. *BioTechniques* **1990**, *8* (4), 404.
- (25) Söderberg, M.; Lang, M. A. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *32* (1), 65.
- (26) Brachmann, C. B.; Davies, A.; Cost, G. J.; Caputo, E.; Li, J.; Hieter, P.; Boeke, J. D. *Yeast Chichester Engl.* **1998**, *14* (2), 115.
- (27) Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
- (28) Klein, G.; Devineau, S.; Aude, J. C.; Boulard, Y.; Pasquier, H.; Labarre, J.; Pin, S.; Renault, J. P. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2016**, *32* (1), 195.
- (29) Dulbecco, R.; Vogt, M. *J. Exp. Med.* **1954**, *99* (2), 167.
- (30) Langmuir, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1918**, *40* (9), 1361.
- (31) Boyer, R. S.; Moore, J. S. *Commun ACM* **1977**, *20* (10), 762.
- (32) Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham III, T. E.; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Kolossváry, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Wang, J.; Hsieh, M.-J.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P. A. University of California, San Francisco 2010.
- (33) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14* (1), 33.
- (34) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (13), 1605.
- (35) Emami, F. S.; Puddu, V.; Berry, R. J.; Varshney, V.; Patwardhan, S. V.; Perry, C. C.; Heinz, H. *Chem. Mater.* **2014**, *26* (8), 2647.
- (36) Emami, F. S.; Puddu, V.; Berry, R. J.; Varshney, V.; Patwardhan, S. V.; Perry, C. C.; Heinz, H. *Chem. Mater.* **2014**, *26* (19), 5725.
- (37) Patwardhan, S. V.; Emami, F. S.; Berry, R. J.; Jones, S. E.; Naik, R. R.; Deschaume, O.; Heinz, H.; Perry, C. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (14), 6244.
- (38) Baker, N. A.; Sept, D.; Joseph, S.; Holst, M. J.; McCammon, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (18), 10037.
- (39) Gary, J. D.; Lin, W. J.; Yang, M. C.; Herschman, H. R.; Clarke, S. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (21), 12585.
- (40) Henry, M. F.; Silver, P. A. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16* (7), 3668.
- (41) Boisvert, F.-M.; Côté, J.; Boulanger, M.-C.; Richard, S. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **2003**, *2* (12), 1319.
- (42) Goobes, R.; Goobes, G.; Campbell, C. T.; Stayton, P. S. *Biochemistry (Mosc.)* **2006**, *45* (17), 5576.
- (43) Napierska, D.; Thomassen, L. C. J.; Lison, D.; Martens, J. A.; Hoet, P. H. *Part. Fibre Toxicol.* **2010**, *7* (1), 39.
- (44) Rimola, A.; Costa, D.; Sodupe, M.; Lambert, J.-F.; Ugliengo, P. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (6), 4216.
- (45) Atkins, P.; Paula, J. *Atkins' Physical Chemistry*, Oxford University Press.; UK, 2006.
- (46) Carlsson, J.; Aqvist, J. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (13), 6448.
- (47) Sprenger, K. G.; Pfaendtner, J. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2016**, *32* (22), 5690.
- (48) Devineau, S.; Zanotti, J.-M.; Loupiac, C.; Zargarian, L.; Neiers, F.; Pin, S.; Renault, J. P. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2013**, *29* (44), 13465.
- (49) Ben-Tal, N.; Honig, B.; Bagdassarian, C. K.; Ben-Shaul, A. *Biophys. J.* **2000**, *79* (3), 1180.
- (50) Corley, S. M.; Gready, J. E. *Bioinforma. Biol. Insights* **2008**, *2*, 383.
- (51) Raman, B.; Guarnaccia, C.; Nadassy, K.; Zakhariyev, S.; Pintar, A.; Zanuttin, F.; Frigyes, D.; Acatrinei, C.; Vindigni, A.; Pongor, G.; Pongor, S. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29* (16), 3377.
- (52) Blackwell, E.; Zhang, X.; Ceman, S. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19* (7), 1314.

Importance of post-translational modifications in the interaction of proteins with mineral surfaces: the case of arginine methylation and silica surfaces.

Supplementary information

SI 1: Why the ratio Ads:NA can be considered proportional to K_{ads}

Table S1: Sequence of the primers used for plasmid construction

Table S2: Yeast proteins with the highest number of RGG motifs

Table S3: Human proteins with the highest number of RGG motifs

Figure S1: Molecular representation of the simulated system

Figure S2: Western blotting of Npl3-GFP fusion proteins

Figure S3: Isothermal titration calorimetry of peptides P1 (A) and P3 (B) adsorbing on SiNPs.

Figure S4: Charge repartition and atom names on K, R, ADM-R and SDM-R

Figure S5: Molecular representation and evolution of the distances between the nitrogen atoms of the guanidinium group of Arg 12 and the silica surface.

Figure S6: Atomic representation of stable interaction between SDM-R and silica surface.

Figure S7: Ramachandran graph

SI 1: Why the ratio Ads:Na can be considered proportional to K_{ads}

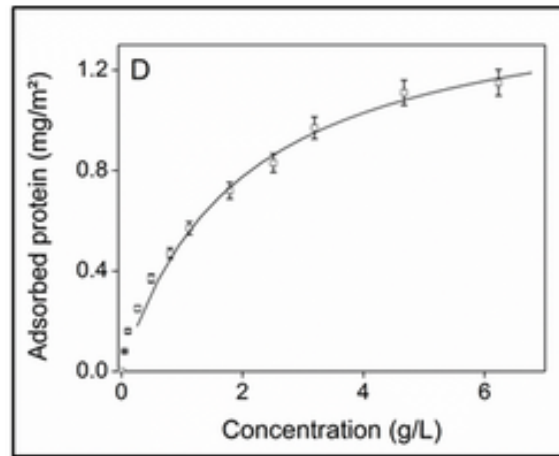


Figure S11 : adsorption isotherm of yeast proteins on silica NPs in PBS buffer; experimental data (□) and fitting by the Langmuir model (black line) (Mathé et al., 2013)

The adsorption of the protein pool follows a Langmuir isotherm (eq. S1 and Fig. S11 above), from which an average affinity constant $K_{\bar{p}}$ may be defined with respect to the concentration of the free protein pool $C_{\bar{p}}$ (We don't need here to calculate these concentrations. However, it can be done by considering an averaged molecular weight of 44 kDa for the pool of proteins (Milo, 2013)).

$$\theta_{\bar{p}} = \frac{[n_{pads}]}{[n_{maxads}]} = \frac{K_{\bar{p}}C_{\bar{p}}}{1+K_{\bar{p}}C_{\bar{p}}} \quad (\text{eq S1})$$

Where $\theta_{\bar{p}}$ is the fraction of adsorption site occupied by the protein pool, $[n_{pads}]$ the total amount of protein adsorbed (in moles/L of solution), $[n_{maxads}]$ the number of adsorption sites introduced in the solution (in moles/L).

Within the same formalism, the adsorption of a minor protein X from the pool can be expressed as the following Langmuir competition isotherm (eq S2; Wang and Ching, 2003).

$$\theta_X = \frac{[n_{Xads}]}{[n_{maxads}]} = \frac{K_X C_X}{1+K_X C_X + K_{\bar{p}} C_{\bar{p}}} \quad (\text{eq S2})$$

Where K_X is the affinity of the protein X for the surface, C_X its concentration in solution, and $[n_{Xads}]$ the amount of protein X adsorbed (in moles/L of solution).

Under our experimental conditions, we are using an excess of the protein pool to saturate the surface. From eq S1, it translates in $\theta_{\bar{p}} \approx 1$ and $K_{\bar{p}}C_{\bar{p}} \gg 1$.

The RGG proteins are proteins with moderate abundance. For example, under standard conditions, Npl3 has 8000 copies in one cell, which corresponds to about 1/6000 of the total protein pool (Kulak et al., 2014). Though under our working conditions, the GFP-Npl3 fusions are overexpressed (GAL promotor) and the number of Npl3 copies is certainly higher than 8000 copies/cell, it does not obviously saturate the surface, which translates from eq S2 in $\theta_X \ll 1$ and $K_{\bar{p}}C_{\bar{p}} \gg K_X C_X$.

Within these approximations, eq S2 becomes eq S3.

$$\theta_X = [n_{xads}] / [n_{maxads}] = \frac{K_X C_X}{K_{\bar{p}} C_{\bar{p}}} \quad (\text{eq S3})$$

The enrichment factor Ads/NA corresponds to $[n_{xads}]/C_X$ and is proportional to K_X . For a similar protein pool concentration, the variation in enrichment between two proteins will represent the variations of their surface affinity constants.

Table S1: Sequence of the primers used for plasmid construction

Name	Sequence
GFPm-S1	CCAACACTTGTCACTACTTTCACTTATGGTGTTC AATGC
GFPm-R1	GCATTGAACACCATAAGTGAAAGTAGTGACAAGTGTGG
NPL3M-S1	GACAATCCTCCACCAATCAGAAGATAAGCCATTTATATAGTTGAGAAA
NPL3M-R1	TTTCTCAACTATATAAATGGCTTATCTTCTGATTGGTGGAGGATTGTC
RGGM-S1	TTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATCAAATAGAGGTGGC
RGGM-R1	GCCACCTCTATTTGATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAA
RGGM-S2	CAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAG
RGGM-R2	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC

Table S2: Yeast proteins with at least six RGG motifs

Protein	RGG ¹	Function	Fold Change ²
Gar1	18	H/ACA ribonucleoprotein complex	5.7
Nop1	17	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar	17.3
Npl3	15	Nucleolar protein 3; Poly(A+) RNA binding	17
Sbp1	8	Single-stranded nucleic acid-binding	9.7
Dbp2	7	ATP-dependent RNA helicase	5.3
Nsr1	6	pre-RNA processing	13
Ski2	6	RNA helicase	nd ³

(¹) Number of RGG motifs present in the protein. Proteins are listed in descending order. The list is limited to proteins with more than 5 RGG motifs

(²) The "Fold Change" represents the accumulation factor of the protein on the silica surface. Values are extracted from Klein et al. (2016) and are based on the abundance of proteins evaluated by their MS/MS spectral counts.

(³) Not detected by tandem mass spectrometry (data from Klein et al. (2016)).

Table S3: Human proteins with at least six RGG motifs

Protein name	RGG ¹	Function	Fold Change ²
RBP56	22	TATA-binding protein-associated factor 2N	> 5
EWS	22	RNA-binding protein EWS	2.4
GAR1	19	Ribonucleoprotein complex subunit 1	nd ³
FUS	19	RNA-binding protein FUS	7.1
FA98A	12	Protein FAM98A	> 10
PGBM	10	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein HSHG2	nd
NUCL 10		Nucleolin	1.6
LS14A	10	Protein LSM14 homolog A	> 10
UBC	9	PolyUbiquitin C	nd
FBRL	9	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	4.4
CHTOP	9	Chromatin target of PRMT1 protein	nd
WDR33	8	Pre-mRNA 3' end processing protein	nd
HNRPR	8	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	2.2
HNRPQ	8	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	4.9
FILA	8	Filaggrin	nd
PP1RA	7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit	> 10
PAIRB	7	Plasminogen activator inhibitor 1	9.3
MTL14	7	N6-methyltransferase subunit METTL14	nd
HNRPU	7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	2.6
VIR	6	Protein virilizer homolog	> 10
THOC4	6	THO complex subunit 4	> 10
PRC2A	6	Protein PRRC2A	2.7
HNRPG	6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	nd
HABP4	6	Hyaluronan-binding protein 4	nd
FBLL1	6	Fibrillarin-like protein 1	nd
CECR6	6	Cat eye syndrome critical region 6	nd

(1) Number of RGG motifs present in the protein. Proteins are listed in descending order. The list is limited to proteins with more than 5 RGG motifs

(2) The "Fold Change" represents the accumulation factor of the protein on the silica surface. Values are extracted from Klein et al. (2016)

(3) Not detected by tandem mass spectrometry (data from Klein et al. (2016)).

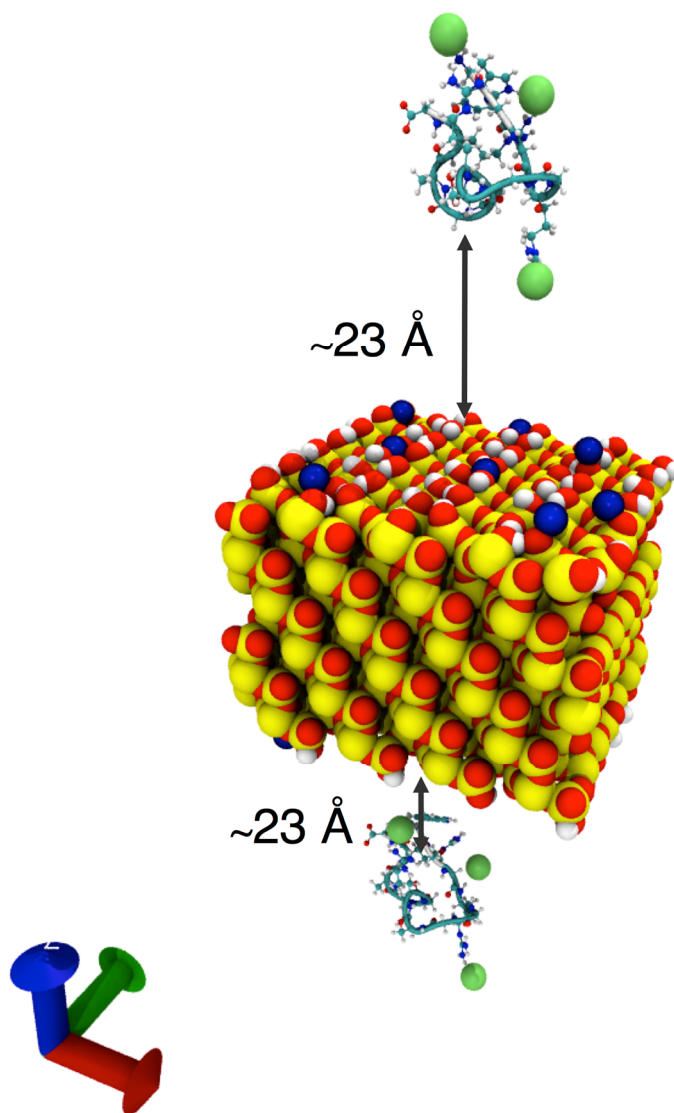


Figure S1: Molecular representation of the simulated system. The backbone peptide is represented in cyan, the side chains in CPK representation. The silica surface is represented in van der Waals representation with the silicon atoms in yellow, the oxygen atoms in red and the hydrogen atoms in white. The total system is neutral with the Cl⁻ represented in green and the Na⁺ in dark blue. The water molecules are not shown for the sake of clarity.

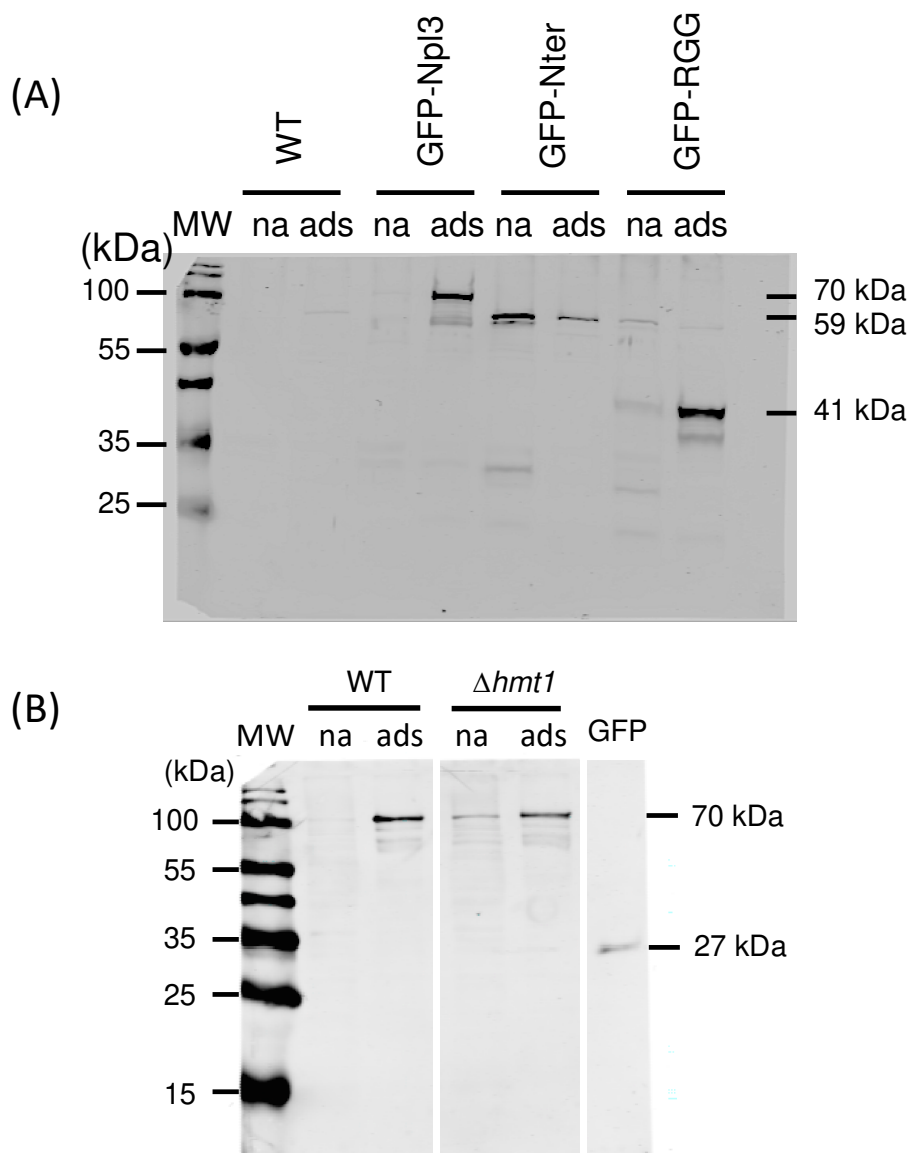


Figure S2: Western blotting of Npl3-GFP fusion proteins.

(A): Total soluble proteins extracted from the WT strain (BY4741) and from the strains expressing the GFP-fusions were put in contact with silica nanoparticles.

(B): Total soluble proteins extracted from the WT strain (BY4741) and from the mutant strain ($\Delta hmt1$) expressing GFP-Npl3 fusion (GFP-Npl3-RGG).

The supernatant (na) and the pellets (ads) were loaded on a SDS-polyacrylamide gel and Western Blotting were performed with GFP antibodies.

Molecular weight of marker proteins (MW) are indicated on the margin.

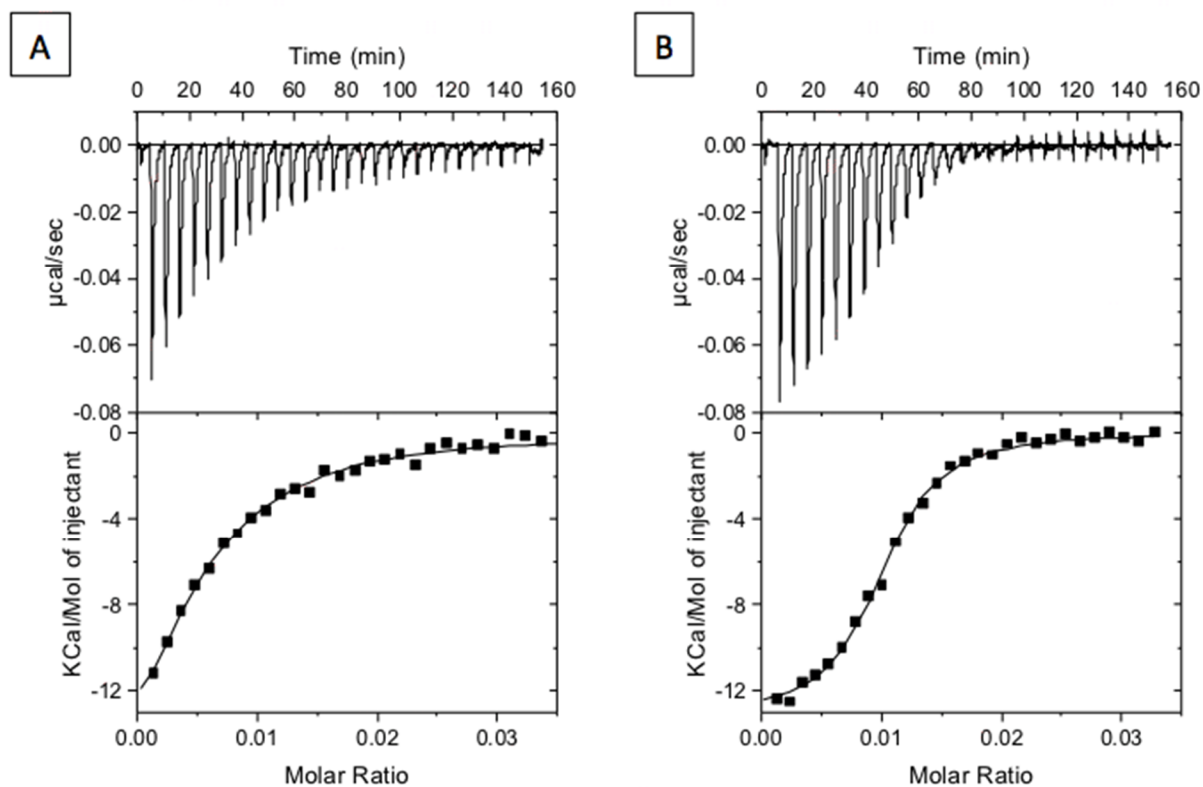


Figure S3: Isothermal titration calorimetry of peptides P1 (A) and P3 (B) adsorbing on SiNPs.

Upper panels: raw data of the heat exchange. Each spike corresponds to one injection of peptide in a SiNPs solution.

Lower panels: Integrated heat of each injection after subtraction of the dilution signal and titration curve fitted according to the SSIS model.

	O	C	N	H	CA	HA	CB	HB2/HB3	CG	HG2/HG3	CD	HD2/HD3
ARG	-0.5894	0.7341	-0.3479	0.2747	-0.2637	0.1560	-0.0007	0.0327	0.0390	0.0285	0.0486	0.0687
ADM-R	-0.5894	0.7341	-0.3479	0.2747	-0.1473	0.1471	-0.2654	0.0695	0.2322	-0.0123	-0.1423	0.1227
SDM-R	-0.5894	0.7341	-0.3479	0.2747	-0.1473	0.1438	-0.2141	0.0574	0.0822	0.0222	0.0465	0.0749

	NE	HE	CZ	NH1	HH11/12	NH2	HH21/22	HH1 & HH2	CH2	HC11/12/13	CH3	HC21/22/23
ARG	-0.5295	0.3456	0.8076	-0.8627	0.4478	-0.8627	0.4478					
ADM-R	-0.4598	0.3571	0.5308	-0.0876		-0.0876	0.4090		-0.2297	0.1342	-0.2297	0.1342
SDM-R	-0.4345	0.3245	0.5780	-0.5931		-0.5931		0.3639	0.3563	-0.0023	0.3563	-0.0023

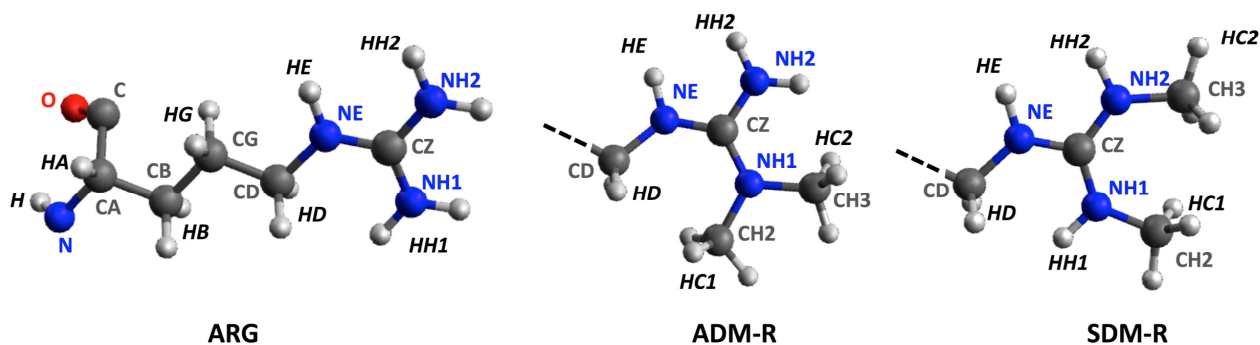


Figure S4: Charges repartition and atom names on lysine, arginine, ADM-R and SDM-R compatible with amber f99SB force field.

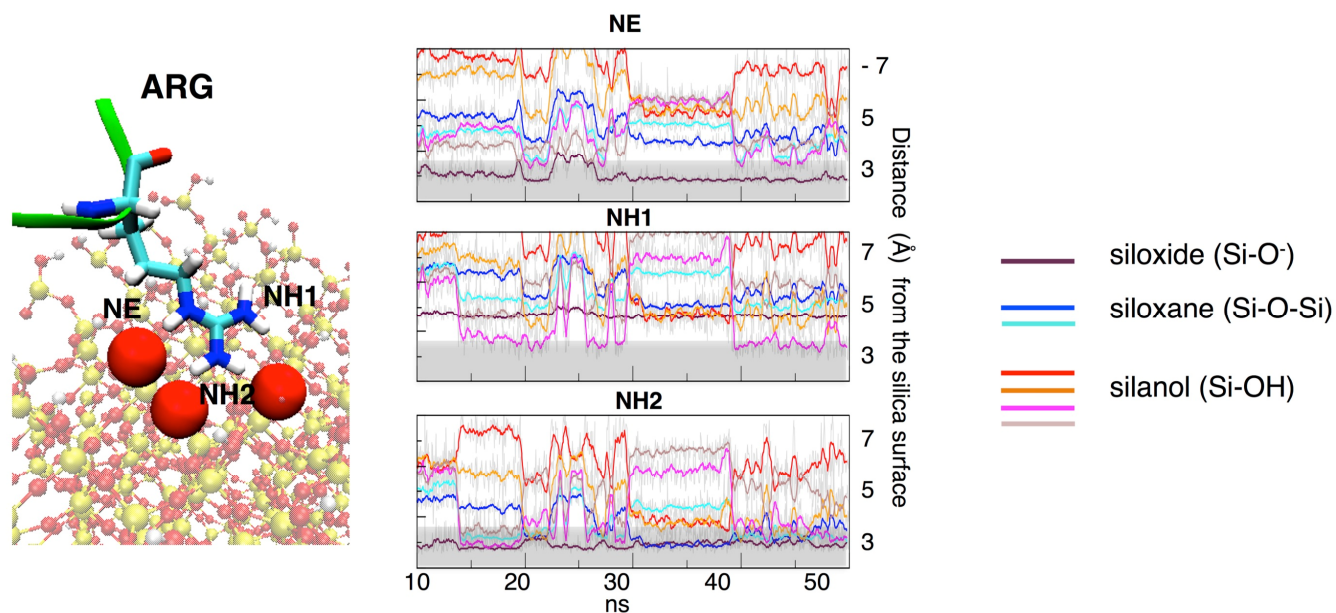
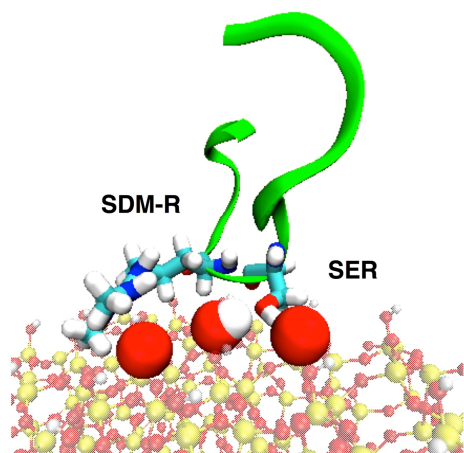


Figure S5: Molecular representation and evolution of the distances between the nitrogen atoms of the guanidinium group of Arg 12 (P6 dynamic 1) and the silica surface. In this particular case, compared to the general observation shown Figure 8A, the R residue is lying on the silica surface allowing NE to contact the surface. This interaction is very similar to the one observed for the ADM-R residue (Figure 8C).

SDM-R and adjacent SER



SDM-R and N-terminal TRP

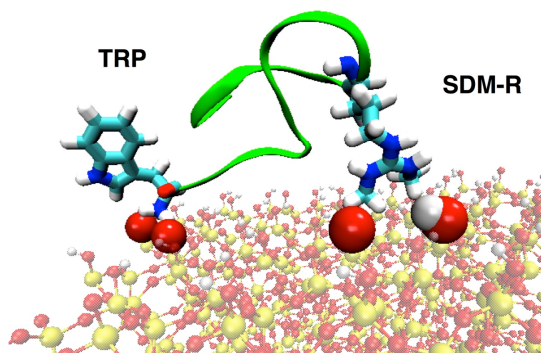


Figure S6: Atomic representation of stable interaction between SDM-R and silica surface. In both cases, a second amino acid is implicated, the adjacent serine (left) or the N^{ter} tryptophan (right).

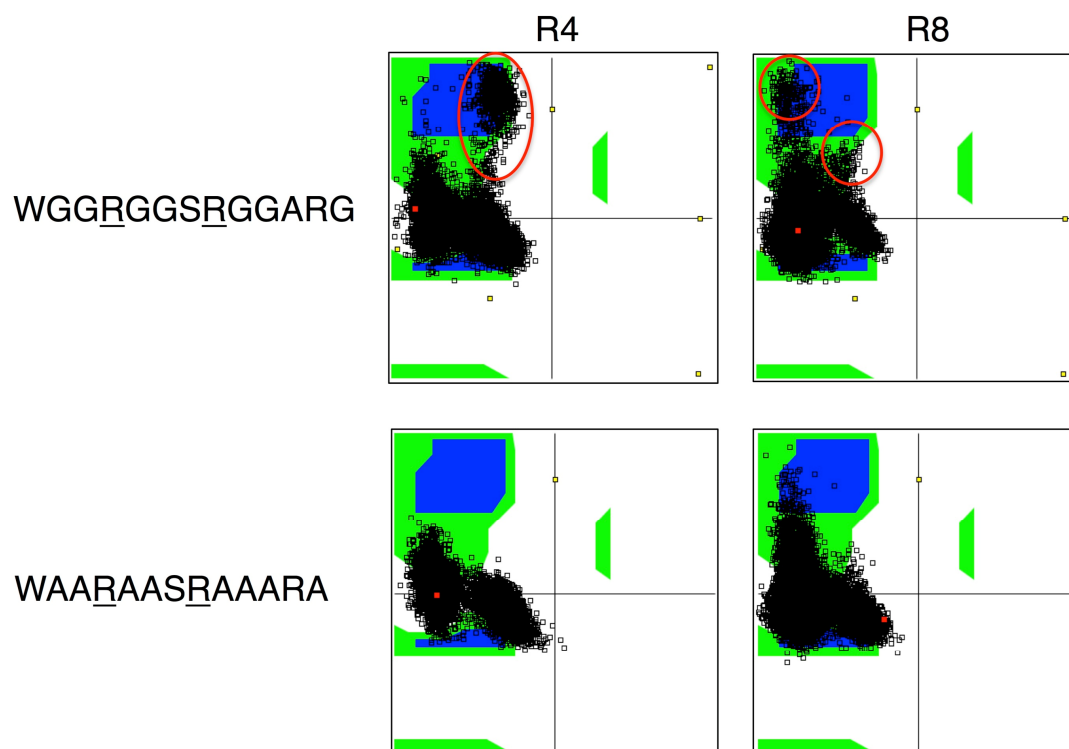


Figure S7: Ramachandran graph (torsion angles phi vs psi distribution) of arginine R4 or R8 in different sequence peptide context, RGG motifs (top) and RAA motifs (bottom)

References

Klein G., Mathé C., Biola-Clier M., Devineau S., Drouineau E., Hatem E., Marichal L., Alonso B., Gaillard J.C., Lagniel G., Armengaud J., Carrière M., Chédin S., Boulard Y., Pin S., Renault J.P., Aude J.C., and Labarre J. (2016) *RNA binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts.* *Nanotoxicology.* **10**: 1555-1564

Kulak N. A., Pichler G., Paron I., Nagaraj N., and Mann M. (2014) *Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells.* *Nat Methods.* **11**, 319-324.

Mathé C., Devineau S., Aude J.C., Lagniel G., Chédin S., Legros V., Mathon M.H., Renault J.P., Pin S., Boulard Y., and Labarre J. (2013) Structural determinants for protein adsorption/non-adsorption to silica surface. *Plos One* **8**: e81346. doi:10.1371/journal.pone.0081346

Milo R. (2013) *What is the total number of protein molecules per cell volume? A call to rethink some published values.* *Bioessays.* **35**, 1050-1055.

Wang X. and Ching C. B. (2003) *Determination of the Competitive Adsorption Isotherms of Nadolol Enantiomers by an Improved h-Root Method.* *Ind. Eng. Chem. Res.* **42**, 6171-6180.

Titre : Interactions protéines-nanoparticules : émergence de nouveaux facteurs déterminant la formation de la couronne de protéines

Mots clés : protéine, nanoparticule, adsorption, interaction, silice, couronne

Résumé : Les nanoparticules sont de plus en plus présentes dans notre quotidien et leur présence dans les organismes vivants est aujourd'hui avérée. Aussi, dans un milieu biologique, des protéines recouvrent spontanément la surface des nanoparticules pour former une couronne de protéines. Suivant la composition de cette couronne, une nanoparticule acquiert une "identité biologique" spécifique qui peut conditionner sa biodistribution ainsi que son éventuelle toxicité.

De nombreuses zones d'ombre persistent quant à la connaissance des mécanismes d'adsorption des protéines sur les nanoparticules. Deux caractéristiques physico-chimiques, peu abordées jusqu'à maintenant, ont été étudiées ici : la taille des protéines et la présence de modification post-traductionnelles. Aussi, du fait de leur forte utilisation, nous nous sommes concentrés sur les nanoparticules de silice (SiNPs).

L'adsorption d'hémoprotéines, de nature similaire mais de tailles différentes, sur des SiNPs, elles-mêmes de tailles différentes, a été étudiée. Les isothermes d'adsorption et les titrations calorimétriques ont notamment montré qu'il existe une

relation entre la taille des protéines et leur affinité pour une surface de silice. Des différences plus fines ont aussi pu être observées selon la taille des nanoparticules. Une analyse structurale des protéines adsorbées a également été effectuée par dichroïsme circulaire et diffusion de neutrons aux petits angles. Les hémoprotéines apparaissent comme des protéines très structurées qui sont peu affectées par l'adsorption. Cependant, bien que la structure quaternaire soit conservée, des modifications structurales sont observables.

Des études faites en présence de mélanges de protéines (extraits de protéines de levure) ainsi que de peptides de synthèse ont également montré le rôle important de la diméthylation asymétrique de l'arginine sur l'interaction protéines/SiNPs. L'utilisation d'un panel de techniques expérimentales et de simulations a permis de comprendre le mécanisme responsable de la forte affinité de peptides contenant cette méthylation particulière. De façon plus générale, nos travaux suggèrent que les modifications post-traductionnelles peuvent influencer notablement les interactions de biomolécules avec des surfaces minérales.

Title: Proteins-nanoparticles interactions: influence of emerging factors affecting the protein corona formation

Keywords: protein, nanoparticle, adsorption, interaction, silica, corona

Abstract: Nanoparticles are ubiquitous in our environment and their presence inside our bodies is now established. Besides, in a biological medium, nanoparticles are spontaneously covered by proteins that form the so-called protein corona. Depending on the corona composition, a nanoparticle will possess a specific "biological identity" conditioning its biodistribution as well as its potential toxicity.

Despite being highly studied, many aspects of the protein adsorption mechanisms remain unknown. Here we particularly focused on the influence of two physicochemical characteristics, which had rarely been addressed: protein size and post-translational modifications. Also, because of their intensive use, we worked on silica nanoparticles (SiNPs).

We studied the adsorption of hemoproteins on SiNPs, both of them having different sizes. Adsorption isotherms and calorimetry studies showed a relationship between the protein size and

its affinity towards silica surfaces. Finer differences could also be observed by varying the SiNPs size. Additionally, structural analyses of adsorbed proteins were performed using circular dichroism and small-angle neutron scattering. The adsorption of hemoproteins, which are well-structured proteins, seems to have little effects on their structure. However, even though the quaternary structure is maintained, structural modifications can be seen.

Using yeast protein extracts and synthetic peptides, the major role of arginine asymmetric dimethylation on proteins/SiNPs interaction could be established. The use of experimental and simulation techniques allowed us to understand the mechanism responsible for the high affinity of peptides having this peculiar methylation. As a whole, this work suggests that post-translational modifications can influence considerably the interactions between biomolecules and mineral surfaces.

