



**HAL**  
open science

# Caractérisation multiéchelle d'assemblages d'hémoglobine : de l'adsorption sur les nanoparticules aux gels nanocomposites

Gaël Giraudon-Colas

► **To cite this version:**

Gaël Giraudon-Colas. Caractérisation multiéchelle d'assemblages d'hémoglobine : de l'adsorption sur les nanoparticules aux gels nanocomposites. Matériaux. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASF011 . tel-03218077

**HAL Id: tel-03218077**

**<https://theses.hal.science/tel-03218077>**

Submitted on 5 May 2021

**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.

Caractérisation multiéchelle  
d'assemblages d'hémoglobine :  
de l'adsorption sur les nanoparticules  
aux gels nanocomposites

*Hemoglobin assemblies multiscale characterisation:  
from adsorption on nanoparticles to nanocomposite gels*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

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

Spécialité de doctorat: Chimie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, NIMBE, 91191, Gif-sur-Yvette, France

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,  
le 19 mars 2021, par**

**Gaël GIRAUDON--COLAS**

**Composition du Jury**

**Claire SMADJA**

Professeure des Universités, Université Paris-Saclay

Présidente

**Ali ASSIFAoui**

Maître de Conférences, HDR, Université de Bourgogne

Rapporteur & Examineur

**Ahmed HAOUZ**

Ingénieur Expert, HDR, Institut Pasteur

Rapporteur & Examineur

**Isabelle MICHAUD-SORET**

Directrice de Recherche CNRS, Université Grenoble Alpes

Examinatrice

**Direction de la thèse**

**Jean-Philippe RENAULT**

Chercheur CEA, Université Paris-Saclay

Directeur de thèse

**Serge PIN**

Directeur de Recherche CNRS, Université Paris-Saclay

Co-directeur de thèse



# Remerciements

Je tiens en premier à remercier mes deux directeurs de thèse, Jean-Philippe Renault et Serge Pin (NIMBE) d'avoir accepté de me diriger. Merci pour tout ce qu'ils m'ont appris, pour leurs conseils, leurs écoutes, et leurs recommandations. Par leur complémentarité, ils ont pu me donner un suivi qui a couvert les nombreuses interrogations que j'ai traversé durant les trois ans de ma thèse.

Je tiens aussi à remercier l'université Paris Saclay d'avoir financé ma thèse et de m'avoir permis d'arriver à ce diplôme de docteur.

Je remercie aussi tous les scientifiques qui m'ont aidé durant cette thèse.

Déjà, merci aux permanents de mon équipe au NIMBE/LIONS, notamment Elodie Barruet et Valérie Geertsen pour les expériences d'ICPMS, David Carrière pour les expériences en DXPGA sur la ligne SWING du synchrotron Soleil, Mickael Bouhier pour tous les montages techniques ainsi que Sandrine Moreau pour le soutien sur de nombreuses expériences au début de ma thèse.

Merci aussi à Daniel Sanchez-Guzman et Stéphanie Devineau (BFA) pour leur collaboration sur les expériences de dichroïsme circulaire sur les protéines adsorbées sur les nanoparticules. Stéphanie en tant qu'ancienne doctorante du laboratoire et ayant travaillé sur des sujets similaires a été d'une aide particulièrement précieuse.

Merci aux scientifiques du LLB : Fabrice Cousin pour son aide précieuse sur les expériences de DNPA sur la ligne PAXY ainsi que les traitements des résultats, Jean-Marc Zanotti pour avoir trouvé du temps providentiel pour faire les études en diffusion élastique et inélastique de neutrons sur la ligne IN6/SHARP à l'ILL ainsi que pour son encadrement, Alexis Chennevière pour les nombreuses expériences de rhéologie sans oublier Sophie Combet pour les expériences de dichroïsme circulaire.

Merci aux scientifiques du synchrotron SOLEIL : Andrea Zitolo pour le temps qu'il a consacré à m'aider pour les expériences de XAS sur la ligne SAMBA ainsi que sur le traitement des résultats et Franck Wein pour son encadrement sur les expériences de dichroïsme circulaire sur la ligne DISCO.

Merci aussi à Christian Herrero de l'ICMMO pour les expériences de RPE, Mathieu Pinault du NIMBE/LEDNA pour les expériences de microscopie électronique à balayage ainsi que Laurent Marichal et Jéril Degrouard du LPS pour les expériences de cryo-microscopie électronique en transmission. Je remercie tout particulièrement Laurent pour m'avoir formé quand il était lui-même doctorant au NIMBE ainsi que pour son optimisme et son énergie communicative.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de mon jury (Claire Smadja, Ali Assifaoui, Ahmed Haouz et Isabelle Michaud-Soret) pour avoir accepté de juger ma thèse. Merci pour leurs dévouements à lire mon manuscrit, aux nombreuses remarques pertinentes qui ont été relevé ainsi que pour leurs pertinentes questions lors de ma soutenance.

Merci à Camille Loupiac (PAM) pour avoir accepté d'être dans mon comité de thèse. Je la remercie pour le temps qu'elle a pris sur trois ans à écouter mes progrès et pour ses nombreuses indications qui ont été précieuses.

Merci aux personnels administratifs qu'on oublie bien souvent, mais sans qui les thèses ne seraient pas possibles. Je tiens spécifiquement à remercier Céline Delobel au niveau du NIMBE pour sa



gentillesse et son dévouement face aux nombreux soucis administratifs ainsi que Corinne Ruello de l'école doctorale 2MIB pour son travail.

Je tiens enfin à remercier tous les gens de mon équipe, notamment mes camarades étudiants : Antonin Bouland, Clémentine Colas, Sonia Domingues, Maxime Durelle, Lucie Huart, Amine Khitous, Marine Le Goas, Pierre Picot, Marie-Claire Pignié, Florent Saudrais, Marion Schvartz. Merci pour l'aide dans les expériences de jour et parfois de nuit au synchrotron, les pauses thé, café, goûter, en somme, les bons moments.

Je tiens enfin à remercier les gens de mon entourage. Ma famille, notamment ma mère pour m'avoir appuyé durant mes 8 études d'étude qui m'ont amené à ce diplôme. Mes amis pour les bons instants et pour l'entraide dans les mauvais : Luana, Eva, Caro, Thomas, tous ceux de la BDF, de LJSF ou de LPB et puis tellement d'autres que je n'oublie pas. Un petit merci à mon chat Jupiter qui a été une de mes meilleures sources pour me déstresser durant la rédaction. Enfin, je tiens à remercier Hélène de m'avoir soutenu, d'avoir relu et rere lu mon manuscrit et surtout de partager ma vie. Tu sais ce que je ressens, mais parfois l'écrire ne fait jamais de mal.

## Abréviations utilisées

<b>Abréviation</b>	<b>Sens</b>
<b>Hb</b>	hémoglobine
<b>oxyHb</b>	oxyhémoglobine
<b>désoxyHb</b>	désoxyhémoglobine
<b>métHb</b>	méthémoglobine
<b>carboxyHb</b>	carboxyhémoglobine
<b>polyHb</b>	polymère d'hémoglobine
<b>GTA</b>	glutaraldéhyde
<b>NP</b>	nanoparticule
<b>BPG</b>	2,3-bisphosphoglycérate
<b>IHP</b>	inositol hexaphosphate
<b>BSA</b>	albumine de sérum bovin
<b>RPE</b>	résonance paramagnétique électronique
<b>XAS</b>	X-ray absorption spectroscopy (spectroscopie d'absorption X)
<b>XANES</b>	X-ray Absorption Near Edge Structure (spectroscopie de structure près du front d'absorption de rayons X)
<b>EXAFS</b>	extended X-Ray Absorption Fine Structure (spectroscopie d'absorption étendue des rayons X pour les structures fines)
<b>DNPA/SANS</b>	diffusion de neutrons aux petits angles / small-angle neutron scattering
<b>DXPA/SAXS</b>	diffusion de rayons X aux grands angles / small angle X-ray scattering
<b>DXGA/WAXS</b>	diffusion de rayons X aux petits angles / wide angle X-ray scattering
<b>RMN</b>	résonance magnétique nucléaire
<b>cryo-TEM</b>	Cryo-microscopie électronique à transmission
<b>MEB</b>	microscopie électronique à balayage
<b>ICP-MS</b>	inductively coupled plasma mass spectrometry (spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif)
<b>EIS</b>	electrochemical impedance spectroscopy (spectroscopie d'impédance électrochimique)
<b>pD</b>	potentiel deutérium (équivalent du pH en milieu deutéré)
<b>UV</b>	ultraviolet
<b>HS</b>	haut spin
<b>BS</b>	bas spin
<b>SCER</b>	somme des carrées des écarts relatifs
<b>ANSES</b>	agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
<b>PBD</b>	protein data base

# Table des matières

<b>Chapitre 1 : Introduction</b>	<b>1</b>	
I-	Préambule : Pourquoi développer des gels nanocomposites ?	1
1)	Vecteurs médicamenteux	2
2)	Immobilisation des enzymes	3
3)	Utilisation des gels dans la fabrication de prothèses	4
4)	Gels alimentaires	5
II-	De la protéine à la formation d'un gel	5
1)	Intérêt des protéines	5
2)	Mise en forme des protéines	6
3)	Les gels de protéine et les moyens de réticulation	7
a)	Les protéines qui gélifient	7
b)	Réticulation thermique	7
c)	Réticulation par irradiation gamma	8
d)	Réticulation par diverses méthodes	9
e)	Réticulation chimique	9
III-	Quels nanomatériaux dans un gel de protéine ?	10
1)	Intérêt des nanoobjets	11
2)	Les gels nanocomposites	12
IV-	L'interface nano-protéines : adsorption des protéines sur les nanoparticules	13
1)	La physique de l'adsorption	13
2)	Changements de structure et d'activité de la protéine lors de l'adsorption	14
3)	Prédire l'adsorption	15
V-	Définition de notre système	17
1)	L'hémoglobine de porc	18
2)	Les nanoparticules de silice	21
3)	Le glutaraldéhyde	24
VI-	Objectifs	27
	Bibliographie	29
<b>Chapitre 2 : Etudes de l'adsorption de l'hémoglobine sur les nanoparticules</b>	<b>43</b>	
I-	Etude de l'assemblage nanoparticules-hémoglobine par isothermes d'adsorption	43
1)	Modèle de l'isotherme de Langmuir	43
2)	Effet de la concentration en hémoglobine	44
3)	Effet de l'état du fer de l'hémoglobine	46
4)	Effet de la deutération	47
5)	Effet du pH	48
II-	Oxygénation de l'hémoglobine adsorbée	49
III-	Modifications de l'hème de l'hémoglobine et de son fer	53
1)	Etude par résonance paramagnétique électronique	53
2)	Etude par spectroscopie d'adsorption des rayons X	60
3)	Dichroïsme circulaire de la bande de Soret	68
IV-	Modifications de la globine	72
1)	Etude de la structure secondaire avec le dichroïsme circulaire dans le domaine UV-proche	72
2)	Etude par la diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA)	76

V-	Compréhension de l'assemblage nanoparticules-hémoglobine	80
1)	Structure de l'assemblage par diffusion de neutrons aux petits angles	80
2)	Etude de la structure des assemblages via cryo-microscopie électronique	81
VI-	Discussion sur l'effet fonctionnel de l'adsorption de l'hémoglobine sur les nanoparticules	83
	Bibliographie	89

### **Chapitre 3 : Etudes des gels d'hémoglobine réticulés par le glutaraldéhyde dopés aux nanoparticules** 95

I-	Gélification de l'oxyhémoglobine par le glutaraldéhyde	95
1)	Diagramme de gélification	95
2)	Analyse de la mise en place de la gélification par rhéologie	100
a)	Etude sans nanoparticule	103
b)	Effet des nanoparticules	107
II-	Propriétés d'oxygénation des gels	111
III-	Modifications de l'hème de l'hémoglobine et de son fer	112
1)	Etude par résonance paramagnétique électronique	112
2)	Etude par spectroscopie d'adsorption des rayons X	114
a)	Etude sans nanoparticule	114
b)	Etude avec nanoparticules	114
3)	Dichroïsme circulaire de la bande de Soret	117
IV-	Modifications de la globine	118
1)	Etude de la structure secondaire par dichroïsme circulaire	118
a)	Etude sans nanoparticule	118
b)	Etude avec nanoparticules	121
2)	Etude par la diffusion de rayons X aux grands angles (DXGA)	121
3)	Etude par la diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA)	130
a)	Etude sans nanoparticule	130
b)	Etude avec nanoparticules	132
4)	Etude par la diffusion de rayons X aux petits angles (DXPA)	132
V-	Vers une compréhension de la structure du gel	135
1)	Etude de la structure par diffusion de neutrons aux petits angles	135
a)	Etude sans nanoparticule	135
b)	Etude avec nanoparticules	139
2)	Diffusion de rayons X aux petits angles	140
3)	Prise de clichés par microscopie électronique à balayage	143
VI-	Discussion	146
	Bibliographie	150

### **Chapitre 4 : Approches des propriétés dynamiques et perspectives** 155

I-	Effet de la température sur la structure quaternaire	156
II-	Effet de la température sur la structure secondaire	158
III-	Etude des vibrations locales	163
1)	Mobilité de l'hémoglobine	163
2)	Densité d'états vibrationnels	165
IV-	Perspectives	166
	Bibliographie	167

<b>Chapitre 5 : Matériels et méthodes</b>	171
Récapitulatif de la forme des échantillons	171
I-    Origine des produits et production des composés de base	172
1) Produits chimiques et petits matériels utilisés	172
2) Préparation et purification de l'hémoglobine	173
3) Nanoparticules de silice	174
4) Tampons	174
5) Deutération	175
II-   Techniques de caractérisation fondamentale	175
1) Spectroscopie UV-Visible	175
2) Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif	176
III-  Préparation des échantillons pour caractérisation	177
1) Préparation des mélanges Hb/NP et mesure des isothermes	177
2) Préparation des gels d'hémoglobine et diagramme de gélification	178
IV-   Oxygénation de l'hémoglobine	179
1) Courbes d'oxygénation des mélanges Hb/NP	179
2) Oxygénation/désoxygénation des gels	181
V-    Caractérisation de l'hème et de son fer	182
1) Résonance paramagnétique électronique	182
2) Spectroscopie d'absorption X	182
3) Dichroïsme circulaire de la bande de Soret	183
VI-   Caractérisation de la globine	183
1) Dichroïsme circulaire dans l'UV-Visible	183
2) Diffusion de neutrons aux petits angles	184
3) Diffusion de rayons X aux petits et grands angles	186
VII-  Caractérisation par prises de clichés	186
1) Cryo-microscopie électronique en transmission	186
2) Microscopie électronique à balayage	186
VIII- Dynamique par diffusion élastique et inélastique de neutrons	186
IX-   Caractérisation du gel par rhéologie	187
Bibliographie	188
 <b>Chapitre 6 : Conclusions et ouvertures</b>	 190

# Chapitre 1 : Introduction

## I- Préambule : Pourquoi développer des gels nanocomposites ?

Avec les protéines, objets biochimiques par excellence, il est possible de fabriquer des gels, qui ont de nombreuses utilités pratiques comme nous allons le voir. De ce fait, ils sont de plus en plus étudiés. Toutefois, il semble difficile de trouver un moyen de moduler les propriétés des gels sans changer la technique de gélification ou la protéine. Si on veut avoir un meilleur contrôle sur ces derniers, il est indispensable de compléter avec une autre technologie. C'est ce qui a déjà été démontré avec les hydrogels nanocomposites utilisant des nanomatériaux comme fonction d'ajustement. Pour les protéines toutefois, l'utilisation de nanomatériaux oblige d'étudier le phénomène d'adsorption qui se produit et les changements qu'ils provoquent sur la protéine. Une fois ce mécanisme compris, il est alors possible d'étudier la gélification, puis le dopage des gels par les nanoparticules

Cependant, avant toute chose, il faut définir ce qu'est un gel. Il s'agit d'un système de polymères ou de colloïdes dilués homogène, ne présentant aucun écoulement à l'état stable. Le gel est un des états les plus fondamentaux de la matière vivante : on peut noter que dans les cellules eucaryotes, le cytoplasme est généralement un gel tout comme la matrice extracellulaire autour des cellules. On retrouve les gels partout autour de nous : dans la nourriture (les yaourts ou le fromage par exemple), les produits du quotidien (on peut penser au dentifrice) ou autres produits industriels (les colles et adhésifs en sont)<sup>1</sup>.

En outre, les utilités pour les gels sont nombreuses pour des applications à l'interface biologique. Il y a une recherche constante pour des gels biocompatibles, ayant une matière première peu onéreuse, pouvant avoir des fonctions très variées et gélifiant facilement. A ces critères, la protéine répond :

-la biocompatibilité est quasiment assurée par le fait d'être une macromolécule biologique faisant partie de l'organisme ;

-certaines protéines sont très peu coûteuses car issues des déchets végétaux ou animaux n'étant pas valorisés actuellement ;

-la classe des enzymes ainsi que d'autres protéines pouvant fixer un ligand ont des fonctions très variées et pouvant être valorisées ;

-la gélification se produit naturellement pour certaines protéines comme le collagène qui s'auto-assemble<sup>2</sup>. Il sera abordé par la suite d'autres méthodes pour obtenir des gels.

Ainsi, on voit bien l'intérêt des gels de protéine, motivant l'étude menée dans cette thèse. En parallèle, il est possible de doper des gels avec des nanomatériaux en les incorporant avant la gélification. Dans certains cas, les nanomatériaux peuvent même provoquer la gélification<sup>3</sup>. Ils sont surtout intéressants pour moduler certaines des propriétés du gel (physiques, chimiques, biologiques, électriques, etc.).

Avant d'aborder les gels de protéine nanocomposites en détails, il est intéressant de détailler quelques usages de gels possédant les propriétés susnommées *via* quelques exemples.

## 1) Vecteurs médicamenteux

Les gels peuvent servir comme vecteurs médicamenteux, c'est-à-dire transporter une substance active afin de la libérer sur une zone à traiter. C'est notamment utilisé comme traitement pour les cancers où les médicaments utilisés doivent être amenés spécifiquement à l'endroit où se trouve la tumeur pour éviter d'abimer des cellules saines. Pour cette application, les gels doivent respecter différents critères : être biocompatible afin d'éviter une réaction de rejet, pouvoir stocker la substance active en grande quantité et pouvant absorber des principes actifs peu solubles et ayant une libération contrôlée<sup>4</sup>. Les gels peuvent se présenter sous différentes tailles, chacune ayant son propre fonctionnement comme exposé dans la Figure 1.

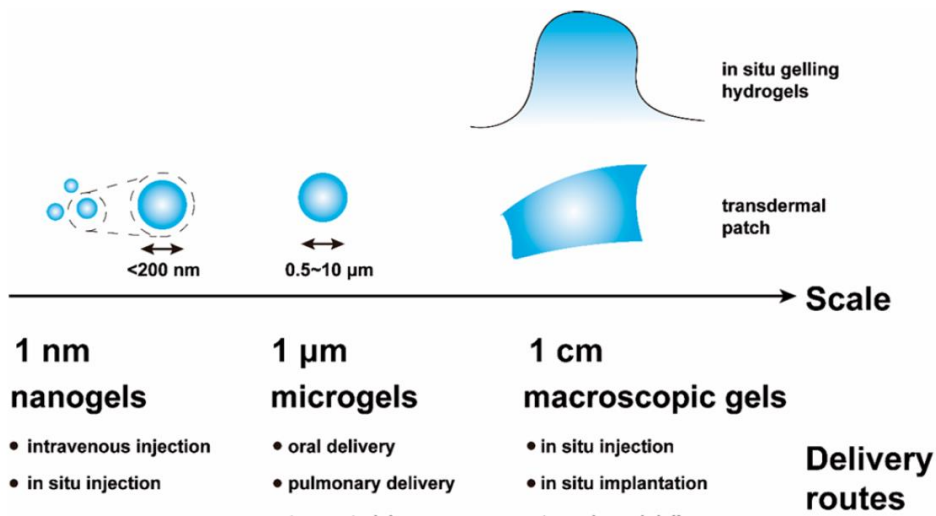


Figure 1 : Différentes structures de gels utilisées comme vecteurs médicamenteux et leurs modes d'actions possibles. Tiré de <sup>5</sup>.

On voit ainsi que suivant le mode d'action, le gel doit parfois respecter certaines contraintes en plus<sup>4</sup>. Et pour un gel macroscopique, il faut qu'il reste liquide avant injection et que ce soit les conditions du milieu physiologique qui le fassent gélifier<sup>6</sup>. Il faut également contrôler ses propriétés mécaniques une fois injecté ou implanté. Mais dans tous les cas, il faut un stimulus pour que le relargage soit contrôlé. Ce dernier peut être de diverses natures comme exposé dans la Figure 2.

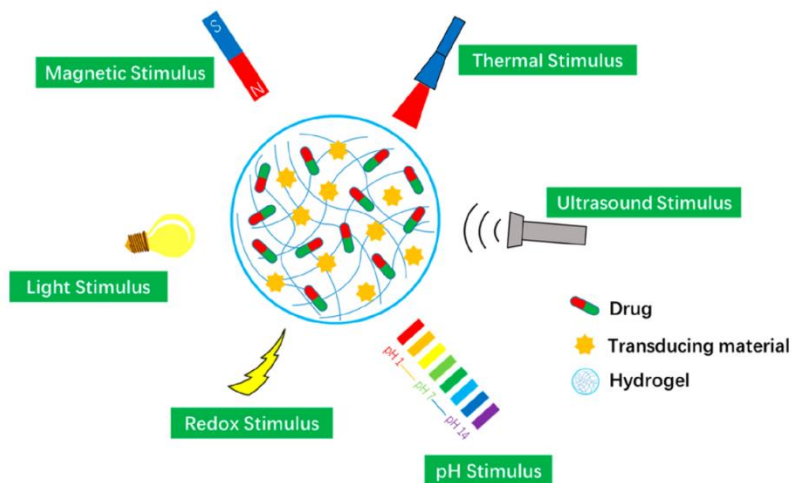


Figure 2 : Différents types de stimuli permettant de relarguer les médicaments. Tiré de <sup>5</sup>.

Les gels de protéine<sup>7,8</sup> ont déjà été étudiés pour faire du relargage contrôlé tout comme les gels nanocomposites<sup>9,10</sup>. Néanmoins, on voit qu'il est très intéressant d'utiliser des gels de protéine nanocomposites où la protéine permet d'assurer les qualités que doit avoir le gel, notamment la composante biocompatible tandis que la composante nanoparticulaire peut servir de capteur du stimulus. Il semble d'ailleurs que ce système commence à être étudié bien qu'il utilise aussi du polyacrylamide comme constituant du gel<sup>11</sup>. Une autre idée serait pour les principes actifs peu solubles dans l'eau de les formuler sous forme de nanoobjets et de les utiliser comme composante nanoparticulaire<sup>12</sup>. Le sujet paraît tout de même prometteur et mériterait d'être approfondi dans le futur.

## 2) Immobilisation des enzymes

Les enzymes sont utilisées dans de nombreux domaines de l'industrie. On peut citer les protéases digérant les autres protéines, utilisées dans la production du fromage<sup>13</sup> ou pour attendrir la viande<sup>14</sup>, ou les cellulases décomposant la cellulose qui sont utilisées en industrie dans le séchage du grain de café, ce qui permet une torréfaction plus simple et donnant ainsi plus de goût au café<sup>15</sup>. Les cellulases peuvent être aussi utilisées dans la fabrication du papier afin d'en modifier la qualité<sup>16</sup>. Voici quelques volumes de fabrication atteints pour certaines utilisations :

- la glucose isomérase pour transformer le sirop de maïs riche en glucose en sirop de maïs à haute teneur en fructose ( $10^7$  tonnes par an) ;
- la lipase pour la transformation des triglycérides des graisses animales ou de l'huile végétale en biodiesel ( $10^4$  tonnes par an) ;
- la nitrile hydratase pour transformer l'acrylonitrile en acrylamide ( $10^5$  tonnes par an)<sup>17</sup>.

Ces chiffres sont atteints grâce à l'immobilisation des enzymes. En effet, l'immobilisation d'enzymes permet de les réutiliser, d'améliorer leur stabilité, d'utiliser des réacteurs en continu, *etc.* On peut aussi immobiliser plusieurs enzymes à la fois, permettant de faire plusieurs réactions en simultané. Les techniques permettant l'immobilisation des enzymes sont nombreuses :

- l'adsorption sur des nanoparticules magnétiques qui permet de les récupérer par simple mise en place d'un champ magnétique<sup>18</sup> ;
- les agrégats d'enzyme formés par réticulation chimique<sup>19</sup> ;
- les gels d'alginate<sup>20</sup> ou d'autres polymères<sup>21</sup> tels que présentés dans la Figure 3.



Figure 3 : Enzyme immobilisée dans des billes d'alginate.

A notre connaissance, il n'a jamais été fait un gel entièrement constitué d'enzymes ou de protéines de transport. Cela serait pourtant utile de pouvoir fabriquer des gels d'enzyme sans que ce soit juste un constituant dans une autre matière qui forme le gel. Cela permettrait d'avoir une plus grande réactivité, de pouvoir jouer sur son activité en mettant des substances activatrices ou inhibitrices dans



le gel. La question qui se pose est : est-ce que la protéine peut conserver sa fonction avec la gélification ? En effet, en utilisant la protéine comme base du gel, elle risque de subir des détériorations qui risquent d'affecter son activité. Ainsi, un des objectifs de cette thèse sera de voir si l'activité de la protéine est conservée, perdue ou modifiée avec la gélification.

### 3) Utilisation des gels dans la fabrication de prothèses

Afin de pouvoir fabriquer des prothèses, il est nécessaire de produire des substituts qui puissent reproduire les caractéristiques que l'on retrouve chez l'humain. Les gels peuvent remplir cette fonction grâce à leurs propriétés mécaniques et élastiques si tant est qu'ils sont biocompatibles. Ainsi, il a été reporté l'existence de prothèses à partir de gels ayant les capacités de pouvoir remplacer les cartilages<sup>22</sup>, muscles<sup>23</sup>, organes<sup>24</sup>, cornée<sup>25</sup>, etc. Ils sont déjà utilisés dans certaines applications concrètes. Des utilisations de gel dans ces cas moins triviaux existent comme pour remplacer les noyaux pulpeux des disques intervertébraux abimés<sup>26</sup>. La Figure 4 présente un exemple avec une prothèse d'oreille formée à base de gel en partie de protéines.

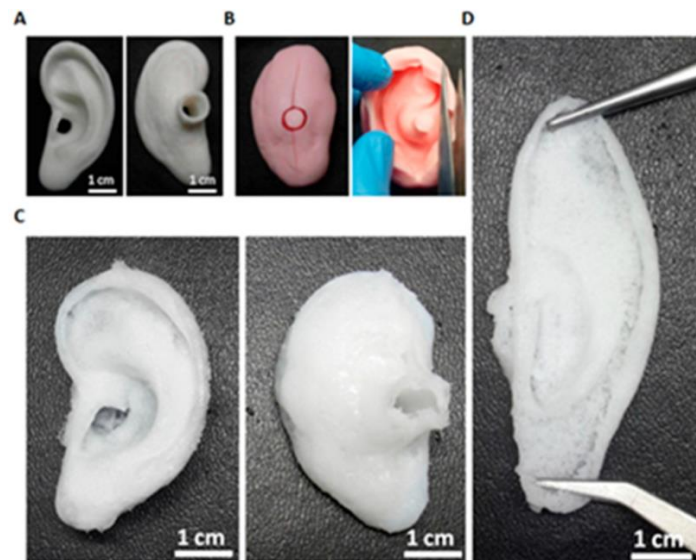


Figure 4 : Prothèse d'oreille fabriquée avec un hydrogel de fibroïne de soie et d'alcool polyvinylique. Tiré de <sup>22</sup>.

On peut remarquer que si les gels sont constitués pour ces usages en polymères naturels, il a été tout de même recensé des gels ayant des protéines pour constituants<sup>22</sup>. Si à l'heure actuelle, les prothèses à base de protéines sont rares, on peut penser qu'elles deviendront plus nombreuses avec l'avancée de la recherche.

En parallèle, l'utilisation des nanomatériaux afin de faire des gels nanocomposites utilisés pour les prothèses existe déjà<sup>27</sup>. Leur utilisation permettrait d'augmenter les capacités du gel au niveau absorption ou de donner des propriétés conductrices pour des utilisations neurologiques<sup>28</sup>. On peut aussi penser au fait que l'ajout de nanoparticules modifie les propriétés mécaniques du gel, permettant ainsi de donner un gel ayant une élasticité adéquate suivant le type de tissus que l'on veut remplacer<sup>29</sup>.

Le couplage avec l'impression 3D permettrait en plus de fabriquer des organes artificiels sur mesure. C'est déjà utilisé actuellement pour la visualisation et des entraînements en prévision d'une opération chirurgicale<sup>30</sup>. Malgré ces avantages, il faut toutefois noter que la technologie est toujours limitée.

## 4) Gels alimentaires

Une utilisation ancestrale de la protéine afin de former des gels est la production de yaourts, fromages et autres produits laitiers à partir des protéines du lait<sup>31</sup>. Cet exemple est idéal pour comprendre pourquoi l'utilisation des protéines est parfaite dans la production de gel. Ainsi, on peut jouer sur les propriétés physico-chimiques afin de moduler le gel obtenu<sup>32</sup>. Ces modulations ont un grand intérêt car elles permettent de jouer sur les propriétés physiques des aliments que l'on va consommer. Ainsi, pour donner un exemple, la bêta-lactoglobuline a été très étudiée en fonction de la température pour différentes conditions (pH, présence de sels, d'agent dénaturant, etc.). En effet, elle rentre en jeu dans les différentes productions laitières et, suivant le chauffage et les conditions physico-chimiques, on peut former différents types de nanostructures et de microstructures intermédiaires permettant d'aboutir à des propriétés sensorielles différentes (goût, toucher, etc.)<sup>33,34</sup>.

Une autre production classique de gel de protéines est avec le surimi<sup>35</sup>. A partir du poisson, il est possible d'obtenir une pâte de poisson très riche en protéines qui, si on enrichit en cryoprotecteurs, est très facilement conservable en congélation sans perdre ses propriétés. A partir de cette pâte, en rajoutant certains épaississants ou gélifiants comme des blancs d'œuf riche en protéine ou des transglutaminases permettant de lier les protéines entre elles, on obtient alors un gel donnant les bâtonnets de surimi qui peuvent avoir différentes textures, plus ou moins souples ou élastiques.

Certaines protéines se retrouvent de façon récurrente dans l'industrie agroalimentaire sous forme de gel comme la protéine de soja<sup>36</sup>, les protéines du blanc d'œuf<sup>37</sup> ou le collagène et la gélatine, son dérivé<sup>38</sup>. L'impression 3D peut aussi utiliser les gels alimentaires, permettant de produire des structures alimentaires précises en une seule étape, permettant d'obtenir de nouvelles textures, voire saveurs dans les plats préparés par ce procédé. Il a été même reporté la possibilité de fabriquer de la viande imprimée avec la transglutaminase<sup>39</sup>.

L'apport des gels nanocomposites pourrait permettre la modification de certains paramètres, notamment la texture des gels, ce qui permettrait d'augmenter la diversité déjà grande des gels alimentaires, servir à modifier l'aspect ou même comme antioxydant<sup>40-42</sup>.

Le potentiel des gels de protéines a donc été établi. Il est désormais intéressant de voir quel est l'état de l'art dans ce domaine.

## II- De la protéine à la formation d'un gel

### 1) Intérêt des protéines

Les protéines présentent de nombreux avantages pour des usages technologiques. En effet, les protéines sont une source de matériel biosourcé, très peu toxique et biocompatible. De plus, il s'agit d'une matière abondante, on les retrouve dans tous les organismes vivants. Enfin, les protéines ont des spécificités que la science a bien des difficultés à reproduire. En effet, pour l'usage que l'on veut faire, parmi toutes les protéines existantes, on peut retenir deux groupes ayant des propriétés très différentes, mais très intéressantes et complémentaires. Cette vision des protéines n'est pas basée sur la catégorisation classique des protéines, mais simplement sur une catégorisation pratique.

En effet, d'un côté, nous avons les protéines dont la fonction peut être exploitée. Cette catégorie rassemble les protéines ayant des fonctions chimiques, les enzymes étant l'exemple le plus parlant de ce phénomène avec leurs propriétés catalytiques dans de nombreux domaines comme il a été abordé

au 1-2) de l'introduction. Dans les usages de protéines hors de l'industrie, on peut aussi penser aux protéines ayant des propriétés de fixation comme les hémoprotéines ayant pour rôle de transporter l'oxygène, qui pourraient donc permettre de créer des substituts sanguins<sup>43</sup>.

De l'autre, nous avons les protéines ayant des prédispositions pour former des structures par auto-assemblage. Nous parlons alors des protéines structurales participant à la structure cellulaire du fait de leurs formes et leurs propriétés mécaniques. L'exemple typique est constitué par les protéines fibreuses qui sont insolubles et qui peuvent former des réseaux tridimensionnels structurés<sup>44</sup>. On peut aussi penser aux protéines globulaires qui sont solubles et sphéroïdes, formant des colloïdes en milieu aqueux<sup>45</sup>.

Avec ces deux aspects que peuvent apporter les protéines, on comprend très vite que certaines protéines peuvent servir de briques de base élémentaire pour former une structure de plus grande échelle tandis que d'autres peuvent être utilisées pour apporter de la fonctionnalité à ces assemblages. Les propriétés de structuration permettent d'atteindre certaines tailles qui peuvent alors être utilisées par l'homme. Il est alors intéressant de trouver des protéines pouvant avoir ces deux caractéristiques extrêmement intéressantes en même temps (structuration et activité). Le but est de gagner en taille tout en gardant la fonction qui nous intéresse dans la protéine.

Si la fonction ne peut être créée, il est possible d'atteindre des tailles d'assemblages permettant une manipulation plus aisée : les protéines ayant une réactivité chimique assez vaste de par la diversité des fonctions chimiques qu'elles portent (amine, thiol, etc.), il existe différentes manières afin de lier les protéines entre elles et obtenir de nouvelles structures.

## 2) Mise en forme des protéines

La Figure 5 permet ainsi de visualiser la multitude de structurations possibles pour la protéine.

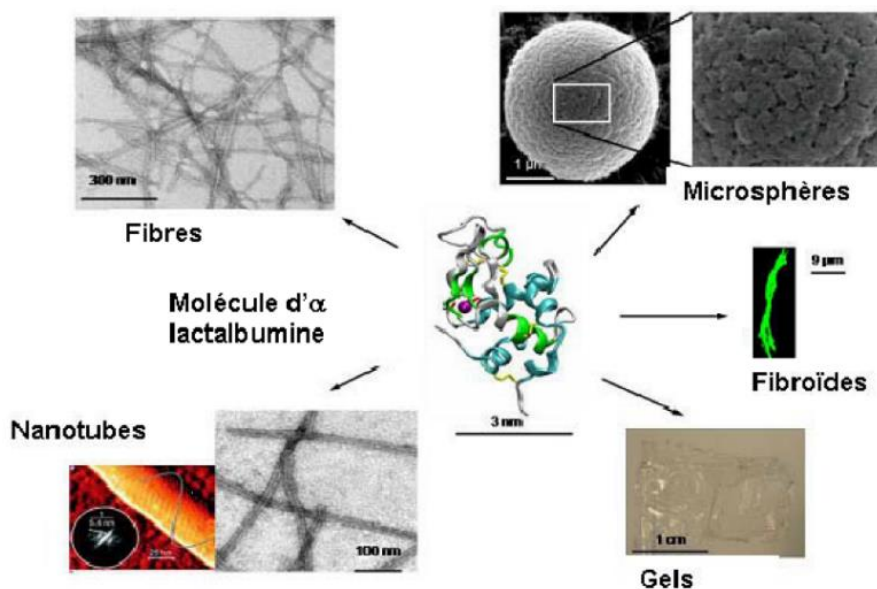


Figure 5 : Différentes structures de l'ordre nanométrique à centimétrique obtenues avec l'alpha-lactalbumine. Tiré de <sup>33</sup>.

On voit donc une large gamme de structures avec les protéines. Les différents niveaux de structuration vont de l'échelle nanométrique à centimétrique, montrant la large échelle de tailles pouvant être atteinte avec une même protéine, chaque échelle pouvant avoir un rôle intéressant qui peut être exploité par l'homme.

La protéine peut aussi s'organiser sous forme de films. Ces films présentent aussi une large gamme de fonctionnalités possibles. On peut citer par exemple :

- faire des films de protéines consommables pouvant servir à envelopper la nourriture, voire remplacer les films polymériques sur le long terme<sup>46</sup> ;
- produire des films composites ultra-flexibles ayant des propriétés conductrices<sup>47</sup>.

Mais ce qui va nous intéresser dans cette thèse seront les gels de protéine.

### 3) Les gels de protéine et les moyens de réticulation

Dans cette thèse, l'étude porte sur les hydrogels, un gel dont l'agent gonflant est l'eau. En pratique, cela signifie que les gels sont fabriqués en milieu aqueux. Par la suite, on parlera de gel ou d'hydrogel sans distinction.

Avant d'entamer les différents moyens permettant d'obtenir un gel, une question doit déjà être posée : parmi toutes les protéines disponibles, quelles sont les protéines ayant des dispositions à gélifier ? En effet, on peut remarquer qu'on retrouve dans les gels de protéines, certaines protéines de façon plus récurrente que d'autres.

#### a) Les protéines qui gélifient

Le collagène<sup>48</sup> et son dérivé hydrolysé, la gélatine<sup>49</sup> sont très souvent étudiés sous forme de gel.. Le collagène est une famille de protéines qui comporte 28 membres différents<sup>50</sup> que l'on retrouve dans les mammifères à hauteur de 30% des protéines totales de l'organisme, ce qui en fait la plus abondante. Il confère aux tissus une résistance mécanique à l'étirement. On retrouve le collagène sous forme de triple hélice fibrillaire dans les os, cartilages ou tendons. Ce fait de se structurer de façon naturelle explique sans doute que les conditions pour gélifier le collagène soient nombreuses vu que le gel appelle à une structuration tridimensionnelle.

On retrouve bon nombre de protéines végétales ou animales étant des sous-produits de certaines productions industrielles comme les protéines de soja<sup>51</sup>, la kératine<sup>52</sup> ou la zéine<sup>53</sup>. Le collagène en fait notamment partie par ailleurs<sup>54</sup>. L'avantage est alors le faible coût de la protéine. Une protéine bon marché et abondante étudiée dans bon nombre d'articles de la littérature comme gels est l'albumine<sup>55-58</sup>. Les protéines de soie sont aussi couramment étudiées<sup>59-61</sup>. Enfin, on peut citer l'hémoglobine S, mutant de l'hémoglobine adulte normale qui gélifie d'elle-même, mais qui perd alors son activité<sup>62</sup>. Ce dernier point est intéressant car il soulève le fait que la gélification puisse avoir un rôle sur l'activité.

Mais toutes ces protéines ayant des dispositions à gélifier, quelles techniques faut-il utiliser pour provoquer la gélification ? En vérité, il existe bien des manières de gélifier des protéines.

#### b) Réticulation thermique

La réticulation thermique consiste à chauffer la protéine. En augmentant la température, il y a un dépliement partiel de la structure de la protéine, faisant que les groupes hydrophobes internes vont être révélés et être alors au contact du milieu aqueux. Cet état dit globule fondu va alors provoquer la protéine à se réticuler via ses parties hydrophobes afin de diminuer les surfaces hydrophobes au contact de l'eau. Un réseau se forme et on obtient alors un gel si la concentration est supérieure à une concentration dite critique de gélification.

La formation d'un gel se déroule donc en 4 étapes :

- dépliage de la protéine ;
- agrégation des molécules protéiques dépliées ;
- réaction intermoléculaire entre les agrégats ;
- réaction intramoléculaire dans les agrégats de plus grande taille<sup>63</sup>.

Ce phénomène se retrouve pour la plupart des protéines. Le problème de ce traitement est qu'il est dénaturant. Ainsi, les enzymes perdent leur activité puisqu'on chauffe au-delà de la température de dénaturation<sup>64</sup>. Une solution serait de trouver des enzymes stables à haute température comme celle des organismes extrêmophiles, l'activité serait alors conservée. L'idée alors serait de faire des mélanges de protéines se dénaturant à basse température.

Ces gels formés à partir des protéines sont aussi de très bons exemples de systèmes potentiellement non-toxiques. En effet, il a été reporté que des gels d'albumine induits par chauffage sont biocompatibles, biodégradables et il a été prouvé qu'ils sont en plus auto-réparant et peuvent être chargés avec des fluorochromes pour donner des propriétés spectroscopiques (couleur et fluorescence) qui sont conservées dans le gel. On peut en outre moduler leurs propriétés mécaniques en modulant soit la concentration en protéines soit la température<sup>65</sup>.

### c) Réticulation par irradiation gamma

L'irradiation gamma est utilisée comme un moyen de réticulation : sous l'effet de l'irradiation, de nombreuses liaisons covalentes se rompent, donnant ainsi des radicaux extrêmement réactifs qui forment alors de nombreuses liaisons au hasard, donnant donc des clusters et potentiellement, des gels ou autres structures macroscopiques.

Les protéines sous irradiation gamma subissent bien une réticulation : il y a polymérisation des protéines donnant des clusters de 5 à 10 fois la taille de la molécule seule<sup>66</sup> ou pouvant donner des films<sup>67</sup>. Si pour de nombreux polymères (cellulose<sup>68</sup>, acide polyacrylique<sup>69</sup>, etc.), il n'a pas été recensé à l'heure actuelle dans la littérature des gels de protéines induits par irradiation gamma autres que pour la fibroïne<sup>59</sup> et le collagène<sup>48</sup>, on peut toutefois remarquer que ces deux protéines sont fibreuses et sont donc prédisposées à former des structures. Des tests ont été faits au laboratoire sur l'albumine de sérum bovin sous irradiation gamma : des gels ont bien été formés, mais seulement au bout d'une centaine d'heures pour des concentrations supérieures à 150 g/L, rendant le processus peu intéressant.

En effet, sous irradiation gamma, la rupture de nombreuses liaisons et la formation de nombreux liens intra ou inter protéines, ainsi que l'oxydation due à l'irradiation, affectent leurs propriétés structurales<sup>70,71</sup>. Ainsi, il a été montré que l'activité d'enzymes et de protéases diminue avec l'irradiation<sup>72</sup>.

Il peut tout de même y avoir un intérêt pour irradier des hydrogels de protéines déjà formés par d'autres moyens. L'irradiation gamma est utilisée, par exemple, afin de renforcer les propriétés mécaniques de films de protéines<sup>73</sup> et les stériliser.

#### d) Réticulation par diverses méthodes

Avant d'aborder la méthode de la réticulation chimique que l'on va utiliser dans cette thèse, il est intéressant de se pencher sur quelques autres méthodes permettant d'aboutir à des gels de protéines. Il ne sera ici question que de quelques méthodes, mais des revues disponibles seront plus exhaustives<sup>74-76</sup>.

Une des principales techniques utilisées est la gélification à froid. Contrairement à ce qu'indique son nom, elle nécessite de chauffer, mais à des températures inférieures à celle de dénaturation ce qui permet tout de même de former des agrégats. Un traitement ensuite est appliqué, gélifiant les agrégats. Dans les traitements possibles, il existe :

-un changement de force ionique, notamment par ajout de cations métalliques comme le cuivre ou le zinc<sup>55</sup> ;

-en augmentant<sup>77</sup> ou en diminuant le pH<sup>78</sup>.

C'est au final une technique plus douce que la gélification à une température supérieure de celle de dénaturation. Pour certaines protéines précises comme la myosine<sup>79</sup>, des exemples existent de gélification par baisse progressive du pH, mais sans traitement thermique au préalable.

Des gels peuvent aussi être formés si on met les protéines sous haute pression (plusieurs centaines de MPa)<sup>80</sup>. Avec la pression peuvent arriver une dénaturation et une agrégation des protéines suivant les conditions physico-chimiques dans lesquelles se situe la protéine<sup>81</sup>. Il y a formation de ponts disulfure inter-protéines ainsi qu'une augmentation des liaisons hydrogène formant des réseaux structurés et donc des gels<sup>82</sup>. Les gels obtenus sont très différents de ceux obtenus par dénaturation thermique tant au niveau couleur et aspect<sup>83</sup> qu'au niveau structural. La pression engendre une augmentation de la dureté et une baisse de l'adhérence des gels, contrairement à ceux induits par température<sup>84</sup>.

On peut enfin citer les gels induits par voie enzymatique avec les transglutaminases<sup>85</sup>. La réticulation entre des chaînes protéiques est engendrée par la catalyse de la réaction entre les résidus glutamine et lysine. Le gel aura des propriétés différentes suivant les concentrations d'enzymes mises en jeu. L'utilisation d'enzymes en fait une technique coûteuse, mais aucune toxicité n'est possible : les enzymes étant des protéines, il s'agit de matériel biologique inoffensif. Cette technique est donc utilisée dans l'industrie agroalimentaire<sup>86</sup>. Toutefois, pour obtenir de meilleurs résultats pour le gel ou pour engendrer de nouvelles structures<sup>87</sup>, il est parfois nécessaire de chauffer ou de mettre sous pression ce qui provoque une dénaturation partielle ou totale de la protéine<sup>88</sup>.

#### e) Réticulation chimique

La réticulation chimique cherche à former des liaisons covalentes en utilisant une molécule comme « pont » entre deux acides aminés. L'enjeu est donc de trouver des espèces chimiques très réactives et pouvant agir avec les différentes fonctions que possèdent une protéine (-NH<sub>2</sub>, -OH, =COO, -SH, etc.) sans que ce réactif soit toxique. L'absence de ponts dans la réticulation enzymatique fait que cette dernière n'est pas classée dans la réticulation chimique bien qu'il y ait formation d'une liaison chimique. La réticulation chimique va permettre la formation d'un réseau du fait des liaisons chimiques qui se forment. La Figure 6 présente ainsi les liens pontants permettant la formation d'un réseau.



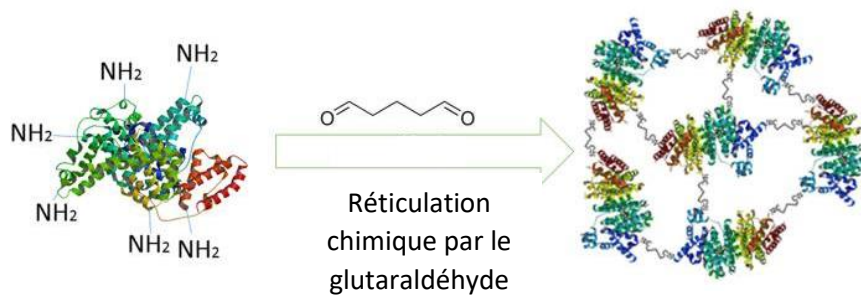


Figure 6 : Réticulation de l'albumine de sérum bovin par le glutaraldéhyde pour donner un gel.  
Tiré de <sup>58</sup>.

Suivant la concentration en protéine, en réticulant et des conditions physico-chimiques (pH, température, etc.), la réticulation chimique permet de produire différents assemblages de protéines : des gels<sup>89</sup>, des polymères de protéines<sup>90</sup>, des nanoparticules<sup>91</sup> ou même des films<sup>92</sup>.

Les espèces chimiques pouvant être utilisées pour réticuler des protéines sont nombreuses. On peut ainsi citer le glutaraldéhyde<sup>92</sup>, le formaldéhyde<sup>93</sup>, le diméthyle suberimidate<sup>94</sup>, etc. Le problème de beaucoup de ces réactifs est qu'ils peuvent présenter une toxicité<sup>95</sup>. Aussi, de nouvelles recherches se sont portées sur de nouvelles molécules intéressantes tel le génipine qui, même s'il ne présente pas une aussi grande possibilité pour former des structures avec les protéines, offre une absence de toxicité<sup>96</sup>.

Les méthodes de gélification chimique sont assez peu étudiées. Il existe cependant des études <sup>43,58,59,97</sup> qui traitent notamment des applications du gel comme son utilisation en relargage contrôlé de médicaments. Mais peu d'efforts sont faits pour comprendre la structure de la protéine ou son activité. Par exemple, contrairement à la réticulation thermique, les études de la structure secondaire dans les gels de protéine sont rares. Il est donc nécessaire de devoir approfondir sur ces angles morts, surtout si on veut réussir à contrôler l'activité de la protéine dans le gel.

Un article récent réouvre la voie des gels de protéines à base de glutaraldéhyde pourtant agent chimique classique<sup>98</sup> en montrant diverses propriétés. C'est sur cette technique que nous nous appuyerons dans cette thèse et nous détaillerons les moyens de mise en œuvre plus tard dans le manuscrit.

### III-Quels nanomatériaux dans un gel de protéine ?

Les nanoparticules sont utilisées depuis de nombreuses années dans différents usages pour l'industrie. On les retrouve ainsi aujourd'hui dans de nombreux objets du quotidien, allant de l'alimentaire<sup>99</sup> aux cosmétiques<sup>100</sup> en passant par les peintures ou les vernis<sup>101</sup>. Mais avant de dissenter plus sur les intérêts des nanoparticules, définissons ce que c'est exactement. Ainsi, la Commission Européenne définit actuellement comme nanomatériau 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). Même si cette définition est controversée, on retrouve de façon claire pourquoi elles sont qualifiées de « nano ». Penchons-nous désormais sur la diversité que peut avoir un nanoobjet et quels intérêts il peut avoir.

## 1) Intérêt des nanoobjets

Pour comprendre l'intérêt des nanomatériaux, il faut voir qu'ils sont très divers. Au niveau de leur forme, on retrouve des sphères<sup>102</sup>, des tubes<sup>103</sup>, des feuillets<sup>104</sup> et bien d'autres formes. Ces formes vont induire des différences de comportements et donc de propriétés : les surfaces de contact mises en jeu changent modifiant la réactivité aussi, tout comme les apports structuraux.

De plus, les matériaux pouvant constituer les nanoobjets sont très variés. On retrouve beaucoup de nanoparticules juste d'un seul type d'atome, souvent métalliques (or, argent, fer, etc.)<sup>105</sup>, mais d'autres existent (carbone, fullerène, graphite ou diamant<sup>106</sup>, bore<sup>107</sup>, etc.). On retrouve aussi beaucoup d'oxydes pour constituer les nanoparticules (silice<sup>4</sup>, oxydes de titane<sup>108</sup>, de zinc<sup>109</sup>, d'aluminium<sup>110</sup>, etc.) ainsi que des polymères (protéines<sup>91</sup> comme dit précédemment, chitosane<sup>111</sup>, acide polylactique<sup>112</sup>, etc.). Il est possible de faire des nanoobjets constitués de plusieurs composants en même temps<sup>113</sup> ou de les doper avec un autre composant<sup>114</sup>. Chacun apporte donc ses caractéristiques : densité, structure électronique, énergie, etc.

Il existe donc une multitude de nanomatériaux possibles. Cela fait donc que les nanoparticules peuvent avoir une multitude de caractéristiques ce qui permet d'avoir de nombreuses utilisations suivant la forme et la composition. La Figure 7 présente ainsi diverses nanoparticules et leur utilisation.

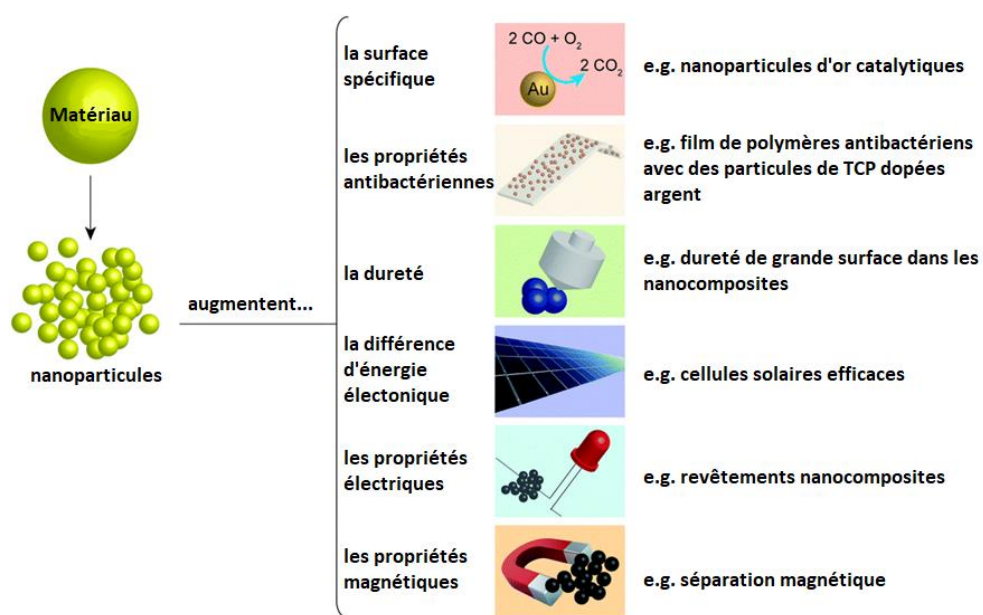


Figure 7 : Exemples de propriétés que possèdent les nanoparticules et leur utilisation potentielle. Traduit de <sup>115</sup>.

Ainsi, face à ces diverses propriétés que possèdent les nanoparticules, elles sont utilisées de longues dates dans les produits du quotidien. On produit plusieurs dizaines de millions de tonnes de différentes nanoparticules par an<sup>116</sup> et le marché mondial des nanomatériaux représente environ 10 milliards de dollars US en 2020<sup>117</sup>. On les retrouvait dans plus de 1 800 produits en 2015<sup>118</sup>, les nanoparticules sont ainsi utiles pour de nombreuses applications.

Pour donner une idée, on les retrouve sous différentes formes dans différents produits<sup>119</sup> :

-les nanoparticules de silice sous le nom E551 en tant qu'antiagglomérant dans de nombreux produits alimentaires comme le sucre, le sel et autres préparations industrielles<sup>120</sup> ;



- les nanoparticules d'argent dans les lessives et vêtements pour ses propriétés bactéricides<sup>121,122</sup> ;
- le dioxyde de titane sous forme nanométrique pour ses propriétés photo-catalytiques et de filtre UV dans les crèmes solaires, les dentifrices, les ciments ;
- les nanotubes de carbone dans les matériaux pour leurs propriétés mécaniques<sup>123</sup> ;
- les nanoparticules d'alumine dans les plastiques, les peintures ou vernis<sup>124</sup>.

On voit donc que les nanoparticules peuvent apporter beaucoup de propriétés et ont beaucoup d'utilité<sup>42</sup>. Avec les propriétés et le fait que certaines des nanoparticules en possèdent plusieurs à la fois, cela fait des nanomatériaux un élément très utile pour différentes applications telles qu'expliquées ci-dessus. Il est donc logique qu'elles aient été intégrées aux gels qui avaient déjà leur propre propriété afin d'en ajouter de nouvelles. C'est pour cela que depuis un certain nombre d'année, les hydrogels nanocomposites sont étudiés.

## 2) Les gels nanocomposites

Un hydrogel nanocomposite est un réseau de polymères constitué d'eau et de nanomatériaux. Dans la plupart des cas, il est obligatoire d'ajouter un réticulant chimique afin de former le gel nanocomposite à partir d'une solution de polymères et de nanomatériaux<sup>125</sup>. Toutefois, l'ajout du nanomatériau permet dans certains cas d'obtenir des gels sans utilisation d'agent de réticulation chimique, les nanomatériaux permettant la réticulation physique du polymère et l'obtention d'un gel<sup>3</sup>.

En contrôlant l'interaction entre les nanoparticules et le polymère, on peut concevoir différentes propriétés physique, chimique comme biologique<sup>9</sup> que ne pourrait pas avoir un gel de polymères organiques seul. En effet, comme on a vu précédemment, les nanomatériaux sont très divers. Les hydrogels nanocomposites peuvent être donc faits avec une large gamme de nanomatériaux (carbone<sup>126</sup>, nanomatériau polymérique<sup>127</sup>, céramique<sup>3</sup> ou nanomatériau métallique<sup>128</sup>), chaque type pouvant apporter une utilité différente. Voici quelques propriétés des gels nanocomposites :

- dureté du gel avec des contraintes de compression pouvant aller à 32 MPa pour des gels d'acrylamide dopés avec des nanofeuilles de Laponite et des nanoparticules de silice<sup>129</sup> ;
- élasticité du gel accrue avec une élongation possible jusqu'à 10 fois et une compression possible de 90% pour différentes nanoparticules, notamment d'argile<sup>130</sup> ;
- les hydrogels nanocomposites peuvent absorber de l'eau en quantité et la restituer grâce à la composition poreuse par exemple de la nanoargile, ce que les hydrogels ne peuvent pas faire<sup>131</sup> ;
- propriétés optiques avec des gels possédant des capacités d'émission, d'absorption et des propriétés photochromiques avec des nanoparticules inorganiques contenant des chromophores organiques<sup>132</sup> ;
- sensibilité au stimulus où la température du gel peut être modifiée par absorption de solutions salines sur des gels d'oligo(éthylène glycol) méthacrylate réticulés par du nanoargile<sup>133</sup>.

On voit que toutes ces propriétés peuvent être utilisées pour les différents usages que nous avons abordés en exemple au début de l'introduction. La modulation de l'élasticité du gel peut tout à fait être utilisée pour les gels alimentaires pour la texture ou les prothèses afin d'imiter au mieux l'organe à remplacer par exemple. La plus grande capacité d'absorption des gels nanocomposites peut aussi être exploitables. La grande diversité de fonctions qu'apportent les nanoparticules est donc tout à fait exploitable pour des applications pratiques et technologiques.

Il est à noter qu'il existe aussi quelques gels de protéine nanocomposites, notamment avec du nanoargile mais le sujet n'est pas si développé<sup>11,134,135</sup>. Toutefois, les rares études ne prennent pas en compte l'effet que peut avoir l'adsorption des protéines sur les nanoparticules.

## IV-L'interface nano-protéines : adsorption des protéines sur les nanoparticules

### 1) La physique de l'adsorption

Sous certaines conditions, les protéines mises au contact d'une surface s'adsorbent dessus. A notre connaissance, ce phénomène a été la première fois observée en 1916 par Nelson et Griffin pour l'invertase sur du charbon<sup>136</sup>. La première étude de ce phénomène sur des nanomatériaux remonte à 1959 par Bixler avec l'adsorption des protéines sur de la silice colloïdale<sup>137</sup>. Ce ne sera que dans les années 70 que le sujet sera étudié plus en détails dont un des pionniers fut Norde<sup>138</sup>. Avant, les études étaient menées sur des petites molécules organiques<sup>139</sup> ou des polymères<sup>140</sup>.

Pour les trois types de molécules que sont les protéines, les molécules organiques et les polymères, on retrouve :

-la nature des interactions de l'adsorption avec :

- interactions à caractère électrostatique (liaisons ioniques et hydrogène) ;
- interactions hydrophobes ;

-l'adsorption suivant le modèle de Langmuir qui sera abordé un peu plus loin et dans le chapitre 2<sup>141</sup>.

On peut tout aussi retenir que certaines observations faites pour les polymères<sup>142</sup> fonctionnent pour les protéines :

-l'adsorption sur une surface est spontanée ;

-l'adsorption se fait par de nombreuses interactions formant donc de nombreux points de contact. Chaque interaction est réversible, mais en raison du grand nombre de liaisons, la désorption deviendrait quasi-impossible. On peut comprendre cela sur la Figure 8 : pour se désorber totalement, il faudrait que toutes les interactions cessent en même temps. Or, en considérant un très grand nombre de liaisons, si un point de liaison cesse, la partie de la protéine va par contre rester proche de la surface et du coup, se réabsorber rapidement.



Figure 8 : Polymère adsorbé sur une surface. Notez les nombreux points d'accroche. Tiré de<sup>138</sup>.

Les analogies avec les polymères s'éloignent quand on considère les différents niveaux de structure que peut avoir une protéine. En outre, la variété physico-chimique des acides aminés qui sont en général au nombre de 20 est plus grande que celles de polymères qui sont la répétition d'un même monomère. Enfin, pour les protéines, on ne retrouve aucune suite logique au contraire des polymères.

Norde a donc développé un modèle entre le type de surface et le type de protéines (les « dures », ayant peu de modifications structurales lors de l'adsorption et les molles perdant une partie de la structure). Le Tableau 1 résume les différents cas.

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

Tableau 1 : Selon le modèle de Norde, adsorption des protéines molles ou dures et suivant leur charge globale sur des nanoparticules dont la surface est positive, négative ou hydrophobe.

A=adsorbé ; NA : non adsorbé. Tiré de <sup>138</sup>.

On voit donc qu'en général, les protéines s'adsorbent sauf cas particulier. Les protéines qui s'adsorbent sur une nanoparticule forment ce qu'on appelle la couronne de protéines<sup>143,144</sup>. La Figure 9 résume cette idée.

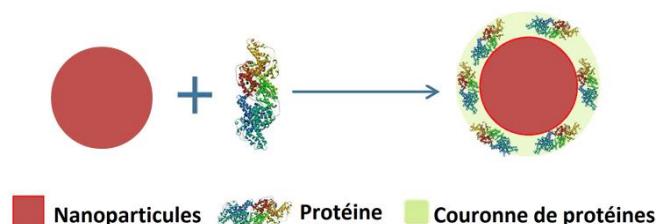


Figure 9 : Adsorption d'une protéine sur une nanoparticule et formation d'une couronne de protéines.

Traduit et adapté de <sup>145</sup>.

Ainsi, les protéines adsorbées donnent une couronne de protéines. Certains distinguent la couronne dure (hard corona) de la couronne molle (soft corona)<sup>146</sup>. La hard corona correspond à des protéines au contact de la nanoparticule où l'interaction est forte, faisant que les protéines ne se désorbent pas. La soft corona correspond à une deuxième couche de protéines sur la nanoparticule, faiblement en interaction et donc en échange constant. Dans les études de notre équipe, nous n'avons constaté qu'une seule couronne irréversiblement liée<sup>147,148</sup>.

Toujours d'après les études de notre équipe, les protéines en interaction avec la nanoparticule peuvent être représentées comme des sphères dures sur la nanoparticule sphérique. L'épaisseur de la couronne de la protéine est alors celle du diamètre de la protéine, la forme de cette dernière n'ayant pas changé avec l'adsorption<sup>148</sup>.

## 2) Changements de structure et d'activité de la protéine lors de l'adsorption

Comme on a vu, la forme de la protéine ne change pas avec l'adsorption, démontrant que la structure quaternaire est conservée<sup>148</sup>. Pour certaines protéines, on a par contre une perte de structure secondaire avec l'adsorption<sup>149,150</sup>. Il existe bien quelques exceptions où des interactions très spécifiques conduisent à la formation d'hélices alpha<sup>151</sup>. Quant à la structure tertiaire, il apparaît qu'elle est modifiée sans que les différences locales soient bien connues<sup>152</sup>.

Les techniques permettant de sonder la structure secondaire globale comme le dichroïsme circulaire n'ont pas permis de conclure sur la localisation des modifications. En effet, est-ce que l'adsorption modifie la structure secondaire très localement sur des sites en interaction, ou est-ce que les modifications se passent sur toute la protéine ? Encore une fois, les informations manquent pour répondre à cette question.

Une grande question qui se pose est celle des orientations par lesquelles les protéines s'adsorbent. Est-ce que la protéine s'adsorbe par un côté en particulier ou est-ce qu'il n'y a aucune orientation privilégiée ? Des expériences ont été faites dans ce sens au laboratoire avec des images prises par microscope électronique à transmission d'hémoglobine de très grande taille sur des nanoparticules. Il a ainsi été montré qu'il n'y avait pas d'orientation privilégiée<sup>153</sup>.

En ce qui concerne l'activité biologique, c'est plus complexe que la perte systématique d'une partie de la structure secondaire. Ainsi, il a été relevé des augmentations<sup>154</sup>, des pertes<sup>155</sup> ou l'absence de modifications<sup>156</sup> de l'activité. Cela va à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle la perte de structure d'une protéine est généralement reliée à une dénaturation de la protéine ; cette dernière a comme conséquence, normalement, la perte d'activité totale. Ce sont donc surtout des modifications locales qui semblent être la cause de ces changements d'activité. Pour le lysozyme adsorbé sur des nanoparticules de silice, il y a une modification de l'hélice du site actif qui explique la perte d'activité<sup>157</sup>.

Il semble donc qu'il est possible de moduler l'activité des protéines par simple adsorption, phénomène qui va pouvoir nous intéresser dans les travaux de cette thèse. Toutefois, il faut au préalable modéliser l'adsorption en fonction des conditions physico-chimiques.

### 3) Prédire l'adsorption

Pour connaître l'adsorption, on utilise l'isotherme d'adsorption donnant la quantité de substrats adsorbés en fonction de la quantité de substrat libre pour une quantité donnée de surface. Plusieurs modèles d'isotherme existent : le modèle de Freundlich<sup>158</sup>, de Jovanovic<sup>159</sup>, de Temkin-Pyzhev<sup>160</sup>, etc.

Le modèle employé ici sera celui de Langmuir<sup>141</sup>, car des travaux précédents dans l'équipe<sup>148,161,162</sup> ou extérieurs<sup>163,164</sup> montraient que ce modèle fonctionnait particulièrement bien pour simuler mathématiquement l'adsorption. Toutefois, la réalité physique derrière ce modèle n'a en fait que peu à voir avec le véritable phénomène qu'est l'adsorption des protéines. En effet, l'isotherme de Langmuir ne peut fonctionner qu'avec un système respectant les quatre conditions suivantes<sup>164,165</sup> :

- tous les sites sont équivalents, distinguables et indépendants ;
- chaque site d'adsorption ne peut fixer qu'une molécule de substrat (monocouche) ;
- les molécules adsorbées n'interagissent pas entre elles d'une manière pouvant influencer leur comportement d'adsorption ;
- le phénomène d'adsorption représente un processus dynamiquement réversible.

Avec l'adsorption des protéines, des phénomènes<sup>166</sup> tels que la coopérativité de l'adsorption des protéines, la formation de clusters et l'agrégation font que le modèle de Langmuir est difficilement utilisable. Comme expliqué dans<sup>167</sup>, cela cause des phénomènes contradictoires aux conditions des isothermes de Langmuir :

- les sites d'adsorption ne sont pas identiques en taille et en énergie suivant la concentration en protéines. En effet, la protéine ne se déforme pas avec l'adsorption de la même façon que n'ayant pas le même étalement.
- l'agrégation de protéines peut aboutir à une situation ressemblant à une adsorption multicouche ;
- il y a des effets protéines-protéines qui influencent leur adsorption (agrégation, etc.) ;
- les protéines peuvent se déformer ou s'étaler différemment, ne pas s'adsorber sur la même face et surtout ne pas avoir la même compacité avec l'adsorption suivant les concentrations en protéine et nanoparticule. En pratique, l'adsorption est donc irréversible.

Ce dernier point peut être résumé par la Figure 10 qui explique qu'on trouve en pratique une forme d'isotherme de Langmuir malgré la non-validité du modèle tel qu'exposé au-dessus ainsi que la raison de l'irréversibilité du processus.

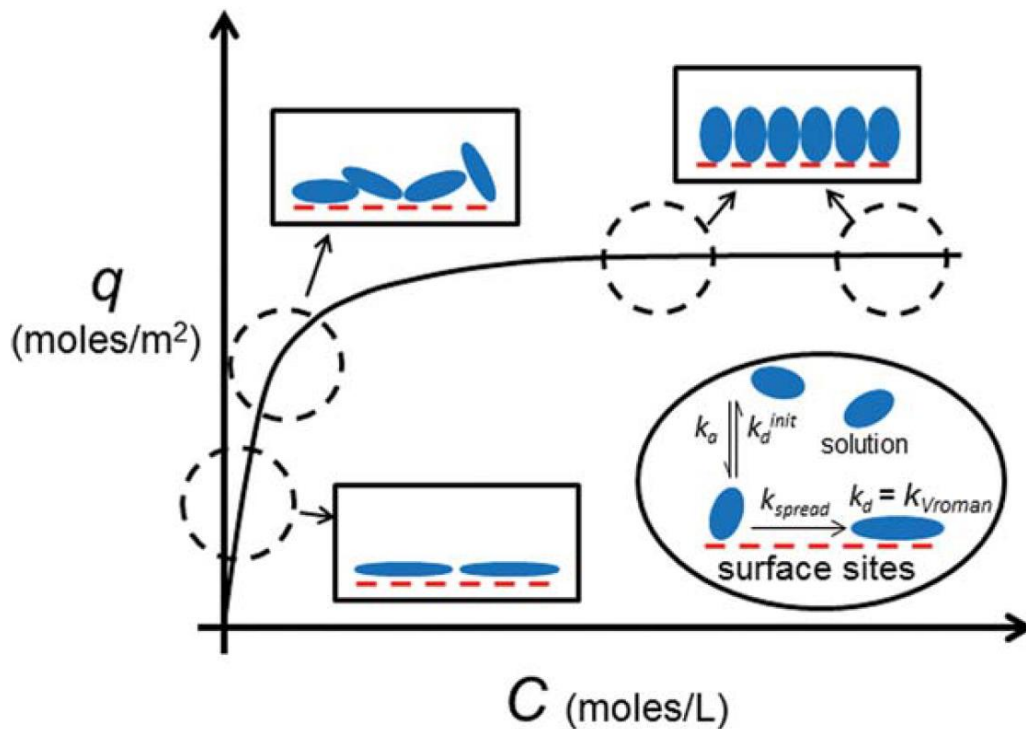


Figure 10 : Caractéristiques d'une isotherme d'adsorption de protéines sur une surface avec  $q$ , la quantité de protéines adsorbées par unité de surface et  $C$ , la concentration de protéines libres.  
Tiré de <sup>167</sup>.

Si l'interaction de la protéine avec la surface est un équilibre, la protéine une fois adsorbée se déforme de manière irréversible. La protéine s'étale et/ou se réoriente afin de maximiser sa surface d'interaction. Le degré d'étalement de la protéine dépend de la stabilité interne de la protéine (capacité à se déformer, rigidité/souplesse), de la force de l'interaction surface/protéine et des interactions répulsives protéine-protéine. En somme, le phénomène est géré en partie par la cinétique : plus la concentration en protéines est élevée à surface égale (concentration de nanoparticules), plus la surface sera vite saturée, donnant un plus grand nombre de protéines adsorbées, donc moins les protéines pourront se déformer. Si on ajoute à ces phénomènes que les protéines n'adhèrent pas les unes aux autres, cela fait qu'au final la surface est saturée avec une monocouche.

L'usage veut qu'on trace une isotherme d'adsorption en conservant la quantité de substrat/nanoparticules fixe pour différentes quantités d'adsorbat/protéines. Cela permet ainsi d'obtenir une relation simple et donc un ajustement théorique facile. Dans notre cas, où la gélification se produit avec une quantité de protéine donnée, nous allons privilégier une approche où l'adsorption sera étudiée pour une quantité de protéines totale (libre et adsorbée) fixe pour différentes quantités de nanoparticules. Les avantages sont multiples :

- en pratique, on peut se servir du modèle de Langmuir afin de prédire simplement les quantités adsorbées pour des concentrations de nanoparticules qui n'ont pas été mesurées ;

- en théorie, les premiers points de nos isothermes correspondent à une situation où la concentration en protéine est beaucoup plus grande devant la concentration en nanoparticule. La droite qui sera

tracée sera donc directement liée au nombre de sites maximal par nanoparticule (c'est-à-dire sans étalement) et facilement mesurable.

Il est à noter que la constante d'adsorption se lit au moment où l'isotherme commence à tendre vers un plateau. La mesure en pratique est difficile. La valeur correspondante quand nous arriverons à la mesurer permettra de comparer d'une condition à l'autre l'étalement relatif de protéine avec l'adsorption.

## V- Définition de notre système

L'idée sur le long terme est de fabriquer des hydrogels de protéines nanocomposites réticulées chimiquement où l'utilisation de protéines fonctionnelles et de nanoparticules fonctionnelles permettra d'obtenir des gels ayant de nombreuses propriétés. Avant de pouvoir arriver à ce niveau, le but de cette thèse va être d'étudier des gels de protéines fonctionnelles réticulées chimiquement. Une fois ces gels non dopés analysés, on étudiera des gels de ces mêmes protéines en les dopant d'un nanomatériau modèle afin de faire des gels nanocomposites simple. Toutefois, les protéines et les nanoparticules interagissant, il sera obligatoire d'étudier dans un premier temps l'adsorption des protéines avant d'étudier des gels de protéines classiques comme nanocomposites. La Figure 11 permet d'exposer l'interdépendance du système.

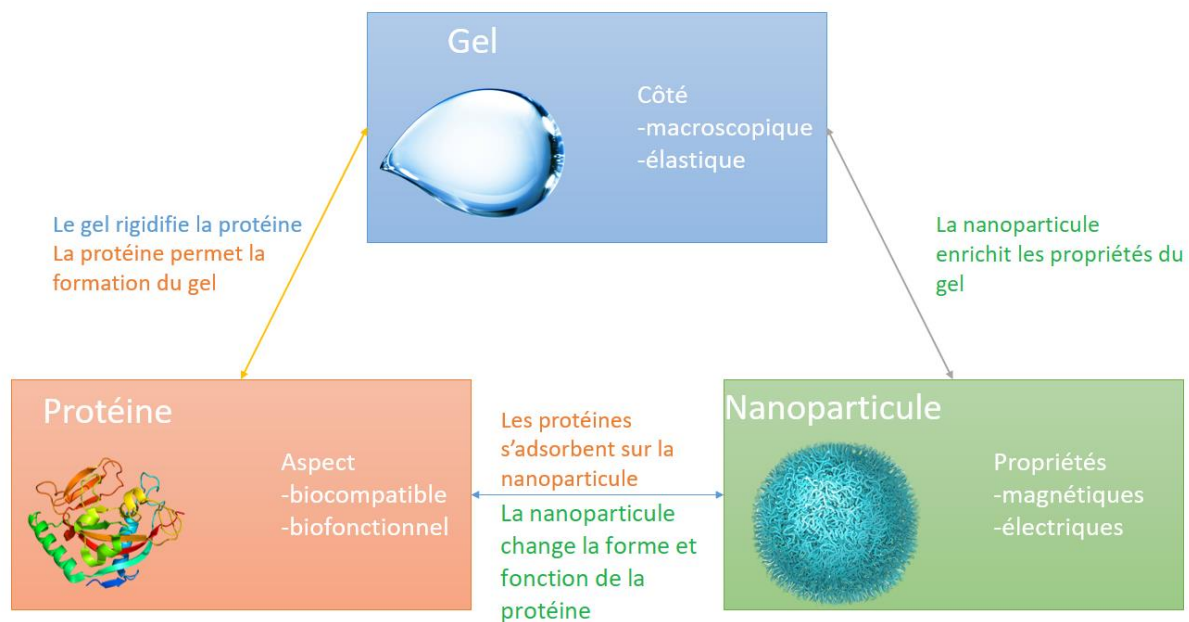


Figure 11 : Facteurs apportés par chacun des constituants d'un gel de protéine dopé avec des nanoparticules ainsi que les interdépendances des trois constituants.

Notre choix s'est porté sur l'utilisation d'hémoglobine de porc comme protéine fonctionnelle. Le nanomatériau modèle sera quant à lui des nanoparticules de silice. La réticulation chimique sera elle assurée par le glutaraldéhyde. Nous allons expliquer pourquoi nous avons porté notre choix sur chacune des composantes et toutes les informations importantes sur la composante en question.

## 1) L'hémoglobine de porc

L'hémoglobine est présente dans le sang de nombreuses espèces et a pour but de transporter l'oxygène dans l'organisme. Il en existe différents types suivant les espèces, mais celle qui nous intéresse est l'hémoglobine de porc. L'intérêt d'utiliser cette protéine est liée à plusieurs facteurs :

- elle est abondante et peu coûteuse étant donné la quantité de sang et le prix que proposent les abattoirs travaillant avec les porcs ;
- elle est soluble, stable dans le temps sous certaines conditions et facilement quantifiable ;
- elle a une fonction intéressante considérant son activité de fixation du dioxygène, ligand gazeux qui ne s'adsorbera donc pas sur les nanoparticules ;
- ses propriétés sont bien connues (structure, courbe d'oxygénation, spectroscopie, etc.).

De plus, le choix de l'hémoglobine permet aussi d'apporter de nouvelles possibilités d'application. On peut penser aux substituts sanguins qui permettraient d'éviter les manques dans les stocks des dons du sang ou de permettre le transport d'organes de façon plus aisée<sup>168</sup>. On peut aussi penser à l'ingénierie où la recherche de tissus permettant de délivrer de l'oxygène est grande pour des utilisations pour les grands brûlés, nécroses et autres problèmes impliquant la peau<sup>169</sup>.

La structure tridimensionnelle de l'hémoglobine porcine a été caractérisée dans <sup>170</sup> et publiée dans la PDB sous le code 1QPW. Aux concentrations classiques à laquelle on va l'utiliser (1-10 mM), sa structure quaternaire est sous forme tétramérique. Elle a alors une masse molaire de 64 500 g/mol ou Da. Ses quatre chaînes polypeptidiques se répartissent en deux chaînes  $\alpha$  de 141 acides aminés et deux chaînes  $\beta$  de 146 acides aminés. La structuration du tétramère est assurée par des interactions non covalentes avec les interactions  $\alpha\beta$  beaucoup plus nombreuses et stables que les interactions non-covalentes inter- $\alpha$  ou inter- $\beta$ . On peut donc considérer le tétramère comme l'association de deux dimères  $\alpha\beta$ . La Figure 12 présente la structure de l'hémoglobine avec ses chaînes polypeptidiques.

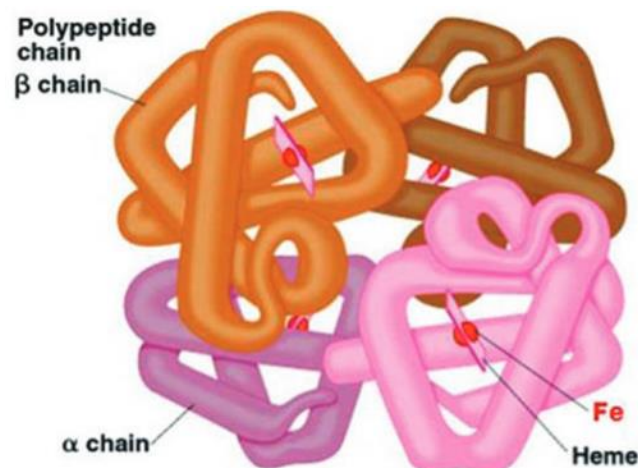


Figure 12 : Structure de l'hémoglobine avec ses deux fois deux chaînes polypeptidiques  $\alpha$  et  $\beta$ .  
Tiré de <sup>171</sup>.

Les quatre chaînes donnent un agencement tétraédrique, la protéine pouvant être assimilée à une sphère. Par diffusion de rayonnement et microscopie électronique, il a été trouvé un diamètre de 4,6 nm<sup>148,172</sup>. Les chaînes  $\alpha$  ont 7 hélices pour structure secondaire alors que les chaînes  $\beta$  en ont 8. Aucune autre structure secondaire n'a été recensée pour l'hémoglobine porcine<sup>170</sup>. De plus, l'hémoglobine de



porc est une hémoprotéine ayant un groupe prosthétique par chaîne, l'hème étant une porphyrine avec des fonctions propionate et vinylique, avec un atome de fer au centre de la porphyrine. C'est sur le fer de l'hème que se fixe de manière réversible, la molécule de dioxygène. Tous ces éléments font que l'hémoglobine porcine ressemble énormément à l'hémoglobine humaine. Or, si les recherches pour l'hémoglobine porcine ne sont pas abondantes, pour l'hémoglobine humaine, de très nombreuses études ont été faites. Les informations suivantes sont celles sur l'hémoglobine humaine.

L'hème se présente comme sur la Figure 13 avec le fer qui est coordonné par quatre atomes d'azote de la porphyrine dans le plan, un azote en-dessous venant d'une histidine et potentiellement, par un atome d'un 6<sup>ème</sup> ligand. L'histidine est située en position 87 pour les chaînes  $\alpha$  et 92 pour les chaînes  $\beta$ . Cette histidine est toujours située en 8<sup>ème</sup> position sur la 6<sup>ème</sup> hélice (dite position F8) et est dite proximale<sup>173</sup>. Pour les formes avec ligand, la porphyrine est plane et le fer normalement au centre de la porphyrine, donc dans le même plan.

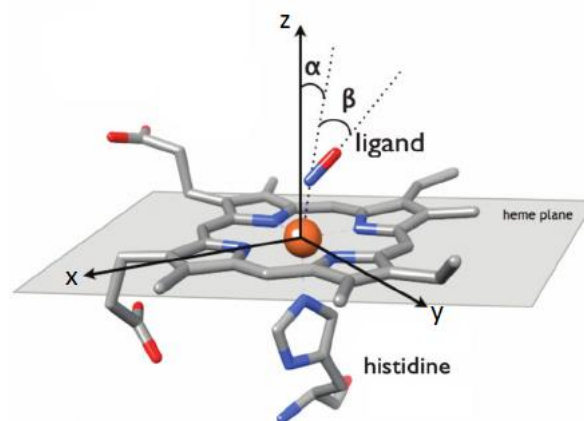


Figure 13 : Structure de l'hème de l'hémoglobine avec un ligand et sa disposition dans l'espace. La boule orange représente le fer de l'hème. Adapté de <sup>174</sup>.

Le fer de l'hème de l'hémoglobine existe sous différents états, mais l'étude s'est concentrée sur trois cas où chaque forme donne un nom différent à l'hémoglobine :

- l'oxyhémoglobine (ou oxyHb). Il s'agit de la forme oxygénée, où le fer complexe un oxygène du dioxygène en sixième coordination. C'est la forme classique que nous obtenons après traitement du sang, à l'air libre. L'état d'oxydation du fer de l'hème de cette forme est un vieux sujet de discussion<sup>175,176</sup> car les différentes techniques utilisées pour le déterminer n'ont pas toujours donné des résultats concordant. Dans cette thèse, il sera assumé que le fer est en état d'oxydation +III<sup>177</sup>, mais nous ne prenons pas cette affirmation comme une vérité absolue.

- la méthémoglobine (ou métHb). L'hème est dans une forme oxydée, mais où le fer ne fixe pas le dioxygène. Le fer est dans un état +III avec un 6<sup>ème</sup> ligand aqua ou hydroxo. Cette forme existe d'ailleurs elle-même sous deux états suivant le pH :

- haut spin à bas pH, où le fer est ligandé par l'oxygène du ligand aqua.

- bas spin à haut pH, où le fer est ligandé par l'oxygène du ligand hydroxo<sup>178</sup>.

- la désoxyhémoglobine (ou désoxyHb), obtenue en désoxygénant ou en présence d'un réducteur. Le fer n'a pas de 6<sup>ème</sup> ligand et il est dans un état +II.

Il est important de s'intéresser à la structure de l'hème dans la désoxyhémoglobine. Pour la désoxyHb, il n'y a donc pas de 6<sup>ème</sup> ligand, contrairement aux autres formes. Le fer n'étant coordonné que 5 fois, le fer normalement au centre de la porphyrine est légèrement déplacé vers le bas, du côté de l'histidine proximale. En conséquence, la porphyrine normalement plane ne l'est plus et a une forme de dôme. La Figure 14 illustre l'agencement dans l'espace pour la désoxyhémoglobine.



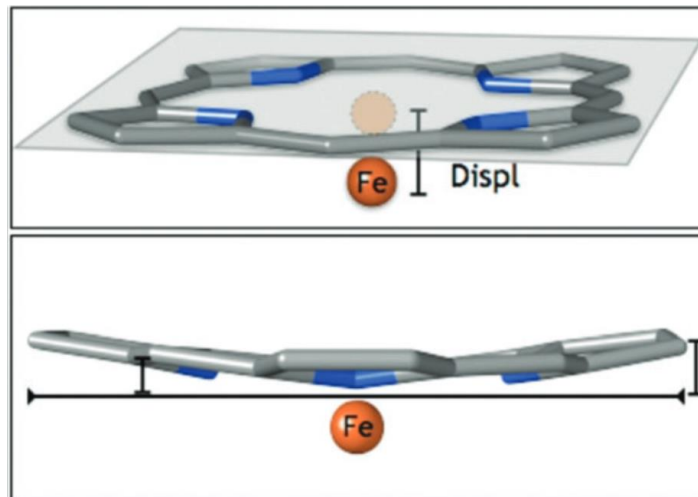


Figure 14 : Structure de l'hème de l'hémoglobine sans ligand (forme désoxygénée) et sa disposition dans l'espace suivant deux vues différentes. L'histidine proximale et les fonctions propionate et vinylique ne sont pas représentées. Adapté de <sup>174</sup>.

Les porphyrines sont connues pour avoir des propriétés spectroscopiques. L'hème ne fait pas exception et chaque forme de l'hémoglobine a une couleur différente et donc un spectre différent entre 400 et 700 nm dans le domaine visible. La Figure 15 présente ainsi les différents spectres d'absorption de l'hémoglobine qui permettent ainsi de pouvoir caractériser les différentes formes et d'obtenir leur concentration (voir le chapitre matériels et méthodes).

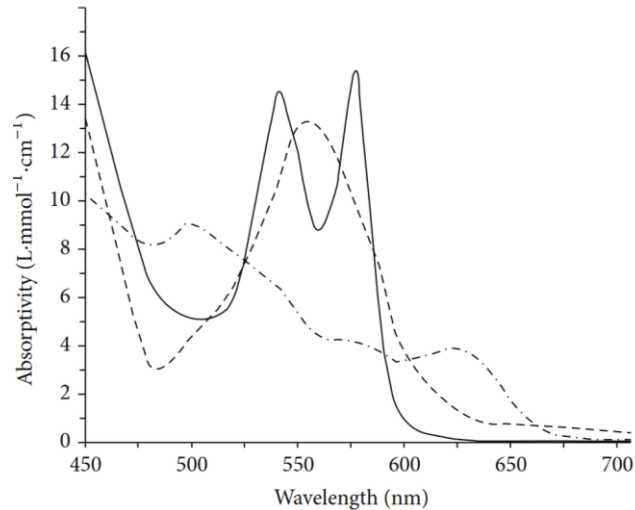


Figure 15 : Spectres d'adsorption des différentes formes de l'hémoglobine : trait plein : oxyHb, pointillés : désoxyHb et tiret-point : métHb. pH 7 Tiré de <sup>179</sup>.

De plus, comme expliqué plus tôt, le fer de l'hème sert à fixer le dioxygène, il s'agit donc du site actif de la protéine. La courbe d'oxygénation de l'hémoglobine, appelée aussi courbe de dissociation présente la proportion d'oxyHb en fonction de la pression partielle en dioxygène. Cette courbe suit une forme sigmoïde et cette dernière est affectée par plusieurs facteurs tels le pH, la température, la quantité de 2,3-bisphosphoglycérate ou de dioxyde de carbone que la désoxyHb a fixé. La Figure 16 présente ainsi une courbe de dissociation avec les effets des différents facteurs.

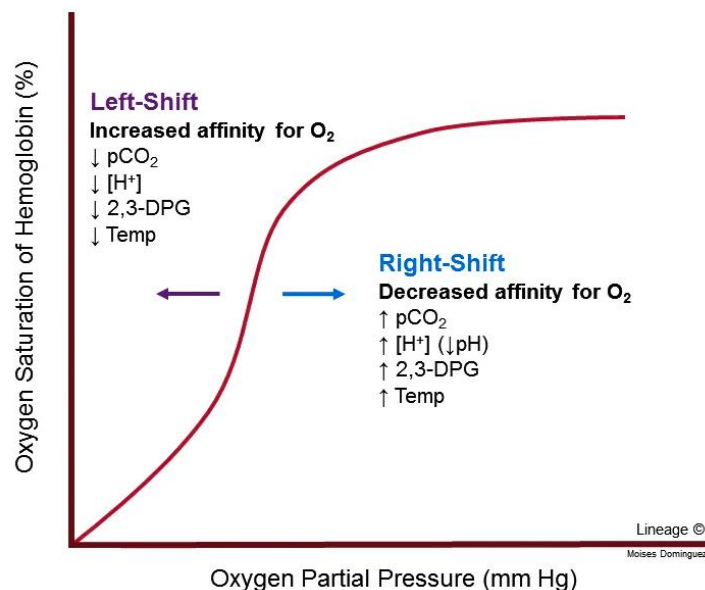


Figure 16 : Courbe d'oxygénation de l'hémoglobine et effets de différents facteurs sur la courbe

Il est à noter que la forme sigmoïde de la courbe est liée au comportement coopératif de l'hémoglobine. En pratique, un tétramère d'hémoglobine peut fixer quatre molécules de dioxygène vu qu'il possède un hème par chaîne. Ce comportement coopératif se traduit par une fixation plus aisée de la deuxième molécule de dioxygène que pour la première. Idem pour la troisième par rapport à la deuxième et pour la quatrième par rapport à la troisième. L'hémoglobine augmente son affinité pour le dioxygène au fur et à mesure qu'elle le fixe. La pression de demi-saturation est représentative de l'affinité et le modèle de Hill permet de calculer la constante de Hill permettant d'évaluer la coopérativité<sup>180</sup>. Il existe d'autres modèles pour modéliser l'oxygénation comme celui d'Adair<sup>181</sup> ou celui de Pauling<sup>182</sup>, mais nous utiliserons celui de Hill dans cette thèse.

Pour la fixation du dioxygène, la coopérativité provient de la dynamique survenant dans la protéine durant la fixation successive des molécules de dioxygène à l'origine de changements de conformation. Ainsi, la désoxyHb est une forme rigide, contrainte par des ponts salins entre les sous-unités<sup>183</sup>. Quand une molécule de dioxygène est fixée, le fer de l'hème se déplace et se positionne au centre de l'hème dans le plan. L'histidine proximale qui est liée au fer se rapproche de l'hème, la structure du monomère est modifiée, certains ponts salins sont rompus et la structuration du tétramère est modifiée par déplacement des dimères l'un par rapport à l'autre. Cette nouvelle conformation rend les hèmes encore non occupés plus susceptibles de fixer le dioxygène<sup>184</sup>.

Tout cela montre que l'hémoglobine est une molécule intéressante à étudier. Sa capacité à fixer le dioxygène est directement liée aux modifications de la structure de son hème, aux variations de la structure (de la structure secondaire à la structure quaternaire) et de la dynamique de la protéine. Ce seront donc des paramètres à évaluer afin de comprendre les changements que peuvent apporter l'adsorption comme la gélification.

## 2) Les nanoparticules de silice

Avant de détailler les nanoparticules de silice que nous allons utiliser, il faut déjà voir comment se présente une nanoparticule de silice et les groupes fonctionnels qu'elle porte. Cela est qu'explicité sur la Figure 17.

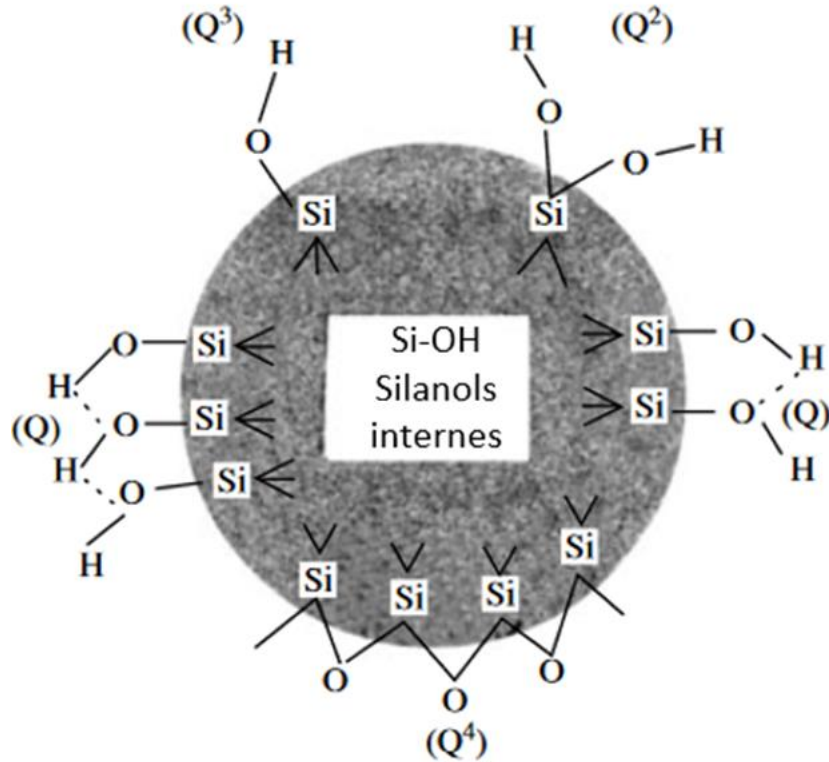


Figure 17 : Présentation des différents types de groupement silanol et pont siloxane pouvant être présents sur des nanoparticules de silice : (Q) Silanol vicinal, (Q2) Silanol géminé, (Q3) Silanol isolé et (Q4) pont siloxane. Traduit de <sup>185</sup>.

On retrouve donc des groupes silanol Si-OH et des ponts siloxane Si-O-Si sur les nanoparticules. Si les groupes silanol contribuent à l'hydrophilie, les ponts siloxane apportent de l'hydrophobicité<sup>186</sup>. On a donc des interactions électrostatiques entre les groupes chargés positivement des acides aminés et les groupements silanol tandis que les ponts siloxane créent les interactions hydrophobes avec les chaînes latérales des acides aminés apolaires si on s'en réfère à ce qu'on a dit plus tôt sur l'adsorption.

Un avantage majeur est que les nanoparticules de silice sont bon marché, parfaitement contrôlées dans leur structuration et caractérisation et les études sont nombreuses. L'inconvénient majeur qui est de ne pas apporter de fonctionnalités utiles au contraire d'autres nanoparticules (métalliques pour les propriétés magnétiques et électriques, par exemple) nous arrange. En effet, nous voulons avoir les gels nanocomposites les plus simples possible au départ. De plus, leur simplicité peut être vite compensée par l'existence de nanoparticules métalliques recouvertes de silice qui permet ainsi d'avoir des fonctionnalités. On peut ainsi penser à la marque Turbobeats fabricant de nombreux produits de ce genre<sup>187</sup>.

Les nanoparticules que nous allons utiliser sont des Ludox TM-50. Il s'agit de nanoparticules de silice commerciales. Nous avons utilisé durant toute la thèse le même lot, assurant que nos nanoparticules sont identiques quelque soit les expériences que nous avons faites. La façon dont on passe de la solution commerciale à la solution nanoparticules que l'on utilise est présentée dans le chapitre matériels et méthodes. La Figure 18 explique comment caractériser de façon classique un nanomatériau.

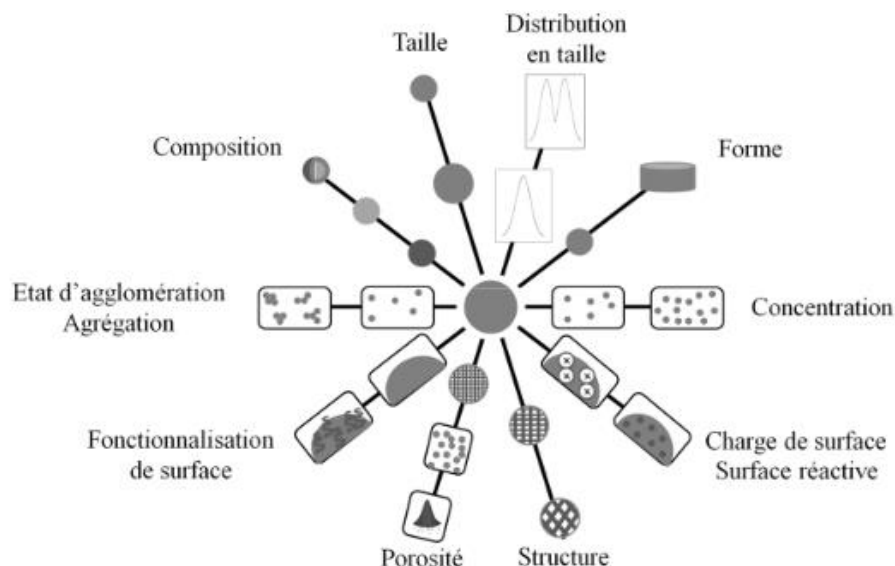


Figure 18 : Informations nécessaires afin de caractériser un nanoobjet (ISO/TC 229, 2009).

Le Tableau 2 résume ainsi les informations importantes sur les nanoparticules utilisées.

Composition	Silice
Taille	R=12,7 nm Surface spécifique de 107 m <sup>2</sup> /g.
Distribution en taille	Monodisperse
Forme	Sphérique
Concentration	Variable (en dessous de 500 g/L)
Charge de surface	Négative
Structure	Amorphe
Porosité	Lisse
Fonction de surface	Silanol
Fonctionnalisation supplémentaire de surface	Aucune
Agrégation	Absente

Tableau 2 : Informations nécessaires afin de caractériser des Ludox TM-50

Afin de connaître la composition de nos nanoparticules et les impuretés présentes, nous avons dissous les nanoparticules de silice et les avons passées en spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif comme détaillé dans le chapitre matériels et méthodes. Le Tableau 3 donne ainsi les concentrations pour les principaux atomes repérés dans les nanoparticules pour une concentration en nanoparticules de 215 g/L.

	C (g/L)
Si	100
Fe	0,055
Na	1,2
Zr	0,054
Ti	0,023

Tableau 3 : Concentration des différents atomes repérés pour les Ludox TM-50 (la concentration en nanoparticules correspond alors à 215 g/L).

On voit qu'on a donc du fer dans les nanoparticules. Cela est important, car si on utilise des méthodes pour étudier le fer de l'hème de l'hémoglobine adsorbée sur les nanoparticules, il faudra tenir compte de la contribution du fer des nanoparticules aussi. Si la proportion de fer semble faible et donc

négligeable, les concentrations très fortes d'hémoglobine que l'on va utiliser fera que la quantité de fer venant des nanoparticules sera du même ordre de grandeur que celle venant de l'hémoglobine.

A côté de cela, nous allons étudier l'hémoglobine adsorbée sur des nanoparticules de silice. L'adsorption des protéines sur les nanoparticules de silice a été particulièrement étudiée<sup>188,189</sup> et les protéines semblent avoir une grande affinité pour ces dernières. En particulier l'adsorption de l'hémoglobine de porc sur les nanoparticules de silice a été très largement étudiée par l'équipe du laboratoire par différentes techniques<sup>148,190-193</sup>. Les principaux résultats sont les suivants :

- l'hémoglobine a bien une adsorption sur les Ludox TM-50 respectant le modèle mathématique de Langmuir ;
- l'adsorption sur des nanoparticules de silice provoque un changement dans la structure secondaire de la protéine observée par dichroïsme circulaire dans l'UV-Visible ;
- la protéine conserve sa structure quaternaire une fois adsorbée sur les nanoparticules
- les propriétés d'oxygénation continuent d'exister une fois l'hémoglobine adsorbée. Toutefois, une augmentation de l'affinité ainsi qu'une baisse de la coopérativité pour le dioxygène a été remarquée pour des nanoparticules polydisperses ;
- l'effet Bohr (changement de l'affinité suivant le pH) existe toujours malgré l'adsorption sur les nanoparticules ; idem pour deux effecteurs classiques de l'hémoglobine : 1,3-bisphosphoglycérate et Inositol hexaphosphate ;
- l'hémoglobine une fois désorbée reprend son activité normale (affinité et coopérativité que l'hémoglobine libre) ;
- pour la myoglobine, protéine de la même famille que l'hémoglobine, une fois adsorbée, elle perd sa transition dynamique. La densité d'états vibrationnels diminue. Tout cela montre que la dynamique de la protéine est restreinte une fois la protéine adsorbée.

On a donc déjà des informations importantes sur les nanoparticules de silice qu'on utilise et sur leurs interactions avec l'hémoglobine porcine. Il manque cependant certaines informations pour caractériser le phénomène. Ainsi, il manque toujours une explication claire sur pourquoi l'affinité de l'hémoglobine change avec l'adsorption. Un des angles morts des précédentes études concerne l'hème et le fer de l'hémoglobine. De plus, l'étude de l'impact de l'état du fer sur l'adsorption n'a jamais été faite non plus. Ce seront donc des points qui seront abordés dans cette thèse. Le dernier point à étudier est l'agent dont on va se servir pour la réticulation chimique : le glutaraldéhyde.

### 3) Le glutaraldéhyde

Pour la réticulation, nous emploierons donc une méthode chimique en utilisant le glutaraldéhyde (GTA). Le glutaraldéhyde est utilisé en tant que réticulant dans beaucoup d'applications comme l'histochimie<sup>194</sup>, le tannage du cuir<sup>195</sup>, l'immobilisation d'enzyme et d'autres protéines<sup>196</sup>, la stérilisation chimique<sup>197</sup> et dans les sciences biomédicales<sup>198</sup> comme pharmaceutiques<sup>199</sup>. On peut aussi citer son rôle comme fixateur pour conserver la structure des cellules ou des tissus<sup>200</sup>. Il a servi en microscopie<sup>201</sup> ou cytochimie<sup>202</sup>, pour stabiliser la structure de cristal de protéines pour la diffraction X<sup>203</sup> ou pour caractériser la structure quaternaire de protéines en solutions<sup>204</sup>. On peut aussi noter son utilisation en spectrométrie de masse<sup>93</sup> afin d'étudier les interaction protéine-protéine. Comme on peut le voir, le glutaraldéhyde est étudié depuis longtemps pour réticuler les protéines et il a été très souvent utilisé pour former de nombreuses structures avec ces dernières<sup>92,205</sup>.

Le glutaraldéhyde est donc un réticulant (ou cross-linker) bifonctionnel, c'est-à-dire qu'il peut interagir deux fois et donc lier deux chaînes polymériques. Ces chaînes peuvent être liées intra et inter polymères. Le glutaraldéhyde est connu pour être un composé chimique très réactif grâce à ses deux

fonctions aldéhyde. Le glutaraldéhyde est notamment utilisé car il est le plus efficace réticulant des dialdéhydes. En effet, une étude sur la réticulation du collagène par divers dialdéhydes de différentes tailles de chaînes carbonées (2 à 6 atomes de carbone soit respectivement glyoxal, malonaldéhyde, succinaldéhyde, glutaraldéhyde, et adipaldéhyde) a montré que la réactivité était favorisée pour le glutaraldéhyde à cinq atomes de carbone<sup>206</sup>.

Il est déjà à noter qu'il y a une aldolisation du glutaraldéhyde sur lui-même formant d'autres espèces plus réactives<sup>207</sup>. Ainsi, en plus de la forme dialdéhyde, une solution aqueuse de glutaraldéhyde contient une multitude de formes dérivées du glutaraldéhyde ainsi que des polymères formés à partir de ces dérivés. La formation des différentes formes dépend du pH, de la température ainsi que de la concentration<sup>208,209</sup>. Le phénomène est étudié depuis plus de 40 ans et la Figure 19 résume ainsi les différentes formes déjà observées selon le pH.

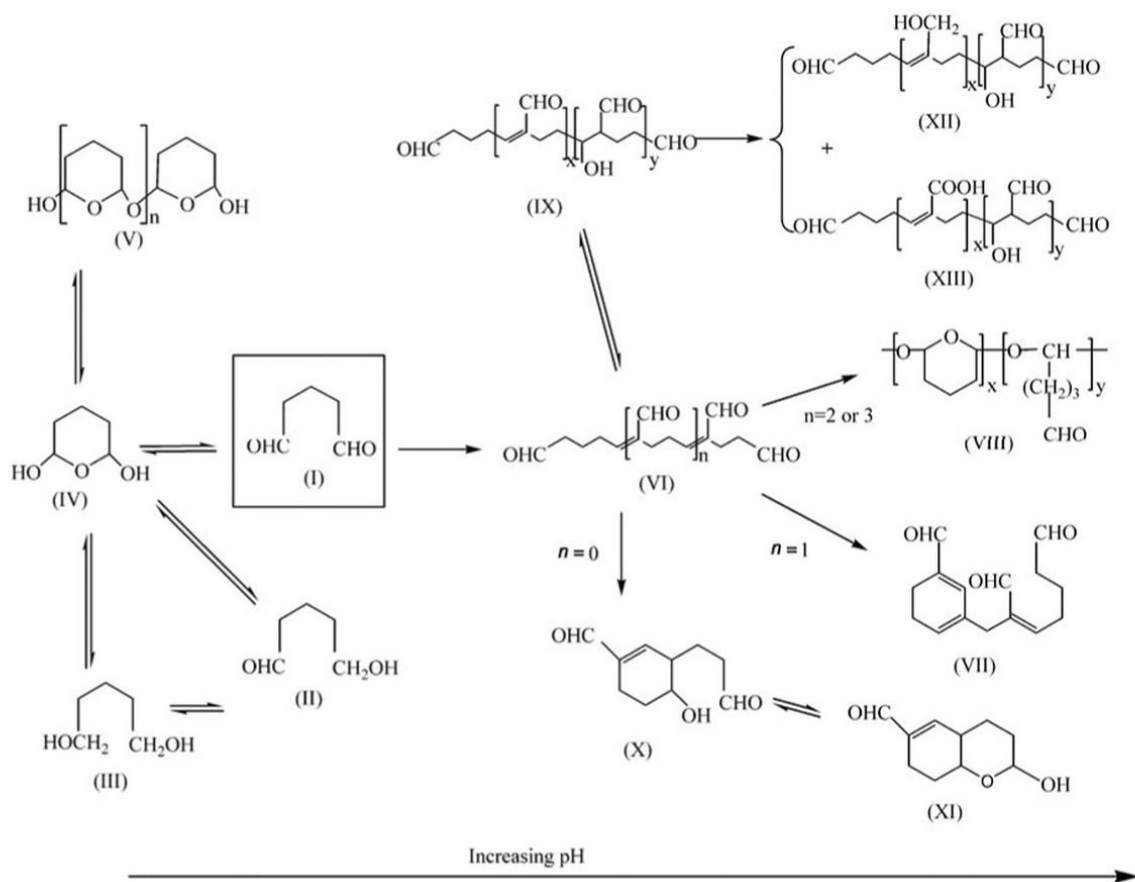


Figure 19 : Différentes formes dérivées et polymérisées du glutaraldéhyde en fonction du pH.  
Tiré de <sup>208</sup>.

Le glutaraldéhyde en formant des polymères réticulants de différentes longueurs comme on vient de le voir fait que les solutions contenant du glutaraldéhyde sont des très bons réticulants<sup>209</sup>.

La principale réaction assumée du glutaraldéhyde et de ses formes dérivées est de se fixer sur des amines via addition nucléophile d'une de ses fonctions aldéhyde sur une amine primaire suivi d'une élimination d'eau ce qui donne une imine secondaire qui est aussi une base de Schiff. Cette théorie fait que le glutaraldéhyde réagira surtout avec la chaîne latérale des résidus lysine. Toutefois, cette théorie sur les bases de Schiff fondée sur la couleur jaune que prend souvent les protéines au contact du glutaraldéhyde<sup>210</sup> a été modulée en observant que l'hydrolyse acide ne provoquait pas la rupture de la liaison protéine-GTA. Au final, il a été remarqué que le GTA ne réagissait pas uniquement avec

les amines des acides aminés, mais aussi avec les groupes thiol, imidazole et phénol<sup>211</sup>, ce qui en fait une molécule extrêmement réactive. Les résidus arginine, histidine, tyrosine et cystéine pourraient donc réagir avec le glutaraldéhyde<sup>196,211–214</sup>. Au final, les théories sont nombreuses et les expériences permettant d'aboutir à des réponses sont rares dû à la difficulté à identifier les produits formés<sup>213</sup>.

En adéquation avec cette étude<sup>209</sup>, nous choisissons de considérer que le glutaraldéhyde réagit principalement avec la chaîne latérale des résidus lysine. En utilisant des simulations simples, on a estimé qu'une hémoglobine a environ 25 résidus lysine exposés qui peuvent donc être attaqués.

Au final, ce travail ne s'intéressera pas aux mécanismes de formation, ni aux différents produits formés, mais uniquement aux gels d'hémoglobine formés par la réaction du glutaraldéhyde sur les protéines. Toutefois, l'hémoglobine réticulée pour obtenir un gel n'a jamais été étudiée. Il existe bien une étude sur un gel d'hémoglobine ayant eu subi par une thiolation, puis réticulée chimiquement par du polyéthylène glycol maléimide<sup>215</sup>. Malheureusement, l'article ne s'intéressait pas à la structure, ni à l'activité de la protéine dans le gel. On peut aussi faire une comparaison avec les gels d'hémoglobine S qui se forment spontanément. Bien que la comparaison ne puisse pas être totale car l'hémoglobine S provient d'une mutation, on peut déjà faire des suppositions. On peut ainsi noter que les gels d'hémoglobine S se forment seulement pour la forme désoxygénée et que les gels une fois formés ne s'oxygènent pas (on a donc une courbe d'oxygénation très différente)<sup>62</sup>.

Ce qui a été activement étudiée, ce sont les polymères d'hémoglobine obtenu par réticulation par le glutaraldéhyde (PolyHb)<sup>168,216–221</sup>. Il existe d'ailleurs de nombreux PolyHb qui sont commercialisés : Oxyglobin<sup>®222</sup>, Hemopure<sup>®223</sup> ou PolyHeme<sup>®224</sup>. Les polymères formés vont de 150 à 1500 kDa<sup>220</sup>, le monomère d'hémoglobine ayant une masse molaire de 16,5 kDa. Pour l'activité, on peut ainsi voir sur la Figure 20 que l'oxygénation des polymères d'hémoglobine change de celui la forme libre et que cela diffère suivant la forme initiale avant réticulation (forme désoxygénée ou oxygénée).

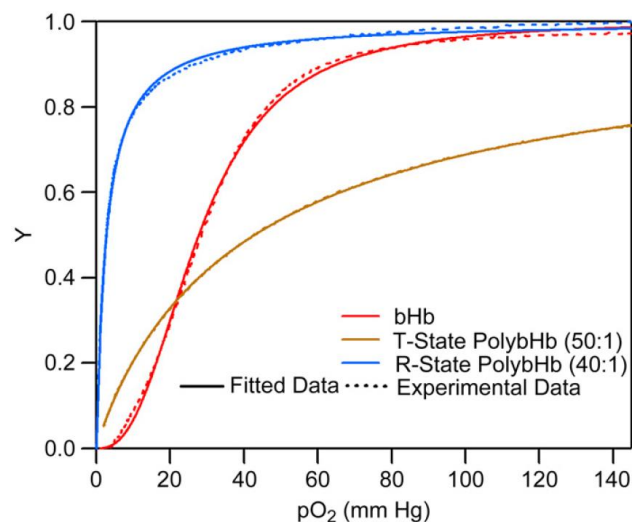


Figure 20 : Courbes d'oxygénation pour l'hémoglobine bovine libre (rouge), les polymères d'hémoglobine réticulée dans leur état de basse affinité (orange) et de haute affinité (bleu)).

Tiré de <sup>218</sup>.

L'hémoglobine réticulée dans sa forme oxygénée a son affinité qui augmente tandis que c'est l'inverse pour la forme désoxygénée. La coopérativité quant à elle n'existe plus. L'explication donnée est qu'une fois l'hémoglobine réticulée, sa structure quaternaire est gelée et réduisant la flexibilité de sa structure. Cela empêcherait donc les changements qui se passent dans la structure quaternaire durant l'oxygénation ou la désoxygénation, faisant donc que l'hémoglobine perd sa coopérativité<sup>218</sup>. Aucune



explication n'est donnée pour les changements d'affinité, mais cela doit être lié au fait que la forme désoxygénée est de basse affinité tandis que l'oxyhémoglobine est très affine pour le dioxygène<sup>225</sup>. Il sera donc intéressant d'étudier les propriétés d'oxygénation de l'hémoglobine dans le gel et de voir si l'état (oxygéné ou désoxygéné) de l'hémoglobine avant réticulation modifie l'affinité.

La thèse présentera pour la première fois des hydrogels d'hémoglobine réticulée par le glutaraldéhyde. Si le mécanisme de réticulation des protéines semble être connu depuis 1970<sup>210</sup>, le sujet de la formation de gel ne semble pas avoir fait d'émule. Il est difficile de trouver des articles abordant des gels de protéine réticulée par du glutaraldéhyde. A notre connaissance, c'est seulement en 2008 qu'apparaît le premier article en parlant<sup>226</sup>. Toutefois, l'article n'aborde pas l'aspect novateur de la formation de ce gel, la technique est utilisée en premier lieu pour éliminer certains mouvements de la protéine afin d'étudier avec plus de clarté leur dynamique. Il existe bien d'autres études<sup>227</sup> abordant les gels de protéine réticulée par le glutaraldéhyde, mais les articles ne sont pas liés les uns aux autres, ne se concentrent pas sur l'originalité d'obtenir un gel et ne se centrent pas sur l'apport de cette nouvelle technique de gélification. Une étude novatrice est sortie en 2013<sup>209</sup>. La structure de gels de protéines obtenus par réticulation chimique grâce au glutaraldéhyde a été étudiée pour la première fois. Les résultats de cette étude seront abordés en détail plus tard en comparaison des gels que nous développerons. Il est tout de même à noter que la protéine conserve sa structure native dans le gel. Un article de 2016 apporte aussi certains éléments<sup>98</sup>. Dans cet article, avec la réaction du glutaraldéhyde sur l'albumine de sérum bovin, on obtient des gels biocompatibles, biodégradables et ayant acquis des propriétés d'autofluorescence dans le vert et le rouge. L'article aborde ainsi les aspects spectroscopiques, rhéologiques et la toxicité. De plus, il est très surprenant de trouver un gel non toxique alors que le glutaraldéhyde a des effets nocifs sur l'organisme<sup>95</sup>.

Ce qui est tout de même clair, c'est que les études des gels de protéine réticulée chimiquement ne se sont jamais intéressés en détail à l'activité, ce qui sera donc un des points centraux à étudier. Tout cela nous amène aux objectifs de cette thèse.

## VI-Objectifs

Il est déjà intéressant de voir comment les chercheurs caractérisent les gels de protéine. La Figure 21 présente ainsi les principales caractérisations effectuées et par quelle technique.

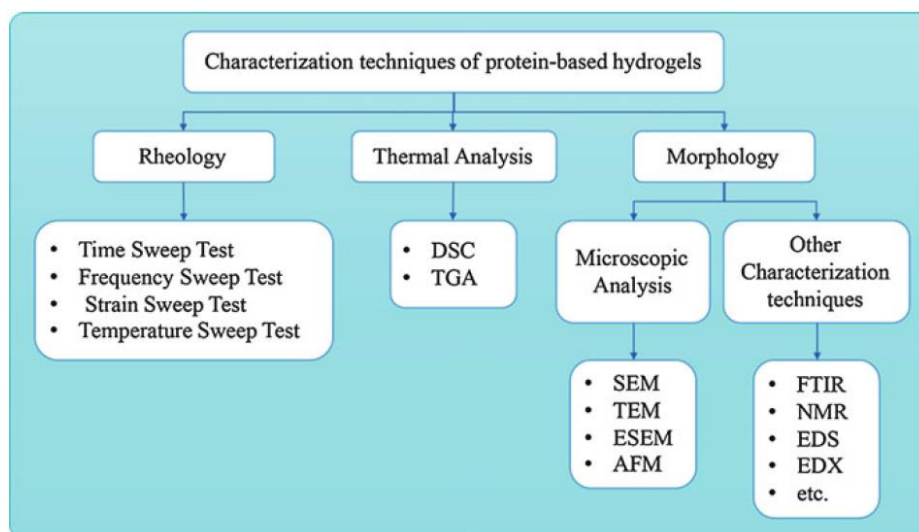


Figure 21 : Techniques de caractérisation classiques des gels de protéine. Tiré de <sup>76</sup>.



On voit donc que deux points qui ne sont jamais abordés habituellement sont la structure de la protéine dans le gel ainsi que son activité. C'est sur ces deux points que l'on va particulièrement se pencher.

On va donc tenter de faire une caractérisation multi-échelle du gel, en allant de l'étude de l'hème, sonde de petite taille jusqu'à la structuration du gel en passant par les structures secondaire et tertiaire de la protéine. Pour cela, il faudra effectuer des analyses en rhéologie afin de comprendre les propriétés élastiques du gel.

Cette approche novatrice va permettre de résoudre le deuxième but de cette thèse. En effet, nous allons étudier l'activité de l'hémoglobine dans le gel et si l'activité change, essayer de comprendre pourquoi. Pour cela, le premier point à regarder sera l'intégrité de la protéine qui sera faite via l'étude multi-échelle. Si cela n'aboutit pas, des études de dynamique de la protéine seront tentées.

Notre objectif, en plus de caractériser des gels d'hémoglobine sera d'étudier des gels nanocomposites. Il est donc déjà nécessaire dans un premier temps de comprendre ce que provoque l'adsorption afin de séparer dans l'analyse d'un gel nanocomposite ce qui vient de l'adsorption et ce qui vient de la gélification. Pour cela, nous appliquerons le même objectif aux assemblages Hb/NP qu'aux gels : étude multi-échelle et étude de l'activité.

Pour cela, le plan sera le même pour les assemblages que pour les gels. Tout d'abord, étude des conditions de formation des objets. Pour l'adsorption, cela passera par la détermination des isothermes d'adsorption suivant les concentrations en hémoglobine et suivant la forme de la protéine (oxyHb, désoxy ou métHb). Des études avec la deutération seront faites, car indispensables pour certaines expériences en milieu D<sub>2</sub>O comme la diffusion de neutrons et suivant le pH afin de se mettre dans des conditions où l'adsorption est forte. Pour les gels, cela passera par la détermination des diagrammes de gélification, puis par des études de rhéologie en oscillation qui nous donneront les temps de gélification et les propriétés élastiques.

Par la suite, pour les assemblages comme pour les gels, l'activité de l'objet sera étudiée par tonométrie. Avec l'utilisation du modèle de Hill, on déterminera l'affinité et la coopérativité relative.

Par la suite, ce sera le début de l'étude multi-échelle en étudiant la structure de la protéine. Pour cela, on ira du plus petit au plus grand :

- étude du fer et de l'hème par résonance paramagnétique électronique, spectroscopie d'adsorption X et dichroïsme circulaire dans la bande de Soret ;

- analyse de la globine en étudiant de la structure secondaire à la structure quaternaire grâce au dichroïsme circulaire dans l'UV-Visible et la diffusions de rayonnement (rayons X et neutrons, petits et grands angles quand ce sera possible).

Finalement, l'étude de la structuration du gel sera faite en utilisant la diffusion de rayonnement aux petits angle ((rayons X et neutrons) à nouveau en étudiant les états d'agrégations grâce à la dimension fractale (Figure 22) et le facteur de structure. Il y aura aussi une étude directe par microscopie électronique en transmission pour les assemblages, ou par microscopie électronique à balayage pour les gels.

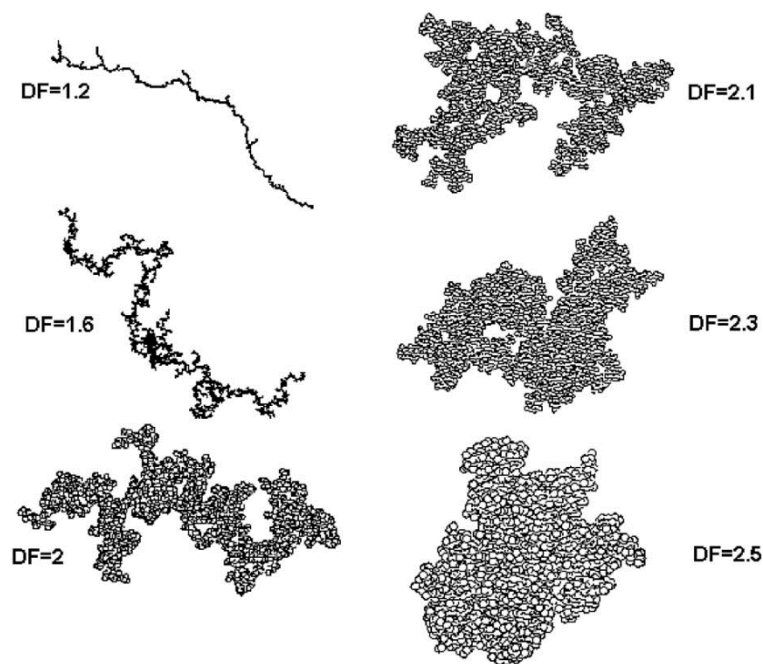


Figure 22 : Différents états d'agrégation suivant la dimension fractale trouvée en diffusion de rayonnement. Tiré de <sup>228</sup>.

L'étude des assemblages sera faite dans le chapitre 2 tandis que celle des gels sera faite dans le chapitre 3. Enfin, avec le chapitre 4, nous essayerons d'aborder la dynamique de la protéine une fois dans le gel en tentant certaines approches en température grâce au dichroïsme circulaire dans l'UV-Visible et à la diffusion de neutrons. Une étude de la mobilité de l'hydrogène de la protéine sera faite en température afin de regarder la transition dynamique, puis on mesurera la densité d'états vibrationnels. Pour cela, on utilisera la diffusion élastique et inélastique de neutrons.

## Bibliographie

- (1) R. Raghavan, S.; F. Douglas, J. The Conundrum of Gel Formation by Molecular Nanofibers, Wormlike Micelles, and Filamentous Proteins : Gelation without Cross-Links? *Soft Matter* **2012**, *8* (33), 8539–8546. <https://doi.org/10.1039/C2SM25107H>.
- (2) Zhu, J.; Kaufman, L. J. Collagen I Self-Assembly: Revealing the Developing Structures That Generate Turbidity. *Biophys J* **2014**, *106* (8), 1822–1831. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.03.011>.
- (3) Okay, O.; Oppermann, W. Polyacrylamide–Clay Nanocomposite Hydrogels: Rheological and Light Scattering Characterization. *Macromolecules* **2007**, *40* (9), 3378–3387. <https://doi.org/10.1021/ma062929v>.
- (4) Borawake, D.; Vishal, P.; Giri, M. Mesoporous Silica Nanoparticles as Theranostic Platform for Smart Drug Delivery: A Review. *Nanomedicine and Nanoscience Research* **2017**, *2017*, 1–11.
- (5) Sun, Z.; Song, C.; Wang, C.; Hu, Y.; Wu, J. Hydrogel-Based Controlled Drug Delivery for Cancer Treatment: A Review. *Mol. Pharmaceutics* **2020**, *17* (2), 373–391. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b01020>.
- (6) Thambi, T.; Li, Y.; Lee, D. S. Injectable Hydrogels for Sustained Release of Therapeutic Agents. *Journal of Controlled Release* **2017**, *267*, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.08.006>.

- (7) Einerson, N. J.; Stevens, K. R.; Kao, W. J. Synthesis and Physicochemical Analysis of Gelatin-Based Hydrogels for Drug Carrier Matrices. *Biomaterials* **2003**, *24* (3), 509–523. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00369-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00369-1).
- (8) Xu, X.; Xu, Z.; Yang, X.; He, Y.; Lin, R. Construction and Characterization of a Pure Protein Hydrogel for Drug Delivery Application. *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *95*, 294–298. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.028>.
- (9) Song, F.; Li, X.; Wang, Q.; Liao, L.; Zhang, C. Nanocomposite Hydrogels and Their Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Journal of biomedical nanotechnology* **2015**, *11* (1), 40–52.
- (10) Koshy, S. T.; Zhang, D. K. Y.; Grolman, J. M.; Stafford, A. G.; Mooney, D. J. Injectable Nanocomposite Cryogels for Versatile Protein Drug Delivery. *Acta Biomaterialia* **2018**, *65*, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.11.024>.
- (11) Prusty, K.; Biswal, A.; Biswal, S. B.; Swain, S. K. Synthesis of Soy Protein/Polyacrylamide Nanocomposite Hydrogels for Delivery of Ciprofloxacin Drug. *Materials Chemistry and Physics* **2019**, *234*, 378–389. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.05.038>.
- (12) Gupta, H.; Aqil, M.; Khar, R. K.; Ali, A.; Bhatnagar, A.; Mittal, G. Nanoparticles Laden in Situ Gel for Sustained Ocular Drug Delivery. *J Pharm Bioallied Sci* **2013**, *5* (2), 162–165. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.111824>.
- (13) Shah, M. A.; Mir, S. A.; Paray, M. A. Plant Proteases as Milk-Clotting Enzymes in Cheesemaking: A Review. *Dairy Sci. & Technol.* **2014**, *94* (1), 5–16. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0144-3>.
- (14) Bekhit, A. A.; Hopkins, D. L.; Geesink, G.; Bekhit, A. A.; Franks, P. Exogenous Proteases for Meat Tenderization. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2014**, *54* (8), 1012–1031. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.623247>.
- (15) Reh, C.; Palzer, S.; Bel-Rhlid, R.; ANANTA, E. Method of Producing a Coffee Extract. WO2017037216A1, March 9, 2017.
- (16) Singh, S.; Singh, V. K.; Aamir, M.; Dubey, M. K.; Patel, J. S.; Upadhyay, R. S.; Gupta, V. K. Chapter 13 - Cellulase in Pulp and Paper Industry. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Gupta, V. K., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2016; pp 152–162. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00013-7>.
- (17) DiCosimo, R.; McAuliffe, J.; Poulouse, A. J.; Bohlmann, G. Industrial Use of Immobilized Enzymes. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (15), 6437–6474. <https://doi.org/10.1039/C3CS35506C>.
- (18) Dyal, A.; Loos, K.; Noto, M.; Chang, S. W.; Spagnoli, C.; Shafi, K. V. P. M.; Ulman, A.; Cowman, M.; Gross, R. A. Activity of *Candida Rugosa* Lipase Immobilized on  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Magnetic Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (7), 1684–1685. <https://doi.org/10.1021/ja021223n>.
- (19) Cao, L.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. *Org. Lett.* **2000**, *2* (10), 1361–1364. <https://doi.org/10.1021/ol005593x>.
- (20) The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in calcium alginate gels - Kierstan - 1977 - Biotechnology and Bioengineering - Wiley Online Library <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.260190309> (accessed May 13, 2019).
- (21) Pollak, A.; Blumenfeld, H.; Wax, M.; Baughn, R. L.; Whitesides, G. M. Enzyme Immobilization by Condensation Copolymerization into Crosslinked Polyacrylamide Gels. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (20), 6324–6336. <https://doi.org/10.1021/ja00540a026>.
- (22) Lee, J.; Sultan, M.; Kim, S.; Kumar, V.; Yeon, Y.; Lee, O.; Park, C.; Lee, J. M.; Sultan, M. T.; Kim, S. H.; Kumar, V.; Yeon, Y. K.; Lee, O. J.; Park, C. H. Artificial Auricular Cartilage Using Silk Fibroin and Polyvinyl Alcohol Hydrogel. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18* (8), 1707. <https://doi.org/10.3390/ijms18081707>.
- (23) Ismail, Y. A.; Martínez, J. G.; Al Harrasi, A. S.; Kim, S. J.; Otero, T. F. Sensing Characteristics of a Conducting Polymer/Hydrogel Hybrid Microfiber Artificial Muscle. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2011**, *160* (1), 1180–1190. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.09.044>.

- (24) Corneal replacement using a synthetic hydrogel cornea, AlphaCor™: device, preliminary outcomes and complications | Eye <https://www.nature.com/articles/6700333> (accessed May 13, 2019).
- (25) Hicks, C. R.; Crawford, G. J.; Lou, X.; Tan, D. T.; Snibson, G. R.; Sutton, G.; Downie, N.; Werner, L.; Chirila, T. V.; Constable, I. J. Corneal Replacement Using a Synthetic Hydrogel Cornea, AlphaCor™: Device, Preliminary Outcomes and Complications. *Eye* **2003**, *17* (3), 385. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6700333>.
- (26) Vresilovic, E.; Marcolongo, M. S.; Lowman, A. M.; Clemow, A. J. T.; Keane, M. F. Hydrogel Balloon Prosthesis for Nucleus Pulposus. US8287595B2, October 16, 2012.
- (27) Hasnain, M. S.; Ahmad, S. A.; Minhaj, M. A.; Ara, T. J.; Nayak, A. K. Nanocomposite Materials for Prosthetic Devices. In *Applications of Nanocomposite Materials in Orthopedics*; Elsevier, 2019; pp 127–144.
- (28) Kim, D.-H.; Abidian, M.; Martin, D. C. Conducting Polymers Grown in Hydrogel Scaffolds Coated on Neural Prosthetic Devices. *J Biomed Mater Res A* **2004**, *71* (4), 577–585. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30124>.
- (29) Silva, M. A. da; Dreiss, C. A. Soft Nanocomposites: Nanoparticles to Tune Gel Properties. *Polymer International* **2016**, *65* (3), 268–279. <https://doi.org/10.1002/pi.5051>.
- (30) Lupuleasa, D. BIOCOMPATIBLE POLYMERS FOR 3D PRINTING. *FARMACIA* **2018**, *66*, 737–746. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2018.5.1>.
- (31) van Vliet, T.; Lakemond, C. M. M.; Visschers, R. W. Rheology and Structure of Milk Protein Gels. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2004**, *9* (5), 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.002>.
- (32) Boye, J. I.; Alli, I.; Ismail, A. A. Interactions Involved in the Gelation of Bovine Serum Albumin. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44* (4), 996–1004. <https://doi.org/10.1021/jf950529t>.
- (33) Bouhallab, S.; Riaublanc, A.; Croguennec, T. Elaboration de Nano et Microstructures Par Assemblages de Protéines. **2011**.
- (34) Gault, P.; Fauquant, J. Aptitude à la gélification thermique de la  $\beta$ -lactoglobuline : influence du pH, de l'environnement ionique et de la présence des autres protéines du lactosérum. *Lait* **1992**, *72* (6), 491–510. <https://doi.org/10.1051/lait:1992636>.
- (35) Park, J. W. *Surimi and Surimi Seafood, Third Edition*; CRC Press, 2013.
- (36) Labropoulos, A. E.; Varzakas, T. H. Rheological Studies of Physical Soy Protein Gels. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal* **2016**, *4* (Special Issue Nutrition in Conference October 2016), 18–25.
- (37) Garcés-Rimón, M.; Sandoval, M.; Molina, E.; López-Fandiño, R.; Miguel, M. Egg Protein Hydrolysates: New Culinary Textures. *International Journal of Gastronomy and Food Science* **2016**, *3*, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2015.04.001>.
- (38) Hashim, P.; Ridzwan, M. M.; Bakar, J.; Hashim, M. D. Collagen in Food and Beverage Industries. *International Food Research Journal* **2015**, *22* (1), 1.
- (39) Godoi, F. C.; Prakash, S.; Bhandari, B. R. 3d Printing Technologies Applied for Food Design: Status and Prospects. *Journal of Food Engineering* **2016**, *179*, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.025>.
- (40) Milinčić, D. D.; Popović, D. A.; Lević, S. M.; Kostić, A. Ž.; Tešić, Ž. L.; Nedović, V. A.; Pešić, M. B. Application of Polyphenol-Loaded Nanoparticles in Food Industry. *Nanomaterials* **2019**, *9* (11), 1629.
- (41) Peters, R. J.; van Bommel, G.; Herrera-Rivera, Z.; Helsper, H. P.; Marvin, H. J.; Weigel, S.; Tromp, P. C.; Oomen, A. G.; Rietveld, A. G.; Bouwmeester, H. Characterization of Titanium Dioxide Nanoparticles in Food Products: Analytical Methods to Define Nanoparticles. *Journal of agricultural and food chemistry* **2014**, *62* (27), 6285–6293.
- (42) Weir, A.; Westerhoff, P.; Fabricius, L.; Hristovski, K.; Von Goetz, N. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environmental science & technology* **2012**, *46* (4), 2242–2250.

- (43) Sen Gupta, A. Hemoglobin-Based Oxygen Carriers: Current State-of-the-Art and Novel Molecules. *Shock* **2019**, *52* (1S), 70–83. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001009>.
- (44) Mason, T. O.; Shimanovich, U. Fibrous Protein Self-Assembly in Biomimetic Materials. *Adv Mater* **2018**, *30* (41), e1706462. <https://doi.org/10.1002/adma.201706462>.
- (45) Woldeyes, M. A.; Calero-Rubio, C.; Furst, E. M.; Roberts, C. J. Predicting Protein Interactions of Concentrated Globular Protein Solutions Using Colloidal Models. *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121* (18), 4756–4767.
- (46) Wittaya, T. Protein-Based Edible Films: Characteristics and Improvement of Properties. **2012**. <https://doi.org/10.5772/48167>.
- (47) Ji, J.; Li, B.; Zhong, W.-H. An Ultraelastic Poly(Ethylene Oxide)/Soy Protein Film with Fully Amorphous Structure. *Macromolecules* **2012**, *45* (1), 602–606. <https://doi.org/10.1021/ma202347v>.
- (48) Inoue, N.; Bessho, M.; Furuta, M.; Kojima, T.; Okuda, S.; Hara, M. A Novel Collagen Hydrogel Cross-Linked by Gamma-Ray Irradiation in Acidic PH Conditions. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2006**, *17* (8), 837–858.
- (49) Kang, H.-W.; Tabata, Y.; Ikada, Y. Fabrication of Porous Gelatin Scaffolds for Tissue Engineering. *Biomaterials* **1999**, *20* (14), 1339–1344. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00036-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00036-8).
- (50) Ricard-Blum, S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2011**, *3* (1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>.
- (51) Chien, K. B.; Chung, E. J.; Shah, R. N. Investigation of Soy Protein Hydrogels for Biomedical Applications: Materials Characterization, Drug Release, and Biocompatibility. *J Biomater Appl* **2014**, *28* (7), 1085–1096. <https://doi.org/10.1177/0885328213497413>.
- (52) Wang, J.; Hao, S.; Luo, T.; Cheng, Z.; Li, W.; Gao, F.; Guo, T.; Gong, Y.; Wang, B. Feather Keratin Hydrogel for Wound Repair: Preparation, Healing Effect and Biocompatibility Evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, *149*, 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.10.038>.
- (53) Ni, N.; Duquette, D.; Dumont, M.-J. Synthesis and Characterization of Zein-Based Cryogels and Their Potential as Diesel Fuel Absorbent. *European Polymer Journal* **2017**, *C* (91), 420–428. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.04.031>.
- (54) Ni, N.; Dumont, M.-J. Protein-Based Hydrogels Derived from Industrial Byproducts Containing Collagen, Keratin, Zein and Soy. *Waste Biomass Valor* **2017**, *8* (2), 285–300. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9684-0>.
- (55) Navarra, G.; Giacomazza, D.; Leone, M.; Librizzi, F.; Militello, V.; San Biagio, P. L. Thermal Aggregation and Ion-Induced Cold-Gelation of Bovine Serum Albumin. *Eur Biophys J* **2009**, *38* (4), 437–446. <https://doi.org/10.1007/s00249-008-0389-6>.
- (56) Boye, J. I.; Alli, I.; Ismail, A. A. Interactions Involved in the Gelation of Bovine Serum Albumin. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44* (4), 996–1004. <https://doi.org/10.1021/jf950529t>.
- (57) Semasaka, C.; Katopo, L.; Buckow, R.; Kasapis, S. Modeling Water Partition in Composite Gels of BSA with Gelatin Following Thermal Treatment. *Food Hydrocolloids* **2018**, *76*, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.001>.
- (58) Ma, X.; Sun, X.; Hargrove, D.; Chen, J.; Song, D.; Dong, Q.; Lu, X.; Fan, T.-H.; Fu, Y.; Lei, Y. A Biocompatible and Biodegradable Protein Hydrogel with Green and Red Autofluorescence: Preparation, Characterization and In Vivo Biodegradation Tracking and Modeling. *Sci Rep* **2016**, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep19370>.
- (59) Kim, M. H.; Park, W. H. Chemically Cross-Linked Silk Fibroin Hydrogel with Enhanced Elastic Properties, Biodegradability, and Biocompatibility. *Int J Nanomedicine* **2016**, *11*, 2967–2978. <https://doi.org/10.2147/IJN.S106467>.
- (60) Kapoor, S.; Kundu, S. C. Silk Protein-Based Hydrogels: Promising Advanced Materials for Biomedical Applications. *Acta Biomaterialia* **2016**, *31*, 17–32. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.034>.

- (61) Lee, J.; Sultan, M.; Kim, S.; Kumar, V.; Yeon, Y.; Lee, O.; Park, C.; Lee, J. M.; Sultan, M. T.; Kim, S. H.; Kumar, V.; Yeon, Y. K.; Lee, O. J.; Park, C. H. Artificial Auricular Cartilage Using Silk Fibroin and Polyvinyl Alcohol Hydrogel. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18* (8), 1707. <https://doi.org/10.3390/ijms18081707>.
- (62) Eaton, W. A.; Hofrichter, J. Hemoglobin S Gelation and Sickle Cell Disease. *Blood* **1987**, *70* (5), 1245–1266.
- (63) Tobitani, A.; Ross-Murphy, S. B. Heat-Induced Gelation of Globular Proteins. 1. Model for the Effects of Time and Temperature on the Gelation Time of BSA Gels. *Macromolecules* **1997**, *30* (17), 4845–4854. <https://doi.org/10.1021/ma970112j>.
- (64) Daniel, R. M.; Dines, M.; Petach, H. H. The Denaturation and Degradation of Stable Enzymes at High Temperatures. *Biochem J* **1996**, *317* (Pt 1), 1–11.
- (65) Chen, J.; Ma, X.; Dong, Q.; Song, D.; Hargrove, D.; Vora, S. R.; Ma, A. W. K.; Lu, X.; Lei, Y. Self-Healing of Thermally-Induced, Biocompatible and Biodegradable Protein Hydrogel. *RSC Adv.* **2016**, *6* (61), 56183–56192. <https://doi.org/10.1039/C6RA11239K>.
- (66) Lacroix, M.; Jobin, M.; Mezgheni, E.; Srour, M.; Boileau, S. Polymerization of Calcium Caseinates Solutions Induced by Gamma Irradiation. *Radiation Physics and Chemistry* **1998**, *52* (1), 223–227. [https://doi.org/10.1016/S0969-806X\(98\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0969-806X(98)00144-3).
- (67) Lacroix, M.; Le, T. C.; Ouattara, B.; Yu, H.; Letendre, M.; Sabato, S. F.; Mateescu, M. A.; Patterson, G. Use of  $\gamma$ -Irradiation to Produce Films from Whey, Casein and Soya Proteins: Structure and Functionals Characteristics. *Radiation Physics and Chemistry* **2002**, *63* (3), 827–832. [https://doi.org/10.1016/S0969-806X\(01\)00574-6](https://doi.org/10.1016/S0969-806X(01)00574-6).
- (68) Rimdusit, S.; Somsaeng, K.; Kewsuwan, P.; Jubsilp, C.; Tiptipakorn, S. Comparison of Gamma Radiation Crosslinking and Chemical Crosslinking on Properties of Methylcellulose Hydrogel. *EJ* **2012**, *16* (4), 15–28. <https://doi.org/10.4186/ej.2012.16.4.15>.
- (69) Jabbari, E.; Nozari, S. Swelling Behavior of Acrylic Acid Hydrogels Prepared by  $\gamma$ -Radiation Crosslinking of Polyacrylic Acid in Aqueous Solution. *European Polymer Journal* **2000**, *36* (12), 2685–2692. [https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(00\)00044-6](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(00)00044-6).
- (70) Gaber, M. H. Effect of  $\gamma$ -Irradiation on the Molecular Properties of Bovine Serum Albumin. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2005**, *100* (2), 203–206. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.203>.
- (71) Lee, Y.-W.; Song, K.-B. Effect of  $\gamma$ -Irradiation on the Molecular Properties of Myoglobin. *BMB Reports* **2002**, *35* (6), 590–594. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2002.35.6.590>.
- (72) Hameed, A.; Shah, T. M.; Atta, B. M.; Haq, M. A.; Sayed, H. GAMMA IRRADIATION EFFECTS ON SEED GERMINATION AND GROWTH, PROTEIN CONTENT, PEROXIDASE AND PROTEASE ACTIVITY, LIPID PEROXIDATION IN DESI AND KABULI CHICKPEA. 9.
- (73) Cieśla, K.; Salmieri, S.; Lacroix, M. Modification of the Properties of Milk Protein Films by Gamma Radiation and Polysaccharide Addition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2006**, *86* (6), 908–914. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2436>.
- (74) Totosaus, A.; Montejano, J. G.; Salazar, J. A.; Guerrero, I. A Review of Physical and Chemical Protein-Gel Induction. *International Journal of Food Science & Technology* **2002**, *37* (6), 589–601. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00623.x>.
- (75) Ziegler, G. R.; Foegeding, E. A. The Gelation of Proteins. *Advances in food and nutrition research* **1990**, *34* (C), 203–298. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(08\)60008-X](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(08)60008-X).
- (76) Panahi, R.; Baghban-Salehi, M. Protein-Based Hydrogels. In *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels*; Mondal, Md. I. H., Ed.; Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series; Springer International Publishing: Cham, 2019; pp 1561–1600. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-77830-3\\_52](https://doi.org/10.1007/978-3-319-77830-3_52).
- (77) Alting, A. C.; de Jongh, H. H. J.; Visschers, R. W.; Simons, J.-W. F. A. Physical and Chemical Interactions in Cold Gelation of Food Proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (16), 4682–4689. <https://doi.org/10.1021/jf011657m>.

- (78) Zhao, L.; Chen, X. D.; Mercadé-Prieto, R. Understanding the Alkali Cold Gelation of Whey Proteins with NaCl and SDS. *Rheol Acta* **2016**, *55* (11), 909–920. <https://doi.org/10.1007/s00397-016-0966-z>.
- (79) Fretheim, K.; Egelanddal, B.; Harbitz, O.; Samejima, K. Slow Lowering of PH Induces Gel Formation of Myosin. *Food Chemistry* **1985**, *18* (3), 169–178. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(85\)90044-5](https://doi.org/10.1016/0308-8146(85)90044-5).
- (80) Alvarez, P. A.; Ramaswamy, H. S.; Ismail, A. A. High Pressure Gelation of Soy Proteins: Effect of Concentration, PH and Additives. *Journal of Food Engineering* **2008**, *88* (3), 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.02.018>.
- (81) Dumoulin, M.; Ozawa, S.; Hayashi, R. Textural Properties of Pressure-Induced Gels of Food Proteins Obtained under Different Temperatures Including Subzero. *Journal of Food Science* **1998**, *63* (1), 92–95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15683.x>.
- (82) Angsupanich, K.; Edde, M.; Ledward, D. A. Effects of High Pressure on the Myofibrillar Proteins of Cod and Turkey Muscle. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47* (1), 92–99. <https://doi.org/10.1021/jf980587p>.
- (83) Wei, L.-P.; Li, Y.-P.; Wang, C.-Y.; Kang, Z.-L.; Ma, H.-J. Thermal Gel Properties and Protein Conformation of Pork Batters as Affected by High Pressure and Temperature. *International Journal of Food Properties* **2019**, *22* (1), 1492–1500. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1657444>.
- (84) Katzav, H.; Chirug, L.; Okun, Z.; Davidovich-Pinhas, M.; Shpigelman, A. Comparison of Thermal and High-Pressure Gelation of Potato Protein Isolates. *Foods* **2020**, *9* (8), 1041. <https://doi.org/10.3390/foods9081041>.
- (85) Lorand, L.; Graham, R. M. Transglutaminases: Crosslinking Enzymes with Pleiotropic Functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2003**, *4* (2), 140–156. <https://doi.org/10.1038/nrm1014>.
- (86) Sakamoto, H.; Kumazawa, Y.; Motoki, M. Strength of Protein Gels Prepared with Microbial Transglutaminase as Related to Reaction Conditions. *Journal of Food Science* **1994**, *59* (4), 866–871. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb08146.x>.
- (87) Zasytkin, D. V.; Dumay, E.; Cheftel, J. C. Pressure- and Heat-Induced Gelation of Mixed  $\beta$ -Lactoglobulin/Xanthan Solutions. *Food Hydrocolloids* **1996**, *10* (2), 203–211. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(96\)80036-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(96)80036-1).
- (88) Gilleland, G. M.; Lanier, T. C.; Hamann, D. D. Covalent Bonding in Pressure-Induced Fish Protein Gels. *Journal of Food Science* **1997**, *62* (4), 713–733. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15442.x>.
- (89) Kuijpers, A. J.; Engbers, G. H. M.; Feijen, J.; De Smedt, S. C.; Meyvis, T. K. L.; Demeester, J.; Krijgsveld, J.; Zaat, S. A. J.; Dankert, J. Characterization of the Network Structure of Carbodiimide Cross-Linked Gelatin Gels. *Macromolecules* **1999**, *32* (10), 3325–3333. <https://doi.org/10.1021/ma981929v>.
- (90) Guillochon, D.; Esclade, L.; Remy, M. H.; Thomas, D. Studies on Haemoglobin Immobilized by Cross-Linking with Glutaraldehyde Cross-Linked Soluble Polymers and Artificial Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **1981**, *670* (3), 332–340. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(81\)90105-7](https://doi.org/10.1016/0005-2795(81)90105-7).
- (91) Weber, C.; Coester, C.; Kreuter, J.; Langer, K. Desolvation Process and Surface Characterisation of Protein Nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, *194* (1), 91–102. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00370-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00370-1).
- (92) Park, S. K.; Bae, D. H.; Rhee, K. C. Soy Protein Biopolymers Cross-Linked with Glutaraldehyde. *J Amer Oil Chem Soc* **2000**, *77* (8), 879–884. <https://doi.org/10.1007/s11746-000-0140-3>.
- (93) Sutherland, B. W.; Toews, J.; Kast, J. Utility of Formaldehyde Cross-Linking and Mass Spectrometry in the Study of Protein–Protein Interactions. *Journal of Mass Spectrometry* **2008**, *43* (6), 699–715. <https://doi.org/10.1002/jms.1415>.

- (94) Charulatha, V.; Rajaram, A. Crosslinking Density and Resorption of Dimethyl Suberimidate-Treated Collagen. *Journal of Biomedical Materials Research* **1997**, *36* (4), 478–486. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19970915\)36:4<478::AID-JBM5>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19970915)36:4<478::AID-JBM5>3.0.CO;2-B).
- (95) Takigawa, T.; Endo, Y. Effects of Glutaraldehyde Exposure on Human Health. *Journal of Occupational Health* **2006**, *48* (2), 75–87. <https://doi.org/10.1539/joh.48.75>.
- (96) Manickam, B.; Sreedharan, R.; Elumalai, M. 'Genipin'—the Natural Water Soluble Cross-Linking Agent and Its Importance in the Modified Drug Delivery Systems: An Overview. *Current drug delivery* **2014**, *11* (1), 139–145.
- (97) Song, F.; Zhang, L.-M.; Yang, C.; Yan, L. Genipin-Crosslinked Casein Hydrogels for Controlled Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *373* (1), 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.02.005>.
- (98) Ma, X.; Sun, X.; Hargrove, D.; Chen, J.; Song, D.; Dong, Q.; Lu, X.; Fan, T.-H.; Fu, Y.; Lei, Y. A Biocompatible and Biodegradable Protein Hydrogel with Green and Red Autofluorescence: Preparation, Characterization and In Vivo Biodegradation Tracking and Modeling. *Sci Rep* **2016**, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep19370>.
- (99) McClements, D. J.; Xiao, H. Is Nano Safe in Foods? Establishing the Factors Impacting the Gastrointestinal Fate and Toxicity of Organic and Inorganic Food-Grade Nanoparticles. *npj Science of Food* **2017**, *1* (1), 6. <https://doi.org/10.1038/s41538-017-0005-1>.
- (100) Raj, S.; Jose, S.; Sumod, U. S.; Sabitha, M. Nanotechnology in Cosmetics: Opportunities and Challenges. *J Pharm Bioallied Sci* **2012**, *4* (3), 186–193. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.99016>.
- (101) Kaiser, J.-P.; Zuin, S.; Wick, P. Is Nanotechnology Revolutionizing the Paint and Lacquer Industry? A Critical Opinion. *Science of The Total Environment* **2013**, *442*, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.009>.
- (102) Bardhan, R.; Mukherjee, S.; Mirin, N. A.; Levit, S. D.; Nordlander, P.; Halas, N. J. Nanosphere-in-a-Nanoshell: A Simple Nanomatrix. *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114* (16), 7378–7383.
- (103) Collins, P. G.; Zettl, A.; Bando, H.; Thess, A.; Smalley, R. E. Nanotube Nanodevice. *Science* **1997**, *278* (5335), 100–102. <https://doi.org/10.1126/science.278.5335.100>.
- (104) Horiuchi, S.; Gotou, T.; Fujiwara, M.; Sotoaka, R.; Hirata, M.; Kimoto, K.; Asaka, T.; Yokosawa, T.; Matsui, Y.; Watanabe, K.; Sekita, M. Carbon Nanofilm with a New Structure and Property. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2003**, *42* (9A), L1073. <https://doi.org/10.1143/JJAP.42.L1073>.
- (105) Mody, V. V.; Siwale, R.; Singh, A.; Mody, H. R. Introduction to Metallic Nanoparticles. *J Pharm Bioallied Sci* **2010**, *2* (4), 282–289. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.72127>.
- (106) Oganov, A. R.; Hemley, R. J.; Hazen, R. M.; Jones, A. P. Structure, Bonding, and Mineralogy of Carbon at Extreme Conditions. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **2013**, *75* (1), 47–77. <https://doi.org/10.2138/rmg.2013.75.3>.
- (107) Tang, H.; Ismail-Beigi, S. Novel Precursors for Boron Nanotubes: The Competition of Two-Center and Three-Center Bonding in Boron Sheets. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *99* (11), 115501. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.99.115501>.
- (108) Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products - Environmental Science & Technology (ACS Publications) <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es204168d> (accessed May 15, 2019).
- (109) Rataboul, F.; Nayral, C.; Casanove, M.-J.; Maisonnat, A.; Chaudret, B. Synthesis and Characterization of Monodisperse Zinc and Zinc Oxide Nanoparticles from the Organometallic Precursor [Zn(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>]. *Journal of Organometallic Chemistry* **2002**, *643–644*, 307–312. [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(01\)01378-X](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(01)01378-X).
- (110) Zhou, L.; Tan, Y.; Wang, J.; Xu, W.; Yuan, Y.; Cai, W.; Zhu, S.; Zhu, J. 3D Self-Assembly of Aluminium Nanoparticles for Plasmon-Enhanced Solar Desalination. *Nature Photonics* **2016**, *10* (6), 393–398. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2016.75>.



- (111) Qi, L.; Xu, Z.; Jiang, X.; Hu, C.; Zou, X. Preparation and Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles. *Carbohydrate Research* **2004**, *339* (16), 2693–2700. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.09.007>.
- (112) Zambaux, M. F.; Bonneaux, F.; Gref, R.; Maincent, P.; Dellacherie, E.; Alonso, M. J.; Labrude, P.; Vigneron, C. Influence of Experimental Parameters on the Characteristics of Poly(Lactic Acid) Nanoparticles Prepared by a Double Emulsion Method. *Journal of Controlled Release* **1998**, *50* (1), 31–40. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00106-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00106-5).
- (113) Lin, Y.-H.; Tsai, S.-C.; Lai, C.-H.; Lee, C.-H.; He, Z. S.; Tseng, G.-C. Genipin-Cross-Linked Fucose–Chitosan/Heparin Nanoparticles for the Eradication of Helicobacter Pylori. *Biomaterials* **2013**, *34* (18), 4466–4479. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.02.028>.
- (114) Zhang, Y.; Asahina, S.; Yoshihara, S.; Shirakashi, T. Oxygen Reduction on Au Nanoparticle Deposited Boron-Doped Diamond Films. *Electrochimica Acta* **2003**, *48* (6), 741–747. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(02\)00743-0](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(02)00743-0).
- (115) Dutta, T.; Kim, K.-H.; Deep, A.; Szulejko, J. E.; Vellingiri, K.; Kumar, S.; Kwon, E. E.; Yun, S.-T. Recovery of Nanomaterials from Battery and Electronic Wastes: A New Paradigm of Environmental Waste Management. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2018**, *82*, 3694–3704. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.10.094>.
- (116) Heiligtag, F. J.; Niederberger, M. The Fascinating World of Nanoparticle Research. *Materials Today* **2013**, *16* (7), 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.07.004>.
- (117) Inshakova, E.; Inshakov, O. World Market for Nanomaterials: Structure and Trends. *MATEC Web Conf.* **2017**, *129*, 02013. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201712902013>.
- (118) Vance, M. E.; Kuiken, T.; Vejerano, E. P.; McGinnis, S. P.; Jr, M. F. H.; Rejeski, D.; Hull, M. S. Nanotechnology in the Real World: Redeveloping the Nanomaterial Consumer Products Inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2015**, *6* (1), 1769–1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>.
- (119) Évaluation des risques liés aux nanomatériaux | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail <https://www.anses.fr/fr/content/%C3%A9valuation-des-risques-li%C3%A9s-aux-nanomats%C3%A9riaux> (accessed May 15, 2019).
- (120) Dekkers, S.; Krystek, P.; Peters, R. J. B.; Lankveld, D. P. K.; Bokkers, B. G. H.; Hoeven-Arentzen, P. H. van; Bouwmeester, H.; Oomen, A. G. Presence and Risks of Nanosilica in Food Products. *Nanotoxicology* **2011**, *5* (3), 393–405. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.519836>.
- (121) Vojtech, L.; Neruda, M. Design of Radiofrequency Protective Clothing Containing Silver Nanoparticles. *Fibres & Textiles in Eastern Europe* **2013**, No. Nr 5 (101), 141–147.
- (122) Bansod, S. D.; Bawaskar, M. S.; Gade, A. K.; Rai, M. K. Development of Shampoo, Soap and Ointment Formulated by Green Synthesised Silver Nanoparticles Functionalised with Antimicrobial Plants Oils in Veterinary Dermatology: Treatment and Prevention Strategies. *IET Nanobiotechnology* **2015**, *9* (4), 165–171. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2014.0042>.
- (123) Salvétat, J.-P.; Bonard, J.-M.; Thomson, N. H.; Kulik, A. J.; Forro, L.; Benoit, W.; Zuppiroli, L. Mechanical Properties of Carbon Nanotubes. *Applied Physics A* **1999**, *69* (3), 255–260.
- (124) Dudkin, B. N.; Zainullin, G. G.; Krivoschapkin, P. V.; Krivoschapkina, E. F.; Ryazanov, M. A. Influence of Nanoparticles and Nanofibers of Aluminum Oxide on the Properties of Epoxy Composites. *Glass Physics and Chemistry* **2008**, *34* (2), 187–191.
- (125) Zhang, H.; Li, H.; Hu, F.; Wang, W.; Zhao, X.; Gao, Y.; Zhang, L. Cavitation, Crazing and Bond Scission in Chemically Cross-Linked Polymer Nanocomposites. *Soft Matter* **2019**, *15* (45), 9195–9204. <https://doi.org/10.1039/C9SM01664C>.
- (126) Cirillo, G.; Hampel, S.; Spizzirri, U. G.; Parisi, O. I.; Picci, N.; Iemma, F. Carbon Nanotubes Hybrid Hydrogels in Drug Delivery: A Perspective Review <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/825017/> (accessed Nov 18, 2020). <https://doi.org/10.1155/2014/825017>.
- (127) Gaharwar, A. K.; Peppas, N. A.; Khademhosseini, A. Nanocomposite Hydrogels for Biomedical Applications. *Biotechnol Bioeng* **2014**, *111* (3), 441–453. <https://doi.org/10.1002/bit.25160>.

- (128) Saidi, N. M.; Omar, F. S.; Numan, A.; Apperley, D. C.; Algaradah, M. M.; Kasi, R.; Avestro, A.-J.; Subramaniam, R. T. Enhancing the Efficiency of a Dye-Sensitized Solar Cell Based on a Metal Oxide Nanocomposite Gel Polymer Electrolyte. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (33), 30185–30196. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b07062>.
- (129) Du, J.; Xu, S.; Feng, S.; Yu, L.; Wang, J.; Liu, Y. Tough Dual Nanocomposite Hydrogels with Inorganic Hybrid Crosslinking. *Soft Matter* **2016**, *12* (6), 1649–1654. <https://doi.org/10.1039/C5SM02790J>.
- (130) Haraguchi, K. Nanocomposite Hydrogels. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **2007**, *11* (3), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2008.05.001>.
- (131) Sharma, G.; Thakur, B.; Naushad, Mu.; Kumar, A.; Stadler, F. J.; Alfadul, S. M.; Mola, G. T. Applications of Nanocomposite Hydrogels for Biomedical Engineering and Environmental Protection. *Environ Chem Lett* **2018**, *16* (1), 113–146. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0671-x>.
- (132) Lebeau, B.; Sanchez, C. Sol-Gel Derived Hybrid Inorganic-Organic Nanocomposites for Optics. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **1999**, *4* (1), 11–23. [https://doi.org/10.1016/S1359-0286\(99\)80005-9](https://doi.org/10.1016/S1359-0286(99)80005-9).
- (133) Xia, M.; Wu, W.; Liu, F.; Theato, P.; Zhu, M. Swelling Behavior of Thermosensitive Nanocomposite Hydrogels Composed of Oligo(Ethylene Glycol) Methacrylates and Clay. *European Polymer Journal* **2015**, *69*, 472–482. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.03.072>.
- (134) Liu, C.; Chiang, B.; Lewin Mejia, D.; Luker, K. E.; Luker, G. D.; Lee, A. Mammary Fibroblasts Remodel Fibrillar Collagen Microstructure in a Biomimetic Nanocomposite Hydrogel. *Acta Biomaterialia* **2019**, *83*, 221–232. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.010>.
- (135) Marandi, G. B.; Mahdavinia, G. R.; Ghafary, S. Swelling Behavior of Novel Protein-Based Superabsorbent Nanocomposite. *Journal of Applied Polymer Science* **2011**, *120* (2), 1170–1179. <https://doi.org/10.1002/app.33016>.
- (136) Nelson, J. M.; Griffin, E. G. ADSORPTION OF INVERTASE. *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, *38* (5), 1109–1115. <https://doi.org/10.1021/ja02262a018>.
- (137) Bixler, R. L.; Niemann, C. Surface Effects in  $\alpha$ -Chymotrypsin-Catalyzed Hydrolyses1. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81* (6), 1412–1417. <https://doi.org/10.1021/ja01515a032>.
- (138) Norde, W. My Voyage of Discovery to Proteins in Flatland ...and Beyond. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2008**, *61* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.09.029>.
- (139) Koral, J.; Ullman, R.; Eirich, F. R. The Adsorption of Polyvinyl Acetate. *J. Phys. Chem.* **1958**, *62* (5), 541–550. <https://doi.org/10.1021/j150563a007>.
- (140) De Gennes, P. G. Scaling Theory of Polymer Adsorption. *J. Phys. France* **1976**, *37* (12), 1445–1452. <https://doi.org/10.1051/jphys:0197600370120144500>.
- (141) Langmuir, I. THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. PART I. SOLIDS. *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, *38* (11), 2221–2295. <https://doi.org/10.1021/ja02268a002>.
- (142) Hesselink, F. Th.; Vrij, A.; Overbeek, J. Th. G. Theory of the Stabilization of Dispersions by Adsorbed Macromolecules. II. Interaction between Two Flat Particles. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75* (14), 2094–2103. <https://doi.org/10.1021/j100683a005>.
- (143) Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Berggård, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S. Understanding the Nanoparticle–Protein Corona Using Methods to Quantify Exchange Rates and Affinities of Proteins for Nanoparticles. *PNAS* **2007**, *104* (7), 2050–2055. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608582104>.
- (144) Lynch, I.; Dawson, K. A. Protein-Nanoparticle Interactions. *Nano Today* **2008**, *3* (1), 40–47. [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(08\)70014-8](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(08)70014-8).
- (145) Liu, J.; Peng, Q. Protein-Gold Nanoparticle Interactions and Their Possible Impact on Biomedical Applications. *Acta Biomaterialia* **2017**, *55*, 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.03.055>.

- (146) Milani, S.; Baldelli Bombelli, F.; Pitek, A. S.; Dawson, K. A.; Rädler, J. Reversible versus Irreversible Binding of Transferrin to Polystyrene Nanoparticles: Soft and Hard Corona. *ACS Nano* **2012**, *6* (3), 2532–2541. <https://doi.org/10.1021/nn204951s>.
- (147) Devineau, S. Adsorption des protéines sur les nanomatériaux. Biochimie et physico-chimie d'un nouveau stress. phdthesis, Université Paris Sud - Paris XI, 2013.
- (148) Marichal, L.; Giraudon-Colas, G.; Cousin, F.; Thill, A.; Labarre, J.; Boulard, Y.; Aude, J.-C.; Pin, S.; Renault, J. P. Protein-Nanoparticle Interactions: What Are the Protein-Corona Thickness and Organization? *Langmuir* **2019**, *35* (33), 10831–10837. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01373>.
- (149) Lundqvist, M.; Sethson, I.; Jonsson, B.-H. Protein Adsorption onto Silica Nanoparticles: Conformational Changes Depend on the Particles' Curvature and the Protein Stability. *Langmuir* **2004**, *20* (24), 10639–10647.
- (150) Cukalevski, R.; Lundqvist, M.; Oslakovic, C.; Dahlbäck, B.; Linse, S.; Cedervall, T. Structural Changes in Apolipoproteins Bound to Nanoparticles. *Langmuir* **2011**, *27* (23), 14360–14369.
- (151) Lundqvist, M.; Nygren, P.; Jonsson, B.-H.; Broo, K. Induction of Structure and Function in a Designed Peptide upon Adsorption on a Silica Nanoparticle. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45* (48), 8169–8173. <https://doi.org/10.1002/anie.200600965>.
- (152) Marichal, L. Interactions protéines-nanoparticules : émergence de nouveaux facteurs déterminant la formation de la couronne de protéines. phdthesis, Université Paris-Saclay, 2018.
- (153) Marichal, L.; Degrouard, J.; Gatin, A.; Raffray, N.; Aude, J.-C.; Boulard, Y.; Combet, S.; Cousin, F.; Hourdez, S.; Mary, J.; Renault, J.-P.; Pin, S. From Protein Corona to Colloidal Self-Assembly: The Importance of Protein Size in Protein–Nanoparticle Interactions. *Langmuir* **2020**, *36* (28), 8218–8230. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c01334>.
- (154) Pandey, P.; Singh, S. P.; Arya, S. K.; Gupta, V.; Datta, M.; Singh, S.; Malhotra, B. D. Application of Thiolated Gold Nanoparticles for the Enhancement of Glucose Oxidase Activity. *Langmuir* **2007**, *23* (6), 3333–3337. <https://doi.org/10.1021/la062901c>.
- (155) Fischer, N. O.; McIntosh, C. M.; Simard, J. M.; Rotello, V. M. Inhibition of Chymotrypsin through Surface Binding Using Nanoparticle-Based Receptors. *PNAS* **2002**, *99* (8), 5018–5023. <https://doi.org/10.1073/pnas.082644099>.
- (156) Wu, X.; Narsimhan, G. Effect of Surface Concentration on Secondary and Tertiary Conformational Changes of Lysozyme Adsorbed on Silica Nanoparticles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2008**, *1784* (11), 1694–1701. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.06.008>.
- (157) Vertegel, A. A.; Siegel, R. W.; Dordick, J. S. Silica Nanoparticle Size Influences the Structure and Enzymatic Activity of Adsorbed Lysozyme. *Langmuir* **2004**, *20* (16), 6800–6807. <https://doi.org/10.1021/la0497200>.
- (158) Freundlich, H. Über Die Adsorption in Lasugen (Leipzig). *Z. Phys. Chem. A* **1906**, *57*, 385–470.
- (159) Jovanović, D. S. Physical Adsorption of Gases. *Kolloid-Z.u.Z.Polymere* **1969**, *235* (1), 1203–1213. <https://doi.org/10.1007/BF01542530>.
- (160) Tempkin, M.; Pyzhev, V. Kinetics of Ammonia Synthesis on Promoted Iron Catalyst. *Acta Phys. Chim. USSR* **1940**, *12* (1), 327.
- (161) Devineau, S.; Zargarian, L.; Renault, J. P.; Pin, S. Structure and Function of Adsorbed Hemoglobin on Silica Nanoparticles: Relationship between the Adsorption Process and the Oxygen Binding Properties. *Langmuir* **2017**, *33* (13), 3241–3252. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04281>.
- (162) Devineau, S.; Zanotti, J.-M.; Loupiac, C.; Zargarian, L.; Neiers, F.; Pin, S.; Renault, J. P. Myoglobin on Silica: A Case Study of the Impact of Adsorption on Protein Structure and Dynamics. *Langmuir* **2013**, *29* (44), 13465–13472. <https://doi.org/10.1021/la4035479>.
- (163) Wertz, C. F.; Santore, M. M. Adsorption and Relaxation Kinetics of Albumin and Fibrinogen on Hydrophobic Surfaces: Single-Species and Competitive Behavior. *Langmuir* **1999**, *15* (26), 8884–8894. <https://doi.org/10.1021/la990089q>.

- (164) Lan, Q.; Bassi, A. S.; Zhu, J.-X. (Jesse); Margaritis, A. A Modified Langmuir Model for the Prediction of the Effects of Ionic Strength on the Equilibrium Characteristics of Protein Adsorption onto Ion Exchange/Affinity Adsorbents. *Chemical Engineering Journal* **2001**, *81* (1), 179–186. [https://doi.org/10.1016/S1385-8947\(00\)00197-2](https://doi.org/10.1016/S1385-8947(00)00197-2).
- (165) Langmuir, I. VAPOR PRESSURES, EVAPORATION, CONDENSATION AND ADSORPTION. *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54* (7), 2798–2832. <https://doi.org/10.1021/ja01346a022>.
- (166) Rabe, M.; Verdes, D.; Seeger, S. Understanding Protein Adsorption Phenomena at Solid Surfaces. *Adv Colloid Interface Sci* **2011**, *162* (1–2), 87–106. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.12.007>.
- (167) Latour, R. A. The Langmuir Isotherm: A Commonly Applied but Misleading Approach for the Analysis of Protein Adsorption Behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2015**, *103* (3), 949–958. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35235>.
- (168) Patton, J. N.; Palmer, A. F. Photopolymerization of Bovine Hemoglobin Entrapped Nanoscale Hydrogel Particles within Liposomal Reactors for Use as an Artificial Blood Substitute. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (1), 414–424. <https://doi.org/10.1021/bm049432i>.
- (169) Farris, A. L.; Rindone, A. N.; Grayson, W. L. Oxygen Delivering Biomaterials for Tissue Engineering. *J Mater Chem B Mater Biol Med* **2016**, *4* (20), 3422–3432. <https://doi.org/10.1039/C5TB02635K>.
- (170) Lu, T.-H.; Panneerselvam, K.; Liaw, Y.-C.; Kan, P.; Lee, C.-J. Structure Determination of Porcine Haemoglobin. *Acta Cryst D* **2000**, *56* (3), 304–312. <https://doi.org/10.1107/S0907444900000093>.
- (171) Ofori, J. A.; Hsieh, Y.-H. P. Characterization of a 12 KDa Thermal-Stable Antigenic Protein in Bovine Blood. *J Food Sci* **2011**, *76* (9), C1250-1256. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02393.x>.
- (172) Sanchez-Guzman, D.; Giraudon-Colas, G.; Marichal, L.; Boulard, Y.; Wien, F.; Degrouard, J.; Baeza-Squiban, A.; Pin, S.; Renault, J. P.; Devineau, S. *In Situ* Analysis of Weakly Bound Proteins Reveals Molecular Basis of Soft Corona Formation. *ACS Nano* **2020**, *14* (7), 9073–9088. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c04165>.
- (173) Antonini, E.; Brunori, M. *Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands*; North-Holland Pub. Co., 1971.
- (174) Lima, F. A.; Penfold, T. J.; van der Veen, R. M.; Reinhard, M.; Abela, R.; Tavernelli, I.; Rothlisberger, U.; Benfatto, M.; Milne, C. J.; Chergui, M. Probing the Electronic and Geometric Structure of Ferric and Ferrous Myoglobins in Physiological Solutions by Fe K-Edge Absorption Spectroscopy. *Phys Chem Chem Phys* **2014**, *16* (4), 1617–1631. <https://doi.org/10.1039/c3cp53683a>.
- (175) Pauling, L. Nature of the Iron–Oxygen Bond in Oxyhæmoglobin. *Nature* **1964**, *203* (4941), 182–183. <https://doi.org/10.1038/203182b0>.
- (176) Weiss, J. J. Nature of the Iron–Oxygen Bond in Oxyhæmoglobin. *Nature* **1964**, *203* (4941), 183–183. <https://doi.org/10.1038/203183a0>.
- (177) Wilson, S. A.; Green, E.; Mathews, I. I.; Benfatto, M.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Sarangi, R. X-Ray Absorption Spectroscopic Investigation of the Electronic Structure Differences in Solution and Crystalline Oxyhemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110* (41), 16333–16338. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315734110>.
- (178) Peisach, J.; Blumberg, W. E.; Wittenberg, B. A.; Wittenberg, J. B.; Kampa, L. Hemoglobin A: An Electron Paramagnetic Resonance Study of the Effects of Interchain Contacts on the Heme Symmetry of High-Spin and Low-Spin Derivatives of Ferric Alpha Chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1969**, *63* (3), 934–939. <https://doi.org/10.1073/pnas.63.3.934>.
- (179) Giangreco, G. J.; Campbell, D.; Cowan, M. J. A 32-Year-Old Female with AIDS, Pneumocystis Jiroveci Pneumonia, and Methemoglobinemia. *Case Rep Crit Care* **2013**, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/980589>.
- (180) Hill, A. V. XLVII. THE COMBINATIONS OF HAEMOGLOBIN WITH OXYGEN AND WITH CARBON MON- OXIDE. I. 10.

- (181) Adair, G. S.; With the collaboration of A. V. Bock and H. Field, J. The Hemoglobin System Vi. the Oxygen Dissociation Curve of Hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **1925**, *63* (2), 529–545.
- (182) Pauling, L. The Oxygen Equilibrium of Hemoglobin and Its Structural Interpretation. *PNAS* **1935**, *21* (4), 186–191. <https://doi.org/10.1073/pnas.21.4.186>.
- (183) Perutz, M. F. Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin: Haem–Haem Interaction and the Problem of Allostery. *Nature* **1970**, *228* (5273), 726–734. <https://doi.org/10.1038/228726a0>.
- (184) Everse, J. Heme Proteins. In *Encyclopedia of Biological Chemistry*; Lennarz, W. J., Lane, M. D., Eds.; Elsevier: New York, 2004; pp 354–361. <https://doi.org/10.1016/B0-12-443710-9/00304-5>.
- (185) Zhuravlev, L. T.; Potapov, V. V. Density of Silanol Groups on the Surface of Silica Precipitated from a Hydrothermal Solution. *Russ. J. Phys. Chem.* **2006**, *80* (7), 1119–1128. <https://doi.org/10.1134/S0036024406070211>.
- (186) Hassanali, A. A.; Singer, S. J. Model for the Water–Amorphous Silica Interface: The Undissociated Surface. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (38), 11181–11193. <https://doi.org/10.1021/jp062971s>.
- (187) TurboBeads <http://www.turbobeads.com/> (accessed May 16, 2019).
- (188) Vertegel, A. A.; Siegel, R. W.; Dordick, J. S. Silica Nanoparticle Size Influences the Structure and Enzymatic Activity of Adsorbed Lysozyme. *Langmuir* **2004**, *20* (16), 6800–6807. <https://doi.org/10.1021/la0497200>.
- (189) Suh, C. W.; Kim, M. Y.; Choo, J. B.; Kim, J. K.; Kim, H. K.; Lee, E. K. Analysis of Protein Adsorption Characteristics to Nano-Pore Silica Particles by Using Confocal Laser Scanning Microscopy. *Journal of Biotechnology* **2004**, *112* (3), 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.05.005>.
- (190) Devineau, S. Adsorption des protéines sur les nanomatériaux. Biochimie et physico-chimie d'un nouveau stress. phdthesis, Université Paris Sud - Paris XI, 2013.
- (191) Marichal, L. Interactions protéines-nanoparticules : émergence de nouveaux facteurs déterminant la formation de la couronne de protéines. phdthesis, Université Paris-Saclay, 2018.
- (192) Devineau, S.; Zargarian, L.; Renault, J. P.; Pin, S. Structure and Function of Adsorbed Hemoglobin on Silica Nanoparticles: Relationship between the Adsorption Process and the Oxygen Binding Properties. *Langmuir* **2017**, *33* (13), 3241–3252. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04281>.
- (193) Devineau, S.; Kiger, L.; Galacteros, F.; Baudin-Creuz, V.; Marden, M.; Renault, J. P.; Pin, S. Manipulating Hemoglobin Oxygenation Using Silica Nanoparticles: A Novel Prospect for Artificial Oxygen Carriers. *Blood Advances* **2018**, *2* (2), 90–94. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017012153>.
- (194) Hopwood, D. The Behaviour of Various Glutaraldehydes on Sephadex G-10 and Some Implications for Fixation. *Histochemie* **1967**, *11* (4), 289–295.
- (195) Fein, M. L.; Harris Jr, E. H.; Naghski, J.; Filachione, E. M. Tanning with Glutaraldehyde. I. Rate Studies. *The Journal of the American Leather Chemists Association* **1959**, 1–28.
- (196) Richards, F. M.; Knowles, J. R. Glutaraldehyde as a Protein Cross-Linking Reagent. *Journal of Molecular Biology* **1968**, *37* (1), 231–233. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90086-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90086-7).
- (197) Gorman, S. P.; Scott, E. M.; Russell, A. D. Antimicrobial Activity, Uses and Mechanism of Action of Glutaraldehyde. *Journal of Applied Bacteriology* **1980**, *48* (2), 161–190.
- (198) Nimni, M. E.; Cheung, D.; Strates, B.; Kodama, M.; Sheikh, K. Chemically Modified Collagen: A Natural Biomaterial for Tissue Replacement. *Journal of biomedical materials research* **1987**, *21* (6), 741–771.
- (199) Gosselin, R. E.; Gleason, M. N. *Clinical Toxicology of Commercial Products*; Williams & Wilkins, 1976.

- (200) Sabatini, D. D.; Bensch, K.; Barnett, R. J. CYTOCHEMISTRY AND ELECTRON MICROSCOPY : The Preservation of Cellular Ultrastructure and Enzymatic Activity by Aldehyde Fixation. *Journal of Cell Biology* **1963**, *17* (1), 19–58. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.19>.
- (201) Hayat, M. E. *Fixation for Electron Microscopy*; Elsevier, 2012.
- (202) Hopwood, D. Some Aspects of Fixation with Glutaraldehyde. A Biochemical and Histochemical Comparison of the Effects of Formaldehyde and Glutaraldehyde Fixation on Various Enzymes and Glycogen, with a Note on Penetration of Glutaraldehyde into Liver. *J Anat* **1967**, *101* (Pt 1), 83–92.
- (203) Wine, Y.; Cohen-Hadar, N.; Freeman, A.; Frolow, F. Elucidation of the Mechanism and End Products of Glutaraldehyde Crosslinking Reaction by X-Ray Structure Analysis. *Biotechnology and Bioengineering* **2007**, *98* (3), 711–718. <https://doi.org/10.1002/bit.21459>.
- (204) Fadouloglou, V. E.; Kokkinidis, M.; Glykos, N. M. Determination of Protein Oligomerization State: Two Approaches Based on Glutaraldehyde Crosslinking. *Analytical Biochemistry* **2008**, *373* (2), 404–406. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.10.027>.
- (205) Bowes, J. H.; Cater, C. W. The Reaction of Glutaraldehyde with Proteins and Other Biological Materials\*. *Journal of the Royal Microscopical Society* **1966**, *85* (2), 193–200. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1966.tb02180.x>.
- (206) Bowes, J. H.; Cater, C. W. The Interaction of Aldehydes with Collagen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure* **1968**, *168* (2), 341–352.
- (207) Richards, F. M.; Knowles, J. R. Glutaraldehyde as a Protein Cross-Linking Reagent. *Journal of Molecular Biology* **1968**, *37* (1), 231–233. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90086-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90086-7).
- (208) Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C. Glutaraldehyde: Behavior in Aqueous Solution, Reaction with Proteins, and Application to Enzyme Crosslinking. *Biotechniques* **2004**, *37* (5), 790–806.
- (209) Kaieda, S.; S. Plivelic, T.; Halle, B. Structure and Kinetics of Chemically Cross-Linked Protein Gels from Small-Angle X-Ray Scattering. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2014**, *16* (9), 4002–4011. <https://doi.org/10.1039/C3CP54219J>.
- (210) Hopwood, D.; Allen, C. R.; McCabe, M. The Reactions between Glutaraldehyde and Various Proteins. An Investigation of Their Kinetics. *Histochem J* **1970**, *2* (2), 137–150. <https://doi.org/10.1007/BF01003541>.
- (211) Habeeb, A. F. S. A.; Hiramoto, R. Reaction of Proteins with Glutaraldehyde. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1968**, *126* (1), 16–26. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90554-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90554-7).
- (212) Monsan, P.; Puzo, G.; Mazarguil, H. Étude du mécanisme d'établissement des liaisons glutaraldéhydeprotéines. *Biochimie* **1976**, *57* (11), 1281–1292. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(76\)80540-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(76)80540-8).
- (213) Okuda, K.; Urabe, I.; Yamada, Y.; Okada, H. Reaction of Glutaraldehyde with Amino and Thiol Compounds. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **1991**, *71* (2), 100–105. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(91\)90231-5](https://doi.org/10.1016/0922-338X(91)90231-5).
- (214) Salem, M.; Mauguen, Y.; Prangé, T. Revisiting Glutaraldehyde Cross-Linking: The Case of the Arg–Lys Intermolecular Doublet. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **2010**, *66* (Pt 3), 225–228. <https://doi.org/10.1107/S1744309109054037>.
- (215) Lee, C.; Lim, K.; Kim, S. S.; Thien, L. X.; Lee, E. S.; Oh, K. T.; Choi, H.-G.; Youn, Y. S. Near Infrared Light-Responsive Heat-Emitting Hemoglobin Hydrogels for Photothermal Cancer Therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**, *176*, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.070>.
- (216) Guillochon, D.; Esclade, L.; Remy, M. H.; Thomas, D. Studies on Haemoglobin Immobilized by Cross-Linking with Glutaraldehyde Cross-Linked Soluble Polymers and Artificial Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **1981**, *670* (3), 332–340. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(81\)90105-7](https://doi.org/10.1016/0005-2795(81)90105-7).

- (217) Palmer, A. F.; Sun, G.; Harris, D. R. The Quaternary Structure of Tetrameric Hemoglobin Regulates the Oxygen Affinity of Polymerized Hemoglobin. *Biotechnol Progress* **2009**, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/btpr.265>.
- (218) Buehler, P. W.; Zhou, Y.; Cabrales, P.; Jia, Y.; Sun, G.; Harris, D. R.; Tsai, A. G.; Intaglietta, M.; Palmer, A. F. Synthesis, Biophysical Properties and Pharmacokinetics of Ultrahigh Molecular Weight Tense and Relaxed State Polymerized Bovine Hemoglobins. *Biomaterials* **2010**, *31* (13), 3723–3735. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.072>.
- (219) Cabrales, P.; Sun, G.; Zhou, Y.; Harris, D. R.; Tsai, A. G.; Intaglietta, M.; Palmer, A. F. Effects of the Molecular Mass of Tense-State Polymerized Bovine Hemoglobin on Blood Pressure and Vasoconstriction. *Journal of Applied Physiology* **2009**, *107* (5), 1548–1558. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00622.2009>.
- (220) Gu, X.; Bolden-Rush, C.; Cuddington, C. T.; Belcher, D. A.; Savla, C.; Pires, I. S.; Palmer, A. F. Comprehensive Characterization of Tense and Relaxed Quaternary State Glutaraldehyde Polymerized Bovine Hemoglobin as a Function of Cross-Link Density. *Biotechnology and Bioengineering* **2020**, *117* (8), 2362–2376. <https://doi.org/10.1002/bit.27382>.
- (221) Eike, J. H.; Palmer, A. F. Effect of Cl<sup>-</sup> and H<sup>+</sup> on the Oxygen Binding Properties of Glutaraldehyde-Polymerized Bovine Hemoglobin-Based Blood Substitutes. *Biotechnology Progress* **2004**, *20* (5), 1543–1549. <https://doi.org/10.1021/bp049872l>.
- (222) Cabrales, P.; Tsai, A. G.; Intaglietta, M. Balance between Vasoconstriction and Enhanced Oxygen Delivery. *Transfusion* **2008**, *48* (10), 2087–2095. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01834.x>.
- (223) Rice, J.; Philbin, N.; Light, R.; Arnaud, F.; Steinbach, T.; McGwin, G.; Collier, S.; Malkevich, N.; Moon-Massatt, P.; Rentko, V.; Pearce, L. B.; Ahlers, S.; McCarron, R.; Handrigan, M.; Freilich, D. The Effects of Decreasing Low-Molecular Weight Hemoglobin Components of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers in Swine with Hemorrhagic Shock. *J Trauma* **2008**, *64* (5), 1240–1257. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e318058245e>.
- (224) Day, T. K. Current Development and Use of Hemoglobin-Based Oxygen-Carrying (HBOC) Solutions. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* **2003**, *13* (2), 77–93. <https://doi.org/10.1046/j.1435-6935.2003.00084.x>.
- (225) Mihalescu, M.-R.; Russu, I. M. A Signature of the T → R Transition in Human Hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98* (7), 3773–3777. <https://doi.org/10.1073/pnas.071493598>.
- (226) Persson, E.; Halle, B. Nanosecond to Microsecond Protein Dynamics Probed by Magnetic Relaxation Dispersion of Buried Water Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (5), 1774–1787. <https://doi.org/10.1021/ja0775873>.
- (227) Caillard, R.; Remondetto, G. E.; Mateescu, M. A.; Subirade, M. Characterization of Amino Cross-Linked Soy Protein Hydrogels. *Journal of Food Science* **2008**, *73* (5), C283–C291. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00780.x>.
- (228) Mohamed, B. Stability and Flocculation of Nanosilica by Conventional Organic Polymer. *Natural Science* **2012**, *2012*. <https://doi.org/10.4236/ns.2012.46052>.

# Chapitre 2 :

## Etudes de l'adsorption de l'hémoglobine sur les nanoparticules

Dans ce chapitre, il sera abordé les interactions nanoparticules de silice-hémoglobine de porc. Dans un premier temps, on essaiera de comprendre les règles permettant de prédire les quantités d'hémoglobine adsorbée en fonction de la concentration de protéines. Par la suite, il sera traité l'activité de l'hémoglobine adsorbée en regardant ses capacités d'oxygénation. On essaiera de les corrélés aux modifications de l'hème qui pourraient survenir avec l'adsorption, puis avec les changements potentiels de la globine. On finira par la caractérisation de l'assemblage nanoparticule-hémoglobine.

### I- Etude de l'assemblage nanoparticules-hémoglobine par isothermes d'adsorption

Avant toute étude plus poussée sur l'adsorption de l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice, il est nécessaire de pouvoir prévoir les quantités de protéines adsorbées. Pour cela, nous avons tracé des isothermes d'adsorption pour différentes conditions physico-chimiques (concentration, pH, deutération). La façon de préparer les échantillons est détaillée dans la partie Matériels et méthodes. Une isotherme d'adsorption, pour rappel, permet de caractériser l'adsorption d'un substrat sur un solide. Elle relie la quantité d'adsorbat (ici, des protéines) à la concentration de la même espèce libre en solution sous une pression et température données. Nous avons utilisé le modèle de Langmuir<sup>1</sup> dont les différentes hypothèses et limitations sont décrites dans l'introduction.

#### 1) Modèle de l'isotherme de Langmuir

Les paragraphes suivants détailleront les formules théoriques permettant d'accéder à un modèle d'isotherme de Langmuir dans les conditions choisies (concentration de nanoparticules changeant pour une concentration d'hémoglobine fixe).

Considérant un équilibre  $S + A \rightleftharpoons SA$  entre S, le substrat (les sites libres des nanoparticules où peuvent s'adsorber les protéines), A, l'adsorbat (la protéine non adsorbée) et SA, les sites des nanoparticules occupés par des protéines adsorbées, on a  $K_{ads}$ , la constante d'adsorption du modèle (L/mol) reliant ces paramètres selon l'équation 1 :

$$K_{ads} = \frac{[SA]}{[S] \cdot [A]}$$

(éq.1)

Aussi, nous modifions l'expression de la constante d'équilibre en utilisant les relations de conservation de matière définies dans l'équation 2.

$$[A]_0 = [A] + [SA] \text{ et } [S]_0 = [S] + [SA]$$

(éq.2)



avec  $[S]_0$ , la concentration initiale en site de fixation des nanoparticules et  $[A]_0$ , la concentration initiale en protéines.

Afin de pouvoir relier la concentration de site de fixation à la concentration en nanoparticules, il est utile d'introduire  $n$  tel que  $[S] = n \cdot [NP]$ , avec  $[NP]$ , la concentration en nanoparticules. Ce  $n$  représente le nombre de sites par nanoparticules ou le nombre de protéines maximum qui peuvent se fixer sur une nanoparticule. Il est à relier au plus classique  $n_{\infty}$ , la quantité maximale de protéines par unité de surface de NP que peut adsorber une NP ( $\text{mol}/\text{m}^2$ ) ou  $m_{\infty}$ , la masse maximale de protéines par unité de surface de NP que peut adsorber une NP ( $\text{g}/\text{m}^2$ )

Afin de pouvoir avoir une concentration molaire en NP, il est nécessaire d'introduire une masse molaire de nanoparticules calculée à partir de son rayon mesuré en DNPA et de la densité de la silice en considérant que ce sont des boules monodisperses. Pour passer de  $n$  à  $n_{\infty}$  ou  $m_{\infty}$ , il est nécessaire de calculer la surface spécifique en utilisant ces mêmes données.

Tout cela permet d'amener à l'équation 3 définissant le pourcentage de protéines adsorbées en fonction de la concentration de nanoparticules :

$$\%_{ads} = \frac{\left(n \cdot [NP]_0 + [A]_0 + \frac{1}{K_{ads}}\right) - \sqrt{\left(n \cdot [NP]_0 + [A]_0 + \frac{1}{K_{ads}}\right)^2 - 4 \cdot n \cdot [NP]_0 \cdot [A]_0}}{2 \cdot [A]_0}$$

(Éq.3)

On réalise l'ajustement des données expérimentales au modèle théorique à l'aide du module « Solver » d'Excel en utilisant la méthode de la minimisation de la somme des carrés des écarts relatifs  $SCER^2$  de l'équation 4 permettant ainsi d'obtenir les valeurs  $K_{ads}$  et  $n$  caractéristiques de l'interaction NP/protéines.

$$SCER = \sum_{i=0}^n \frac{(\%_{ads} - \%_{ads}^{calc})^2}{\%_{ads}^2}$$

(Éq.4)

Cette méthode a été publiée dans <sup>3</sup> voir annexe). Pour toutes les mesures suivantes, nous exprimerons les concentrations d'hémoglobine en unité monomérique. En effet, aux concentrations où nous travaillons, l'hémoglobine est tétramérique et ne se dissocie pas, même avec l'adsorption. Pour passer du  $n$  mesuré pour une sous-unité à celui pour l'hémoglobine tétramérique, il est nécessaire de diviser le nombre de sites par 4. Il a été possible de mettre une incertitude sur les valeurs de  $n$ , ce paramètre se lisant en pratique comme la pente de la courbe à petite concentration de NP. Pour  $K_{ads}$ , cela n'a pas été possible. En effet, ce paramètre est lié à l'inflexion de la courbe, paramètre mal défini, ce qui ne permet pas de définir une erreur facilement. De plus, pour certaines conditions, la mesure de  $K_{ads}$  est impossible car le point d'inflexion se passe à grande concentration de nanoparticules et l'inflexion n'est pas visible sur la gamme de concentrations que nous avons mesurée. On peut juste en déduire que la valeur du  $K_{ads}$  sera inférieure à celle de la plus petite valeur mesurée.

## 2) Effet de la concentration en hémoglobine

Afin de vérifier la validité du modèle de Langmuir sur nos interactions oxyHb/NP, nous avons mesuré les isothermes d'adsorption selon le modèle de Langmuir à différentes concentrations d'hémoglobine pour la forme oxygénée. Les mesures ont été faites à pH 7,0 dans du tampon phosphate à 100 mM en

milieu eau légère. Ce pH a été choisi pour se rapprocher le plus des conditions physiologiques. En outre, à ce pH, l'adsorption est quasi-maximale<sup>4</sup>.

La Figure 1 donne les isothermes expérimentales et ajustées pour différentes concentrations. Les expériences ont été faites trois fois pour 1 mM, mais une seule fois pour les autres concentrations.

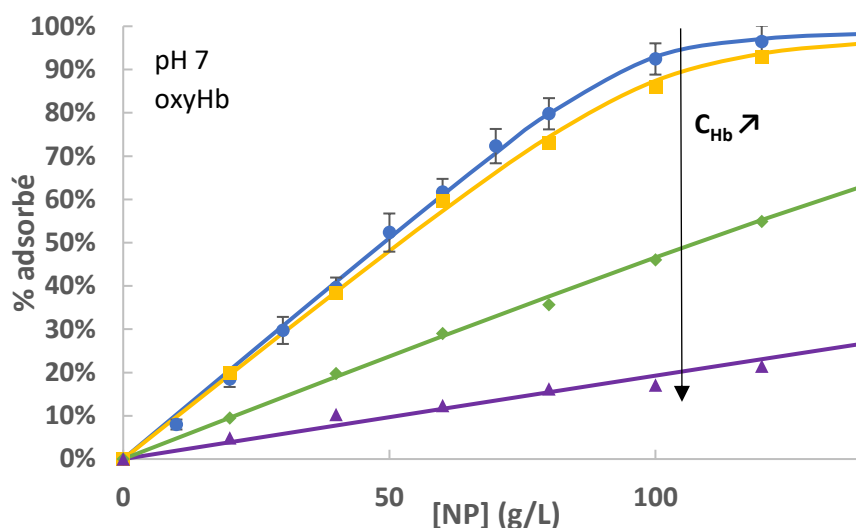


Figure 1 : Isothermes expérimentales et théoriques de l'adsorption de l'oxyhémoglobine à différentes concentrations sur des nanoparticules de silice Ludox TM-50, pH 7,0 tampon phosphate à 100 mM : bleue 1,0 mM, jaune 1,5 mM, vert 2,9 mM et violet 5,9 mM.

On voit que les différentes isothermes théoriques ajustent au plus près les valeurs expérimentales. Les valeurs obtenues pour la concentration la plus grande sont moins certaines dues à la difficulté de travailler à ces concentrations d'hémoglobine (viscosité très grande). Pour les plus fortes concentrations en hémoglobine, la mesure de  $K_{ads}$  est impossible, le point d'inflexion n'étant pas visible comme expliqué plus haut. Le Tableau 1 donne les valeurs de  $K_{ads}$  et  $n$  pour les différentes concentrations.

$C_{protéine}$ (mol/L)	$n$	$n_{\infty}$ (nmol/m <sup>2</sup> )	$m_{\infty}$ (mg/m <sup>2</sup> )	$K_{ads}$ (L.mol <sup>-1</sup> )	$K_{ads}$ (L.g <sup>-1</sup> )
1,0 mM	120 ± 8	97 ± 7	1,6 ± 0,1	1,2.10 <sup>5</sup>	2,0.10 <sup>9</sup>
1,5 mM	170 ± 6	140 ± 5	2,2 ± 0,1	4,0.10 <sup>4</sup>	6,6.10 <sup>8</sup>
2,9 mM	170 ± 7	140 ± 6	2,2 ± 0,1	< 4,0.10 <sup>4</sup>	< 6,6.10 <sup>8</sup>
5,9 mM	130 ± 11	110 ± 9	1,8 ± 0,2	<< 4,0.10 <sup>4</sup>	<< 6,6.10 <sup>8</sup>

Tableau 1 : Constantes calculées à partir du modèle d'isotherme de l'adsorption de l'hémoglobine oxygénée à différentes concentrations sur des nanoparticules de silice Ludox TM-50, pH 7,0 tampon phosphate à 100 mM

A part sur la concentration la plus haute en hémoglobine, on peut noter différents points :

- les valeurs caractéristiques des isothermes ne sont pas identiques, montrant bien que le modèle de Langmuir ne permet pas de caractériser complètement l'adsorption des protéines sur une surface ;
- le nombre de sites de surface augmente avec la concentration en Hb avant de se stabiliser à une valeur limite ;
- la valeur du  $K_{ads}$  diminue avec l'augmentation de la concentration en hémoglobine.

Ces éléments peuvent s'expliquer par le modèle de l'adsorption des protéines sur une surface comme indiqué dans l'introduction (IV-3). Plus la concentration d'hémoglobine est forte, plus l'interaction avec la surface sera rapide, moins la protéine se déformera<sup>5</sup>. Ainsi plus la concentration en protéines est forte :

- plus le nombre de protéines par unité de surface sera grand car elles y occupent moins de place ;
- plus la constante d'adsorption sera faible vu que les protéines ne peuvent optimiser leur interaction avec la surface.

Pour la plus grande concentration en protéines, l'augmentation de la viscosité de la solution peut diminuer la cinétique d'adsorption réversible et donc augmenter la déformation irréversible, donnant ainsi un nombre de protéine par nanoparticules n plus petit.

### 3) Effet de l'état du fer de l'hémoglobine

Parmi les nombreuses formes de l'hémoglobine, nous nous sommes penchés sur les trois formes principales de l'hémoglobine décrites dans l'introduction : l'oxyHb, la désoxyHb et la métHb. La Figure 2 donne les isothermes expérimentales et théoriques pour les différentes formes de l'hémoglobine à 1 mM à pH7.

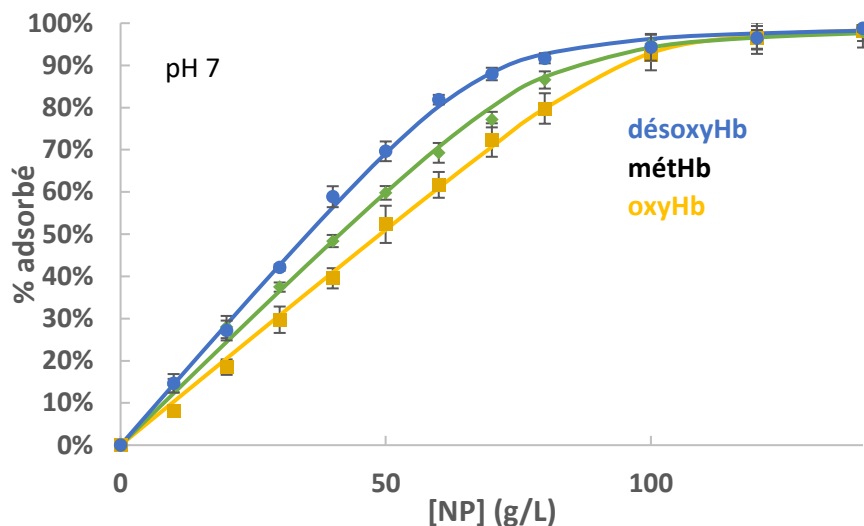


Figure 2 : Isothermes expérimentales et théoriques de l'adsorption de l'hémoglobine dans différents états à 1 mM sur des nanoparticules de silice Ludox TM-50, pH 7,0 tampon phosphate à 100 mM: bleu désoxyHb, vert métHb et jaune oxyHb.

Comme pour l'étude en concentrations, on voit que les différentes isothermes théoriques ajustent au plus près les valeurs expérimentales. Le modèle de Langmuir convient donc afin de simuler mathématiquement l'adsorption Hb/NP. On note également un comportement différent entre les trois formes. Le Tableau 2 donne les valeurs de  $K_{ads}$  et n pour les différentes formes.

	n	$n_{\infty}$ (nmol/m <sup>2</sup> )	$m_{\infty}$ (mg/m <sup>2</sup> )	$K_{ads}$ (L.mol <sup>-1</sup> )	$K_{ads}$ (L.g <sup>-1</sup> )
désoxyHb	170 ± 7	140 ± 6	2,3 ± 0,1	5,1.10 <sup>4</sup>	8,4.10 <sup>8</sup>
métHb	140 ± 8	120 ± 7	1,9 ± 0,1	5,3.10 <sup>4</sup>	8,7.10 <sup>8</sup>
oxyHb	120 ± 8	97 ± 7	1,6 ± 0,1	1,2.10 <sup>5</sup>	2,0.10 <sup>9</sup>

Tableau 2 : Constantes calculées à partir du modèle d'isotherme de l'adsorption pour différents états de l'hémoglobine à 1 mM sur des nanoparticules de silice Ludox TM-50, pH 7,0 tampon phosphate à 100 mM

Les valeurs du nombre de sites diffèrent de façon assez conséquente entre les trois formes. Les valeurs de  $K_{ads}$  sont très proches entre la forme désoxyHb et métHb, le  $K_{ads}$  de la forme oxyHb est plus élevé, montrant une plus grande affinité de cette forme.

Les différences remarquées entre les formes oxy et désoxy peuvent être expliquées par la rigidité de la protéine. En effet, contrairement à oxyHb ou métHb, désoxyHb est une forme plus rigide, contrainte par des ponts salins entre les sous-unités<sup>6</sup>. Comme expliqué au chapitre 1, plus une protéine sera rigide, moins elle s'étalera et donc, le nombre de sites maximal par nanoparticules sera plus élevé et l'adsorption sera d'autant plus réversible (affinité plus petite). Cela se corrèle bien en pratique ici puisque la forme désoxy, qui est rigide, possède un  $n$  plus grand et un  $K_{ads}$  plus petit que la forme oxy, moins rigide.

Pour expliquer la différence de comportement de la forme méthémoglobine par rapport aux deux autres, il est plus logique de la comparer à la forme oxy. Les deux formes sont peu rigides (pas de ponts salins) et le fer de l'hème est dans un état d'oxydation +III. Pour expliquer les différences, il faut se pencher sur la différence majeure : la charge. De fait, la littérature rapporte que l'oxyhémoglobine est moins retenue sur des colonnes échangeuses de cation (Sephadex CM) que la méthémoglobine, ce qui prouve qu'elles ont des réseaux de charges différents<sup>7</sup>. Ce phénomène peut modifier l'interaction de la métHb avec les surfaces de silices chargées.

#### 4) Effet de la deutération

L'étude de la deutération sur l'adsorption a été faite afin de préparer l'étude en oxygénation en milieu eau lourde et en diffusion de neutrons. Afin de les deutérer, les réactifs ont été laissés dans l'eau lourde afin d'échanger tous les protons labiles. Des isothermes ont été mesurées en milieu eau légère et eau lourde pour une concentration de  $63 \mu\text{M}$  en oxyhémoglobine (concentration des études en oxygénation) à pH ou pD 7,4. Ce pH a été choisi pour se rapprocher du pH physiologique. La Figure 3 donne les isothermes expérimentales et théoriques pour ces deux conditions.

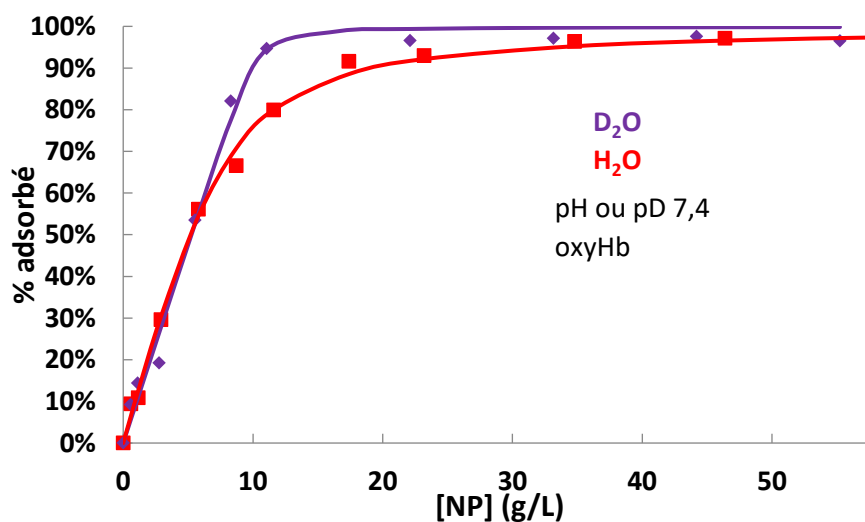


Figure 3 : Isothermes expérimentales et théoriques de l'adsorption de l'oxyhémoglobine à  $63 \mu\text{M}$  sur des nanoparticules de silice Ludox TM-50 en milieu  $\text{H}_2\text{O}$  (rouge) ou  $\text{D}_2\text{O}$  (violet), pH ou pD 7,4 tampon phosphate à  $100 \text{ mM}$

Les différentes isothermes théoriques ajustent au plus près les valeurs expérimentales validant encore l'utilisation du modèle de Langmuir pour cette étude. Il est aussi visible que l'adsorption change de

façon assez significative avec le passage à un milieu deutéré. Le Tableau 3 donne les valeurs de  $K_{ads}$  et  $n$  pour les deux milieux.

	$n$	$n_{\infty}$ (mol/m <sup>2</sup> )	$m_{\infty}$ (mg/m <sup>2</sup> )	$K_{ads}$ (L.mol <sup>-1</sup> )	$K_{ads}$ (L.g <sup>-1</sup> )
H <sub>2</sub> O	94 ± 10	77 ± 8	1,3 ± 0,1	8,8.10 <sup>4</sup>	1,5.10 <sup>9</sup>
D <sub>2</sub> O	68 ± 15	55 ± 12	0,92 ± 0,2	2,3.10 <sup>6</sup>	3,7.10 <sup>10</sup>

Tableau 3 : Constantes calculées à partir du modèle d'isotherme de l'adsorption de l'hémoglobine oxygénée à 63 μM sur des nanoparticules de silice Ludox TM-50, pH ou pD 7,4 tampon phosphate à 100 mM

Si les valeurs en milieu aqueux diffèrent des résultats précédents, il faut se rappeler que le pH n'est pas le même que précédemment et qu'un pH plus élevé limite l'adsorption<sup>4</sup>. En comparant les valeurs entre le milieu eau légère et eau lourde, on remarque une diminution du nombre de sites avec la deutération (diminution de 30%) et une augmentation de l'affinité (multiplication par 30 du  $K_{ads}$ ). Ces changements peuvent être expliqués par plusieurs hypothèses :

-le changement des protons labiles de l'hémoglobine qui sont impliqués dans les liaisons H. Or, les liaisons hydrogène entre la protéine et la surface sont un des moteurs de l'adsorption des protéines comme montré dans l'introduction. La force des liaisons deutérium par rapport aux liaisons hydrogène est un sujet complexe. Certains travaux de la littérature semblent montrer que les liaisons deutérium sont moins fortes que celles hydrogène sur des cas particuliers<sup>8,9</sup> tandis que d'autres travaux montrent l'inverse<sup>10</sup>. En tout cas, il a été montré que l'adsorption de l'eau lourde sur les surfaces est privilégiée par rapport à celle de l'eau légère<sup>11</sup>. Par comparaison, il n'est donc pas étonnant que l'adsorption des protéines est favorisée en milieu deutéré.

-en comparant le rayon de giration de l'oxyhémoglobine, on voit qu'il est de 23,8 Å dans l'eau lourde<sup>12</sup> et de 24,7 Å dans l'eau légère<sup>13</sup>. Cette différence de taille suggère une structure plus rigide dans l'eau lourde, observation confirmée par l'étude des effets de la deutération sur les températures de dénaturation de l'hémoglobine<sup>14</sup>. Cependant, d'après ce que l'on a pu dire plus haut, une telle rigidification aurait tendance à diminuer  $K_{ads}$  et augmenter  $n$ , ce qui n'est pas observé ici.

Au final, la compréhension du phénomène dépasse le cadre de cette thèse. Des expériences complémentaires (en titrage calorimétrique isotherme par exemple) seraient nécessaire pour identifier l'origine thermodynamique.

## 5) Effet du pH

Nous avons enfin effectué des expériences où nous avons vérifié l'effet du pH dans le cas du couple oxyHb/Ludox. Nous avons mis de l'oxyhémoglobine à 1 mM en contact de nanoparticules à pH 9 avec du tampon ammonium, 5 mM. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus à pH 7 avec 100 mM de tampon phosphate. La Figure 4 présente ainsi l'adsorption à ces deux pH.

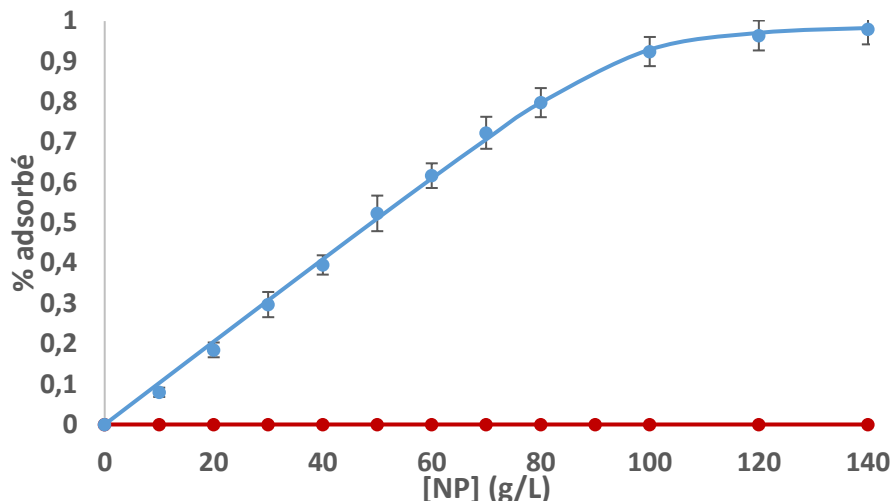


Figure 4 : Isothermes expérimentales et théoriques de l'adsorption de l'oxyhémoglobine à 1 mM sur des nanoparticules de silice Ludox TM-50 à deux pH : bleu pH 7,0 tampon phosphate 100 mM et bordeaux pH 9,0 tampon ammonium 5 mM

On constate qu'à pH 9, il n'y a aucune adsorption mesurable par centrifugation des nanoparticules. Ce phénomène avait déjà été mis en lumière dans <sup>4</sup> : plus aucune adsorption n'existe au-dessus d'un pH 8,6. Pour expliquer ce phénomène, il faut se pencher sur les interactions électrostatiques : la silice a un  $pI = 2^{15}$  et sa surface est de plus en plus chargée négativement avec l'augmentation du pH tandis que l'hémoglobine a un  $pI = 7,4^{16}$ , elle est donc globalement chargée positivement à pH acide et négativement à pH alcalin. A pH 7, l'hémoglobine est encore chargée positivement tandis que la silice est négative, créant ainsi des interactions favorables et donc le phénomène d'adsorption est facilité. A pH 9, les deux objets doivent être tous les deux négativement chargés ; les interactions sont alors défavorables, ce qui empêche l'adsorption. Une partie des résultats de cette section a été publiée<sup>3</sup> (voir annexe). Les expériences à pH 9 décrites seront utilisées comme témoins négatifs de protéines adsorbées dans le reste du chapitre.

## II- Oxygénation de l'hémoglobine adsorbée

Afin de comprendre l'effet de l'adsorption sur l'activité d'une protéine, nous avons étudié la fixation du dioxygène sur l'hémoglobine<sup>17</sup>. Pour cela, il a été effectué des tests où l'hémoglobine est seule, puis dans des conditions où elle est adsorbée. Les expériences ont été faites avec de l'hémoglobine à 63  $\mu$ M dans des conditions où l'adsorption est supérieure à 95% sur les nanoparticules à pH ou pD 7,4 (concentration en NP de 38,4 g/L en milieu H<sub>2</sub>O et 40,5 g/L en milieu D<sub>2</sub>O) (Figure 3). Les expériences ont été faites en milieu eau légère et lourde afin de les corrélérer à des expériences de diffusion de neutrons, la deutération ayant des effets connus sur l'oxygénation.

Pour cela, nous avons fait des expériences de tonométrie où la solution à étudier a été désoxygénée sous flux d'azote. De petites quantités d'air contenant donc du dioxygène sont ajoutées et on suit par spectroscopie UV-Visible la formation de l'oxyhémoglobine. On utilise pour cela le fait que les formes désoxygénées et oxygénées de l'hémoglobine ont des spectres visibles très différents dans la gamme 510-610 nm. Une sphère d'intégration a été utilisée durant ces mesures de spectrophotométrie afin de diminuer au maximum l'effet de diffusion des nanoparticules comme détaillé dans la partie matériels et méthodes.

On obtient ainsi une évolution telle que présentée sur les spectres de la Figure 5 :

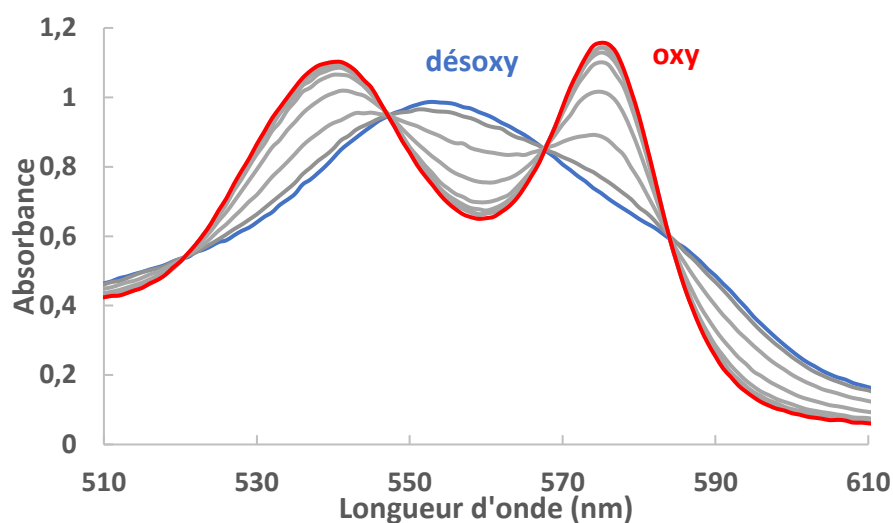


Figure 5 : Spectres d'absorption de l'hémoglobine désoxygénée en bleu, oxygénée en rouge et toutes les formes intermédiaires obtenues par ajouts successifs de volumes d'air (2 mL). Spectres pour Hb 63  $\mu\text{M}$  sans NP, pH 7,4, tampon phosphate 100 mM

Il est possible de savoir le pourcentage d'hémoglobine oxygénée pour chaque spectre en faisant une combinaison linéaire sur de nombreuses longueurs d'ondes afin d'obtenir une meilleure statistique. On obtient ainsi une courbe d'oxygénation. Cette courbe peut se modéliser par le modèle de Hill<sup>18</sup> qui traduit la coopérativité et l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène. Un diagramme de Hill suit la loi de l'équation 5 :

$$\log \frac{Y}{1-Y} = n. (\log P_{O_2} - \log P_{1/2})$$

(éq.5)

avec Y la fraction d'hémoglobine oxygénée,  $P_{O_2}$  la pression partielle en dioxygène, n, le coefficient de Hill (totalement différent du n introduit pour les isothermes d'adsorption) et  $P_{1/2}$ , la pression de demi-saturation.

La  $P_{1/2}$  permet de déterminer l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Ainsi, plus la  $P_{1/2}$  est élevée, plus l'affinité est faible car il faut donc une pression partielle en dioxygène plus grande pour oxygéner la même quantité d'hémoglobine. n représente quant à lui la coopérativité de l'hémoglobine pour la fixation du dioxygène. La coopérativité se traduit par l'affinité de l'hémoglobine augmentant avec la fixation du dioxygène. En d'autres termes, l'hémoglobine étant un tétramère aux concentrations étudiées, elle peut donc fixer 4 molécules d'oxygène et la fixation de la quatrième molécule sera plus aisée que la troisième, elle-même plus facilement fixable que la deuxième et ainsi de suite. Cette coopérativité donne à la courbe d'oxygénation la forme d'une sigmoïde.

De façon expérimentale, le coefficient de Hill est compris entre 2,7 et 3 pour l'hémoglobine<sup>19</sup> pour traduire son effet coopératif. De façon générale, la valeur du coefficient de Hill est supérieure à 1 pour un comportement coopératif, égale à 1 pour un comportement non-coopératif<sup>20</sup> et inférieure à 1 pour un comportement anti-coopératif<sup>21</sup>.

Ainsi, nous obtenons les courbes d'oxygénation suivantes pour les différentes conditions sur la Figure 6. Une modélisation par le modèle de Hill ajustée par la méthode SCER (comme expliqué à l'équation 4) a été effectuée pour chaque courbe. La disposition a été faite afin de bien relever les effets de la deutération d'une part et de l'adsorption d'autre part.

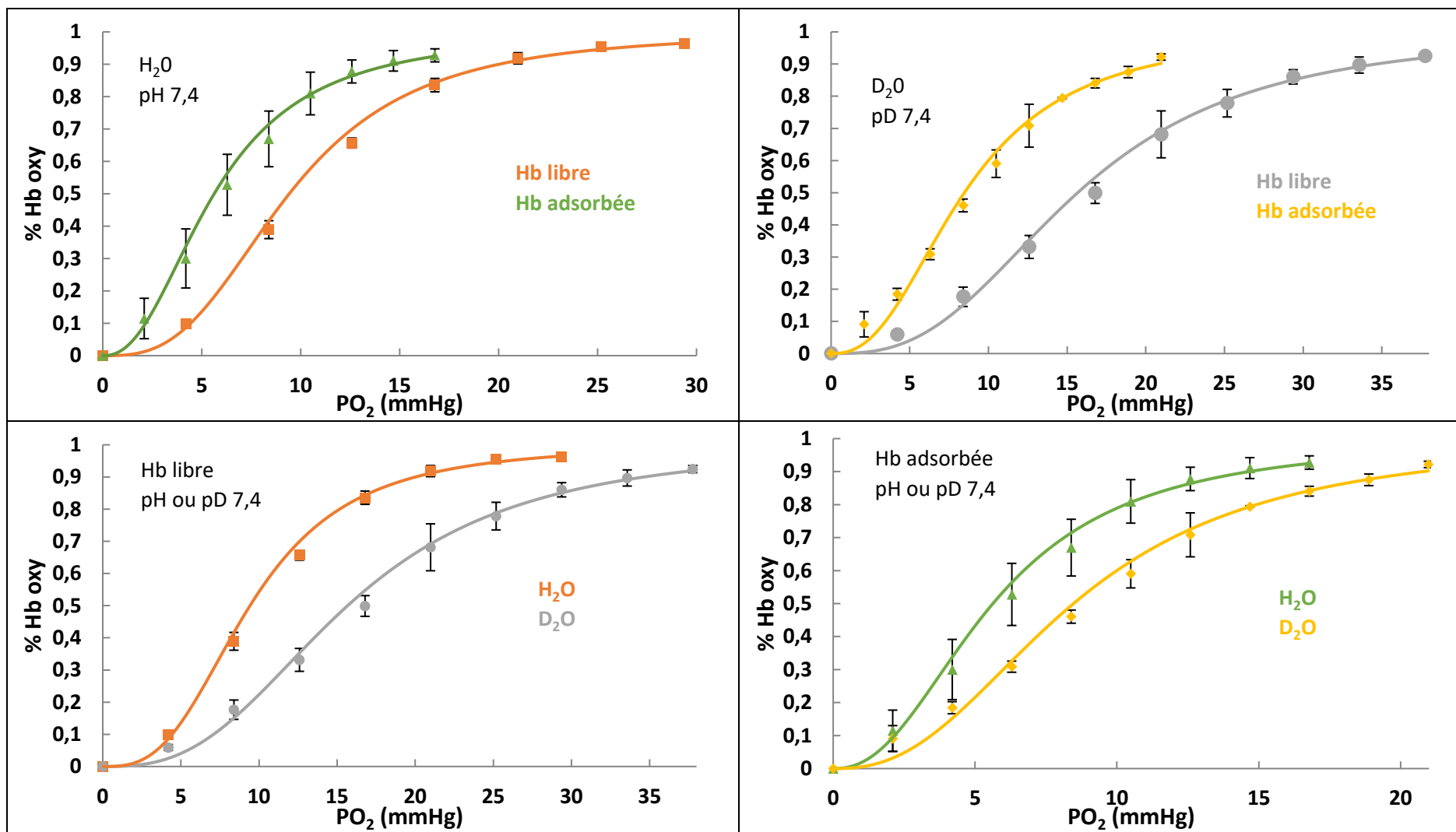


Figure 6 : Courbes d'oxygénation de l'hémoglobine à 63  $\mu$ M adsorbée à 95% ou non, en milieu deutéré ou non, ajustées par le modèle de Hill, pH ou pD 7,4 tampon phosphate à 100 mM : orange H<sub>2</sub>O sans NP, vert H<sub>2</sub>O avec NP ( $C_{NP}=38,4$  g/L), gris D<sub>2</sub>O sans NP, jaune D<sub>2</sub>O avec NP ( $C_{NP}=40,5$  g/L)



On remarque:

- les courbes expérimentales peuvent être ajustées par l'équation du modèle de Hill. La deutération comme l'adsorption ne modifie pas ce modèle régissant l'oxygénation.
- les courbes expérimentales suivent la forme d'une sigmoïde, montrant que la coopérativité est conservée quelques soient les conditions ;
- adsorption mise à part, la deutération fait diminuer l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène (figures du haut) ;
- deutération mise à part, l'adsorption fait augmenter l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène (figures du bas).

Le Tableau 4 donne les coefficients du modèle de Hill pour les différentes conditions.

	Sans NP		Avec NP	
	H <sub>2</sub> O	D <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	D <sub>2</sub> O
P <sub>1/2</sub> (mmHg)	9,42	15,66	5,97	8,46
n	2,92	2,79	2,60	2,45

Tableau 4 : Constantes calculées à partir du modèle de Hill pour les courbes d'oxygénation de l'hémoglobine à 63  $\mu$ M adsorbée à 95% ou non, en milieu deutéré ou non, pH ou pD 7,4 tampon phosphate à 100 mM

Pour ce qui est de la coopérativité, même s'il y a une diminution de la valeur de n avec l'adsorption et la deutération, les valeurs restent dans une gamme suffisante pour affirmer que la coopérativité est en très grande partie conservée.

En ce qui concerne l'affinité :

-l'augmentation de P<sub>1/2</sub> avec la deutération traduit une perte d'affinité pour l'oxygène, adsorbée ou non. Cette perte d'affinité a déjà été remarquée pour l'hémoglobine humaine non adsorbée<sup>14</sup>. Mais il avait été aussi remarqué une diminution du coefficient de Hill n jusqu'à 2, dénotant donc une perte notable de la coopérativité. Ces modifications avaient alors été reliées à des changements dans la dynamique liée à la deutération<sup>22</sup>.

-la diminution importante de P<sub>1/2</sub> avec l'adsorption sur les NP quel que soit l'isotope, traduit un gain d'affinité. Cela avait été remarqué auparavant avec des nanoparticules de silice polydisperses en milieu eau légère<sup>4,17</sup>, sans explication définitive à l'époque. Nos observations ont donc un caractère beaucoup plus général. Une partie de ces résultats ont été publiés (voir annexe)<sup>23</sup>.

**Nous nous sommes concentrés dans la suite de cette thèse à essayer de comprendre les modifications d'activité en nous penchant sur les modifications potentielles de :**

-l'hème de l'hémoglobine et de son fer. Toute modification sur cette partie de l'hémoglobine peut modifier la réactivité du fer vis-à-vis de l'oxygène.

-la structure de la globine. Les propriétés de coopérativité étant conservées, il semble que la structure quaternaire de l'hémoglobine soit conservée avec l'adsorption. Il est toutefois nécessaire de s'en assurer. Il faut aussi se pencher sur la structure secondaire de la protéine afin d'identifier des modifications locales qui pourraient jouer un rôle dans ces différences.

Quand il a été possible, des mesures à pH 9 ont été faites afin de servir de témoin vu qu'il n'y a pas d'adsorption à ce pH.

### III- Modifications de l'hème de l'hémoglobine et de son fer

#### 1) Etude par résonance paramagnétique électronique

Dans cette partie, nous allons étudier les effets de l'adsorption de l'hémoglobine sur les nanoparticules par résonance paramagnétique électronique (RPE). Il s'agit d'un moyen d'étudier les propriétés physiques comme chimiques des protéines du site métallique des métalloprotéines. La RPE est sensible à l'état magnétique du site métallique et l'environnement électronique de ce site. Elle peut donc aider dans deux cas bien distincts :

-donner des informations sur la présence de métal sous forme paramagnétique et les variations magnétiques que ce métal peut subir si l'environnement électronique du site ne change pas ;

-donner des informations sur les changements dans l'environnement électronique du site métallique. Il faut alors se placer dans des conditions où le site métallique n'a pas son état magnétique modifié<sup>24</sup>.

C'est cette deuxième approche qui va nous intéresser ici. Les caractéristiques du spectre RPE sont sensibles à la conformation de la protéine. En effet, il a été montré que des petits changements dans la conformation peuvent modifier l'environnement immédiat. La RPE peut être une sonde de ces changements qui sont répercutés sur le fer<sup>25</sup>. Cela nous intéresse au plus haut point, car comme il a été étudié précédemment dans ce chapitre, les propriétés d'oxygénation de l'hémoglobine changent avec l'adsorption. Or, les études menées sur l'hémoglobine ont montré que des changements de ces propriétés pouvaient être associés à des modifications de structure électronique des orbitales d du fer qui sont celles sondées par la RPE.

La structure électronique est en particulier sensible à la nature au champ de ligand autour du fer, la RPE pourra donc nous renseigner sur un changement de symétrie autour du fer, correspondant à une déformation de l'hème<sup>26</sup>. Si de tels phénomènes sont identifiés, la RPE ne pourra toutefois pas lever l'ambiguïté entre un changement dans la conformation de la protéine causant un changement dans la géométrie de l'hème et un changement dans la géométrie de l'hème directement dû à l'adsorption.

Afin de mener l'étude, il faut toutefois nous placer dans des conditions où un spectre RPE peut être mesuré. En effet, la forme oxygénée comme désoxygénée de l'hémoglobine ne présente aucun signal en RPE (en condition classique d'acquisition), car présentant un spin de valeur entière. Il faut en effet un spin demi-entier (donc sous forme paramagnétique) afin d'avoir un signal.

Nous nous sommes intéressés à la méthémoglobine, ayant un  $\text{Fe}^{3+}$ , de configuration  $d^5$ . Pour rappel, cette forme existe elle-même sous deux états suivant le pH :

-haut spin à bas pH, où le fer est ligandé par cinq atomes d'azote venant de la porphyrine et de la globine et par un oxygène d'une molécule d'eau ;

-bas spin à haut pH, où le fer est ligandé par cinq atomes d'azote venant de la porphyrine et de la globine et par un oxygène d'un hydroxyde<sup>26</sup>. Cet état existe sous plusieurs formes différentes dont les proportions sont différentes suivant le pH. Chacune correspondant à des variations subtiles de la géométrie de l'hème<sup>27</sup> ou du ligand<sup>28</sup>. Le Tableau 5 permet de rassembler les formes BS recensées dans la littérature.

	$g_x$	$g_y$	$g_z$
HS	5,96		2
BS a	2,7236	2,241	1,73-1,75
BS b	2,7853	2,2593	1,65-1,66
BS c	2,586	2,1795	1,8319

Tableau 5 : Valeurs des facteurs  $g$  repérés sur le haut spin et les 3 formes du bas spin de la méthHb tirés de <sup>27</sup>.

Il est possible de rassembler les différentes formes appartenant à un état de spin en définissant un facteur moyen  $g_{iso}$  défini par l'équation 6<sup>29</sup>. Ceci sera utilisé dans cette partie pour lier les différents  $g_x$ ,  $g_y$  et  $g_z$  des formes bas spin.

$$3 \cdot g_{iso} = g_x + g_y + g_z \quad (\text{éq.6})$$

Les expériences de RPE ont été faites à l'ICMMO (Université Paris-Saclay) avec l'aide du Docteur Christian Herrero. Nous avons d'abord étudié la méthémoglobine seule afin de voir si son signal RPE correspondait à ce qui avait déjà été décrit. Les études ont été faites à pH 7 et 9. De plus, les expériences ont été faites quand il a été possible à deux températures (hélium liquide et azote liquide). En effet, plus la température est basse, plus on augmente la population des états fondamentaux et la qualité du signal.

La Figure 7 donne les spectres pour ces différentes conditions. On a donc à 70 K des formes classiques pour les spectres RPE de la méthémoglobine avec sa résonance caractéristique à  $g_{perpendiculaire}=6$  et  $g_{parallèle}=2$  de la forme HS<sup>24-27</sup>. Les autres résonances sont très peu visibles, mais sont dans les gammes de champs caractéristiques des formes BS<sup>27</sup>.

En mesurant les mêmes échantillons à 10 K, nous avons pu relever les valeurs des facteurs  $g$  de ces formes BS. Les facteurs mesurés au-delà de 390 mT sont très difficiles à repérer car les résonances sont très faibles. Le Tableau 6 rassemble les facteurs  $g$  trouvés pour les deux pH à 10 K et leurs attributions (HS haut spin, BS bas spin). La valeur du  $g_{xy}$  de la forme haut spin a été mesurée au maximum de la résonance.

pH 7	$g_x$	$g_y$	$g_z$
HS	5,94		2,00
BS a	2,78	2,25	1,71
BS b	no	no	no
BS c	no	no	no
BS d	3,04	2,06	no
BS e	2,89	2,34	1,45
BS f		2,14	1,67

pH 9	$g_x$	$g_y$	$g_z$
HS	5,94		2,00
BS a	2,76	2,25	1,73
BS b	no	no	no
BS c	2,59	2,18	1,83
BS d	3,06	2,06	no
BS e	no	no	no
BS f	no	no	no

Tableau 6 : Valeurs des facteurs  $g$  repérés sur la méthHb à pH 7 et 9 à 10 K : « no » non observé

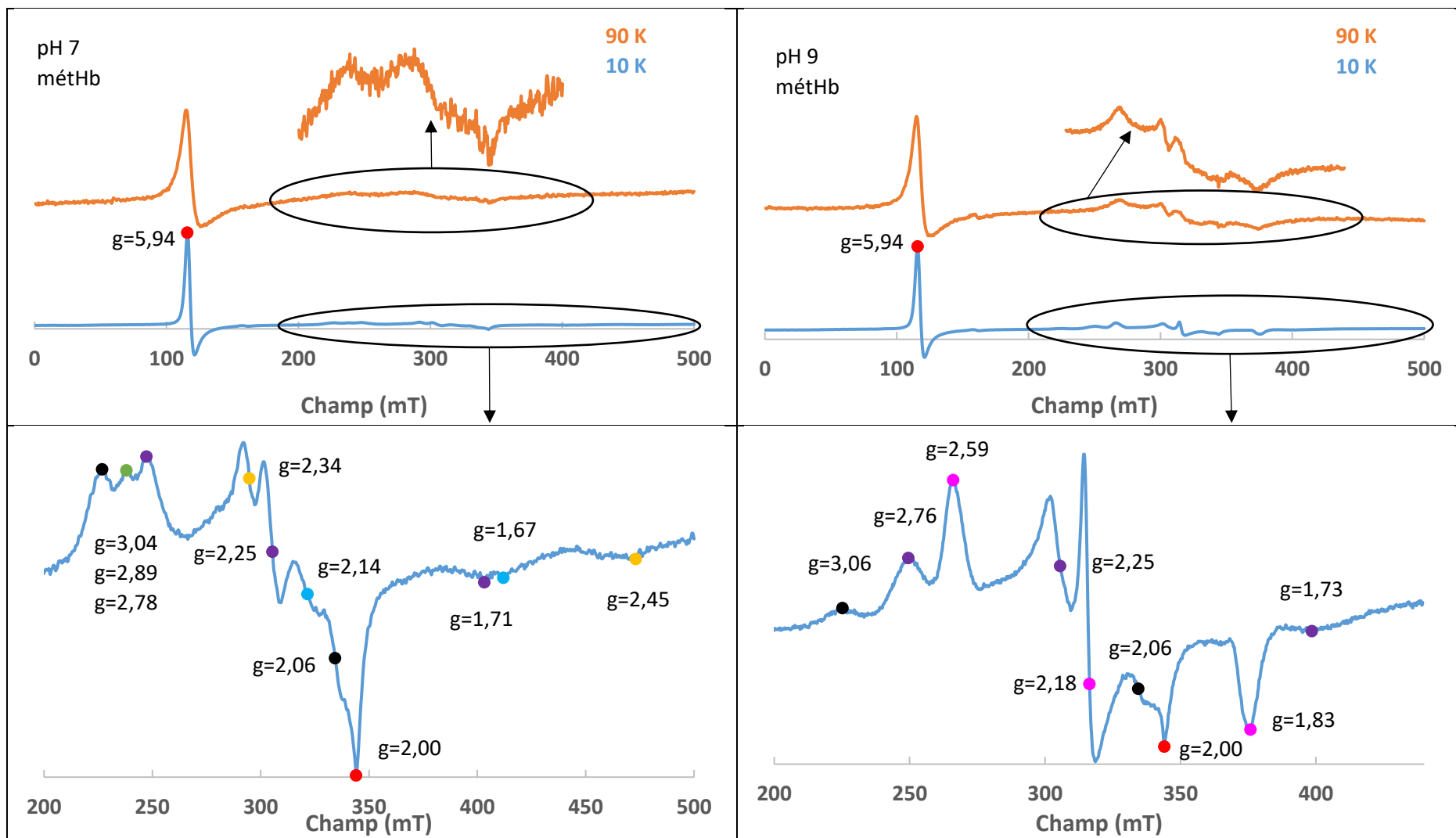


Figure 7 : Spectres RPE du fer dans la méthémoglobine 1 mM A gauche, tampon phosphate 100 mM pH 7, à droite, tampon carbonate 100 mM pH 9. En bleu, milieu hélium liquide,  $T=10$  K, en orange, milieu azote liquide,  $T=90$  K.

On voit donc que pour les spectres que nous avons acquis, nous pouvons conclure :

-que pour les deux pH, les résonances en rouge correspondent à la forme HS avec des facteurs très proches de ce qui a déjà été relevé. Elle est majoritaire à pH 7.

-en comparant par rapport à la littérature exposé dans le Tableau 5 : Valeurs des facteurs g repérés sur le haut spin et les 3 formes du bas spin de la métHb tirés de <sup>27</sup>. on retrouve à pH 7 comme à pH 9 la forme BS a. En revanche, il n'y a pas la forme BS b de la littérature. Quant à la forme BS c, elle n'est présente qu'à pH 9.

-on trouve à pH 7 comme 9 une forme non recensée BS que l'on a nommé ici d. De plus, à pH 7, on trouve deux autres formes que l'on a nommé BS e et f qui sont elles aussi inconnues.

Différentes raisons sont possibles pour expliquer le fait qu'elles n'ont pas été documentées :

-la température utilisée dans cette expérience est plus basse que celles de la littérature (10 contre 25 K ou plus), permettant d'obtenir des signaux de meilleure qualité dans notre cas.

-l'utilisation d'hémoglobine porcine et non humaine. La détermination de la structure de l'hémoglobine porcine par diffraction X a montré qu'elle était extrêmement proche de l'hémoglobine humaine pour les structures secondaire, tertiaire et quaternaire<sup>30</sup>. On ne peut toutefois pas exclure des différences très fines ce qui donneraient ces états que nous avons ici.

Il serait intéressant d'un point de vue strict de faire plus d'études en température et à des champs magnétiques différents afin de pouvoir expliquer au mieux ces signaux que nous repérons. Toutefois, l'étude de ces différences dépasse le cadre de ce travail.

Avant de s'intéresser aux mélanges, les nanoparticules de silice ont été analysées car elles contiennent du fer comme expliqué dans l'introduction. La Figure 8 donne les spectres RPE des nanoparticules à 10 et 70 K, pour le pH 7 et 9 tandis que le Tableau 7 donne les facteurs g.

Quelques soient les conditions selon lesquelles on a mesuré les spectres (à 10K ou 70 K, pH 7 ou 9), le spectre reste identique. Si on exclut le signal à  $g=2,06$ , on retrouve un signal caractéristique du fer à l'état d'oxydation +III dans les verres de silice<sup>31</sup>. Ainsi, on retrouve :

-un signal intense asymétrique à  $g=4,3$  et un signal plus faible à  $g=8$ , caractéristiques de transitions paramagnétiques de  $Fe^{3+}$  en symétrie rhombique plus ou moins distordue. <sup>32-34</sup>.

-un signal faible à  $g=2,0$  dont l'attribution est moins claire<sup>35</sup>. Il pourrait s'agir d'une autre impureté métallique ou de défauts de la silice.

Maintenant, nous allons étudier des mélanges à pH 7 où la méthémoglobine est adsorbée à 98% sur les nanoparticules de silice (donc avec un signal de métHb libre quasi-nul et une couverture seulement partielle de la surface des NP). Les conditions de l'étude sont définies grâce aux isothermes de la Figure 1. Des études seront faites aux mêmes concentrations de métHb et NP à pH 9 comme témoin de l'effet des NP sans adsorption. Nous n'avons pas eu cependant la possibilité de faire toutes les études à 10K, suite à des problèmes d'approvisionnement en hélium.

Pour éviter des soustractions de signaux qui augmentent le bruit de fond des spectres, nous avons donc comparé le signal expérimental (métHb adsorbée et NP, la contribution de la métHb libre pouvant être considérée comme négligeable) à des combinaisons linéaires des signaux de métHb libre et de NP obtenus plus haut dans les mêmes concentrations (Figure 7 et Figure 8). Le Tableau 8 donne les proportions de fer pour le signal expérimental et la combinaison linéaire, calculée à l'aide de la quantité de fer des nanoparticules déterminée en ICPMS dans l'introduction et celle de l'hémoglobine.

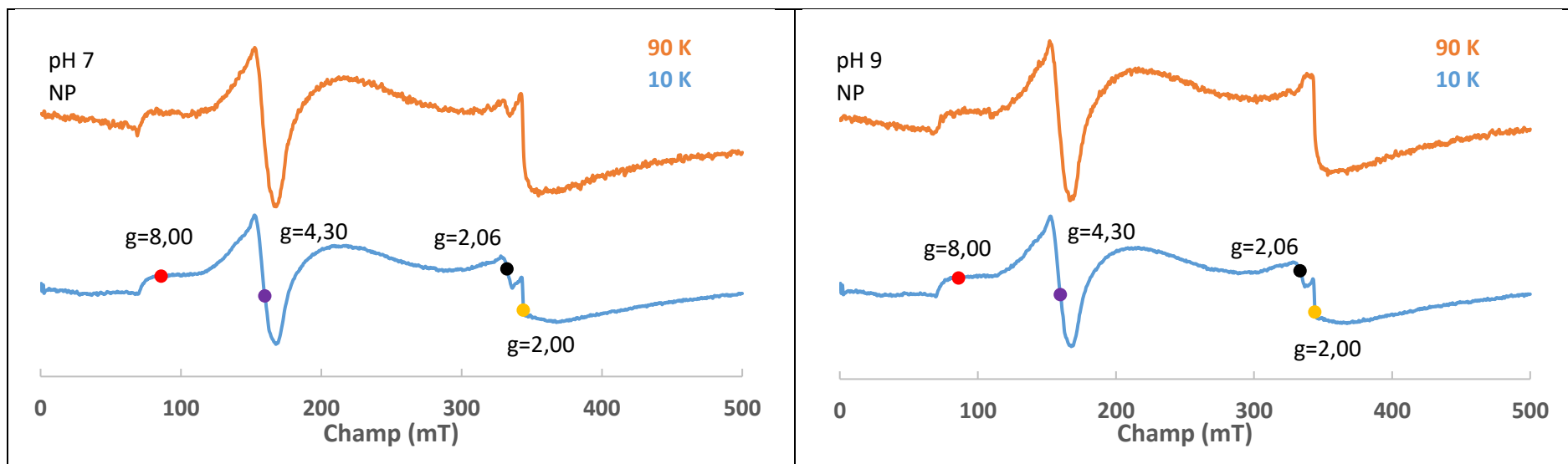


Figure 8 : Spectres RPE du fer dans les nanoparticules de silice 120 g/L. A gauche, tampon phosphate 100 mM pH 7, à droite, tampon carbonate 100 mM pH 9. En bleu, milieu hélium liquide,  $T=10$  K, en orange, milieu azote liquide,  $T=90$  K.

g	
pH 7	pH 9
8,00	8,00
4,30	4,30
2,06	2,06
2,00	2,00

Tableau 7 : Valeurs des facteurs  $g$  repérés sur les nanoparticules de silice à pH 7 et 9 à 10 K.

	Hb libre	Hb ads	NP
Concentrations en fer (mM) mesurées dans le mélange 98 % ads	0,02	0,98	0,55
Concentrations en fer (mM) utilisées dans la combinaison linéaire	1	0	0,55

Tableau 8 : Proportions des différents types de fer dans un mélange de 1 mM de métHb et 120 g/L de NP.

La Figure 9 présente ainsi les spectres RPE des mélanges avec oxyHb adsorbée/NP et des combinaisons linéaires oxyHb libre et NP.

Pour les spectres mesurés à 70 K à pH 7, les spectres de la méthémoglobine adsorbée sur les nanoparticules recouvrent quasiment parfaitement les combinaisons linéaires. Cela signifie donc que l'adsorption ne provoque aucun changement sur le spectre du fer de la méthémoglobine. Idem à pH 9 pour le témoin métHb en présence de NP.

A 10 K on ne retrouve aucune différence notable entre le mélange et la combinaison linéaire dans la plus grande partie du spectre. Des changements minimes sont cependant possibles dans la distribution des formes BS.

Afin de confirmer ces observations, nous avons décidé de faire la même étude sur des mélanges où 50% de la méthémoglobine est adsorbée sur des nanoparticules de silice à pH 7, toujours avec un témoin à pH 9. Nous ne montrerons pas les résultats, car nous trouvons exactement la même chose qu'à 98% d'adsorption, c'est-à-dire les spectres se superposent sauf quelques minimes différences.

De l'étude des deux conditions d'adsorption à pH 7, on peut conclure qu'il n'y a donc aucune différence dans la configuration de l'hème autour du fer après adsorption de la métHb sur les NP. Cela signifie donc que les différences d'oxygénation avec l'adsorption ne peuvent pas s'expliquer par une modification de la structure électronique. Il est aussi possible que l'absence de modifications ne concerne que la méthémoglobine et pas l'oxy ou la désoxy, bien que cela paraisse improbable. Pour conclure définitivement, il faudrait étudier les formes désoxyhémoglobine et oxyhémoglobine qui sont impliquées dans l'oxygénation. Toutefois, il n'est pas possible d'étudier ces formes avec la RPE de façon simple. Nous les avons donc étudiées avec une autre technique d'étude de la structure électronique pouvant mesurer ces formes, la spectroscopie d'adsorption X.

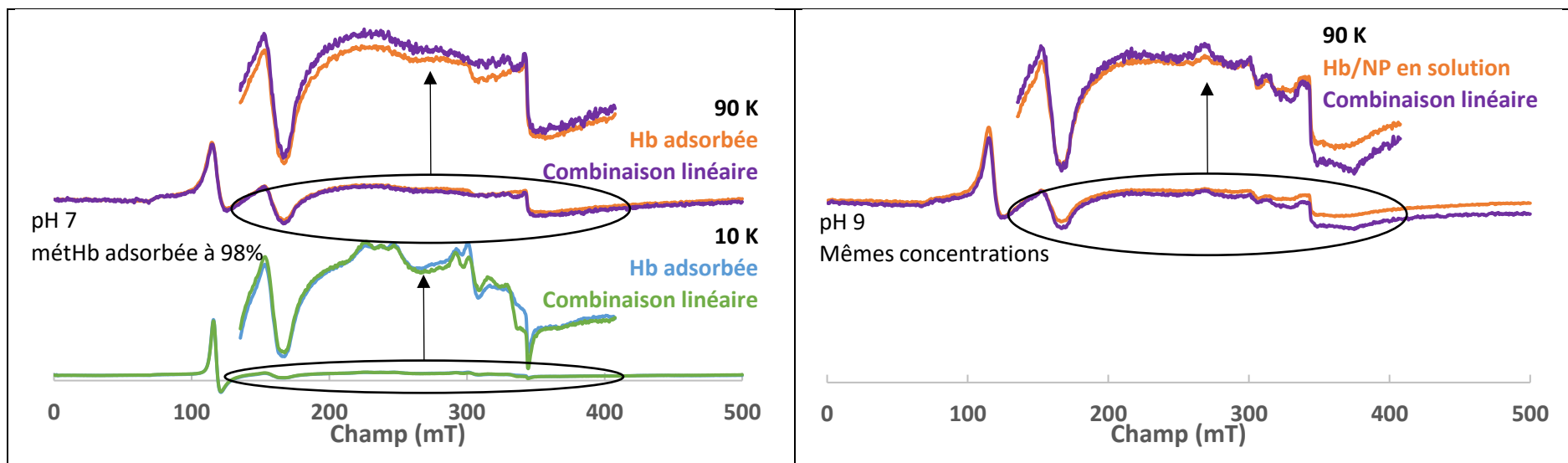


Figure 9 : Spectres RPE du fer dans les mélanges métHb/NP, adsorption à 98%. A gauche, tampon phosphate 100 mM pH 7, à droite, tampon carbonate 100 mM pH 9.

Orange : Azote 90 K Solution métHb/NP 1 mM/120 g/L, adsorbée à 98% à pH 7, pas d'adsorption à pH 9.

Bleu : Hélium 10 K Solution métHb/NP 1 mM/120 g/L, adsorbée à 98% à pH 7, pas d'adsorption à pH 9.

Violet : Azote 90 K Combinaison linéaire du signal de métHb à 1 mM avec signal des NP à 120 g/L.

Vert : Hélium 10 K Combinaison linéaire du signal de métHb à 1 mM avec signal des NP à 120 g/L.



## 2) Etude par spectroscopie d'adsorption des rayons X

La spectroscopie d'absorption des rayons X (acronyme XAS, d'après l'anglais « X-ray absorption spectroscopy ») est une technique utilisant la lumière de synchrotron pour sonder l'environnement local d'un élément et sa structure électronique.

La spectroscopie d'absorption X est basée sur l'effet photoélectrique, correspondant à l'excitation d'un électron de niveau de cœur d'un atome donné par l'absorption d'un photon, induisant l'éjection d'un photoélectron dans le continuum. L'énergie cinétique du photon émis  $E_c$  est égal à  $E_c = h\nu - E_0$ ,  $h\nu$  étant l'énergie du photon adsorbé et  $E_0$  étant l'énergie du seuil d'adsorption.

Selon le type d'électrons, donc selon l'énergie du photon, on peut avoir des seuils différents : le seuil K qui correspond à l'excitation d'un électron 1s et les seuils L correspondant à l'excitation des électrons de type 2s et 2p. La Figure 10 présente les transitions correspondantes pour les différents seuils. Nous nous intéresserons ici spécifiquement au seuil d'absorption K du fer (7112 eV pour le fer métallique).

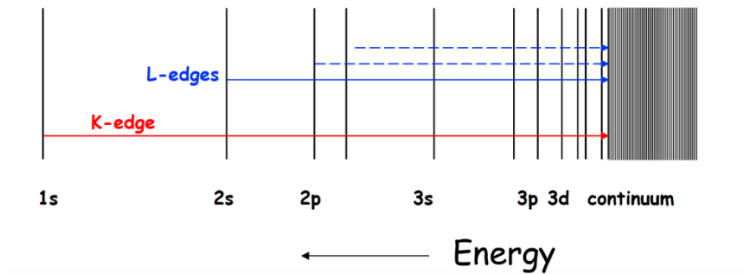


Figure 10 : Les différents seuils et leurs transitions électroniques correspondantes.

Dans un spectre XAS typique, on peut identifier deux régions différentes, permettant d'extraire des informations complémentaires. La Figure 11 présente ainsi ses différentes régions et les chemins du photoélectron correspondants :

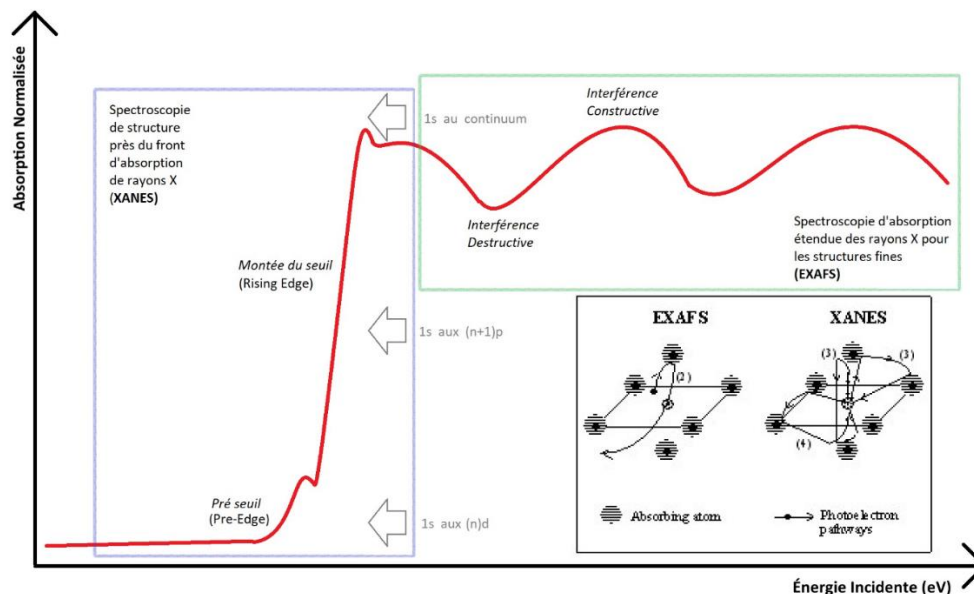


Figure 11 : Les différents domaines d'un spectre XAS au seuil K du fer, les transitions électroniques correspondantes et les trajectoires du photoélectron (pour le Fer, il s'agit des sous-couches 3d et 4p).

Un spectre XAS donne le coefficient d'absorption  $\mu(E)$  en fonction de l'énergie incidente. Le coefficient d'adsorption peut être mesuré par absorption (ou fluorescence si la concentration en photoadsorbé est faible).

On retrouve ainsi la région correspondante au XANES (pour X-ray Absorption Near-Edge Structure) à plus basse énergie (normalement jusqu'à 60 eV après le seuil d'absorption). Cette partie correspond à la diffusion multiple du photoélectron émis, dû à sa faible énergie cinétique et à une grande rétrodiffusion causée par les atomes. Cette partie du spectre est alors très riche d'informations sur la structure électronique (comme l'état d'oxydation et de spin) et sur la structure tridimensionnelle. Mais son interprétation en termes de diffusion multiple est plus longue et compliquée. La partie EXAFS ne sera pas analysée dans cette thèse.

Dans la partie XANES, on peut s'intéresser au pré-seuil, donnant des informations sur la coordination ainsi que sur le champ de ligand. La position de son maximum est ainsi un élément permettant de vérifier si nous avons bien le bon composant. Il est aussi possible d'étudier l'état d'oxydation du fer grâce au seuil. En effet, plus le fer est dans un état d'oxydation élevé, plus son seuil d'adsorption sera haut en énergie. Les atomes avec un plus fort degré d'oxydation ont une plus grande charge. Ils requièrent des rayons X plus énergétiques afin d'éjecter un électron de cœur et ont donc un seuil d'adsorption plus haut en énergie<sup>36</sup>. L'énergie du seuil d'absorption  $E_0$  correspond à l'énergie du point d'inflexion de la montée du seuil. En représentant la dérivée première du signal,  $E_0$  correspond à l'énergie du maximum de la dérivée. Pour l'hémoglobine, plusieurs points d'inflexion sont présents. Nous décidons de définir le seuil au premier point d'inflexion comme dans la littérature<sup>37</sup>.

Sur tout le spectre XAS, il est possible de décomposer un signal par combinaison linéaire si on connaît le signal et la participation des différentes composantes de ce mélange<sup>38</sup>. La XAS est donc une technique tout à fait utilisable afin d'étudier les sites métalliques des métallo-hémo-protéines et donc, ici les changements que subit le fer de l'hème de l'hémoglobine quand elle est adsorbée. L'idée est donc de pouvoir les corrélérer avec les différences d'affinité observées pour l'oxygène.

Les études ont été faites au synchrotron SOLEIL sur la ligne SAMBA avec le Docteur Andrea Zitolo. Les études ont été faites sur l'adsorption des formes oxyhémoglobine et désoxyhémoglobine à pH 7, car étant les formes impliquées dans les phénomènes d'oxygénation. La désoxyhémoglobine a été obtenue par ajout de dithionite de sodium. Aucune étude n'a été faite à pH 9 faute de temps de faisceau.

Avant de s'intéresser aux mélanges avec adsorption, les différents constituants ont été mesurés individuellement. Le tampon phosphate et la dithionite de sodium ont été mesurés et n'ont présenté aucun signal de fer. L'oxyhémoglobine et la désoxyhémoglobine ont été utilisées à hautes concentrations (autour de 10 mM en monomères). Les nanoparticules de silice LUDOX TM-50 à 120 g/L ont également été mesurées étant donné qu'elles contiennent du fer. Les échantillons ont été mesurés dans un cryostat à hélium à la température de 20 K et le coefficient d'adsorption a été mesuré par fluorescence avec un détecteur en germanium de type Canberra à 35 éléments et calibré sur une feuille de fer.

La Figure 12 donne les spectres XAS normalisés et la dérivée première des deux formes de l'hémoglobine.

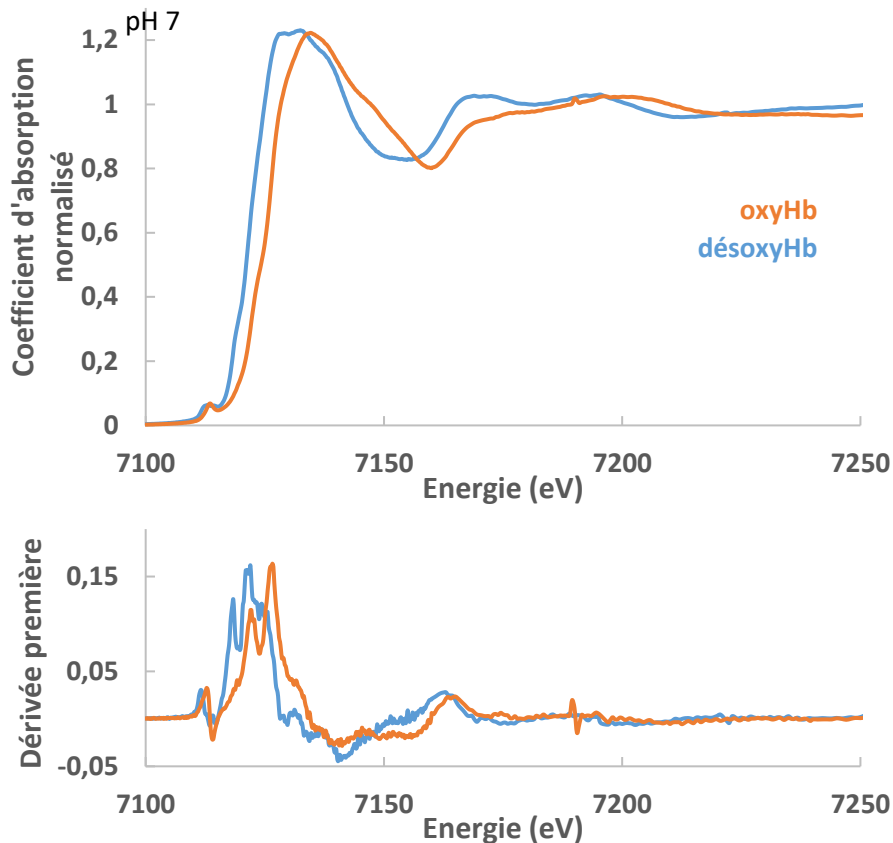


Figure 12 : Spectres XAS normalisés et leur dérivée première au seuil K du fer de l'oxyhémoglobine en orange et de la désoxyhémoglobine en bleu clair. Tampon phosphate 100 mM, pH 7,0. T= 20K.

L'hémoglobine est étudiée de longue date par spectroscopie d'absorption X<sup>39</sup>. Si on compare ainsi aux spectres ou aux dérivées premières de l'oxyhémoglobine et désoxyhémoglobine tirés de <sup>37</sup>, on retrouve d'ailleurs les mêmes caractéristiques spectrales par simple comparaison visuelle, les deux formes ayant différentes bandes très caractéristiques chacune.

De façon quantitative, on peut comparer les valeurs de l'énergie du maximum du pré-seuil ainsi que l'énergie du seuil d'adsorption E<sub>0</sub>. Le Tableau 9 donne les valeurs entre nos données et ceux de différents articles. Les valeurs du pré-seuil ne sont pas toujours données. De plus, les valeurs du seuil n'ont pas été mesurées au même endroit que dans notre étude, aussi nous ne les donnerons pas pour éviter de la confusion, mais nous donnerons les écarts entre l'espèce oxy et désoxy.

Energie (eV)	Pré-seuil oxyHb	Pré-seuil désoxyHb	Différence pré-seuil	E <sub>0</sub> oxyHb	E <sub>0</sub> désoxyHb	Différence
Données expérimentales	7113,6	7113,0	0,6	7122,2	7118,4	3,8
Wilson 2013 <sup>37</sup>	7113,0	7112,4	0,6	7121,3	7117,5	3,8

Tableau 9 : Valeurs en énergie pour le pré-seuil et seuil de l'oxy- et désoxyhémoglobine. Eisenberger et collaborateurs<sup>39</sup> avaient mesuré en 1976 un E<sub>0</sub> de 6 eV tandis que Pin et collaborateurs<sup>40</sup> en 1985 avait mesuré un E<sub>0</sub> de 5 eV.

Pour le maximum en énergie du pré-seuil, les valeurs sont très proches, mais on a un léger décalage par rapport à <sup>37</sup>. Cela peut être expliqué par une calibration au niveau énergétique légèrement

différente entre les deux expériences car on retrouve la même différence en énergie entre HbO<sub>2</sub> et Hb (0,6 eV).

Pour E<sub>0</sub>, l'énergie du seuil d'adsorption, on retrouve aussi un léger décalage en énergie (0,9 eV), mais toujours la même différence en énergie entre HbO<sub>2</sub> et Hb. Cette différence a été recensée de nombreuses fois et oscille dans les articles entre 3,5 et 6,0 eV comme compilé dans <sup>41</sup>.

A côté de cela, nous avons passé les nanoparticules afin d'avoir la forme du fer dans les nanoparticules. Le spectre est présenté sur la Figure 13A.

On remarque d'abord que le bruit est plus fort sur ces mesures que sur les deux formes de l'hémoglobine. Cela est expliqué par la concentration en fer dans l'échantillon étudié de nanoparticules qui est beaucoup plus faible que celles des échantillons étudiés d'hémoglobine. Le spectre des nanoparticules a une forme caractéristique avec un pré-seuil bien défini et intense à 7114,6 eV et l'énergie du seuil d'adsorption E<sub>0</sub> à 7124,0 eV. Le seuil correspond lui à celui d'un fer +III, comme l'avait déjà montré la RPE.

Ce type de signal ressemble fortement à celui déjà étudié dans de la silice désordonnée mésoporeuse ayant été fonctionnalisée avec des atomes de fer<sup>42</sup>, et qui a été interprété comme du fer III en environnement tétraédrique (Figure 13B)

Les composants seuls participant à l'adsorption ayant été caractérisés, nous pouvons maintenant nous intéresser aux mélanges correspondant à l'adsorption de l'hémoglobine sur les nanoparticules. Pour l'état oxygéné comme désoxygéné de l'hémoglobine, on a étudié deux niveaux d'adsorption où les protéines sont soit adsorbées à 50%, soit 98% sur les nanoparticules de silice. Pour la désoxyhémoglobine adsorbée, la dithionite a été ajoutée au dernier moment sur le mélange oxyHb/NP déjà préparé et directement gelé après, ce qui fait qu'on peut considérer que le pourcentage d'hémoglobine adsorbée n'a pas changé avec le changement de forme. La Figure 14 donne les spectres de ces différents mélanges.

Les spectres mesurés ne peuvent pas être interprétés tel quels. En effet, chaque spectre est la somme de trois espèces de fer : le fer de l'hème de l'hémoglobine adsorbée, le fer de l'hème de l'hémoglobine libre en solution et le fer des nanoparticules. Il faut donc soustraire le signal du fer venant des nanoparticules et de l'hémoglobine libre en solution. Grâce aux analyses venant de l'étude en ICP-MS exposées dans l'introduction, nous avons pu ainsi calculer la contribution de chaque signal pour les deux états. Le Tableau 10 donne ainsi les pourcentages de chaque mélange.

		C(Fe) mM			% Fe		
		Hb libre	Hb adsorbée	NP	Hb libre	Hb adsorbée	NP
50 % ads	37,3 g/L de NP	0,50	0,50	0,17	42,7%	42,7%	14,6%
98 % ads	120 g/L de NP	0,02	0,98	0,55	1,3%	63,3%	35,4%

Tableau 10 : Concentration et proportion des différents types de fer pour les 2 états d'adsorption.

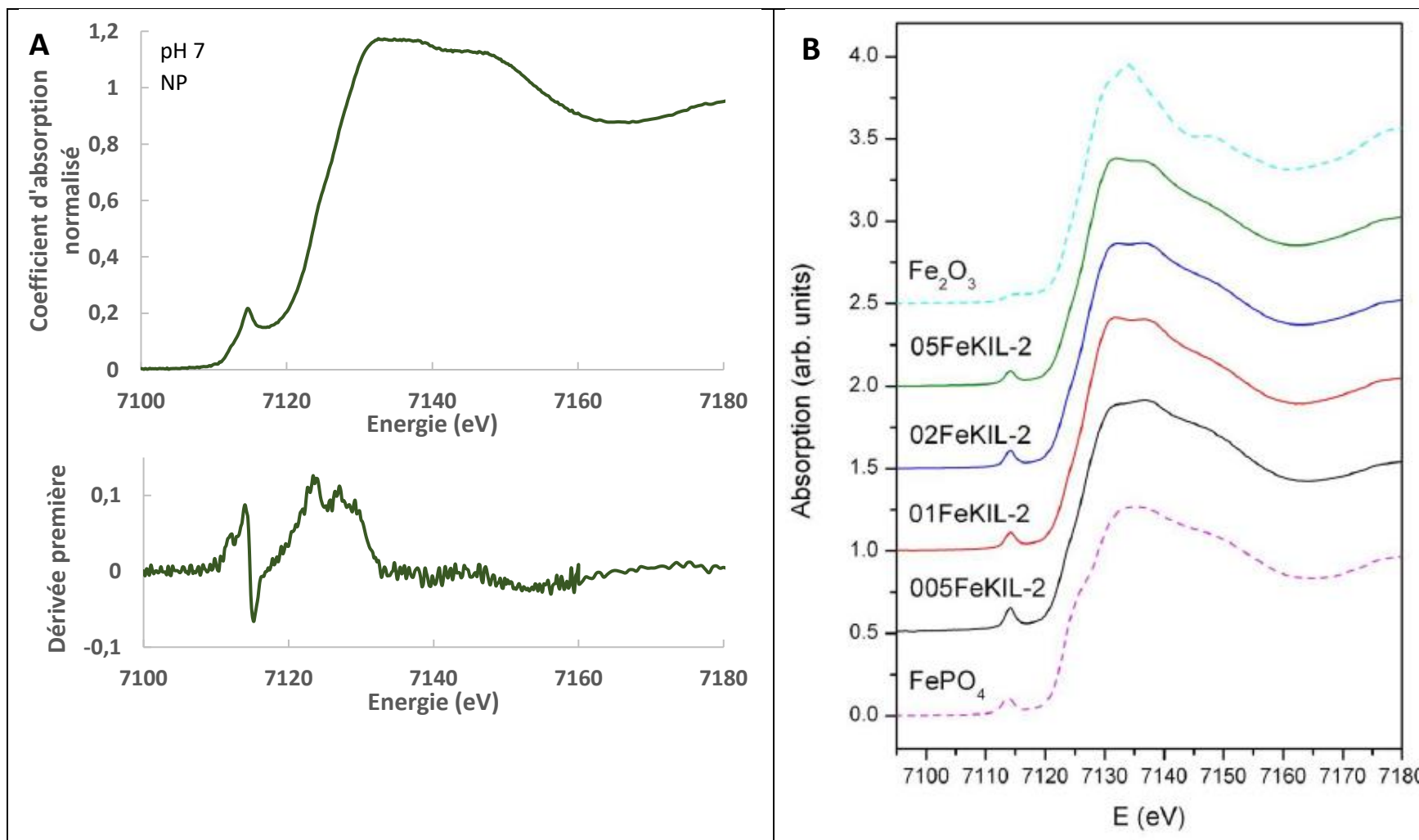


Figure 13A : Spectre XAS et sa dérivée première au seuil K du fer des nanoparticules de silice LUDOX TM-50 en vert foncé. Tampon phosphate 100 mM, pH 7,0. T= 20 K.

Figure B : Spectres XAS au seuil K du fer d'une silice désordonnée mésoporeuse ayant été fonctionnalisée par différentes concentrations de fer, FePO<sub>4</sub> et Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; Tiré de <sup>42</sup>.

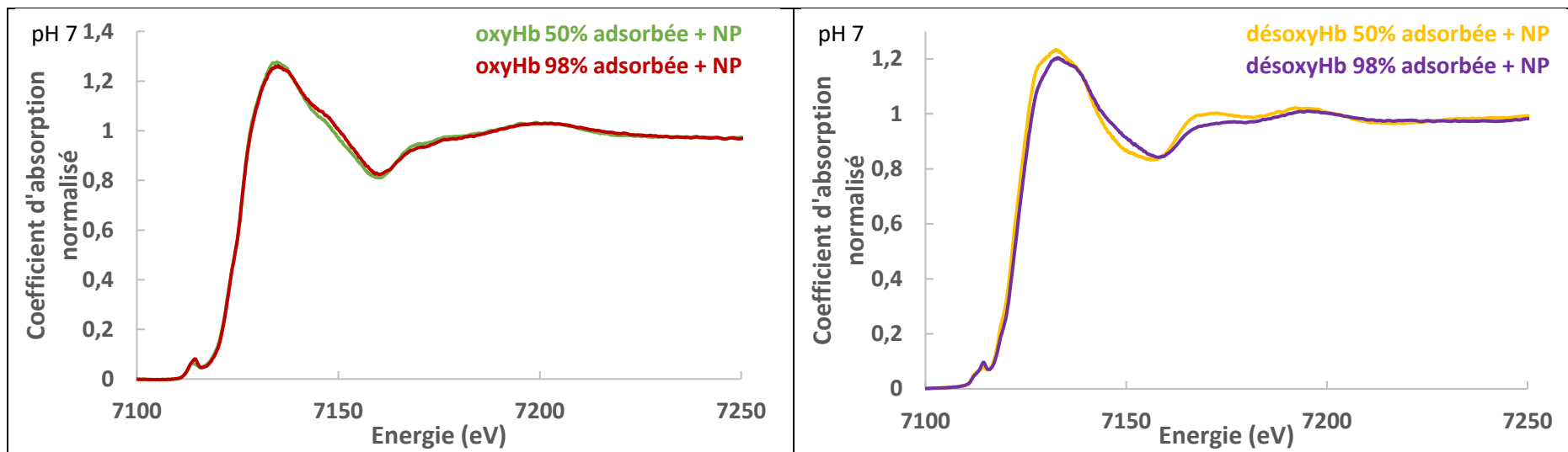


Figure 14 : Spectre XAS au seuil K du fer de :

-l'oxyhémoglobine adsorbée à 50% sur des nanoparticules de silice LUDOX TM-50 en vert ( $C_{Hb}=1,0$  mM,  $C_{NP}=37,3$  g/L).

-l'oxyhémoglobine adsorbée à 98% sur des nanoparticules de silice LUDOX TM-50 en rouge ( $C_{Hb}=1,0$  mM,  $C_{NP}=120$  g/L).

-la désoxyhémoglobine adsorbée à 50% sur des nanoparticules de silice LUDOX TM-50 en jaune ( $C_{Hb}=1,0$  mM,  $C_{NP}=37,3$  g/L).

-la désoxyhémoglobine adsorbée à 98% sur des nanoparticules de silice LUDOX TM-50 en violet ( $C_{Hb}=1,0$  mM,  $C_{NP}=120$  g/L).

Tampon phosphate 100 mM, pH 7,0. T= 20 K.

On calcule le signal de l'hémoglobine adsorbée en utilisant les proportions du Tableau 10 et avec l'équation 7 :

$$I^{Hb\ ads} = I^{mélange} - \%^{Hb\ non\ ads} \cdot I^{Hb} - \%^{NP} \cdot I^{NP}$$

(éq.7)

Cette estimation est basée sur deux hypothèses :

- le fer des nanoparticules, impureté située à l'intérieur des nanoparticules, n'est pas impacté par l'adsorption de l'hémoglobine, phénomène se faisant en surface ;
- l'hémoglobine libre n'a pas son état du fer modifié par la simple présence des nanoparticules en solution.

Nous avons décidé de retirer le signal du fer des nanoparticules et de l'hémoglobine libre pour obtenir le spectre de l'hémoglobine adsorbée, le bruit du signal obtenu étant minime contrairement à la RPE. La Figure 15 présente les spectres de l'hémoglobine adsorbée seule pour les deux conditions d'adsorption, pour l'état oxygéné et désoxygéné.

Nous ne risquons pas à faire une analyse du pré-seuil. En effet, cette partie du spectre est très affectée par la soustraction. Il est difficile de savoir si les changements constatés sont vrais ou s'ils viennent d'erreurs dans la soustraction. Sinon, pour la désoxyhémoglobine, avec ou sans adsorption, il n'y a pas de différences sur la forme du spectre XANES. Les dérivées premières sont en effet superposables, indiquant que la distribution électronique et le degré d'oxydation du fer sont inchangés avec l'adsorption.

Si on se penche sur la forme oxyHb, on voit qu'on a des différences d'intensité sur deux bandes significatives, appelées C1 et D, repérées sur le spectre de l'oxyHb (Figure 15). Dans le modèle de Bianconi<sup>43</sup>, ces deux bandes ont une signification physique précise. La bande C1 est due à la diffusion multiple d'électrons dans l'axe normal au plan de l'hème et interagissant donc avec la molécule de dioxygène. Les changements de l'intensité de la bande C1 permettent de sonder la distance de la liaison Fe-O et l'angle Fe-O-O. La bande D est quant à elle liée à la diffusion multiple dans le plan xy, qui est celui de la porphyrine et est donc surtout sensible à la position des atomes de la porphyrine. Les changements d'intensité des deux bandes semblent indiquer que nous avons un changement dans la géométrie de l'hème.

Pour la désoxyHb, on constate aussi une différence autour du maximum du spectre. Aucun article de la littérature que nous avons consulté attribue les différentes bandes à des directions privilégiées dans la structure tridimensionnelle de l'hème contrairement à l'oxyHb. Toutefois, il a été montré que la forme du spectre est liée à la géométrie de l'hème<sup>37,44,45</sup>. Il semble donc que les différences constatées montrent aussi une déformation de l'hème.

Le résultat montre au final que l'hème garde sa structure en très grande partie. Toutefois, les changements d'intensité prouvent qu'il y a sans doute une déformation de la poche de l'hème de l'hémoglobine avec l'adsorption aussi bien dans son état oxygéné que désoxygéné. Ces changements peuvent donc affecter les propriétés de fixation du dioxygène. Afin de confirmer, il est utile de se pencher sur l'étude de la bande de Soret par dichroïsme circulaire pour étudier l'hème.

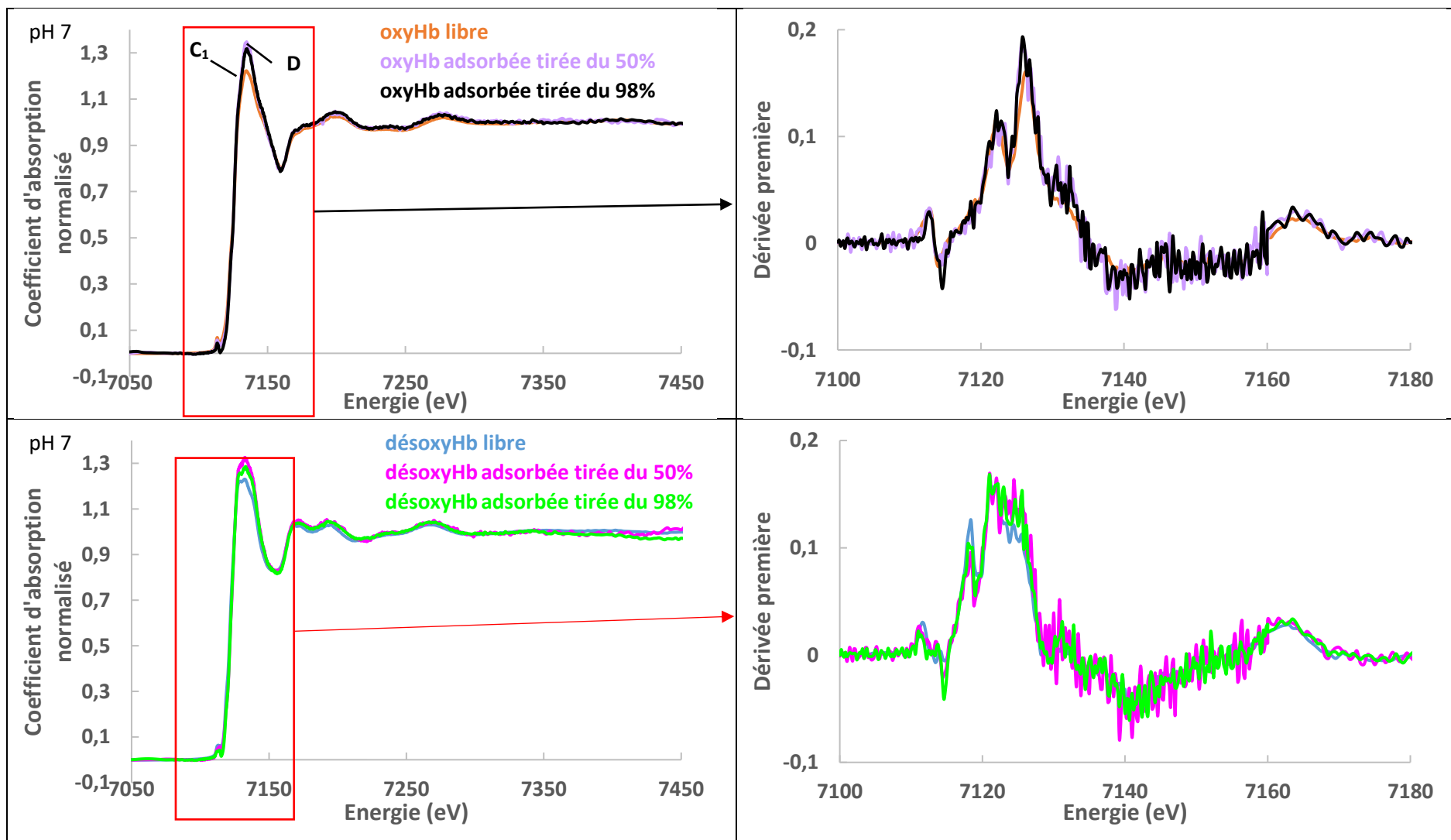


Figure 15 : Spectre XAS et sa dérivée première au seuil K du fer de :  
 -l'oxyhémoglobine non adsorbée en orange.  
 -l'oxyhémoglobine adsorbée seule tirée du signal à 50% en violet clair.  
 -l'oxyhémoglobine adsorbée seule tirée du signal à 98% en noir.

-la désoxyhémoglobine non adsorbée en bleu clair.  
 -la désoxyhémoglobine adsorbée seule tirée du signal à 50% en rose.  
 -la désoxyhémoglobine adsorbée seule tirée du signal à 98% en vert clair.  
 Tampon phosphate 100 mM, pH 7,0. T = 20K.



### 3) Dichroïsme circulaire de la bande de Soret

Le dichroïsme circulaire existe seulement pour les milieux absorbants et chiraux. Cela fonctionne en pratique pour des chromophores chiraux, c'est-à-dire des groupements chimiques absorbant à certaines longueurs et ayant une des propriétés suivantes :

- être intrinsèquement chiral ;
- posséder une liaison covalente entre le chromophore et un centre chiral ;
- le groupement absorbant est dans un environnement asymétrique<sup>46</sup>.

La bande qu'on retrouve vers 400 nm dans le spectre UV visible des hémoprotéines est appelée bande de Soret. Elle provient d'une transition  $\pi-\pi^*$  dans l'hème, de l'état S0 vers S2. Une étude en dichroïsme circulaire sur la bande de Soret nous permet donc d'apporter des informations utiles sur la symétrie locale de l'ensemble du chromophore.

En effet, l'hème libre seul est optiquement actif en dichroïsme circulaire, mais dans une matrice protéique, il se produit un couplage électronique de l'hème avec des groupements aromatiques ou peptidiques, enrichissant la bande de Soret d'informations caractéristiques. Il a été montré que le spectre dichroïque de la bande de Soret est sensible à l'état d'oxydation de l'hème, du ligand et aux interactions chaîne-chaîne. Toutefois, le dichroïsme circulaire de la bande de Soret est plus complexe à analyser que le dichroïsme circulaire dans l'ultra-violet. Il est difficile de savoir quelles interactions donnent les différentes contributions<sup>47-49</sup>.

Pour bien comprendre le dichroïsme circulaire de façon théorique, il est nécessaire d'introduire la force rotationnelle. Elle a été définie par Moscovitz en 1960<sup>50</sup> comme étant la partie imaginaire du produit scalaire du moment dipolaire électrique par le moment dipolaire magnétique. La force rotationnelle est donc donnée par l'équation 8 pour une transition de l'état fondamental 0 à l'état excité a :

$$R_{0a} = \text{Im}\{ \langle \Psi_0 | \hat{\mu} | \Psi_a \rangle \cdot \langle \Psi_a | \hat{m} | \Psi_0 \rangle \}$$

(éq.8)

Avec  $\Psi_0$  et  $\Psi_a$ , les fonctions d'ondes des deux états,  $\hat{\mu}$  et  $\hat{m}$ , respectivement les opérateurs du moment dipolaire électrique et magnétique.

Il y a activité en dichroïsme circulaire si la force rotationnelle est non nulle. L'équation 8 permet de bien comprendre les conditions nécessaires pour qu'on puisse avoir une activité en dichroïsme circulaire. Cette formule, théorique, permet ainsi de faire des simulations. Mais on retrouve en pratique la force rotationnelle sur le spectre dichroïque. En effet, elle est proportionnelle à l'aire sous la bande d'adsorption de la transition correspondante comme le montre l'équation 9 :

$$R_{0a} = \frac{3000 \cdot h \cdot c \cdot \ln(10)}{32\pi^3 N_A} \int_0^{+\infty} \frac{\Delta\varepsilon_{0a}(\lambda)}{\lambda} \cdot d\lambda$$

(éq.9)

Avec h, la constante de Planck, c, la célérité de la lumière,  $N_A$ , la constante d'Avogadro,  $\lambda$ , la longueur d'onde et  $\Delta\varepsilon_{0a}$ , le dichroïsme circulaire de la bande correspondante à la transition 0->a.

Avec la formule théorique, il est possible d'effectuer des simulations de force rotationnelle à l'aide de calcul de chimie quantique. Il est alors possible par comparaison à la pratique de comprendre la

structure électronique autour de l'élément absorbant en testant différentes configurations théoriques.

Pour ce qui nous intéresse ici, dans le cas des hémoprotéines, le dichroïsme circulaire de la bande de Soret et donc la force rotationnelle provient de trois phénomènes indépendants<sup>48</sup>. La force rotationnelle est, au final, une somme de ces composantes comme le montre l'équation 10 :

$$R_{tot} = R_{aro} + R_{pep} + R_{int} \quad (\text{éq.10})$$

Avec  $R_{int}$ , la force rotationnelle intrinsèque de l'hème ;

$R_{aro}$ , la contribution venant du couplage avec les transitions des chaînes latérales aromatiques ;

$R_{pep}$ , la contribution venant du couplage avec le squelette de la chaîne peptidique et des chaînes propionates latérales de l'hème ;

$R_{tot}$ , la force rotationnelle totale.

Ainsi, pour la myoglobine, dans une étude en dynamique moléculaire<sup>51</sup>, il a été remarqué que la non-planarité de l'hème donnait 30% de la force rotationnelle, le couplage avec les transitions aromatiques 40% et le couplage avec la chaîne peptidique 30%.

Pour faire une mesure, on envoie alors sur l'échantillon une lumière polarisée plane combinant deux composantes de même intensité, une composante polarisée circulairement vers la droite et l'autre polarisée circulairement vers la gauche. En mesurant la différence entre l'absorbance de la lumière polarisée gauche et celle de la lumière polarisée droite (noté  $\Delta A$ , sans unité) pour une gamme de longueurs d'onde, on a alors un spectre dichroïque.

L'unité absolue pour la mesure est le dichroïsme circulaire  $\Delta\epsilon$  (en L/mol/cm), équivalent du coefficient d'extinction molaire. Mais pour les protéines où la mesure de l'absorbance est liée au nombre de liaisons peptidiques, afin de comparer de façon efficace les spectres dichroïques de protéines qui peuvent être de masses molaires très différentes, on utilise comme unité le dichroïsme circulaire ramené au nombre d'acides aminés. On a donc l'équation 11 :

$$\Delta\epsilon = \frac{\Delta A}{l \cdot C \cdot m} \quad (\text{éq.11})$$

Avec  $l$ , la longueur de l'échantillon mesuré (cm),  $C$  la concentration molaire en protéine (mol/L) et  $m$ , le nombre d'acides aminés de ladite protéine.

Le dichroïsme circulaire a donc été utilisé pour comprendre les effets sur l'hème de l'adsorption à pH 7, le pH 9 servant de témoin sans adsorption.

Les expériences ont été faites en collaboration avec Stéphanie Devineau sur le spectrographe du Laboratoire Léon Brillouin. Pour obtenir la forme désoxygénée de l'hémoglobine, du dithionite de sodium a été utilisé à 10 g/L. Les spectres en contenant n'ont pas été présentés en dessous de 380 nm, le dithionite de sodium ayant son propre signal à ces longueurs d'onde, il n'aurait pas été pertinent de les représenter. La Figure 16 présente donc les spectres en dichroïsme circulaire de ces mélanges avec les témoins hémoglobine libre.

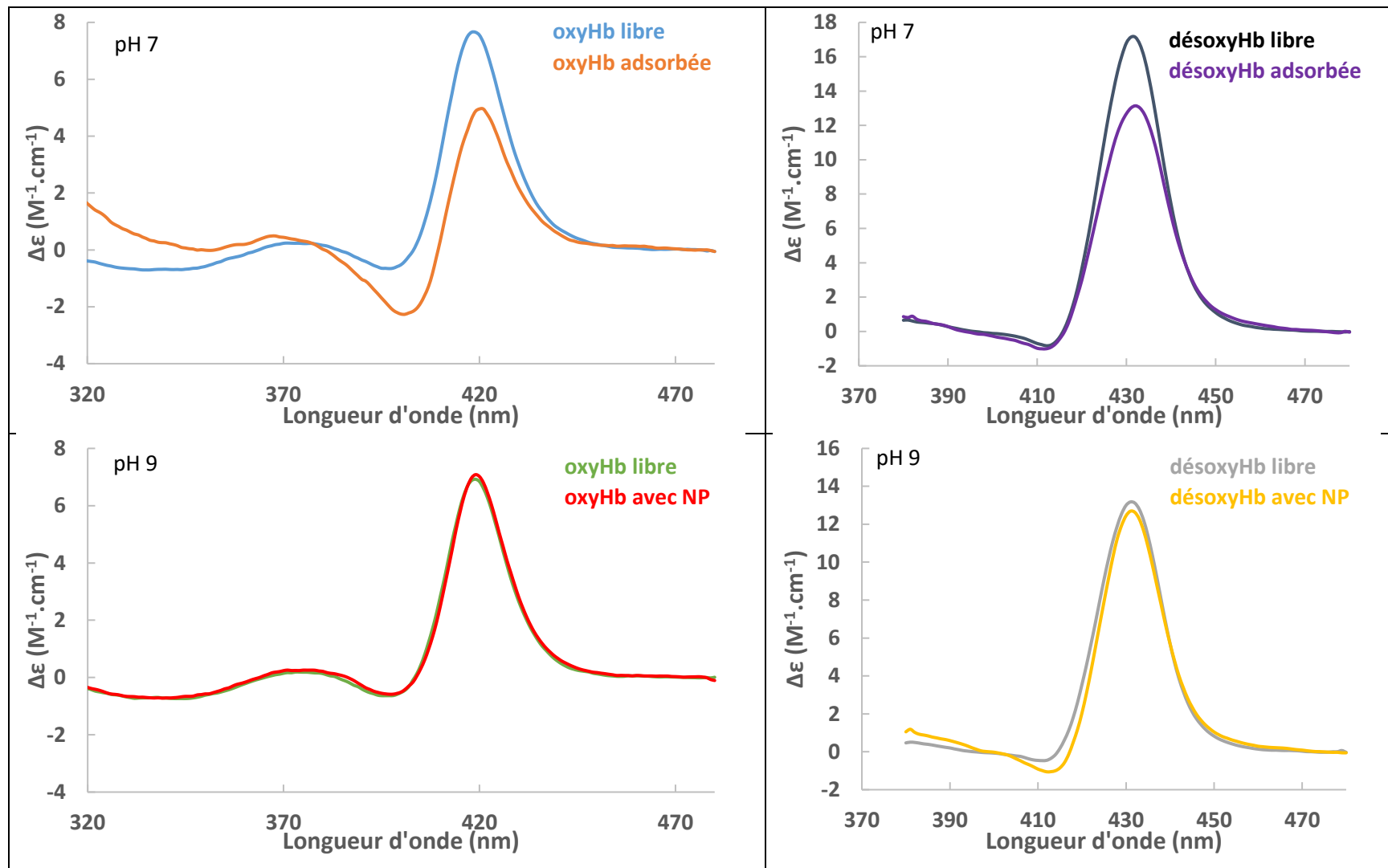


Figure 16 : Spectres de dichroïsme circulaire de : Bleu: OxyHb (1 mM), tampon phosphate 100 mM pH 7 Orange: OxyHb adsorbée à plus de 98 % sur des NP (1 mM/100 g/L), tampon phosphate 100 mM pH 7, Noir : DésoxyHb (1 mM), tampon phosphate 100 mM pH 7, Violet : DésoxyHb adsorbée à plus de 98 % sur des NP (1 mM/100 g/L), tampon phosphate 100 mM pH 7, Vert: OxyHb (1 mM), tampon ammonium 5 mM pH 9, Rouge: OxyHb au contact de NP (1 mM/100 g/L), tampon ammonium 5 mM pH 9, Gris: DésoxyHb (1 mM), tampon ammonium 5 mM pH 9, Jaune: DésoxyHb au contact de NP (1 mM/100 g/L), tampon ammonium 5 mM pH 9 Pour la forme désoxyHb, le signal n'est pas représentée en dessous de 380 nm car le signal est marqué par la présence de la dithionite de sodium nécessaire pour former la désoxyHb.

Pour la forme oxygénée à pH 7 comme 9, on retrouve la forme du spectre telle qu'elle a été présentée à de nombreuses reprises dans la littérature avec un maximum fort à 418 nm et un léger minimum à 398 nm ; idem avec la forme désoxygénée, avec elle un fort maximum à 432 nm et un léger minimum à 414 nm.<sup>52</sup> Les spectres de la littérature sont présentés Figure 17.

A pH 9, en présence de nanoparticules, il n'y a aucun changement notable dans le spectre pour la forme oxygénée ou désoxygénée. A pH 7, des changements ont lieu avec l'adsorption. Sur la forme oxygénée, le spectre présente une diminution de la bande positive et l'apparition d'une bande négative nette avec un maximum à 420 nm et un minimum à 401 nm. Sur la forme désoxygénée, il y a une diminution notable de la bande positive, mais aucune apparition d'une bande négative nette. On a donc une diminution de la force rotationnelle pour les deux formes.

Cette bande négative dans le spectre a déjà été remarquée pour des hémoglobines A humaines recombinantes avec un hème inversé. La Figure 17 présente les spectres des deux types d'hémoglobine avec un schéma indiquant la disposition de l'hème. On peut remarquer pour les deux formes avec l'hème inversé que les spectres sont très proches de ceux que nous avons pour l'hémoglobine adsorbée. Toutefois, le retournement de l'hème avec l'adsorption est difficilement crédible car requiring un mécanisme trop complexe.

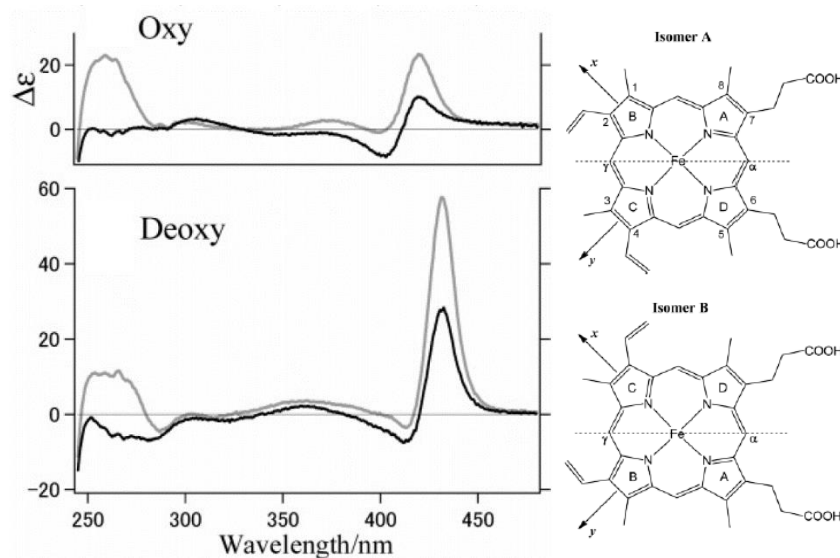


Figure 17 : Spectres en dichroïsme circulaire de la forme classique de l'hémoglobine en gris et l'hémoglobine recombinante avec un hème inversé en noir (tiré de<sup>47</sup>) avec les deux formes, A étant l'hème classique et B, l'hème inversé (tiré de<sup>48</sup>).

Une autre étude concernant des dimères de tétramères d'hémoglobine obtenus par réticulation chimique, présente cette même bande négative et les auteurs interprètent les différences observées sur le spectre dichroïque comme des altérations de l'environnement autour de l'hème<sup>53</sup>.

Cela va avec certaines simulations qui ont réussi à reproduire une force rotationnelle négative<sup>51</sup>. En particulier, la force rotationnelle peut grandement être modifiée par le changement de l'angle dièdre décrivant la conformation des groupes vinyliques de l'hème<sup>48</sup>. La Figure 18 présente le changement de la force rotationnelle en fonction de ces angles et la définition de ces angles.

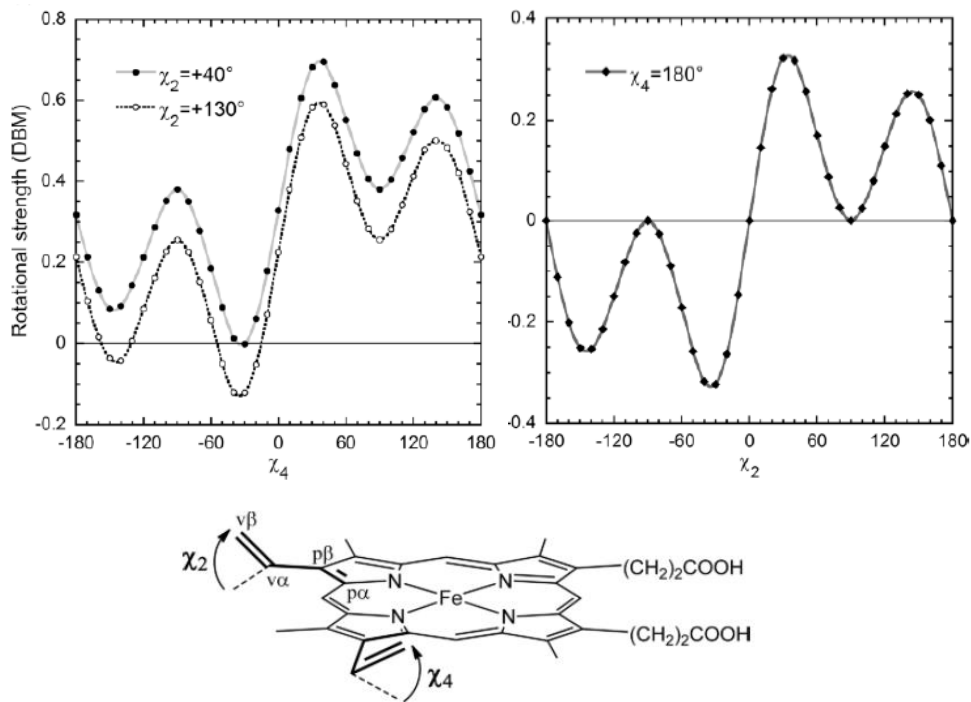


Figure 18 : Force rotationnelle en fonction de l'angle des groupes vinyliques de l'hème avec un schéma représentant cet angle. Tiré de <sup>48</sup>.

On peut donc penser que l'adsorption peut occasionner une réorganisation des fonctions latérales autour de l'hème occasionnant ce changement dans le spectre. Si de tels changements ont lieu, on peut penser qu'ils peuvent en partie expliquer la différence d'affinité constatée auparavant si la nouvelle position des fonctions vinyliques favorise l'approche et le départ du dioxygène.

Il est donc possible qu'il y ait des changements dans les angles des fonctions latérales qui peuvent être causés par une modification de la poche de l'hème. Ce constat complète les changements sondés par la spectroscopie d'adsorption X. La RPE nous donne l'information que la structure électronique du fer n'est en revanche pas modifiée.

## IV- Modifications de la globine

### 1) Etude de la structure secondaire avec le dichroïsme circulaire dans le domaine UV-proche

Afin d'étudier la structure secondaire des protéines, les méthodes quantitatives ne sont pas nombreuses. Cela est faisable par acquisition de spectres infrarouges. En effet, pour les protéines, chaque type de structurations secondaires donne une bande caractéristique dans la bande amide. En déconvoluant, il est possible de savoir les différentes structures secondaires avec leur proportion relative. D'autres techniques permettent d'appréhender de façon globale la structure comme la diffusion de rayons X aux grands angles, mais ne permettent pas de quantifier de façon optimale. On peut aussi penser à l'utilisation de la radiocristallographie, mais celle-ci requiert de cristalliser nos échantillons dans leur condition d'adsorption ou de contact avec les nanoparticules.

Pour étudier les structures secondaires de l'hémoglobine dans des mélanges de cette dernière avec des nanoparticules de silice, la technique utilisée ici a été la spectroscopie de dichroïsme circulaire.

Pour bien expliquer cette technique, il est intéressant de partir sur une approche différente de l'explication donnée pour le dichroïsme circulaire de la bande de Soret.

Pour l'étude qui nous intéresse, on utilise la propriété que les structures secondaires sont chirales et absorbent dans le domaine ultraviolet. En dessous de 240 nm, l'absorption correspond à la transition  $n \rightarrow \pi^*$  (bande large à 220 nm) et à la transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  (bandes plus intenses à 190 et 208 nm) des liaisons peptidiques. Cela fait que chaque structure présente donc chacune un spectre dichroïque caractéristique (Figure 19).

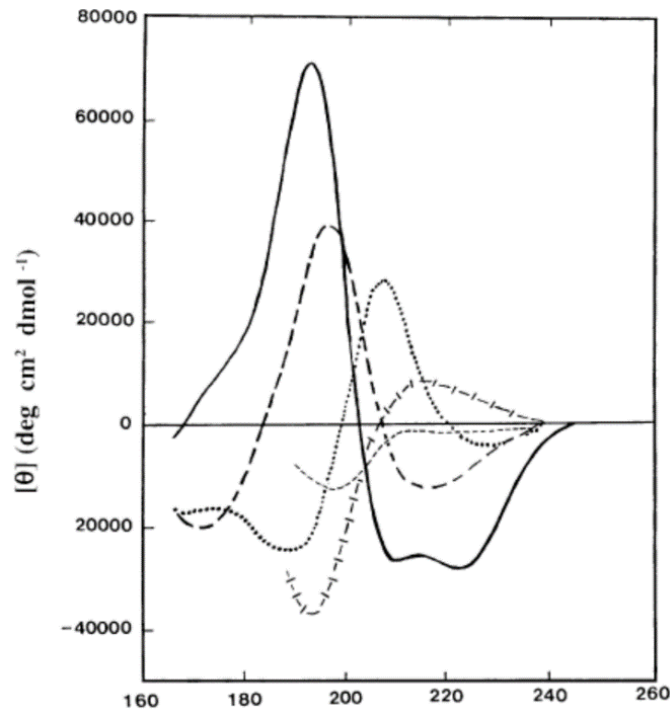


Figure 19 : Spectres de dichroïsme circulaire donnant les signaux caractéristiques des différents types de structure secondaire des protéines : trait plein : hélices ; trait interrompu fort : feuillets ; pointillés : coudes ; trait interrompu barré : hélices PP II ; trait interrompu fin : structure pelote aléatoire (random coil) Tiré de <sup>46</sup>.

Le spectre dichroïque d'une protéine est analysé en considérant que ce spectre est une combinaison linéaire des spectres de chaque type de structures secondaires pondérés par leur proportion relative dans la protéine. En déconvoluant un spectre, il est donc possible de connaître les différents types de structures secondaires présentes et leurs proportions.

D'autres moyens qualitatifs existent, utilisant par exemple le rapport de pics  $r_\alpha = \Delta\epsilon(222\text{nm})/\Delta\epsilon(208\text{nm})$  permettant d'obtenir des informations sur l'absence ou présence d'interactions intra- et inter-hélicoïdales dans les protéines oligomériques<sup>54</sup>. Le ratio  $r_\alpha$  est utilisé afin de distinguer deux états structuraux des hélices<sup>55-58</sup> :

- Lorsque  $r_\alpha < 1$ , les hélices n'ont pas d'interactions entre elles ;
- Lorsque  $r_\alpha > 1$ , il y a de fortes interactions intra- et inter-hélices. On peut penser à la structure superhélice (ou coiled coil) (des hélices sont enroulées ensemble les unes autour des autres et forment une structure tertiaire propre).

Les expériences ont été effectuées en collaboration avec Daniel Sanchez-Guzman et Stéphanie Devineau sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL avec l'aide du Docteur Franck Wien. L'avantage de

faire les expériences en utilisant un flux de lumière synchrotron est d'exploiter l'UV lointain, riche en information (en dessous de 200 nm) et d'avoir un flux suffisamment puissant pour traverser des échantillons qui sont très absorbants dans ces domaines de longueurs d'onde.

Le but du travail a été d'étudier l'effet de l'adsorption des formes oxygénée et désoxygénée de l'hémoglobine sur des nanoparticules de silice à pH 7 (Figure 20A et B). A pH 9, des mesures ont été faites pour les mêmes concentrations de Hb et de NP comme témoin. Pour obtenir la forme désoxygénée de l'hémoglobine, du dithionite de sodium a été utilisé à 10 g/L (Figure 20C).

Les maxima à 194, 209 et 222 nm montrent que nous avons des hélices comme structures secondaires dominantes, cela pour Hb libre ou adsorbée, oxyHb ou désoxyHb, pH 7 ou 9. Toutefois, on s'aperçoit qu'à pH 7 l'adsorption a un effet sur la forme du spectre, donc sur la structure secondaire. L'intensité relative de l'oxyHb adsorbée décroît à 209 et 194 nm tandis que la bande à 222 nm n'est pas affectée. Le ratio  $\Delta\epsilon(222\text{nm})/\Delta\epsilon(208\text{nm})$  est égal à 1,08 pour l'oxyHb libre et est de 1,51 pour l'oxyHb adsorbée. Cette augmentation indique une augmentation des interactions des hélices entre elles.

Pour la désoxyHb adsorbée, le signal décroît à 222, 209 et 194 nm. Le ratio  $\Delta\epsilon(222\text{nm})/\Delta\epsilon(208\text{nm})$  est égal à 1,18 pour la désoxyHb libre et est de 1,60 pour la désoxyHb adsorbée. Cette augmentation indique une augmentation de la compacité des hélices liée à de plus fortes interactions des hélices entre elles. Toutefois, le changement d'intensité à 222 nm indique qu'il y a un effet de l'adsorption sur toute la protéine et pas seulement en bout d'hélices si on considère que la normalisation a été faite proprement.

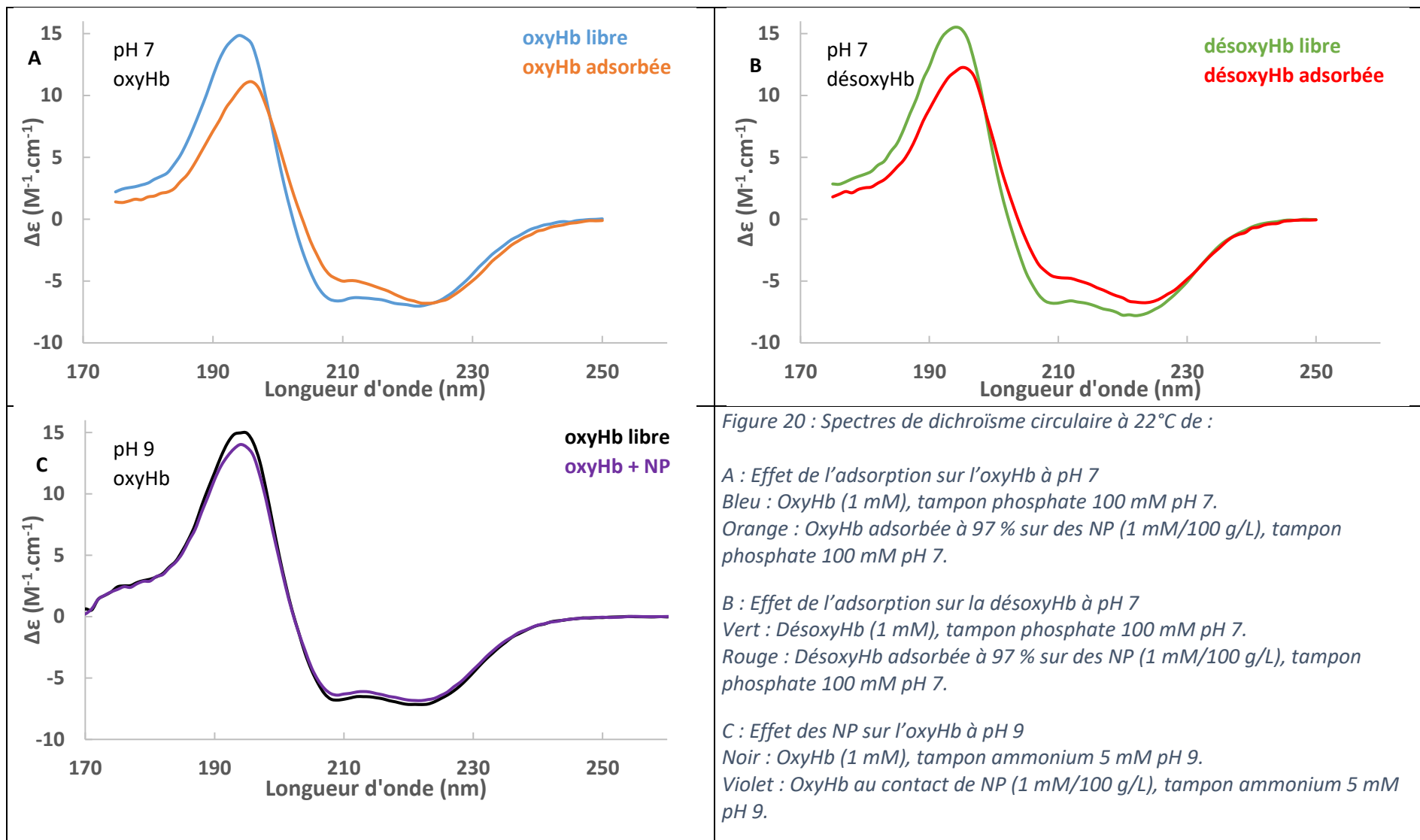
A pH 9, l'effet de la présence des nanoparticules est quasi nul ou dans l'erreur liée à la mesure (le rapport évolue par exemple de 1,07 à 1,09).

Au-delà des études qualitatives, il a été procédé à des études quantitatives. Pour cela, la structure secondaire de l'hémoglobine de porc dans les différents mélanges a été déterminée par déconvolution de leurs spectres dichroïques par la méthode BeStSel<sup>59,60</sup>. On a alors comparé les résultats à la structure secondaire venant de la structure cristallographique de l'oxyHb porcine (1QPW.pdb dans la Protein Data Base (PDB), calcul fait aussi avec BeStSel). Le Tableau 11 donne les proportions dans les différentes conditions.

	1QPW	oxyHb pH7		désoxyHb pH7		oxyHb pH9	
	Sans NP	Sans NP	Avec NP	Sans NP	Avec NP	Sans NP	Avec NP
Feuillets antiparallèles (%)	0	0	0	0	0	0	0
Feuillets parallèles (%)	0	3	1	6	6	3	4
Coudes (%)	9	7	13	8	13	7	8
Hélices régulières (%)	49	42	34	43	35	42	40
Hélices distordues (%)	19	25	26	24	23	25	24
Total hélices (%)	67	67	59	67	58	67	64
Autres (%)	24	23	27	19	23	23	24

Tableau 11 : Pourcentage des différentes structures secondaires de l'hémoglobine dans différentes conditions, oxyHb porcine de la PDB (1QPW) comme référence

On voit que la structure de l'hémoglobine telle que recensée dans la PDB est faite majoritairement faits d'hélices avec un peu de coudes. On retrouve cela pour les différents mélanges sans nanoparticules, les résultats du dichroïsme circulaire sont donc en accord (les pourcentages de feuillets sont très faibles, il s'agit d'artéfacts de l'ajustement. De plus, il est clair que la forme (oxy ou désoxy) ou le pH ne change qu'à la marge la structure secondaire de l'hémoglobine libre.





Avec l'adsorption sur les nanoparticules à pH 7 tant pour la forme oxygénée que désoxygénée, on remarque sur la structure secondaire de l'hémoglobine une baisse de la quantité d'hélices (13 %). La baisse est surtout localisée sur les hélices régulières (milieu des hélices  $\alpha$  et  $3_{10}$ ), les hélices distordues (bouts des hélices  $\alpha$  et  $3_{10}$ ) n'étant pas affectées. Pour les autres types de structures, on remarque des changements dans les proportions, mais celles-ci sont en dessous de 5 % et il est difficile de conclure une tendance nette sur ses structures déjà minoritaires sans adsorption. En présence de nanoparticules à pH 9, il n'y a aucun changement notable sur la structure secondaire de l'oxyhémoglobine.

L'étude quantitative permet de montrer que l'adsorption de l'hémoglobine sur les nanoparticules diminue la proportion d'hélices dans la structure secondaire de l'hémoglobine. La déstructuration est loin d'être importante, la protéine conserve en grande partie sa structure secondaire avec l'adsorption. L'étude qualitative montre qu'il y a des réorganisations avec l'adsorption, des hélices étant plus en interaction. Pour le témoin à pH 9, les nanoparticules n'affectent en rien la structure secondaire.

Ces résultats et analyses ont été publiés<sup>3</sup> (voir annexe). Afin de parfaire cette étude sur la globine, il est important d'étudier la structure quaternaire de la protéine et l'effet de l'adsorption sur la forme par la diffusion de neutrons aux petits angles.

## 2) Etude par la diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA)

Pour la détermination de structures quaternaires, l'utilisation de la diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA ou SANS en anglais pour small angle neutron scattering) est appropriée. Les échelles spatiales sondées par la DNPA vont du nanomètre à quelques centaines de nanomètres. Pour ce qui nous intéresse, elle permet ainsi d'étudier la structure tertiaire et quaternaire des protéines et de juger les interactions protéines-protéines et pour les gels, la structure locale de ces derniers, comme leur taille de mailles. La DNPA diffère de son équivalent, la diffusion de rayons X aux petits angles (DXPA ou SAXS en anglais pour small angle X-ray scattering) par le fait que les neutrons interagissent avec les noyaux alors que les rayons X interagissent avec les nuages électroniques.

Il faut d'abord introduire le vecteur de diffusion dont la norme est donnée par l'équation 12.

$$q = 4.\pi/\lambda. \sin(\theta/2)$$

(éq.12)

où  $\lambda$  est la longueur d'onde du neutron émis et  $\theta$  est l'angle du neutron diffusé par rapport à la direction du flux non diffusé.

Ces dernières notions sont identiques pour la diffusion de rayons X, le principe étant le même à la différence des éléments diffusés. En exprimant l'intensité diffusée par un échantillon suivant le vecteur de diffusion, on peut décomposer l'intensité diffusée comme montré dans l'équation 13 :

$$I(q) = \Phi.V.\Delta\rho^2.P(q).S(q)$$

(éq.13)

avec :

- $\Phi$ , la fraction volumique (sans unité), proportionnelle au nombre de particules diffusantes ;

- $V$ , le volume des particules diffusantes (en  $\text{cm}^3$ ) ;

$-\Delta\rho^2$ , le terme de contraste en  $\text{cm}^{-4}$  ( $\Delta\rho$  étant la différence entre la densité de longueur de diffusion électronique des objets diffusants et du solvant) ;

$-P(q)$ , le facteur de forme décrivant la forme, taille, masse de l'objet seul ;

$-S(q)$ , le facteur de structure décrivant les interactions de ces objets entre eux. Il tend vers 1 aux grands angles.

Afin d'avoir du signal en DNPA, il est nécessaire que le terme de contraste soit le meilleur possible. Il est impossible d'avoir un signal de qualité en milieu aqueux (hydrogène  $^1\text{H}$ ). L'eau deutérée présente l'avantage de produire une diffusion incohérente des neutrons 40 fois inférieure à celle de l'eau hydrogénée améliorant ainsi le rapport signal/bruit. Il est donc nécessaire d'échanger les protons des molécules étudiées.

En dehors de l'obligation de travailler en milieu deutéré, la DNPA a de nombreux avantages :

-cette technique est plus sensible aux éléments légers, ce qui nous intéresse ici vu la structure organique des protéines ;

-c'est une technique utilisant des flux faibles, donc non destructive pour les échantillons ;

-on peut faire des variations du terme de contraste en modulant la quantité de  $\text{D}_2\text{O}$  et ainsi, faire disparaître un élément diffusant du signal recueilli.

Les expériences ont été faites au Laboratoire Léon Brillouin sur l'appareil PAXY avec l'aide de Fabrice Cousin. Afin de pouvoir comprendre la structure de l'oxyhémoglobine dans les gels, adsorbée ou non sur des nanoparticules, il est déjà nécessaire de comprendre cette structure sur l'oxyhémoglobine seule comme celle des nanoparticules. Ainsi, la Figure 21 donne le spectre pour l'oxyhémoglobine seule et les nanoparticules de silice LUDOX TM-50 (ce dernier signal provient de la thèse de Laurent Marichal<sup>61</sup> s'agissant du même lot utilisé ici).

Pour ce qui est des nanoparticules, un traitement via SASview avec un modèle de facteur de forme de sphère<sup>62</sup> et en rajoutant de la dispersité, a permis de calculer le rayon physique,  $R$  qui est donc de  $13,0 \pm 0,2$  nm.

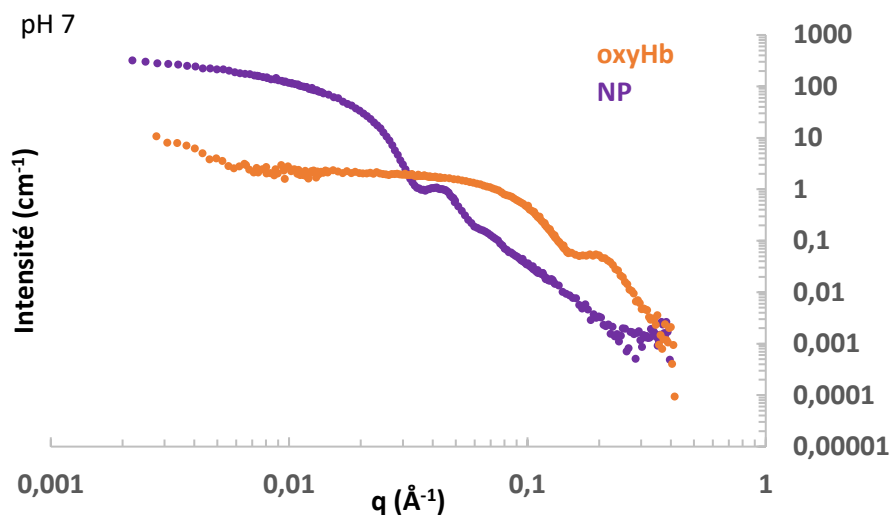


Figure 21 : Spectres DNPA de l'oxyhémoglobine de porc 2,5 mM en orange et des nanoparticules de silice Ludox TM-50 50 g/L en violet, tampon phosphate 0,1 mol.L-1, pH 7,0.

Pour ce qui est de l'oxyhémoglobine, on retrouve la forme décrite dans la littérature<sup>63,64</sup> et ce qui a été mesurée auparavant par l'équipe<sup>61</sup>. Le signal de l'oxyhémoglobine présente aussi deux épaulement à  $q = 0,12$  et  $0,2 \text{ \AA}^{-1}$ , correspondant aux distances intra et inter sous-unités<sup>23</sup>. On peut observer un

plateau aux angles intermédiaires, avec des remontées aux petits angles en dessous de  $6,8 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$ . On peut interpréter ces remontées par une agrégation d'une faible partie des protéines ou des difficultés de soustraction du bruit de fond aux petits angles. En effet, sur cette gamme d'angles, la remontée du faisceau vide est importante et le flux faible.

Sur la zone de  $1,45 \cdot 10^{-2}$  à  $1,45 \cdot 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ , il a été calculé le rayon de giration  $R_g$  via un modèle de Guinier dont voici l'équation 14 :

$$I(q) = I(0)e^{\frac{-R_g^2 \cdot q^2}{3}} \quad (\text{éq.14})$$

On trouve alors un rayon de 2,2 nm. Cette valeur est très proche de la littérature qui indique un rayon de giration de 2,38 nm<sup>12</sup> et de ce qui a été fait auparavant par l'équipe (2,3 nm)<sup>65</sup>.

Afin de pouvoir étudier l'effet de l'adsorption, nous avons testé deux mélanges représentant deux pourcentages d'adsorption différents : oxyHb/NP 2,5 mM/26 g/L (14% oxyHb adsorbée) et 2,5 mM/75 g/L (41% oxyHb adsorbée). La Figure 22 montre les spectres DNPA pour ces deux mélanges avec le signal de l'oxyHb libre en comparaison.

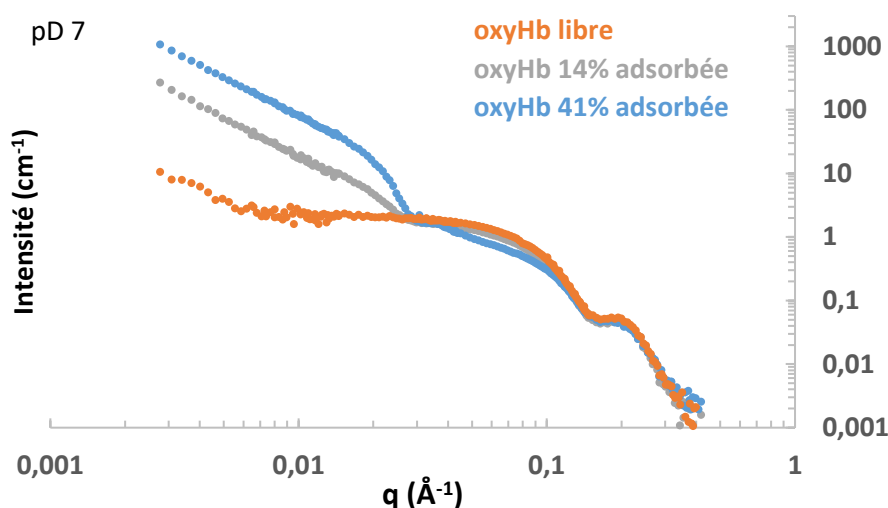


Figure 22 : Spectres DNPA de l'oxyHb libre en orange et de solutions de ratios oxyHb/NP 2,5 mM/26 g/L (14% oxyHb adsorbée) en gris et 2,5 mM/75 g/L (41% oxyHb adsorbée) en bleu, tampon phosphate 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pD 7,0.

Aux ratios oxyHb/NP que nous utilisons, les nanoparticules ont un taux de couverture proche de 100%. On constate que le signal caractéristique des NP est apparent vers  $4,0 \cdot 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$  bien que cette bosse se soit décalée vers les petits angles, signifiant une augmentation du rayon. Si on considère que les nanoparticules sont recouvertes des protéines et qu'on a donc une plus grande sphère, il est normal de mesurer cette augmentation du rayon.

Afin de pouvoir étudier le signal de oxyHb adsorbée dans les mélanges, il est nécessaire de retirer la contribution d'oxyHb libre. Pour cela, il faut d'abord déterminer le facteur de forme de l'oxyhémoglobine avec précision afin de s'affranchir des remontées parasites aux petits angles. En partant de l'oxyhémoglobine seule, un facteur de forme de l'oxyhémoglobine a donc été calculé sur toute la gamme d'angles en conservant les points mesurés pour  $q > 0,012 \text{ \AA}^{-1}$  et en gardant les points de l'ajustement de Guinier aux petits angles afin de s'affranchir des remontées parasites (Figure 23).

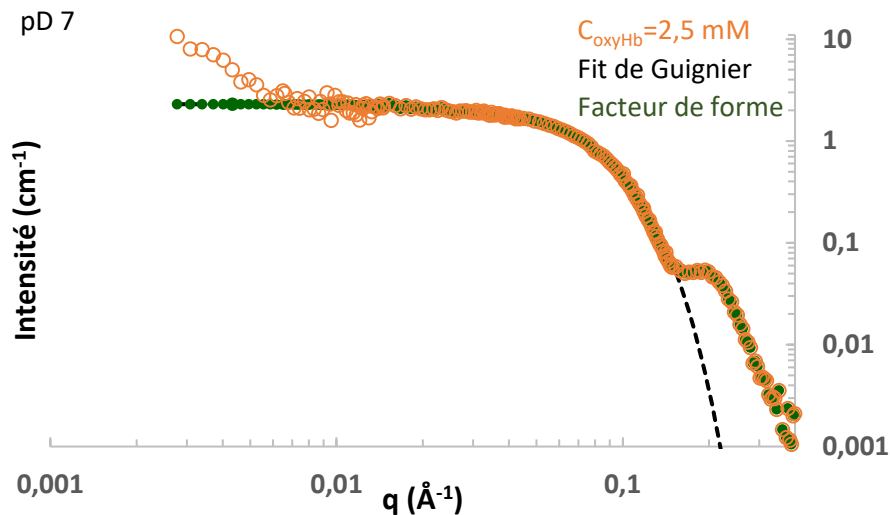


Figure 23 : Spectres DNPA à 25°C de l'oxyhémoglobine à 2,5 mM en orange, du fit de Guignier en pointillés noirs et facteur de forme de l'oxyhémoglobine en vert foncé, pD 7,0 tampon phosphate 100 mM.

Il est impossible d'avoir le signal d'oxyHb adsorbée seule. En effet, il faudrait aussi enlever la participation des NP, mais le signal de ces dernières dans le mélange est inconnu étant donné que, comme expliqué plus haut, elles ont changé de formes. On ne peut mesurer que l'intensité de l'assemblage NP/oxyHb adsorbée. Pour cela, il faut prendre les intensités des mélanges mesurées expérimentalement auquel on soustrait la proportion d'oxyHb libre par le facteur de forme de l'oxyhémoglobine comme expliqué par l'équation 15.

$$I(q)^{assemblage} = I(q)^{mélange} - \%^{non\ ads} \cdot P(q)^{oxyHb} \quad (\text{éq.15})$$

Le signal de l'oxyHb adsorbée extrait est exposé dans la Figure 24 avec le signal de l'oxyHb libre en comparaison.

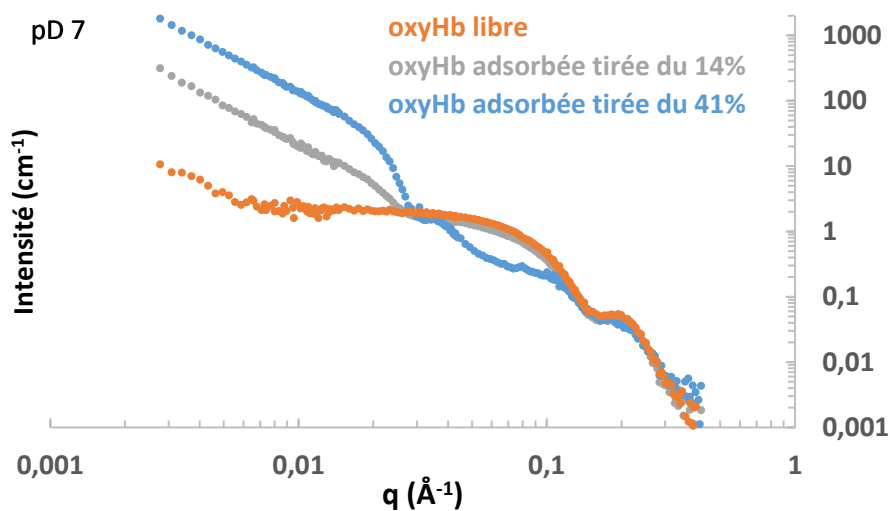


Figure 24 : Spectres DNPA de l'oxyHb libre en orange et spectres de l'oxyHb adsorbée tirés du signal de solutions de ratios oxyHb/NP 2,5 mM/26 g/L (14% oxyHb adsorbée) en gris et 2,5 mM/75 g/L (41% oxyHb adsorbée) en bleu, tampon phosphate 0,1 mol.L-1, pD 7,0.

On retrouve encore le signal des NP aux angles intermédiaires. Pour les plus grands vecteurs d'onde, les NP n'ayant pas de signal sur cette gamme, on peut étudier directement l'oxyHb adsorbée. On retrouve le même spectre que pour l'oxyhémoglobine libre au-delà de  $1,0 \cdot 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ , ce qui montre que l'oxyhémoglobine conserve sa forme et sa structure même adsorbée. Cela avait déjà été constaté dans l'équipe<sup>65</sup>. La partie aux plus petits angles n'est pas étudiée ici, cette partie étant riche en information sur la structuration de l'assemblage et non sur la forme de la globine qui est le point qui nous intéresse ici. Les différentes études montrent donc que la structure globale de l'oxyhémoglobine ne change pas avec l'adsorption. Les changements de l'oxygénation avec l'adsorption ne peuvent donc pas être corrélés à la globine étant donné qu'elle garde son intégrité. La dernière question posée pour les assemblages Hb/NP était la structure hémoglobine-nanoparticule, ce qui va être abordé dans la dernière partie de ce chapitre.

## V- Compréhension de l'assemblage nanoparticules-hémoglobine

### 1) Structure de l'assemblage par diffusion de neutrons aux petits angles

Afin de comprendre la structure de l'assemblage oxyHb/NP, il est possible d'étudier plus en détails les résultats liés à la diffusion aux petits angles. On va donc travailler pour obtenir le facteur de structure afin de pouvoir caractériser l'assemblage. Un ajustement global est en revanche compliqué dans la région des angles intermédiaires dans laquelle les contributions d'oxyHb adsorbée et des NP se mélangent. En divisant l'intensité de l'assemblage NP/oxyHb adsorbée par le facteur de forme et en normalisant à 1 aux grands angles, on obtient le facteur de structure voulu. L'équation 16 présente ainsi le calcul effectué pour obtenir le facteur de structure de l'assemblage.

$$S(q)^{assemblage} = \frac{I(q)^{assemblage}}{P(q)^{oxyHb}}$$

(éq.16)

Le facteur de structure a été calculé pour le mélange avec le plus de protéines adsorbées (41% d'oxyHb adsorbée) afin d'avoir un résultat satisfaisant. Le facteur de structure est ainsi présenté sur la Figure 25.

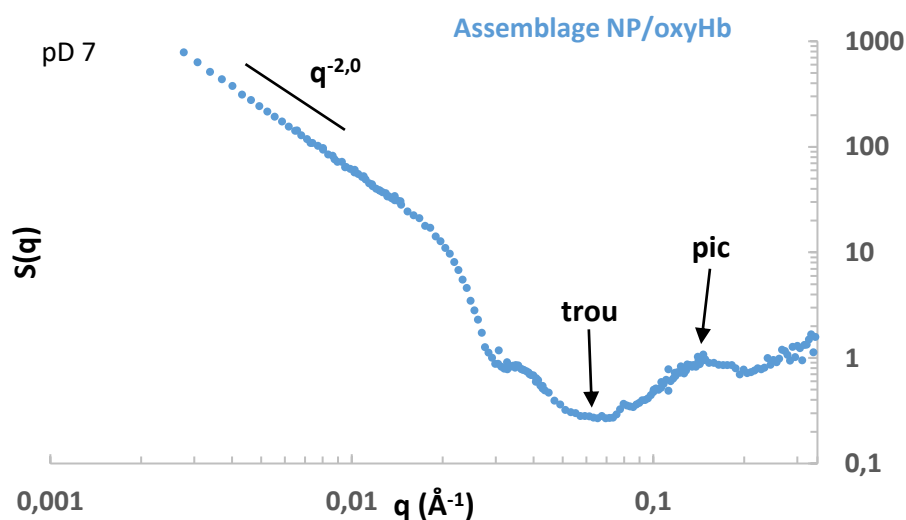


Figure 25 : Facteur de structure de l'oxyhémoglobine adsorbée tiré du spectre d'une solution de ratio oxyHb/NP 2,5 mM/75 g/L, tampon phosphate 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pD 7,0.

Le facteur présenté n'est pas celui de la structure de l'assemblage seule, il présente aussi le facteur de forme des NP qu'il est impossible de soustraire vu que les NP sont modifiées dans leur forme par l'adsorption (ce qui n'était pas le cas pour l'oxyHb libre). Mais en dehors du pic des NP vers  $0,35 \text{ \AA}^{-1}$ , le reste est interprétable.

On constate donc :

-à très petits  $q$ , on a un signal proportionnel à  $q^{-2,0}$ , caractéristique d'un régime d'agrégation limitée par la réaction<sup>66,67</sup>. La vitesse de diffusion est alors plus rapide que la vitesse d'agrégation des deux particules. Ce processus a généralement lieu dans des systèmes où il y a des phénomènes d'attraction à petite distance et présente de la répulsion faible sur des plus grandes distances. Cette faible barrière énergétique répulsive entre les particules doit être surmontée afin que l'agrégation ait lieu. Cela donne en pratique des agrégats compacts<sup>68</sup>. On retrouve aussi la même remontée pour la solution à 14% d'oxyHb adsorbée, ce qui montre que l'agrégat se forme même avec très peu d'oxyHb sur les nanoparticules (Figure 24).

-un trou de corrélation vers  $0,08 \text{ \AA}^{-1}$ .

-un pic de corrélation à  $0,15 \text{ \AA}^{-1}$ . Cela correspond à une distance de  $42 \text{ \AA}$  dans l'espace réel. Cette distance correspond au contact de deux oxyhémoglobines, le diamètre de l'oxyHb étant de  $44 \text{ \AA}$  si on regarde le rayon de giration que nous avons mesuré ( $2,2 \text{ nm}$ ).

Le trou et pic de corrélation montrent que nous pouvons donc assimiler les protéines à une solution de sphères dures quand adsorbées sur la surface d'une nanoparticule<sup>69,70</sup>. Ces résultats sont identiques à ceux déjà mesurés par l'équipe<sup>23</sup>.

## 2) Etude de la structure des assemblages via cryo-microscopie électronique

Afin de comprendre au mieux l'assemblage des nanoparticules avec l'oxyhémoglobine, j'ai préparé un mélange d'oxyHb/NP  $200 \text{ mM}$ /qui a été analysé en cryo-microscopie en transmission électronique par Laurent Marichal et Jeril Degrouard du Laboratoire de Physique des Solides. Le mélange a été préparé à pH 7 en plusieurs exemplaires. Trois échantillons ont été sacrifiés pour faire des mesures par centrifugation afin de déterminer les proportions d'adsorption de ces mélanges.  $56 \pm 4 \%$  de l'oxyHb était ainsi adsorbée. Un échantillon a été conservé (et n'est donc pas passé en centrifugation) pour être étudié en cryo-TEM. Des clichés ont aussi été pris pour les échantillons ne contenant que les nanoparticules seules à la même concentration à pH 7. La Figure 26 donne les images pour les NP seules ainsi que les mélanges contenant NP et oxyHb avec un traitement afin de souligner nanoparticules et protéines (traitement réalisé par Stéphanie Devineau).

Pour plus de clarté, un grossissement d'une image a été faite afin de bien montrer les différents constituants que l'on peut retrouver (Figure 27).

Le diamètre moyen des nanoparticules a été mesuré et est de  $25,6 \pm 0,6 \text{ nm}$ , identique à celui mesuré auparavant<sup>61</sup>. Il a été aussi mesuré la taille d'oxyHb adsorbée. Pour cela, on a considéré une forme sphérique et un diamètre de  $4,7 \pm 0,2 \text{ nm}$  a été mesuré, très proche de celui recensé pour l'hémoglobine porcine ( $d = 4.6 \text{ nm}$ ).

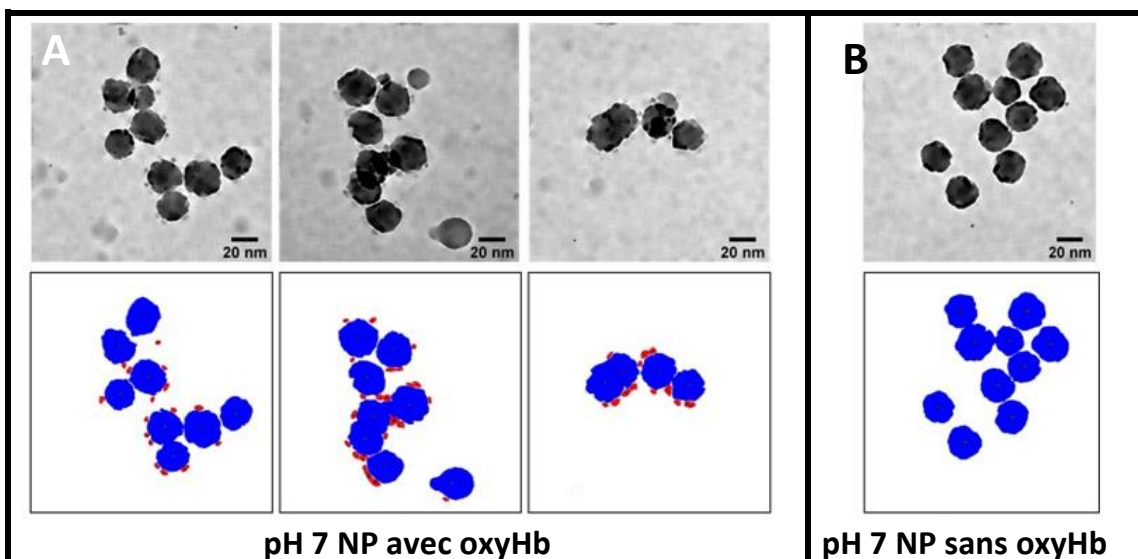


Figure 26 : Images en cryo-MET et résultats de l'analyse automatique des particules avec les NP en bleu et l'oxyHb adsorbée en rouge avec une échelle de 20 nm de  
 A : Hb (200  $\mu$ M) avec NP (9 g/L) à pH 7 tampon phosphate 100 mM ( $56 \pm 4$  % d'oxyHb adsorbée).  
 B : NP (9 g/L) à pH 7 tampon phosphate 100 mM

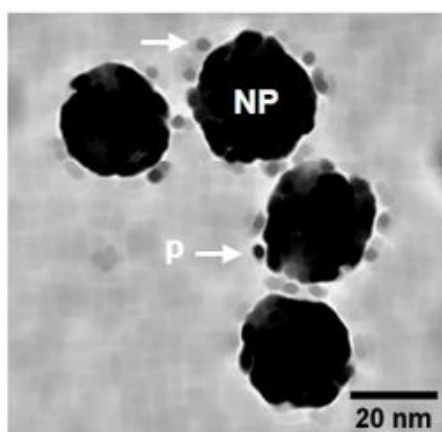


Figure 27 : Grossissement d'une image d'un mélange NP/oxyHb. Certaines protéines adsorbées sont indiquées par une flèche.

Des molécules de protéines sont sur la surface des nanoparticules. A pH 7, il y a donc une couronne de protéines, ce qui est en accord avec les isothermes d'adsorption mesurées précédemment. On peut penser que l'hémoglobine est fortement liée aux nanoparticules de silice, et que même dans des conditions de séparation puissante comme la centrifugation, les molécules d'hémoglobine restent attachées aux nanoparticules (« hard corona »).

Les résultats et analyses de cette partie ont été publiés<sup>3</sup> (voir annexe).

Au final, on constate que l'assemblage Hb/NP formé par adsorption correspond à la formation d'une couronne de protéines sur les nanoparticules. Les protéines sont au contact les unes avec les autres et un ordre fractal se forme, montrant la formation d'agrégat dense.

## VI- Discussion sur l'effet fonctionnel de l'adsorption de l'hémoglobine sur les nanoparticules

Les différentes expériences que nous avons menées montrent que l'adsorption provoque certaines modifications de la protéine tout en en gardant d'autres. La Figure 28 résume ainsi les points communs et différences constatés entre l'hémoglobine libre et l'hémoglobine adsorbée.

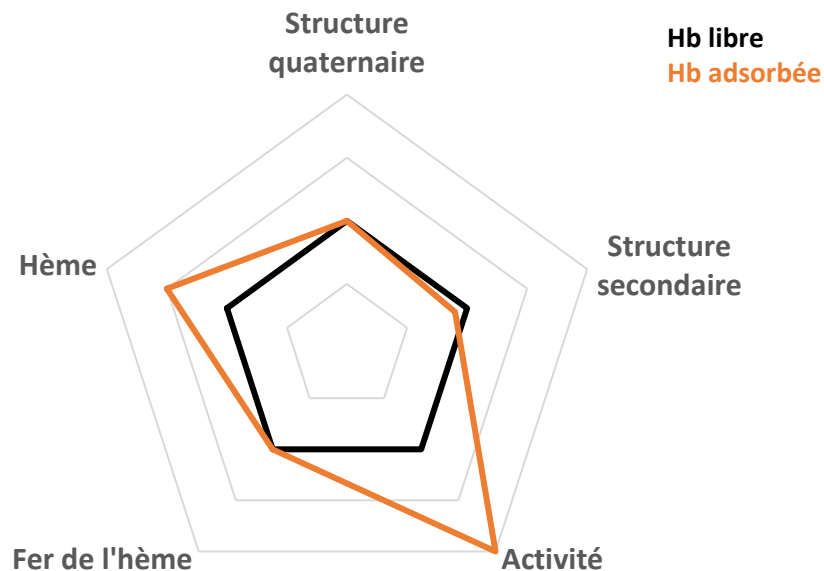


Figure 28 : Points communs et différences entre l'hémoglobine libre et l'hémoglobine adsorbée sur des nanoparticules de silice.

La principale différence vient de l'activité. En effet, avec l'adsorption, on constate une augmentation de l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène et une conservation du caractère coopératif de cette fixation même si le coefficient de Hill diminue légèrement.

Une étude avait déjà été faite par Devineau et collaborateurs<sup>4</sup> sur l'hémoglobine adsorbée sur des nanoparticules de silice. Cette étude avait aussi montré qu'il y avait une augmentation de l'affinité, une diminution de la structuration en hélice et avait interprété les résultats comme une conservation de la forme quaternaire. Toutefois, elle avait recensé une perte conséquente de la coopérativité ( $n$  descendant jusqu'à 1,6) et avait interprété ses résultats comme une absence de changements sur l'hème.

Les principaux phénomènes recensés pouvant affecter l'activité de l'hémoglobine sans une perte de la coopérativité sont les effecteurs de l'hémoglobine. Les effecteurs sont des molécules qui se fixent et modifient l'affinité pour une autre molécule. Le dioxygène peut être considéré comme un effecteur puisque sa fixation sur l'hémoglobine change l'affinité<sup>71,72</sup>. Les principaux effecteurs de l'hémoglobine sont les ions hydronium  $H^+$ , le 2,3-bisphosphoglycerate ou BPG, le dioxyde de carbone  $CO_2$  et les ions chlorure  $Cl^-$ <sup>73,74</sup>.



En pratique, les nanoparticules de silice pourraient être assimilées à un effecteur de l'hémoglobine. La seule différence est que les nanoparticules seraient le premier effecteur permettant d'augmenter l'affinité envers le dioxygène autour du pH physiologique. Pour aller au bout de cette idée, il faut se pencher sur ce que provoquent les effecteurs de façon classique.

Ainsi, l'effet des ions hydronium est appelé effet Bohr.  $H^+$  est un effecteur négatif de l'hémoglobine sur la gamme de pH 6 à 9. Plus le pH est bas, plus l'affinité pour  $O_2$  est faible. Ce phénomène se vérifie tout à fait pour l'hémoglobine de porc<sup>17,75</sup>. La pression de demi-saturation qui est une mesure de l'affinité est ainsi de 3,2 mmHg à pH 8,7, de 7,7 mmHg à pH 7,4, et de 17,1 mmHg à pH 6 à 25°C.

Si l'adsorption modifie plusieurs propriétés de la protéine, ce n'est pas le cas du pH (Figure 29) :

- en nous fiant à notre étude, les spectres en dichroïsme circulaire dans l'UV de l'oxyhémoglobine à pH 7 et pH 9 sont identiques. Cela montre bien que la structure secondaire n'est pas modifiée quel que soit le pH alors que l'adsorption provoque une modification de la structure secondaire avec une perte partielle de la structuration en hélices. Cela avait déjà été vu dans la littérature pour l'hémoglobine bovine pour les mêmes gammes de pH<sup>76</sup>.

- pour l'hème, une étude en spectroscopie d'adsorption X a montré que pour l'hémoglobine humaine, il n'y a aucune différence dans la gamme de pH 6 à 9<sup>40</sup> pour la forme désoxyHb, métHb et HbCO. Cela a été aussi constaté pour le spectre de la désoxyhémoglobine de carpe à pH 6,5, identique à celui à pH 8,5<sup>38</sup>. Les spectres en spectroscopie d'adsorption X ont quant à eux des différences subtiles avec l'adsorption, mais démontrant tout de même une déformation de la poche de l'hème.

- la structure quaternaire n'est pas modifiée par le pH comme semble l'indiquer une étude sur l'hémoglobine d'escargot où aucune différence existe entre le pH 5 et le pH 7,5 sur un spectre de diffusion de rayons X aux petits angles<sup>77</sup>. De manière analogue, il n'y a aucune différence dans la forme de l'oxyhémoglobine qu'elle soit libre ou adsorbée comme on l'a constaté avec la DNPA.

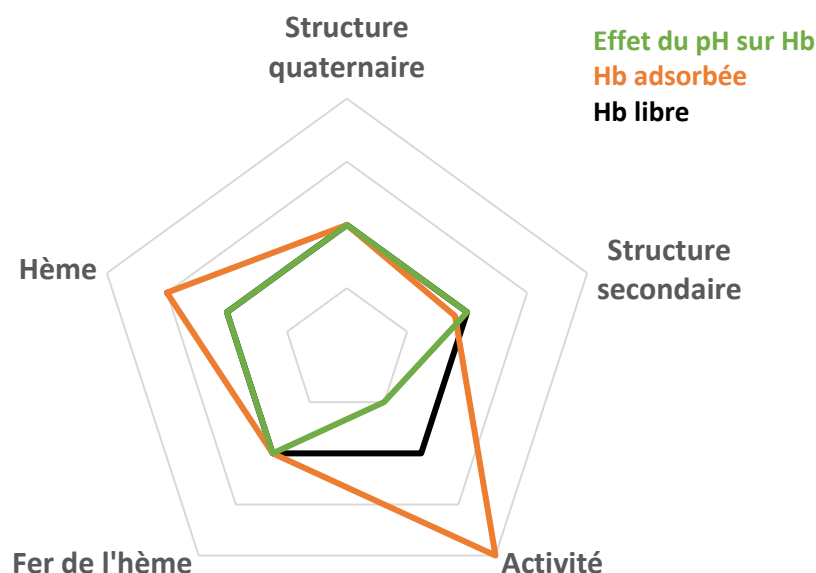


Figure 29 : Points communs et différences entre l'effet de l'adsorption sur l'hémoglobine et celle des ions hydronium. (Hémoglobine libre mise comme référence).

On peut se tourner sur d'autres effecteurs classiques de l'hémoglobine pour voir si on constate aussi une absence d'effets comme avec le pH ou des différences qui se rapprochent plus de ce que nous

avons avec l'adsorption. L'étude du 2,3-bisphosphoglycerate ou BPG est intéressante car il s'agit d'un effecteur naturel de l'hémoglobine qu'on retrouve dans les globules rouges. En comparant l'activité de l'hémoglobine totalement purifiée et celle de l'hémoglobine dans les globules rouges, on constate que l'hémoglobine purifiée a beaucoup plus d'affinité pour le dioxygène que celle des globules rouges. La différence vient en fait du BPG qui permet d'ajuster l'affinité dans l'organisme<sup>71</sup>. Dans notre étude, nous avons bien fait attention à retirer le BPG durant sa purification (voir matériels et méthodes). Un autre effecteur classique dans les expériences *in vitro* est l'inositol hexaphosphate (IHP). Il joue un rôle régulateur assez similaire au BPG, mais chez les oiseaux. L'IHP est notable car il diminue plus fortement l'affinité de l'hémoglobine que le BPG.

D'après la structure cristallographique de la désoxyHb en présence de BPG<sup>78</sup>, le BPG se fixe une seule fois par protéine. L'IHP se fixe au même endroit que le BPG dans une poche au centre du tétramère<sup>79,80</sup>. Il est donc cohérent d'étudier ces deux effecteurs en même temps. Afin de comparer l'effet des effecteurs sur la protéine à celle des nanoparticules de silice, il faut de nouveau regarder les niveaux de structure (Figure 30). En pratique, il y a peu de résultats sur le BPG, mais beaucoup d'informations sur l'IHP. Ainsi :

- le dichroïsme circulaire dans l'UV-Visible montre qu'il n'y a pas de différences entre l'hémoglobine libre et l'hémoglobine fixant l'IHP<sup>17</sup> ;
- la spectroscopie d'adsorption X ne montre aucune différence sur le spectre de désoxyHb humaine entre sa forme libre et sa forme fixant l'IHP<sup>40,81</sup>. Cela a été aussi remarqué pour HbCO d'une part et méthHb d'autre part<sup>40</sup> ; idem entre la méthémoglobine de carpe libre et celle fixant l'IHP<sup>82</sup> ;
- la diffusion de rayons X aux petits angles qui permet de sonder la structure secondaire et tertiaire (voir chapitre 3) montre quant à elle que l'IHP n'altère que peu la structure de la désoxyHb comme celle de l'HbCO humaine<sup>83</sup>. Cela a été aussi montré par dichroïsme circulaire<sup>81</sup>.
- la cristallographie nous informe que si l'IHP provoque quelques petites perturbations sur la structure tertiaire des chaînes  $\beta$  de la désoxyhémoglobine, la structure quaternaire n'est pas modifiée<sup>84</sup>.

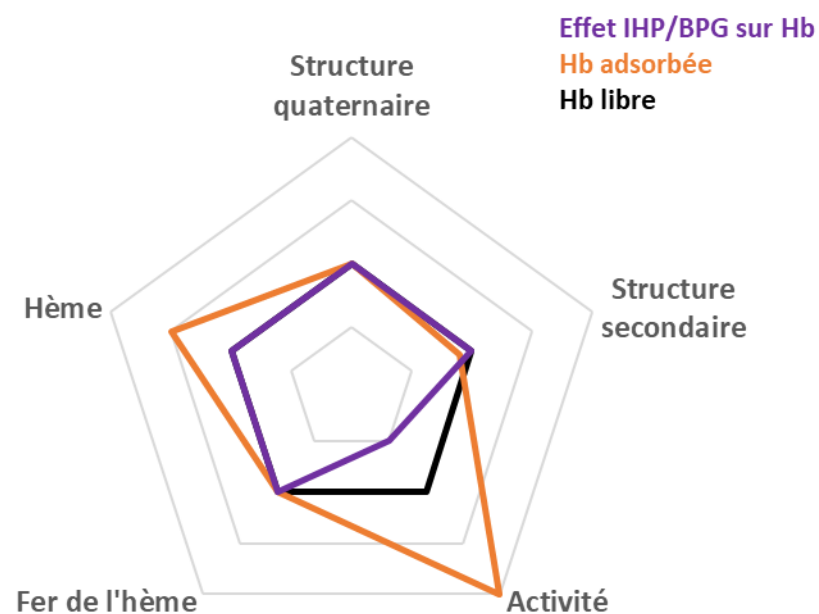


Figure 30 : Points communs et différences entre l'effet de l'adsorption sur l'hémoglobine et celle du BPG/IHP. (Hémoglobine libre mise comme référence).

En étudiant les ions hydronium, le BPG et l'IHP, on peut retenir que leurs effets sont très différents des nanoparticules de silice vu qu'ils ne provoquent de changements dans aucune structure de l'hémoglobine. En se penchant sur les mécanismes d'action des trois effecteurs et des nanoparticules, on peut trouver deux points communs qui pourrait permettre de comprendre la différence d'affinité :

-la modification du réseau de charge des acides aminés. En effet, les ions hydronium en se fixant à l'hémoglobine vont le modifier. Pour le BPG, il porte quatre charges négatives, qui lui permettent de se fixer entre les chaînes  $\beta$  grâce à des interactions électrostatiques avec des acides aminés chargés<sup>79</sup>. Idem pour l'IHP qui lui va se fixer 6 fois<sup>84</sup>. Quant aux nanoparticules de silice, elles sont chargées d'une surface couverte négative qui va notamment interagir avec les acides aminés basiques portant des charges positives en établissant des interactions électrostatiques<sup>85</sup>. On peut donc hypothéser que la modification du réseau de charge puisse être un mode d'action sur l'affinité.

-la stabilisation des formes de basse affinité. En effet, l'effet de l'ion hydronium vient en partie de la protonation ou non de certains acides aminés sur la forme désoxygénée suivant le pH. Suivant leur charge, certains ponts salins vont se former, stabilisant la forme désoxygénée et faisant donc que la désoxyhémoglobine est moins affine pour l'oxygène. Sur la forme oxygénée, il n'y a pas ces phénomènes de ponts salins, ce qui fait que l'oxyhémoglobine n'est pas stabilisée<sup>71</sup>. Pour le BPG, il se fixe de façon préférentielle à la désoxyHb et la stabilise, empêchant ainsi le passage vers une forme oxygénée, plus affine<sup>86</sup>. Quant à l'effet de l'IHP, la forme de l'hémoglobine de basse affinité est dans une forme plus tendue avec la fixation, ce qui expliquera la baisse de l'affinité<sup>81</sup>. On peut tout à fait imaginer pour l'adsorption que l'hémoglobine a sa structure stabilisée par les nombreuses liaisons non covalentes qui se forme entre la surface de la nanoparticule et les acides aminés

En se penchant sur cette théorie, on peut donc penser à une immobilisation partielle de la protéine avec l'adsorption. En effet, quel que soit le modèle qu'on utilise (modèle allostérique de Monod-Wyman-Changeux<sup>87</sup>, structural séquentiel de Perutz<sup>6</sup> ou d'allostérie dynamique de Yonetani<sup>88</sup> ou), le consensus est qu'il existe au minimum deux états de l'hémoglobine : un état de forte affinité pour le dioxygène et un état ayant que peu d'affinité pour le dioxygène. Il a été montré que l'état de forte affinité correspond à la forme oxygénée et l'état de faible affinité à la forme désoxygénée de l'hémoglobine. La forme désoxygénée se transformant en forme oxygénée avec la fixation du dioxygène, il a fallu immobiliser chaque forme afin d'éviter la transition. Cela a été fait de différentes manières (cristal, gel de silice, etc.). Une fois immobilisée, cela a permis de démontrer que les 2 formes possèdent bien des affinités respectives différentes et cohérentes avec le modèle énoncé<sup>89</sup>.

Pour ce qui est de la coopérativité, comme expliqué dans l'introduction, elle vient de mouvements dans la protéine qui font qu'à chaque fois qu'un atome de dioxygène se fixe à un monomère, il y a une restructuration du tétramère, induisant une plus grande affinité pour le dioxygène pour les monomères encore désoxygénés<sup>88</sup>. Avec l'immobilisation des formes, ces mouvements ne peuvent avoir lieu et il est donc logique que les formes immobilisées ne présentent pas de coopérativité<sup>89</sup>.

Avec l'adsorption, on ne peut pas parler d'immobilisation totale de la protéine, le fait que la coopérativité de l'hémoglobine avec l'adsorption soit conservée le prouve. Par contre, des expériences en fluorescence et en RMN ont montré une diminution de la dynamique des protéines quand celles-ci sont adsorbées<sup>90,91</sup>. Une étude en diffusion élastique et inélastique de neutrons faite précédemment dans notre équipe montrait que la myoglobine adsorbée sur des nanoparticules avait sa dynamique fortement changée<sup>92</sup>. En fait, la transition dynamique de la protéine (voir Chapitre 4) était perdue et

les modes de vibration étaient diminués de 20%. Tous ces résultats signifient qu'une partie de la protéine est immobilisée sur la surface et qu'il y a une perte de mouvements dans la protéine. Cette immobilisation partielle peut peut-être expliquer la différence d'affinité. En effet, des études ont suggéré que la présence de contraintes physiques sur la forme de faible affinité de l'hémoglobine empêche la transition vers la forme de forte affinité, faisant que l'affinité pour le dioxygène reste basse<sup>93</sup>. On peut donc hypothéser qu'une hémoglobine restreinte dans la forme de forte affinité aura beaucoup de difficulté à prendre une forme de faible affinité et aura donc une affinité plus forte<sup>94</sup>. Les expériences que nous avons faites pour mesurer l'activité de l'hémoglobine adsorbée a été faite avec la forme oxygénée qui a été mise au contact des nanoparticules. On peut donc penser que l'oxyhémoglobine subit alors une immobilisation partielle dans cette forme plus affine, qui sera conservée en partie même avec la désoxygénation. La forme désoxygénée obtenue après désoxygénation de l'oxyhémoglobine adsorbée serait thermodynamiquement beaucoup moins stable que la forme oxygénée. Afin de pouvoir travailler sur cette hypothèse, une possibilité serait de mesurer la courbe d'oxygénation de l'hémoglobine adsorbée où la forme adsorbée a été obtenue par la mise en contact de la désoxyHb avec des NP. On aurait alors une hémoglobine coincée partiellement dans une forme de faible affinité, moins affine que l'hémoglobine libre d'après notre hypothèse. Si on constate une plus faible affinité que l'hémoglobine libre, cette hypothèse pourrait être validée. La Figure 31 présente le mécanisme hypothésé et ce qui reste encore à étudier pour le confirmer.

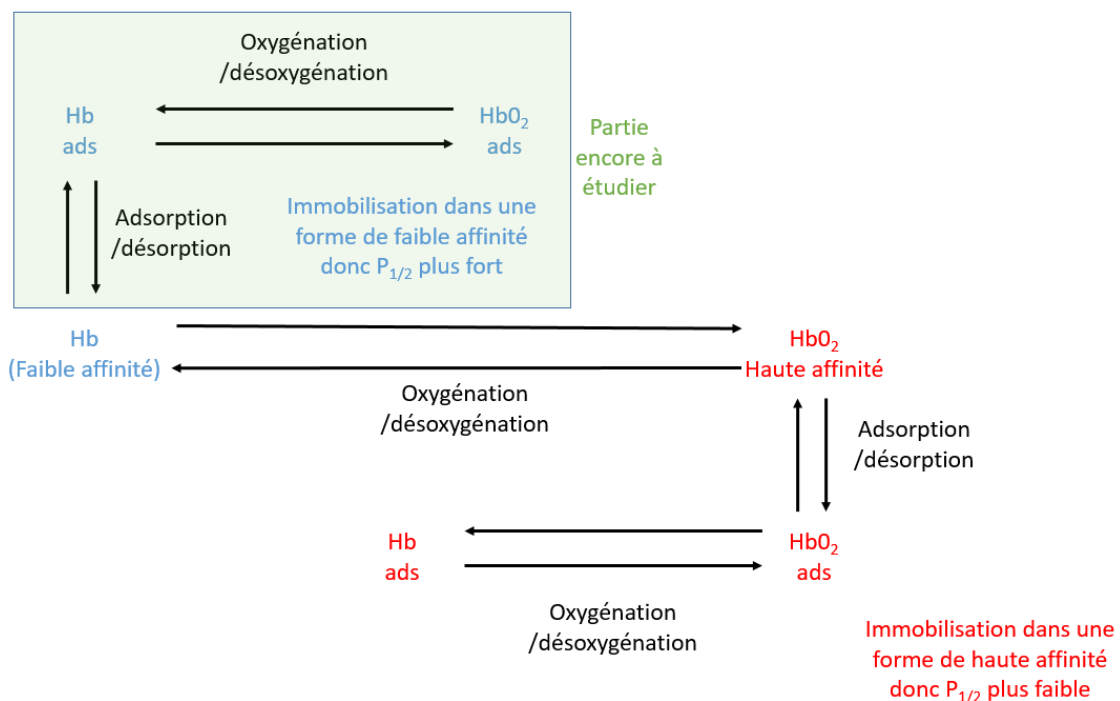


Figure 31 : Les différentes formes oxygénée et désoxygénée de l'hémoglobine libre ou adsorbée selon le mécanisme hypothésé avec ce qui reste encore à étudier afin de confirmer le modèle.

La raison pour laquelle cette expérience n'a pas été faite dans cette thèse est la difficulté à manipuler une forme désoxyHb. En effet, après dégazage, la forme n'est pas stable à l'air libre, ce qui rend difficile les réactions avec des nanoparticules. De plus, on ne peut utiliser le dithionite pour produire la forme désoxygénée car après réaction chimique, désoxyHb ne peut plus se réoxygéner.

D'autres hypothèses permettant d'expliquer les différences d'affinité serait la déformation de la poche de l'hème que l'on a déduit de notre étude de spectroscopie d'adsorption X. Cette déformation peut être interprétée comme une réorganisation des chaînes latérales, qui est confirmée par le dichroïsme circulaire de la bande de Soret. De plus, les changements dans la structure secondaire que l'on a constatés pourraient être une conséquence de cette réorganisation, car comme on a vu dans l'introduction, une partie des hélices sont directement reliées à l'hème par l'histidine, étant dans la sphère de coordination du fer.

L'étude sur des tétramères réticulés chimiquement deux à deux confirme cette théorie<sup>53</sup>. Avec la réticulation, ils retrouvent des spectres en dichroïsme circulaire de la bande de Soret très proches des nôtres (présence d'un signal négatif) avec pour certains agents de réticulation une affinité plus grande et un coefficient de Hill plus faible sans perte de la coopérativité. Ils interprètent les différences observées sur le spectre dichroïque comme des altérations de l'environnement autour de l'hème et lient ces altérations aux différences dans la fixation du dioxygène.

Un phénomène déjà abordé plus tôt dans ce chapitre va aussi le sens d'une augmentation de l'affinité. Des mélanges d'hémoglobine contenant une hémoglobine mutante identique en tout point de vue à Hb humaine, mais possédant un hème inversé présentent une baisse de la pression de demi-saturation et du coefficient de Hill. De plus, le spectre dichroïque de la bande de Soret de l'oxyhémoglobine adsorbée est très proche du spectre de l'oxyhémoglobine avec hème inversé ; idem pour la forme désoxyhémoglobine. En comparant hème inversé et hème normal, les seules différences véritables sont dans l'organisation des chaînes latérales de la porphyrine. Si on en croit notre hypothèse, ces modifications de chaîne latérales expliqueraient ses modifications d'oxygénation.

Il semble donc qu'à chaque fois qu'il y ait des réorganisations des chaînes latérales dans la sphère de l'hème, on a des perturbations dans la pression de demi-saturation et du coefficient de Hill. Souvent, les modifications vont dans le sens d'une diminution de ces deux paramètres comme résume le montre le Tableau 12.

	Mélange Hb hème inversé/Hb	Hb	Tétramère Hb réticulé	Hb	Hb adsorbée	Hb
P <sub>50</sub> (mmHg)	4,7	5,1	4,4	5,1	6,0	9,4
Coefficient de Hill	2,6	3,2	2,2	2,7	2,6	2,9

Tableau 12 : Paramètres caractérisant l'oxygénation de Hb humaine et d'un mélange contenant Hb et Hb possédant un hème inversé. Tiré de <sup>53,95</sup>.

Une autre hypothèse peut être donnée grâce au résultat des isothermes d'adsorption des différentes formes de l'hémoglobine présentées plus tôt dans ce chapitre : la désoxyHb et l'oxyHb ne présentent pas du tout les mêmes caractéristiques d'adsorption. En regardant les isothermes d'adsorption, on voit que la forme oxygénée, de forte affinité, s'adsorbe préférentiellement par rapport à la forme désoxygénée, de faible affinité ( $K_{ads}^{oxy}$  deux fois plus grand que  $K_{ads}^{désoxy}$ ). Cela semble prouver que les nanoparticules stabilisent plus la forme oxygénée, ce qui irait vers le fait que l'affinité pour le dioxygène augmente avec l'adsorption. Si on compare à l'IHP, celle-ci se fixe préférentiellement à la forme désoxygénée de basse affinité et la stabilisant, ce qui fait que l'affinité pour O<sub>2</sub> de l'hémoglobine attachée à l'IHP est faible. Les équilibres en présence sont explicités sur la Figure 32.

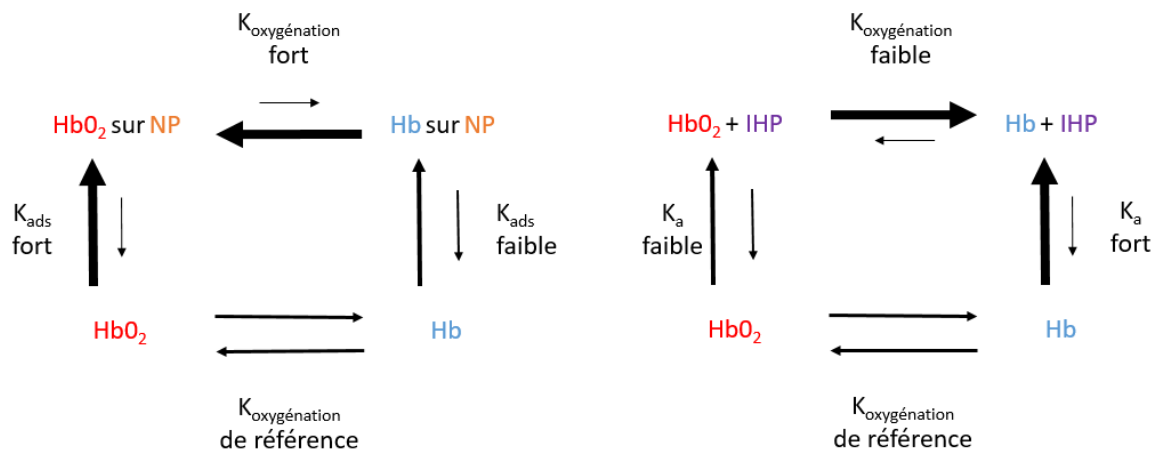


Figure 32 : Diagramme énergétique de l'équilibre Hb <-> HbO<sub>2</sub> suivant la présence d'IHP ou de nanoparticules de silice.

Dans ce cas, l'expérience proposée précédemment (oxygénation de Hb adsorbée où la forme adsorbée a été obtenue par la mise en contact de la désoxyHb avec des NP) montrerait que l'affinité serait identique à celle présentée dans ce chapitre (forme adsorbée obtenue par contact de désoxyHb avec NP). En effet, la forme oxyHb adsorbée étant favorisée thermodynamiquement par rapport à désoxyHb adsorbée.

Enfin, il serait intéressant de recueillir certaines informations sur l'hémoglobine adsorbée. La diffusion de neutrons aux petits angles démontre que la forme tétramérique de l'hémoglobine est conservée avec l'adsorption et que son rayon est conservé, mais elle ne nous donne pas la structure quaternaire en détail. Or, la forme quaternaire a toujours été considérée comme la structuration responsable de la régulation de l'oxygénation de l'hémoglobine. Il est donc primordial de connaître la structure tridimensionnelle de l'hémoglobine adsorbée, quel que soit sa forme et notamment celle de l'hème. L'outil idéal serait la cristallographie couplée à la diffraction de rayons X. Il faudrait donc concevoir une méthode de cristallisation de la protéine adsorbée sur des nanoparticules, ce qui n'a pas encore été accompli à ce jour. Mais à défaut de ne pas obtenir des cristaux, il serait envisageable de faire des études en cryo-EM à très haute résolution

## Bibliographie

- (1) Langmuir, I. The Adsorption of Gases on Plane Surfaces of Glass, Mica and Pt. **1917**. <https://doi.org/10.1021/ja02242a004>.
- (2) Kemmer, G.; Keller, S. Nonlinear Least-Squares Data Fitting in Excel Spreadsheets. *Nat. Protoc.* **2010**, 5 (2), 267.
- (3) Sanchez-Guzman, D.; Giraudon--Colas, G.; Marichal, L.; Boulard, Y.; Wien, F.; Degrouard, J.; Baeza-Squiban, A.; Pin, S.; Renault, J. P.; Devineau, S. *In Situ* Analysis of Weakly Bound Proteins Reveals Molecular Basis of Soft Corona Formation. *ACS Nano* **2020**, 14 (7), 9073–9088. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c04165>.
- (4) Devineau, S.; Zargarian, L.; Renault, J. P.; Pin, S. Structure and Function of Adsorbed Hemoglobin on Silica Nanoparticles: Relationship between the Adsorption Process and the Oxygen Binding Properties. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2017**, 33 (13), 3241–3252. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04281>.

- (5) Latour, R. A. The Langmuir Isotherm: A Commonly Applied but Misleading Approach for the Analysis of Protein Adsorption Behavior. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2015**, *103* (3), 949–958. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35235>.
- (6) Perutz, M. F. Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin: Haem–Haem Interaction and the Problem of Allostery. *Nature* **1970**, *228* (5273), 726–734. <https://doi.org/10.1038/228726a0>.
- (7) Ford, W. H.; Ainsworth, S. Reactions of Partially Oxidised Hemoglobin Solutions I. Separation of Intermediate Compounds by CM-Sephadex Chromatography. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct.* **1968**, *160* (1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(68\)90058-5](https://doi.org/10.1016/0005-2795(68)90058-5).
- (8) Bellamy, L. J.; Rogasch, P. E. Proton Transfer in Hydrogen Bonded Systems. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Sci.* **1960**, *257* (1288), 98–108. <https://doi.org/10.1098/rspa.1960.0137>.
- (9) Dahlgren, G.; Long, F. A. Relative Hydrogen Bonding of Deuterium. I. Ionization Constants of Maleic and Fumaric Acids and of Their Monoethyl Esters in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O<sup>1</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (6), 1303–1308. <https://doi.org/10.1021/ja01491a007>.
- (10) Creswell, C. J.; Allred, A. L. THE STRENGTHS OF HYDROGEN BONDS FORMED BY PROTIUM AND DEUTERIUM. *J. Am. Chem. Soc. US* **1962**, Vol: 84.
- (11) King, A.; James, F. W.; Lawson, C. G.; Briscoe, H. V. A. 365. The Selective Adsorption of Heavy Water. *J. Chem. Soc. Resumed* **1935**, No. 0, 1545–1549. <https://doi.org/10.1039/JR9350001545>.
- (12) Schneider, R.; Mayer, A.; Schmatz, W.; Kaiser, B.; Scherm, R. Neutron Small-Angle Scattering from Aqueous Solutions of Oxy- and Deoxyhaemoglobin. *J. Mol. Biol.* **1969**, *41* (2), 231–235. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(69\)90388-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(69)90388-X).
- (13) Conrad, H.; Mayer, A.; Thomas, H. P.; Vogel, H. X-Ray Small-Angle Scattering from Aqueous Solutions of Oxy- and Deoxyhaemoglobin. *J. Mol. Biol.* **1969**, *41* (2), 225–229. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(69\)90387-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(69)90387-8).
- (14) Tomita, S.; Riggs, A. Effects of Partial Deuteration on the Properties of Human Hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **1970**.
- (15) Orts-Gil, G.; Natte, K.; Drescher, D.; Bresch, H.; Mantion, A.; Kneipp, J.; Österle, W. Characterization of Silica Nanoparticles Prior to in Vitro Studies: From Primary Particles to Agglomerates. *J. Nanoparticle Res.* **2011**, *13*, 1593–1604. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9910-9>.
- (16) Antonini, E.; Brunori, M. *Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands*; North-Holland Pub. Co., 1971.
- (17) Devineau, S. Adsorption des protéines sur les nanomatériaux. Biochimie et physico-chimie d'un nouveau stress. phdthesis, Université Paris Sud - Paris XI, 2013.
- (18) Hill, A. V. XLVII. THE COMBINATIONS OF HAEMOGLOBIN WITH OXYGEN AND WITH CARBON MON- OXIDE. I. 10.
- (19) Mercer, J. M. Cooperativity☆. In *Reference Module in Life Sciences*; Elsevier, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06282-8>.
- (20) Yifrach, O. Hill Coefficient for Estimating the Magnitude of Cooperativity in Gating Transitions of Voltage-Dependent Ion Channels. *Biophys. J.* **2004**, *87* (2), 822–830. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.040410>.
- (21) Abeliovich, H. An Empirical Extremum Principle for the Hill Coefficient in Ligand-Protein Interactions Showing Negative Cooperativity. *Biophys. J.* **2005**, *89* (1), 76–79. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.060194>.
- (22) Cupane, A.; Palma, M. U.; Vitrano, E. Dependence of Co-Operativity in the Reaction of Haemoglobin with Oxygen on Deuterium Oxide Concentration and Temperature. *J. Mol. Biol.* **1974**, *82* (2), 185–192. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90340-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90340-4).
- (23) Marichal, L.; Giraudon-Colas, G.; Cousin, F.; Thill, A.; Labarre, J.; Boulard, Y.; Aude, J.-C.; Pin, S.; Renault, J. P. Protein-Nanoparticle Interactions: What Are the Protein-Corona Thickness and Organization? *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2019**, *35* (33), 10831–10837. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01373>.

- (24) Blumberg, W. E. [19] The Study of Hemoglobin by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. In *Methods in Enzymology*; Hemoglobins; Academic Press, 1981; Vol. 76, pp 312–329. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(81\)76129-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(81)76129-9).
- (25) Peisach, J.; Blumberg, W. E.; Ogawa, S.; Rachmilewitz, E. A.; Oltzik, R. The Effects of Protein Conformation on the Heme Symmetry in High Spin Ferric Heme Proteins as Studied by Electron Paramagnetic Resonance. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246* (10), 3342–3355.
- (26) Peisach, J.; Blumberg, W. E.; Wittenberg, B. A.; Wittenberg, J. B.; Kampa, L. Hemoglobin A: An Electron Paramagnetic Resonance Study of the Effects of Interchain Contacts on the Heme Symmetry of High-Spin and Low-Spin Derivatives of Ferric Alpha Chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1969**, *63* (3), 934–939. <https://doi.org/10.1073/pnas.63.3.934>.
- (27) Svistunenko, D. A.; Sharpe, M. A.; Nicholls, P.; Blenkinsop, C.; Davies, N. A.; Dunne, J.; Wilson, M. T.; Cooper, C. E. The PH Dependence of Naturally Occurring Low-Spin Forms of Methaemoglobin and Metmyoglobin : An EPR Study. **2000**, 11.
- (28) Jameson, G. B.; Ibers, J. A. Biological and Synthetic Dioxygen Carriers. 86.
- (29) Clark, A.; Sedhom, J.; Elajaili, H.; Eaton, G. R.; Eaton, S. S. Dependence of Electron Paramagnetic Resonance Spectral Lineshapes on Molecular Tumbling: Nitroxide Radical in Water:Glycerol Mixtures. *Concepts Magn. Reson. Part A* **2016**, *45A* (5), e21423. <https://doi.org/10.1002/cmr.a.21423>.
- (30) Katz, D. S.; White, S. P.; Huang, W.; Kumar, R.; Christianson, D. W. Structure Determination of Aquomet Porcine Hemoglobin at 2.8 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **1994**, *244* (5), 541–553. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1751>.
- (31) Vercamer, V.; Lelong, G.; Hijjiya, H.; Kondo, Y.; Galois, L.; Calas, G. Diluted Fe<sup>3+</sup> in Silicate Glasses: Structural Effects of Fe-Redox State and Matrix Composition. An Optical Absorption and X-Band/Q-Band EPR Study. 20.
- (32) Dowsing, R. D.; Gibson, J. F. Electron Spin Resonance of High-Spin D<sub>5</sub> Systems. *J. Chem. Phys.* **1969**, *50* (1), 294–303. <https://doi.org/10.1063/1.1670791>.
- (33) Kurkjian, C. R.; Sigety, E. A. Co-Ordination of Fe<sup>3+</sup> in Glass. *Phys. Chem. Glas.* **1968**, *9* (3), 73-.
- (34) Montenero, A.; Friggeri, M.; Giori, D. C.; Belkhiria, N.; Pye, L. D. Iron-Soda-Silica Glasses: Preparation, Properties, Structure. *J. Non-Cryst. Solids* **1986**, *84* (1), 45–60. [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(86\)90761-1](https://doi.org/10.1016/0022-3093(86)90761-1).
- (35) Dunaeva, E. S.; Uspenskaya, I. A.; Pokholok, K. V.; Minin, V. V.; Efimov, N. N.; Ugolkova, E. A.; Brunet, E. Coordination and RedOx Ratio of Iron in Sodium-silicate Glasses. *J. Non-Cryst. Solids* **2012**, *358* (23), 3089–3095. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrsol.2012.08.004>.
- (36) Penner-Hahn, J. E. X-Ray Absorption Spectroscopy. In *eLS*; American Cancer Society, 2005. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0002984>.
- (37) Wilson, S. A.; Green, E.; Mathews, I. I.; Benfatto, M.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Sarangi, R. X-Ray Absorption Spectroscopic Investigation of the Electronic Structure Differences in Solution and Crystalline Oxyhemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110* (41), 16333–16338. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315734110>.
- (38) Pin, S.; Tilly, V. L.; Alpert, B.; Cortes, R. XANES Spectroscopy Sensitivity to Small Electronic Changes Case of Carp Azidomethemoglobin. *FEBS Lett.* **1989**, *242* (2), 401–404. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80510-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80510-1).
- (39) Eisenberger, P.; Shulman, R. G.; Brown, G. S.; Ogawa, S. Structure-Function Relations in Hemoglobin as Determined by x-Ray Absorption Spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1976**, *73* (2), 491–495. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.2.491>.
- (40) Pin, S.; Valat, P.; Cortes, R.; Michalowicz, A.; Alpert, B. Ligand Binding Processes in Hemoglobin. Chemical Reactivity of Iron Studied by XANES Spectroscopy. *Biophys. J.* **1985**, *48* (6), 997–1001. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(85\)83862-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(85)83862-5).
- (41) Pin, S.; Alpert, B.; Congiu-Castellano, A.; Della Longa, S.; Bianconi, A. [14] X-Ray Absorption Spectroscopy of Hemoglobin. In *Methods in Enzymology*; Hemoglobins Part C: Biophysical Methods; Academic Press, 1994; Vol. 232, pp 266–292. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)32052-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)32052-7).



- (42) Rangus, M.; Mazaj, M.; Dražić, G.; Popova, M.; Tušar, N. N. Active Iron Sites of Disordered Mesoporous Silica Catalyst FeKIL-2 in the Oxidation of Volatile Organic Compounds (VOC). *Materials* **2014**, *7* (6), 4243–4257. <https://doi.org/10.3390/ma7064243>.
- (43) Bianconi, A.; Castellano, A. C. *Biophysics and Synchrotron Radiation*; Springer Science & Business Media, 2012.
- (44) Della Longa, S.; Pin, S.; Cortès, R.; Soldatov, A. V.; Alpert, B. Fe-Heme Conformations in Ferric Myoglobin. *Biophys. J.* **1998**, *75* (6), 3154–3162. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77757-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77757-4).
- (45) Della Longa, S.; Gambacurta, A.; Bertolini, A.; Girasole, M.; Castellano, A. C.; Ascoli, F. Structure of the Fe-Heme in the Hemodimeric Hemoglobin from *Scapharca Inaequalis* and in the T721 Mutant: An X-Ray Absorption Spectroscopic Study at Low Temperature. *Eur. Biophys. J. EBJ* **2001**, *29* (8), 559–568. <https://doi.org/10.1007/s002490000102>.
- (46) Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C. How to Study Proteins by Circular Dichroism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2005**, *1751* (2), 119–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>.
- (47) Nagai, M.; Nagai, Y.; Imai, K.; Neya, S. Circular Dichroism of Hemoglobin and Myoglobin: CD OF HEMOGLOBIN AND MYOGLOBIN. *Chirality* **2014**, *26* (9), 438–442. <https://doi.org/10.1002/chir.22273>.
- (48) Woody, R. W.; Pescitelli, G. The Role of Heme Chirality in the Circular Dichroism of Heme Proteins. *Z. Für Naturforschung A* **2014**, *69* (7), 313–325. <https://doi.org/10.5560/zna.2014-0004>.
- (49) Geraci, G.; Parkhurst, L. J. [17] Circular Dichroism Spectra of Hemoglobins. In *Methods in Enzymology; Hemoglobins*; Academic Press, 1981; Vol. 76, pp 262–275. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(81\)76127-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(81)76127-5).
- (50) Moscowitz, A. Analysis of Rotatory Dispersion Curves. *Rev. Mod. Phys.* **1960**, *32* (2), 440–443. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.32.440>.
- (51) Woody, R. W.; Kiefl, C.; Sreerama, N.; Lu, Y.; Qiu, Y.; Shelnut, J. A. Molecular Dynamics Simulations of Carbonmonoxy Myoglobin and Calculations of Heme Circular Dichroism. In *Insulin & Related Proteins - Structure to Function and Pharmacology*; Dieken, M. L., Federwisch, M., De Meyts, P., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2002; pp 233–248. [https://doi.org/10.1007/0-306-47582-0\\_18](https://doi.org/10.1007/0-306-47582-0_18).
- (52) Sugita, Y.; Nagai, M.; Yoneyama, Y. Circular Dichroism of Hemoglobin in Relation to the Structure Surrounding the Heme. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246* (2), 383–388.
- (53) Hu, D.; Kluger, R. Functional Cross-Linked Hemoglobin Bis-Tetramers: Geometry and Cooperativity. *Biochemistry* **2008**, *47* (47), 12551–12561. <https://doi.org/10.1021/bi801452b>.
- (54) Chen, W.-T.; Chen, Y.-C.; Liou, H.-H.; Chao, C.-Y. Structural Basis for Cooperative Oxygen Binding and Bracelet-Assisted Assembly of *Lumbricus Terrestris* Hemoglobin. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 9494. <https://doi.org/10.1038/srep09494>.
- (55) Lau, S. Y.; Taneja, A. K.; Hodges, R. S. Synthesis of a Model Protein of Defined Secondary and Quaternary Structure. Effect of Chain Length on the Stabilization and Formation of Two-Stranded Alpha-Helical Coiled-Coils. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259* (21), 13253–13261.
- (56) Graddis, T. J.; Myszka, D. G.; Chaiken, I. M. Controlled Formation of Model Homo- and Heterodimer Coiled Coil Polypeptides. *Biochemistry* **1993**, *32* (47), 12664–12671. <https://doi.org/10.1021/bi00210a015>.
- (57) Mehboob, S.; Luo, B.-H.; Patel, B. M. Aβ Spectrin Coiled Coil Association at the Tetramerization Site. **8**.
- (58) Zheng, T.; Boyle, A.; Marsden, H. R.; Valdink, D.; Martelli, G.; Raap, J.; Kros, A. Probing Coiled-Coil Assembly by Paramagnetic NMR Spectroscopy. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (4), 1159–1168. <https://doi.org/10.1039/C4OB02125H>.
- (59) Micsonai, A.; Wien, F.; Kernya, L.; Lee, Y.-H.; Goto, Y.; Réfrégiers, M.; Kardos, J. Accurate Secondary Structure Prediction and Fold Recognition for Circular Dichroism Spectroscopy.

- Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (24), E3095–E3103.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1500851112>.
- (60) Micsonai, A.; Wien, F.; Bulyáki, É.; Kun, J.; Moussong, É.; Lee, Y.-H.; Goto, Y.; Réfrégiers, M.; Kardos, J. BeStSel: A Web Server for Accurate Protein Secondary Structure Prediction and Fold Recognition from the Circular Dichroism Spectra. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46* (W1), W315–W322. <https://doi.org/10.1093/nar/gky497>.
- (61) Marichal, L. Interactions protéines-nanoparticules: émergence de nouveaux facteurs déterminant la formation de la couronne de protéines. 289.
- (62) Guinier, A.; Fournet, G. *Small-Angle Scattering of X-Rays*; Wiley, 1955.
- (63) Loupiac, C.; Bonetti, M.; Pin, S.; Calmettes, P. High-Pressure Effects on Horse Heart Metmyoglobin Studied by Small-Angle Neutron Scattering. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269* (19), 4731–4737. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03126.x>.
- (64) Schelten, J.; Schlecht, P.; Schmatz, W.; Mayer, A. Neutron Small Angle Scattering of Hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247* (17), 5436–5441.
- (65) Marichal, L.; Giraudon-Colas, G.; Cousin, F.; Thill, A.; Labarre, J.; Boulard, Y.; Aude, J.-C.; Pin, S.; Renault, J. P. Protein–Nanoparticle Interactions: What Are the Protein–Corona Thickness and Organization? *Langmuir* **2019**, *35* (33), 10831–10837. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01373>.
- (66) Lin, M. Y.; Lindsay, H. M.; Klein, R.; Ball, R. C.; Meakin, P. Universal Diffusion-Limited Colloid Aggregation. 22.
- (67) Weitz, D. A.; Huang, J. S.; Lin, M. Y.; Sung, J. Limits of the Fractal Dimension for Irreversible Kinetic Aggregation of Gold Colloids. *Phys. Rev. Lett.* **1985**, *54* (13), 1416–1419. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.54.1416>.
- (68) Cherhal, F.; Cousin, F.; Capron, I. 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* **2015**, *31* (20), 5596–5602. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00851>.
- (69) Mason, T. G.; Graves, S. M.; Wilking, J. N.; Lin, M. Y. Effective Structure Factor of Osmotically Deformed Nanoemulsions<sup>†</sup>. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (44), 22097–22102. <https://doi.org/10.1021/jp0601623>.
- (70) Scheffold, F.; Mason, T. G. Scattering from Highly Packed Disordered Colloids. *J. Phys. Condens. Matter* **2009**, *21* (33), 332102. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/21/33/332102>.
- (71) Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. Hemoglobin Transports Oxygen Efficiently by Binding Oxygen Cooperatively. *Biochem. 5th Ed.* **2002**.
- (72) Yonetani, T.; Tsuneshige, A. The Global Allostery Model of Hemoglobin: An Allosteric Mechanism Involving Homotropic and Heterotropic Interactions. *C. R. Biol.* **2003**, *326* (6), 523–532. [https://doi.org/10.1016/S1631-0691\(03\)00150-1](https://doi.org/10.1016/S1631-0691(03)00150-1).
- (73) Tyuma, I.; Kamigawara, Y.; Imai, K. PH Dependence of the Shape of the Hemoglobin-Oxygen Equilibrium Curve. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *310* (2), 317–320. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(73\)90111-6](https://doi.org/10.1016/0005-2795(73)90111-6).
- (74) Tyuma, I.; Imai, K.; Shimizu, K. Analysis of Oxygen Equilibrium of Hemoglobin and Control Mechanism of Organic Phosphates. *Biochemistry* **1973**, *12* (8), 1491–1498. <https://doi.org/10.1021/bi00732a004>.
- (75) Condo, S. G.; Corda, M.; Sanna, M. T.; Pellegrini, M. G.; Ruiz, M. P.; Castagnola, M.; Giardina, B. Molecular Basis of Low-Temperature Sensitivity in Pig Hemoglobins. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209* (2), 773–776. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17347.x>.
- (76) De, S.; Girigoswami, A. A Fluorimetric and Circular Dichroism Study of Hemoglobin—Effect of PH and Anionic Amphiphiles. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *296* (1), 324–331. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.08.047>.
- (77) Arndt, M. H. L.; Oliveira, C. L. P. de; Régis, W. C. B.; Torriani, I. L.; Santoro, M. M. Small Angle X-Ray Scattering of the Hemoglobin from *Biomphalaria Glabrata*. *Biopolymers* **2003**, *69* (4), 470–479. <https://doi.org/10.1002/bip.10367>.

- (78) Richard, V.; Dodson, G. G.; Mauguen, Y. Human Deoxyhaemoglobin-2,3-Diphosphoglycerate Complex Low-Salt Structure at 2.5 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **1993**, *233* (2), 270–274. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1505>.
- (79) Storz, J. F.; Moriyama, H. Mechanisms of Hemoglobin Adaptation to High Altitude Hypoxia. *High Alt. Med. Biol.* **2008**, *9* (2), 148–157. <https://doi.org/10.1089/ham.2007.1079>.
- (80) Laberge, M.; Kövesi, I.; Yonetani, T.; Fidy, J. R-State Hemoglobin Bound to Heterotropic Effectors: Models of the DPG, IHP and RSR13 Binding Sites. *FEBS Lett.* **2005**, *579* (3), 627–632. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.033>.
- (81) Coletta, M.; Angeletti, M.; Ascone, I.; Boumis, G.; Castellano, A. C.; Dell’Ariccia, M.; Della Longa, S.; De Sanctis, G.; Priori, A. M.; Santucci, R.; Feis, A.; Amiconi, G. Heterotropic Effectors Exert More Significant Strain on Monoligated than on Unligated Hemoglobin. *Biophys. J.* **1999**, *76* (3), 1532–1536. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77312-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77312-1).
- (82) Pin, S.; Cartes, R.; Alpert, B. XANES Spectroscopy of Carp Hemoglobin-Iron in Correlation with the Affinity Changes of the Protein for Ligand. *FEBS Lett.* **1986**, *208* (2), 6.
- (83) Lal, J.; Maccarini, M.; Fouquet, P.; Ho, N. T.; Ho, C.; Makowski, L. Modulation of Hemoglobin Dynamics by an Allosteric Effector. *Protein Sci.* **2017**, *26* (3), 505–514. <https://doi.org/10.1002/pro.3099>.
- (84) Arnone, A.; Perutz, M. F. Structure of Inositol Hexaphosphate–Human Deoxyhaemoglobin Complex. *Nature* **1974**, *249* (5452), 34–36. <https://doi.org/10.1038/249034a0>.
- (85) 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. Structural Determinants for Protein Adsorption/Non-Adsorption to Silica Surface. *PLoS ONE* **2013**, *8* (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081346>.
- (86) Benesch, R.; Benesch, R. E.; Enoki, Y. The Interaction of Hemoglobin and Its Subunits with 2,3-Diphosphoglycerate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1968**, *61* (3), 1102–1106.
- (87) Monod, J.; Wyman, J.; Changeux, J.-P. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* **1965**, *12* (1), 88–118.
- (88) Yonetani, T.; Laberge, M. Protein Dynamics Explain the Allosteric Behaviors of Hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1784* (9), 1146–1158. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.04.025>.
- (89) Henry, E. R.; Mozzarelli, A.; Viappiani, C.; Abbruzzetti, S.; Bettati, S.; Ronda, L.; Bruno, S.; Eaton, W. A. Experiments on Hemoglobin in Single Crystals and Silica Gels Distinguish among Allosteric Models. *Biophys. J.* **2015**, *109* (6), 1264–1272. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.037>.
- (90) Czeslik, C.; Royer, C.; Hazlett, T.; Mantulin, W. Reorientational Dynamics of Enzymes Adsorbed on Quartz: A Temperature-Dependent Time-Resolved TIRF Anisotropy Study. *Biophys. J.* **2003**, *84* (4), 2533–2541. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75058-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75058-9).
- (91) Drobny, G. P.; Long, J. R.; Shaw, W. J.; Cotten, M. L.; Stayton, P. S. *Structure and Dynamics of Proteins Adsorbed to Biomaterial Interfaces*; PNWD-SA-6693; David M Grant & Robin K Harris; Wiley, New York, NY, United States(US), 2002.
- (92) Devineau, S.; Zanotti, J.-M.; Loupiac, C.; Zargarian, L.; Neiers, F.; Pin, S.; Renault, J. P. Myoglobin on Silica: A Case Study of the Impact of Adsorption on Protein Structure and Dynamics. *Langmuir* **2013**, *29* (44), 13465–13472. <https://doi.org/10.1021/la4035479>.
- (93) Ueno, H.; Popowicz, A. M.; Manning, J. M. Random Chemical Modification of the Oxygen-Linked Chloride-Binding Sites of Hemoglobin: Those in the Central Dyad Axis May Influence the Transition between Deoxy-and Oxy-Hemoglobin. *J. Protein Chem.* **1993**, *12* (5), 561–570.
- (94) Eike, J. H.; Palmer, A. F. Effect of Cl<sup>-</sup> and H<sup>+</sup> on the Oxygen Binding Properties of Glutaraldehyde-Polymerized Bovine Hemoglobin-Based Blood Substitutes. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20* (5), 1543–1549. <https://doi.org/10.1021/bp049872l>.
- (95) Nagai, M.; Nagai, Y.; Aki, Y.; Imai, K.; Wada, Y.; Nagatomo, S.; Yamamoto, Y. Effect of Reversed Heme Orientation on Circular Dichroism and Cooperative Oxygen Binding of Human Adult Hemoglobin. *Biochemistry* **2008**, *47* (2), 517–525. <https://doi.org/10.1021/bi7015519>.

# Chapitre 3 :

## Etudes des gels d'hémoglobine réticulés par le glutaraldéhyde dopés aux nanoparticules

On va étudier ici l'effet de la réticulation par le glutaraldéhyde sur hémoglobine. Le but est de pouvoir former des gels comme cela a été constaté pour d'autres protéines<sup>1,2</sup>. A côté de ce phénomène chimique, on va aussi étudier de façon concomitante l'effet de la présence de nanoparticules de silice Ludox TM-50. Comme décrit au chapitre 2, l'hémoglobine va s'adsorber sur les nanoparticules et on va étudier la gélification de ces mélanges. Le but va d'abord être de voir les conditions de concentration et de pH pour former des gels, puis d'étudier la cinétique de la gélification et des propriétés élastiques du gel formé. On verra ensuite si l'hémoglobine dans le gel a ses propriétés de fixation/libération du dioxygène conservée ou non. Pour essayer de comprendre ses modifications, on étudiera l'état de l'hème et du fer ainsi que celui de la globine. Enfin, on étudiera non plus la protéine, mais la structure du gel en lui-même.

### I- Gélification de l'oxyhémoglobine par le glutaraldéhyde

#### 1) Diagramme de gélification

Il est tout d'abord obligatoire de savoir quelles sont les gammes de concentrations en hémoglobine et en glutaraldéhyde pour former les gels. Pour cela, la première tâche a été de faire les diagrammes de gélification c'est-à-dire de déterminer les compositions permettant d'obtenir un gel macroscopique.

A côté de cela, il a aussi été effectué pour deux conditions oxyHb/GTA un ajout de nanoparticules de silice Ludox TM-50 avant ajout de glutaraldéhyde. Un des deux mélanges était un état instable afin de voir si les nanoparticules permettaient de jouer un rôle de réticulant en plus du GTA. L'autre mélange était un gel afin de voir si les nanoparticules pouvaient déséquilibrer le réseau et faire perdre l'état gel.

La Figure 1 (page suivante) présente les diagrammes de phase pour l'hémoglobine seule au contact du glutaraldéhyde (GTA) ainsi que des mélanges oxyHb/NP au contact du glutaraldéhyde pour les deux conditions décrites au-dessus dans du tampon phosphate 100 mM, pH 7. La caractérisation des mélanges est indiquée dans la partie matériels et méthodes. Tout d'abord, nous avons pu identifier 3 phases, que ce soit avec ou sans nanoparticules :

- une phase hydrogel, où la matière s'est structurée en moins de 5 minutes et qui reste sous cette forme même lors de chocs. Les concentrations en protéine et en réticulant sont assez importantes pour former un réseau stable donnant cet état de gel ;
- une phase instable, une phase difficile à caractériser, où la matière a pris en masse, mais qui se remet sous un état liquide visqueux quand on apporte de l'agitation ou de l'énergie comme un choc. Cet état thixotropique peut être interprété comme des conditions où les contraintes extérieures sont susceptibles de casser des liaisons dans le réseau formé<sup>3</sup>,
- une phase solution, où l'ajout de glutaraldéhyde ne change donc pas l'état du système. Cet état correspond à des conditions où les concentrations en polymère et/ou réticulant sont trop basses pour former un quelconque réseau macroscopique.

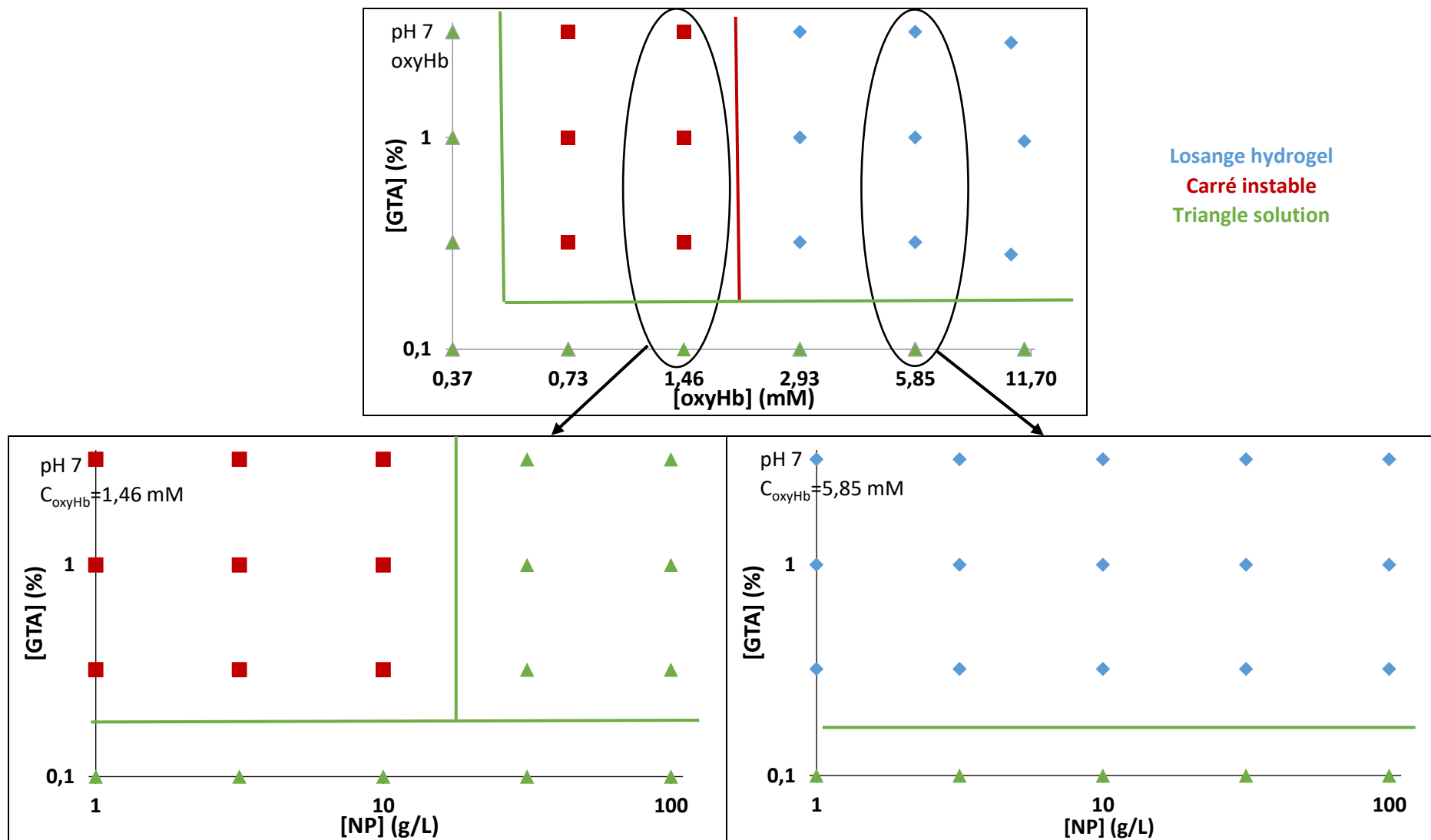


Figure 1 : Diagramme de phase de gélification en tampon phosphate 100 mM pH7 : en haut, diagramme pour plusieurs concentrations d'oxyHb et de GTA sans NP ; en bas à gauche, diagramme à 1,46 mM d'oxyHb pour plusieurs concentrations de NP et de GTA ; en bas à droite, diagramme à 5,85 mM pour plusieurs concentrations de NP et de GTA. Losange bleu hydrogel ; carré rouge instable et triangle vert solution.

Avec le diagramme de phase sans NP, nous voyons donc que :

- le glutaraldéhyde doit avoir une concentration supérieure à 0.32% pour avoir un effet macroscopique.
- l'hémoglobine doit avoir une concentration, minimale :
  - entre 0,73 et 1,46 mM afin de pouvoir former un réseau et sortir de la phase liquide.
  - entre 1,46 et 2,93 mM afin de pouvoir former un gel stable.

Les comparaisons avec la littérature sont difficiles. En effet, aucun article n'a effectué de diagrammes de gélification comme nous l'avons fait. On peut tout de même faire des comparaisons dans la littérature en regardant les concentrations minimums des composants afin de produire des gels.

Ainsi, des gels d'hémoglobine formés par réticulation chimique avec l'aide du polyéthylène glycol ont gélifié à partir de 40 g/L (2,5 mM)<sup>4</sup>. Les gels d'albumine de sérum bovin réticulés par le glutaraldéhyde commencent à 100 g/L (1,5 mM) et avec 1% de glutaraldéhyde<sup>1</sup>. D'autres gels d'albumine de sérum humain formés par réticulation chimique ont gélifié à partir de 30 g/L (200  $\mu$ M). Des gels de différentes protéines<sup>2</sup> ont été obtenus avec 25 % de glutaraldéhyde et :

- 108 g/L (16,5mM) pour le BPTI,
- 28,5 g/L (1,62 mM) pour la myoglobine,
- 59,4 g/L (3,83 mM) pour l'IFABP.

On voit donc que ces concentrations en protéine sont assez cohérentes avec celles que l'on trouve pour nos gels. Concernant la concentration en glutaraldéhyde, les concentrations sont plus difficiles à juger vu le peu de littératures, mais les ordres de grandeur de glutaraldéhyde nécessaire pour former un gel sont cohérents avec ceux que l'on retrouve.

En fixant les concentrations d'oxyHb on constate que l'ajout de NP, pourtant susceptibles d'absorber l'hémoglobine, ne facilite pas la formation du gel (Figure 1). Au contraire à 1,46 mM en Hb, l'ajout de NP a même tendance à déstabiliser le réseau, (Figure 1). Nous avons postulé qu'avec l'adsorption, nous aurions des nœuds supplémentaires dans le réseau facilitant la gélification. Nous supposons donc que l'adsorption sur les nanoparticules, soit créé des nœuds instables (les protéines peuvent se désorber), soit empêche très efficacement les protéines d'entrer dans le gel. En effet, des études ont montré que les fonctions  $\text{NH}_3^+$  des lysines faisaient partie des fonctions des acides aminés qui étaient moteur de l'adsorption des protéines sur la silice<sup>5</sup>. Donc si les résidus lysine réagissent en premier avec la silice dans le phénomène d'adsorption, les résidus lysine ne sont plus disponibles pour réagir avec le glutaraldéhyde et donc pour former un gel aux conditions limites.

Il a été montré pour d'autres gels nanocomposites réticulés chimiquement qu'en présence de NP, et contrairement à ce qui est observé ici il fallait moins de réticulant pour gélifier le polymère, semblant montrer que les nanoparticules ajoutent de la réticulation physique.<sup>6</sup>

En plus de ces tests à pH 7 en milieu tamponné, nous avons également testé la formation de gel :  
- à pH 9 toujours en milieu tamponné ;  
-sans tampon afin de tester si les tampons peuvent avoir un effet sur la gélification. Sans NP, l'oxyHb joue le rôle de tampon et stabilise le pH autour de 7. Avec NP, ce sont les NP qui jouent le rôle de tampon et stabilisent le pH autour de 9.

La Figure 2 présente ces résultats. Nous avons dans ce cas des gels formés à temps court et d'autres à temps long, les temps en présence sont explicités dans la partie matériels et méthodes.

Il est à noter que le point instable à  $C_{\text{oxyHb}}=1,46$  mM et  $C_{\text{GTA}}=0,32\%$  à pH 9 reste une originalité sans explication évidente.

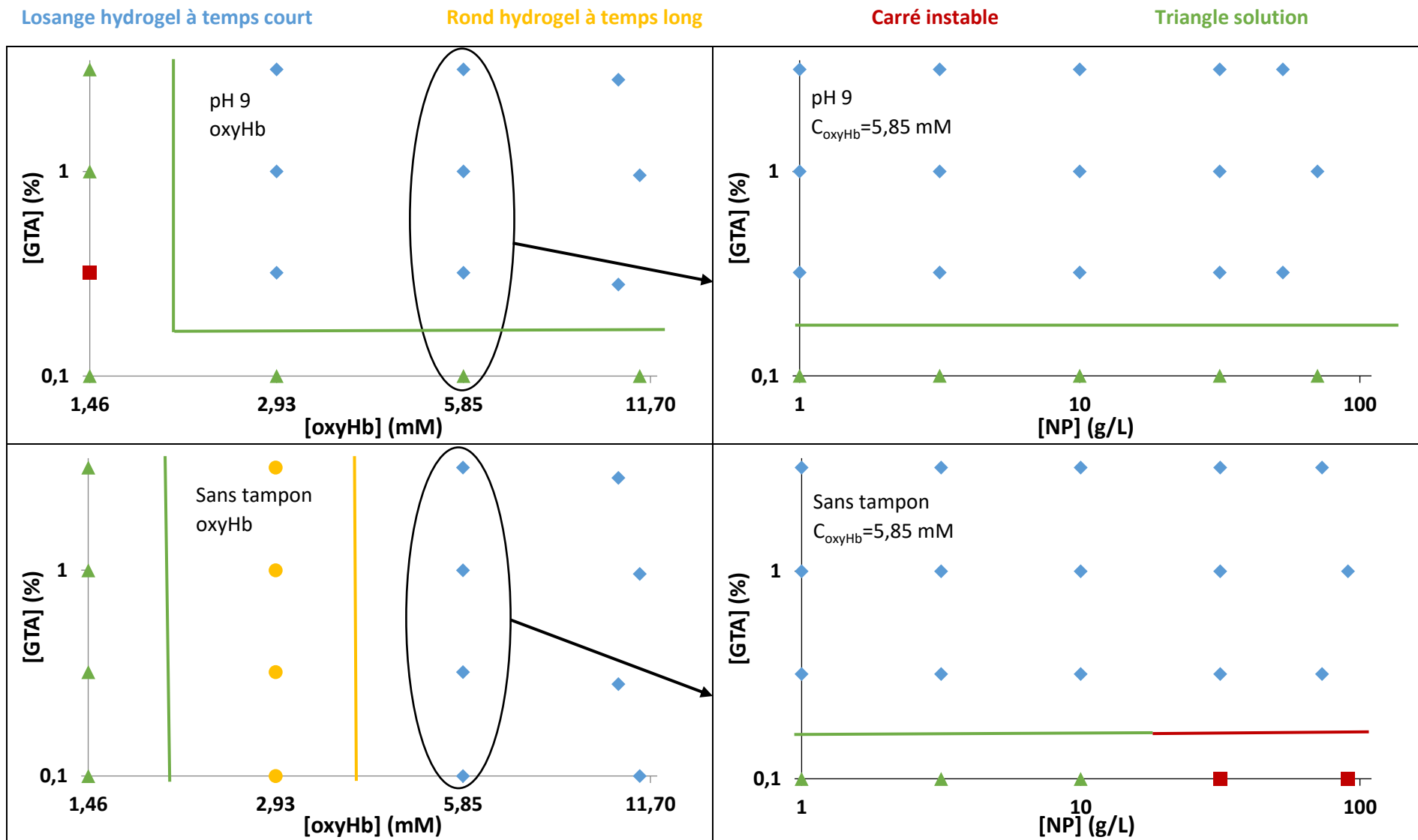


Figure 2 : Diagramme de phase de gélification : en haut, tampon carbonate 100 mM pH 9, gauche diagramme pour plusieurs concentrations d'oxyHb et de GTA sans NP, droite diagramme à 5,85 mM pour plusieurs concentrations de NP et de GTA ; en bas sans tampon, gauche diagramme pour plusieurs concentrations d'oxyHb et de GTA sans NP, droite diagramme à 5,85 mM pour plusieurs concentrations de NP et de GTA. Losange bleu hydrogel à temps court ; rond jaune hydrogel à temps long, carré rouge instable et triangle vert solution.

Avec le diagramme de phase sans NP à pH 9 par comparaison à pH 7, il y a une disparition de la phase instable de cette dernière remplacée par un état solution montrant la difficulté pour un réseau instable de s'installer à pH 9. Autrement, le pH ne modifie pas la concentration minimale en oxyHb ou GTA afin d'avoir un gel stable.

Il a voulu être fait une étude à 1,46 mM sur l'état instable et à 5,85 mM d'oxyHb sur le gel afin de voir si on avait le même effet qu'à pH 7. Toutefois, l'étude n'étant pas faisable à 1,46 mM vu qu'il n'y avait pas d'état instable. Quant à l'étude avec NP à 5,85 mM d'oxyHb à pH 9 tampon carbonate, il est identique à celui à pH 7 : l'ajout de NP, bien qu'il n'ait pas d'adsorption à pH 9 ne modifie rien. La simple présence de NP dans la solution ne change donc rien sur la formation du gel comme à pH 7. Le réseau se forme même avec des NP dans le milieu.

Avec le diagramme de phase sans NP sans tampon (à pH 7 *via* la protéine jouant le rôle de tampon), nous conservons cette concentration limite en oxyHb entre 1,46 et 2,93 mM afin de passer d'une solution à un gel stable. La différence notable est que la concentration minimum pour gélifier est inférieure sans tampon puisque si la concentration en oxyHb est suffisamment forte, 0,1% de GTA est suffisant pour gélifier. Le tampon joue donc un rôle sur la concentration minimum en GTA pour gélifier, mais sinon, le comportement est quasi-identique.

Si on considère le diagramme de phase avec NP à 5,85 mM d'oxyHb sans tampon (passant d'un pH 7 à un pH 9,3 car oxyHb qui tamponnait faiblement est supplanté par les NP qui tamponnent fortement d'après notre mesure de pH expérimentale), il est quasi-identique à celui à pH 9 ce qui est logique vu que le pH de la solution est quasi-identique avec NP.

Il faut noter que sur toute la suite des expériences, nous nous sommes concentrés sur les gels à pH 7, plus proche des conditions normales de pH physiologique. Nous avons toujours comparé les gels à l'hémoglobine non gélifiée quand la technique le permettait afin d'avoir un élément de référence.

Afin de voir l'effet de concentration, les expériences ont été réalisées la plupart du temps sur trois concentrations d'hémoglobine permettant la gélification :

-2,5 mM ;  
-5 mM  
-7,5 mM.

Nous avons fait la même chose pour les concentrations de glutaraldéhyde en nous concentrant sur quatre concentrations :

-0,1% ;  
-0,3% ;  
-1% ;  
-3%.

**Les trois concentrations les plus élevées permettent d'avoir un gel et l'étude de ces trois concentrations permettent d'étudier l'effet de la concentration en glutaraldéhyde.**

0,1% de glutaraldéhyde ne permet pas d'avoir de gel, mais a été étudié quand même quand il a été possible. En effet, à cette concentration de GTA, nous n'avons pas un gel, mais une solution. Les différences mesurées entre l'oxyHb seule et le mélange à 0,1% seront directement imputables à l'effet du glutaraldéhyde sans que la gélification ne rentre en jeu. Les différences dans les mesures entre un mélange à 0,1% et les gels à plus fortes concentrations de GTA seront quant à elles des effets de la gélification.



Nous sommes désormais renseignés sur les conditions de gélification, mais les mesures faites ne nous donnent malheureusement pas d'indications sur la vitesse de mise en place à l'intérieur du réseau gélifié. Pour accéder à cette information, nous avons mis en place des mesures de rhéologie.

## 2) Analyse de la mise en place de la gélification par rhéologie

Pour bien comprendre les propriétés élastiques de nos gels, il faut se pencher sur le bilan énergétique de notre système. En effet, en déformant le matériel, on apporte de l'énergie à celui-ci. Suivant sa nature, soit il accumulera cette énergie afin de la restituer par la suite en reprenant sa forme, soit il perdra cette énergie qui se transformera en chaleur par friction des composants du matériau les uns contre les autres. En pratique, il est plus aisé d'imaginer ce bilan par un exemple concret. Si on étire ou compresse pendant un moment un matériel de la vie de tous les jours, après relâchement, le matériel reprend-il sa forme initiale ou reste-t-il lâche ? Dans le premier cas, on a plus affaire à un solide viscoélastique (balle antistress par exemple). Dans le deuxième, il s'agira plus d'un liquide viscoélastique (le mastic, par exemple).

Un solide viscoélastique est le plus souvent riche en liens dans le matériel, sous forme de liaisons chimiques ou d'interactions physico-chimiques. Les liquides viscoélastiques ont en revanche peu de liens entre les différentes molécules constituant le liquide. L'évolution temporelle de ces deux grandeurs permet donc de mesurer la vitesse de mise en place du réseau gélifié.

Afin de mesurer ces propriétés, on peut utiliser un rhéomètre en mode oscillation. Pour cela, on place notre échantillon entre deux plaques, soit avec une géométrie plan-plan, soit cône plan. Tout cela est montré sur l'image Figure 3.

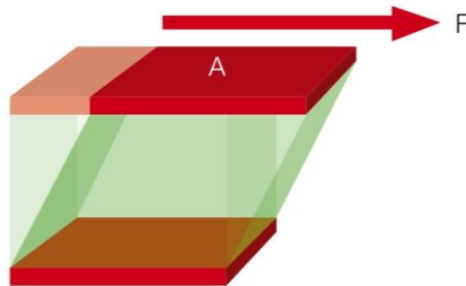


Figure 3 : Schéma présentant l'échantillon soumis à un cisaillement. On applique à une des deux plaques de surface  $A$  une force  $F$  afin de provoquer une déformation  $\gamma = \frac{F}{A}$  en cisaille tandis que la deuxième plaque reste immobile, contrainte.

On mesurera avec l'autre plaque la force  $F'$  qu'il faut afin de maintenir celle-ci immobile, qu'on appelle alors contrainte  $\tau = \frac{F'}{A}$ . Pour arriver à obtenir les informations que nous recherchons, il est nécessaire de faire osciller notre première plaque de façon sinusoïdale, en imposant l'amplitude et la fréquence du déplacement. Il ne faut pas imposer une amplitude trop grande pour éviter une rupture du matériau. Si l'amplitude de déplacement est dans le domaine où le matériel ne se rompt pas, la force que l'on mesurera sur l'autre plaque devrait avoir la même fréquence, mais avec un déphasage et une amplitude réduite. La Figure 4 résume la contrainte  $\tau$  et la déformation  $\gamma$  en fonction du temps.

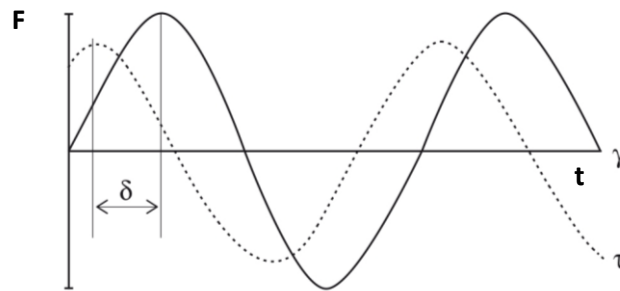


Figure 4 : Contrainte et déformation avec le décalage de phase en fonction du temps.

On a donc  $\gamma = \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t)$  et  $\tau = \tau_0 \cdot \sin(\omega \cdot t + \delta)$ . On définit alors  $G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \cos \delta$  et  $G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \sin \delta$  avec  $\omega = 2 \cdot \pi \cdot f$ ,  $f$  étant la fréquence d'oscillation,  $\tau_0$  et  $\gamma_0$ , les amplitudes de la déformation et de la contrainte respectivement.  $\omega$  et  $\tau_0$  sont fixés par l'opérateur comme expliqué auparavant. Les valeurs mesurées ont un sens physique :

- $G'$  représente le module de conservation. Il reflète le caractère élastique d'un matériau quand il est déformé. Il caractérise la rigidité du matériau viscoélastique et l'énergie accumulée durant une déformation qui est restituée en partie par le matériau. Le module de conservation a la dimension d'une pression, il s'exprime donc le plus souvent en Pascal.

- $G''$  représente quant à lui le module de perte ou dissipation. Il caractérise le comportement visqueux, l'énergie accumulée durant une déformation qui est dissipée sous forme de chaleur. Le module de perte a aussi la dimension d'une pression et s'exprime usuellement en Pascal lui aussi.

Ces deux valeurs permettent de déterminer la nature du matériau. En effet, si  $G' > G''$ , alors le matériau est un solide viscoélastique tandis qu'il s'agit d'un liquide viscoélastique si  $G' < G''$ .

On peut alors mesurer une troisième grandeur, l'angle de phase ou de perte  $\delta$ . Il correspond au déphasage entre la contrainte et la déformation. Ce facteur de perte représente la fraction d'énergie dissipée durant un cycle. On définit  $\tan \delta = \frac{G''}{G'}$ .

Il est d'habitude usuel d'effectuer deux types d'expériences afin d'en apprendre plus sur notre matériau :

-les expériences en amplitude en fixant  $\omega$  et en faisant varier  $\tau_0$ . Le but est de déterminer  $G'$  et  $G''$  dans le domaine de déformation non destructif. En augmentant l'amplitude, on peut déterminer les limites de rupture du matériel.

-les expériences en fréquence en fixant  $\tau_0$  et en faisant varier  $\omega$ . A haute fréquence, on étudie les mouvements rapides sur des temps courts. A basse fréquence, ce sera plus les mouvements lents sur des temps longs, voire au repos.

Dans notre cas, comme nous avons pu le voir, nos gels évoluent au cours du temps, rendant impossible les études habituellement faites, étant donné qu'il est impossible de décorrélérer les effets, en fonction du temps, de celui de la fréquence ou de l'amplitude suivant le test appliqué. Nous avons donc décidé de mesurer le module de conservation et de perte en fonction du temps à fréquence et amplitude fixées. Les expériences ont été effectuées au LLB avec l'aide du Docteur Alexis Chennevière, le rhéomètre utilisé est décrit dans la partie Matériels et méthodes.

Afin de déterminer la fréquence et l'amplitude que nous allons utiliser dans notre étude, nous avons effectué une mesure en fréquence du module de conservation et de perte sur un gel pour différentes amplitudes. Le gel utilisé a été un gel oxyHb 2,5 mM/GTA 0,3%, tampon phosphate 100 mM pH 7 formé depuis plusieurs heures afin d'avoir un gel quasi-stable dans le temps. Les résultats sont donnés dans la Figure 5.

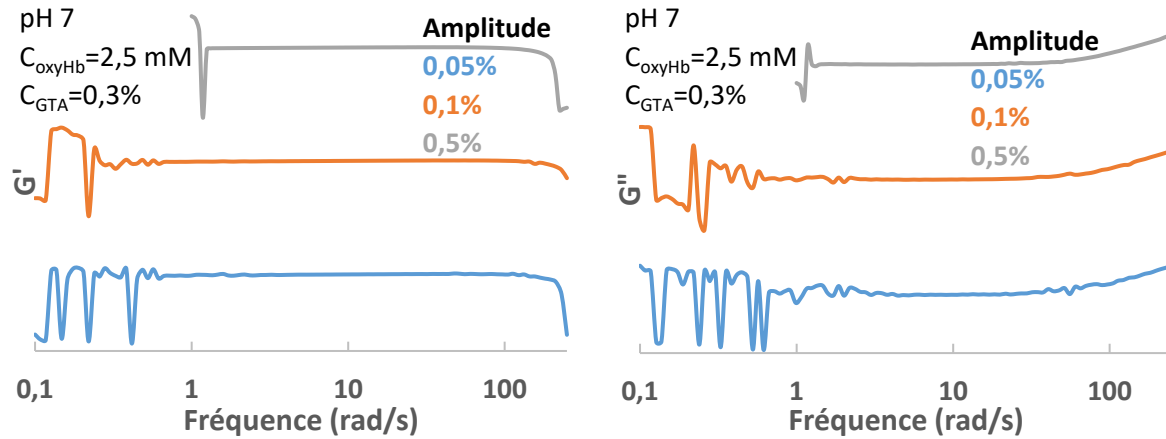


Figure 5 : Module de conservation  $G'$  et de perte  $G''$  d'un gel oxyHb 2,5 mM/GTA 0,3%, tampon phosphate 100 mM pH 7 pour différentes amplitudes en fonction de la fréquence,  $T=25^\circ\text{C}$ .

On voit que le gel n'est pas tout à fait au repos : sur le module de perte, aux grandes fréquences qui sont les dernières mesurées, nous avons une remontée. On voit que le domaine de fréquence stable est entre 2 et 40 rad/s. Nous voyons aussi que l'amplitude donnant le signal le moins bruité est 0,5% de déformation sans qu'il y ait de rupture. Nous avons donc décidé de faire les expériences en oscillation à une fréquence de 10 rad/s et avec une amplitude de 0,5 % à  $25^\circ\text{C}$ .

Afin de caractériser le module de conservation à tout instant  $t$ , il est possible d'utiliser l'équation 1 suivant le modèle de Hill<sup>7</sup> :

$$G'(t) = G'_{\infty} \cdot \frac{t^n}{t^n + \theta^n} \quad (\text{éq.1})$$

avec  $G'_{\infty}$ , le module de conservation à l'équilibre,  
 $\theta$ , le temps de demi-gélification ( $G'(\theta) = \frac{G'_{\infty}}{2}$ ),  
 $n$ , un coefficient d'ajustement.

Les études ont montré que les paramètres importants à étudier sont le module de conservation et le temps de gélification<sup>8</sup>. C'est sur ces deux paramètres que nous nous attarderons durant nos expériences. Le dernier paramètre  $n$  n'a aucun sens physique<sup>9</sup> et n'est pas étudié dans la littérature. Nous le donnerons par la suite pour les expériences, mais nous n'essayerons pas de l'analyser.

Par la suite, nous ne montrerons pas les simulations sur les graphes pour un souci de clarté. Toutefois, si nous donnons les valeurs tirées de la simulation, cela signifie que la simulation reproduit au plus près les données expérimentales. Il est normalement possible de suivre aussi le module de perte avec le temps avec la même formule, mais nous n'avons pas réussi à simuler les courbes de manière convenable car les premiers points que nous mesurons sont après l'évolution rapide qui survient au départ, faisant qu'il est impossible de simuler la courbe de façon convenable.

Il a été par contre possible d'aller plus loin dans l'analyse du gel avec le module de perte. En effet, le module de conservation à l'équilibre peut lui-même être décomposé comme suivant l'équation 2<sup>10</sup> :

$$G'_{\infty} = \vartheta . R . T$$

(éq. 2)

avec  $\vartheta$ , la concentration en sites de réticulation,  
 R, la constante des gaz parfaits,  
 T, la température.

avec la mesure du module de conservation, il est ainsi possible de mesurer la réticulation dans les gels. Il faut cependant être conscient des limites de cette formule qui ne prend pas en compte les possibles enchevêtrements du réseau tridimensionnel.

#### a) Etude sans nanoparticule

On a donc étudié l'effet de la concentration en oxyHb et en GTA. Les expériences ont été faites pour 9 gels (3 concentrations d'oxyHb et trois concentrations de GTA). On va d'abord présenter les résultats sur la Figure 6 donnant les différents modules :

- pour différentes concentrations de glutaraldéhyde à concentration fixe d'oxyhémoglobine (2,5 mM) ;
- pour différentes concentrations d'oxyhémoglobine à concentration fixe de glutaraldéhyde (3%).

Le but est déjà de comprendre les phénomènes en jeu avant de se pencher sur les autres gels.

Les graphes montrent seulement l'évolution avant que des phénomènes de séchage du gel prennent place (vers 800 à 1500 secondes suivant les gels). Les premières secondes de l'expérience n'ont pas pu être mesurées en raison du fait du temps de la mise en place de l'appareil après l'ajout du glutaraldéhyde ( $t < 90$  s environ). Si on prend n'importe quel gel mesuré, à temps court, on a une montée très rapide du module de conservation comme de perte, puis une montée lente sur un temps long. Ce type de comportement a déjà été exploré pour des gels formés par réticulation<sup>11</sup>. Au temps court, beaucoup de liaisons se forment, expliquant la montée rapide des deux modules. On a par contre au temps long des réorganisations des liaisons dans le gel, avec tout de même, de nouvelles liaisons qui continuent de se former, ce qui fait qu'on a une augmentation lente des modules.

Pour le module de conservation, les deux équations 1 et 2 nous ont permis de tirer les données suivantes dans le Tableau 1.

C <sub>Hb</sub> (mM)	C <sub>GTA</sub> (%)	n	$\theta$ (s)	G' <sub>∞</sub> (Pa)	v (mol/m <sup>3</sup> )
2,5	0,3	0,96	765	4,6.10 <sup>3</sup>	1,8
2,5	1	0,44	554	8,4.10 <sup>3</sup>	3,4
2,5	3	0,26	584	1,1.10 <sup>4</sup>	4,3

C <sub>Hb</sub> (mM)	C <sub>GTA</sub> (%)	n	$\theta$ (s)	G' <sub>∞</sub> (Pa)	v (mol/m <sup>3</sup> )
2,5	3	0,26	584	1,1.10 <sup>4</sup>	4,3
5	3	0,33	344	7,9.10 <sup>4</sup>	31,7
7,5	3	0,35	141	2,2.10 <sup>5</sup>	87,1

Tableau 1 : Valeurs tirées de la modélisation du module de conservation. Tampon phosphate 100 mM pH 7, T=25°C.

En haut, effet de la concentration en GTA pour une concentration fixe d'oxyHb (C<sub>oxyHb</sub>=2,5 mM).

En bas, effet de la concentration en oxyHb pour une concentration fixe de GTA (C<sub>GTA</sub>=3,0%).

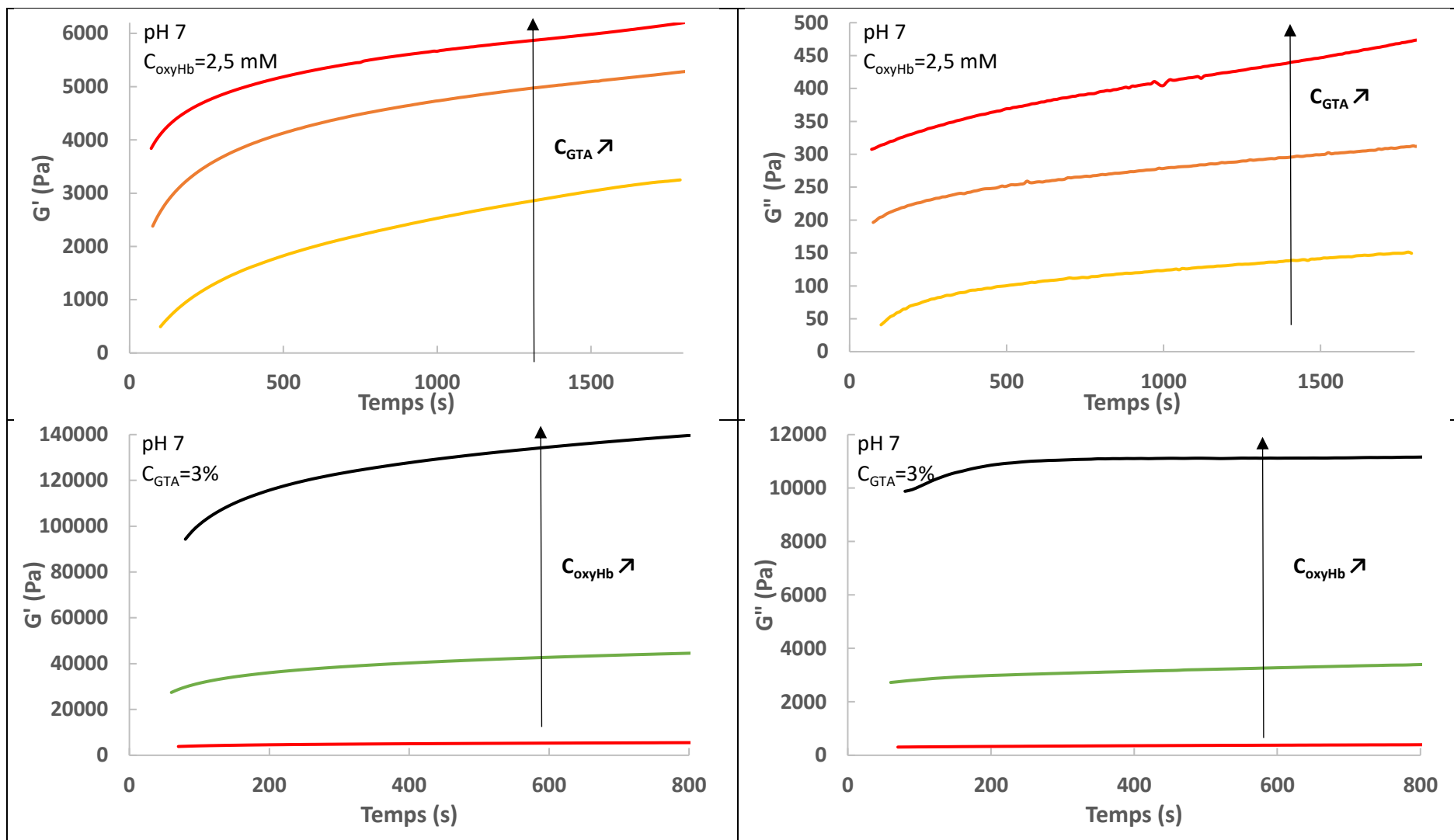


Figure 6 : Module de conservation  $G'$  et de dissipation  $G''$  en fonction du temps. Tampon phosphate 100 mM pH 7,  $T=25^{\circ}\text{C}$ .

En haut, effet de la concentration en GTA pour une concentration fixe d'oxyHb ( $C_{oxyHb}=2,5$  mM) :  $C_{GTA}$  en jaune 0,3%, en orange 1,0% et en rouge 3,0%

En bas, effet de la concentration en oxyHb pour une concentration fixe de GTA ( $C_{GTA}=3,0\%$ ) :  $C_{oxyHb}$  en rouge 2,5 mM, en vert 5,0 mM et en noir 7,5 mM.

On n'essayera pas d'analyser la valeur du  $n$  comme expliqué plus haut. Toutefois, on peut étudier l'effet de la concentration sur le temps de demi-gélification, le module à l'équilibre et la concentration en sites de réticulation qui lui est liée :

-si on considère une augmentation de la concentration de glutaraldéhyde à concentration d'oxyhémoglobine fixe, on voit une augmentation légère du module à l'équilibre et donc de la concentration en sites de réticulation ( $C_{GTA} \times 10$  donne  $G' \times 2,4$ ). Cela est logique car plus il y a de réticulant, plus des liaisons peuvent se créer. Par contre, on n'observe aucune différence notable sur le temps de demi-gélification, montrant que le glutaraldéhyde n'agit pas sur la cinétique de gélification.

-avec une augmentation de la concentration d'oxyhémoglobine à concentration de glutaraldéhyde fixe, on constate une augmentation forte du module à l'équilibre et donc de la concentration en sites de réticulation ( $C_{oxyHb} \times 3$  donne  $G' \times 20$ ). Plus il y a d'oxyhémoglobine, plus il existe de « briques élémentaires » dans le gel et donc participent au renforcement du gel. On voit aussi que plus  $C_{oxyHb}$  est forte, plus le temps de réticulation est court, ( $C_{oxyHb} \times 3$  donne  $\theta / 4$ ) montrant que la concentration en oxyhémoglobine joue un rôle sur la cinétique de gélification.

Les études utilisant le modèle de Hill afin d'ajuster leur module de conservation en fonction du temps sont peu nombreuses et ne concernent que des gels de polyacrylamide<sup>7,9,12</sup>. Il a fallu chercher des informations dans d'autres articles, n'utilisant pas la même manière d'ajuster les courbes expérimentales. Les comparaisons avec la littérature sont donc difficiles pour un temps de gélification car il n'est pas défini identiquement partout. Il apparaît tout de même que :

- le module de conservation croît avec la concentration en polymères<sup>13,14</sup> ;
- le module de conservation croît avec la concentration en réticulants<sup>7</sup> ;
- le temps de gélification diminue avec la concentration en polymères<sup>15</sup>.

Ces trois remarques sont en concordance avec ce que l'on trouve dans cette étude. Toutefois, l'influence de la concentration en réticulant est plus contestée : il apparaît soit que le temps de gélification diminue avec la concentration en réticulants<sup>15</sup>, ce qui n'est pas le cas ici, soit le temps de gélification n'a pas un comportement cohérent avec la concentration en réticulants<sup>9</sup>, en accord avec ce que l'on a constaté ici.

La Figure 7 présente ainsi les modules de conservation et de perte pour les autres gels mesurés.

Les observations faites précédemment se retrouvent dans la plupart des conditions testées (Figure 6). On a, par contre, des comportements inhabituels pour les gels à fortes concentrations en oxyhémoglobine et faibles en glutaraldéhyde. En effet, pour oxyHb 5 mM/GTA 0,3 %, on a toujours une montée rapide avant d'atteindre un maximum suivi d'une lente décroissance. Ce phénomène a déjà été constaté dans l'étude réalisée par Ofei et collaborateurs<sup>16</sup>.

Après la formation rapide du réseau, il y a donc une rupture lente des liaisons. On peut penser qu'à cause du maintien de la sollicitation, certaines liaisons se cassent (ou bougent les unes par rapport aux autres), donnant des écoulements et/ou des mouvements de matière à l'intérieur du gel le fragilisant, se traduisant par cette diminution de valeurs des modules.

On constate un phénomène ressemblant, mais encore plus marqué avec le gel à oxyHb 7,5 mM/GTA 0,3 %. On a toujours une augmentation rapide, puis une chute conséquente et rapide avant d'atteindre un plateau. Le phénomène ressemble à celui précédemment décrit, mais plus violent. On peut penser que pour ce gel, on a une réticulation très rapide comme précédemment, donnant un gel très réticulé et tellement rigide que les liaisons se brisent après maturation. Le phénomène de casse de certaines liaisons/écoulement est plus brutal, permettant par contre d'arriver à une structure plus stable après un temps, équilibré en nombre de liaisons.

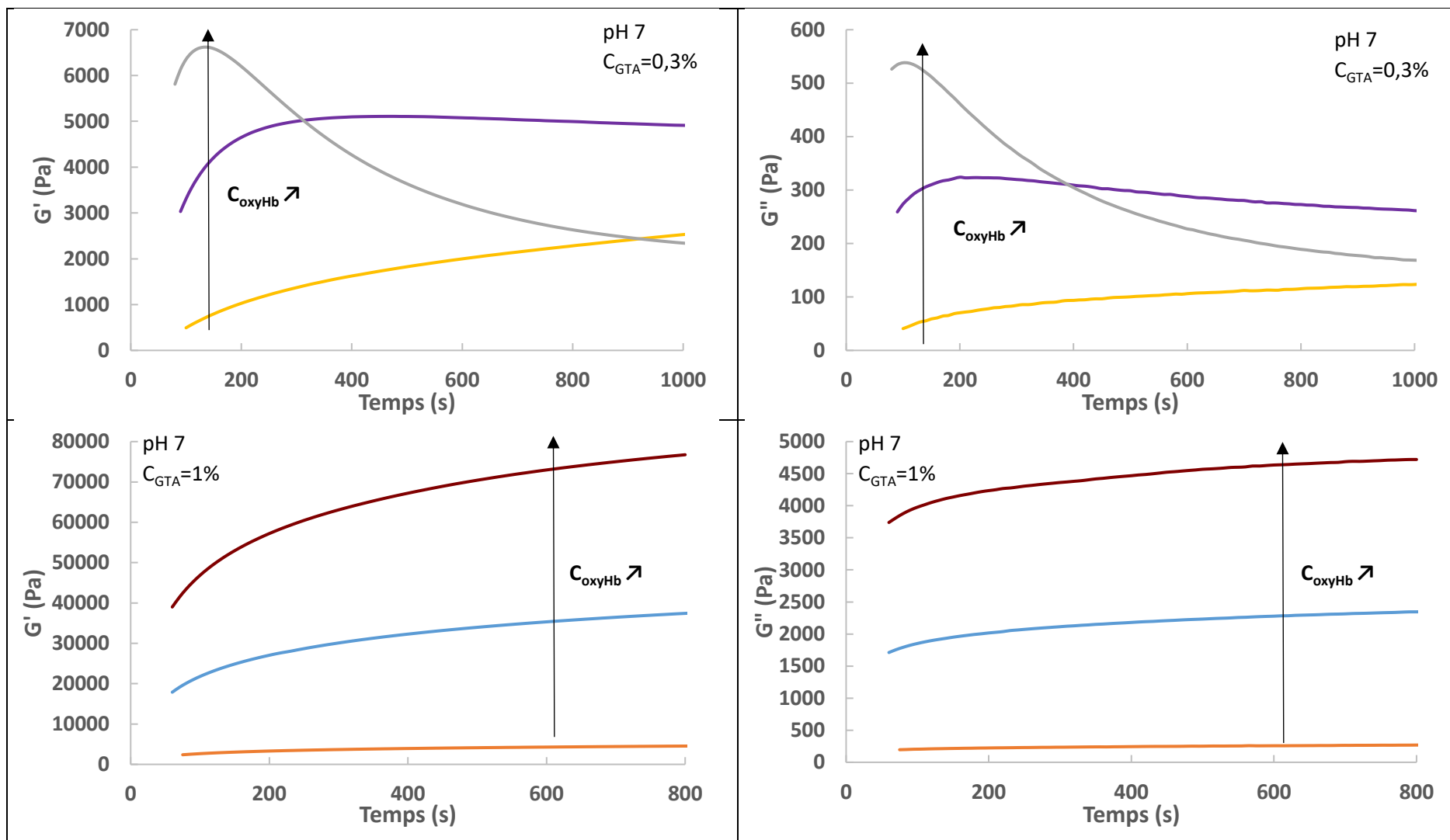


Figure 7 : Module de conservation  $G'$  et de dissipation  $G''$  en fonction du temps. Tampon phosphate 100 mM pH 7,  $T=25^\circ\text{C}$ .

En haut, effet de la concentration en oxyHb pour une concentration fixe de GTA ( $C_{\text{GTA}}=0,3\%$ ) :  $C_{\text{oxyHb}}$  en jaune 2,5 mM, en violet 5,0 mM et en gris 7,5 mM.

En bas, effet de la concentration en oxyHb pour une concentration fixe de GTA ( $C_{\text{GTA}}=1,0\%$ ) :  $C_{\text{oxyHb}}$  en orange 2,5 mM, en bleu 5,0 mM et en marron 7,5 mM.

Pour le module de conservation, il a été possible pour les gels sans décroissance d'appliquer le modèle de Hill. Le Tableau 2 donne les valeurs mesurées.

$C_{Hb}$ (mM)	$C_{GTA}$ (%)	n	$\theta$ (s)	$G_{\infty}$ (Pa)	$v$ (mol/m <sup>3</sup> )
5	1	0,48	306	$6,1 \cdot 10^4$	24,7
5	3	0,33	344	$7,9 \cdot 10^4$	31,7

$C_{Hb}$ (mM)	$C_{GTA}$ (%)	n	$\theta$ (s)	$G_{\infty}$ (Pa)	$v$ (mol/m <sup>3</sup> )
7,5	1	0,56	164	$1,1 \cdot 10^5$	43,7
7,5	3	0,35	141	$2,2 \cdot 10^5$	87,1

$C_{Hb}$ (mM)	$C_{GTA}$ (%)	n	$\theta$ (s)	$G_{\infty}$ (Pa)	$v$ (mol/m <sup>3</sup> )
2,5	1	0,44	554	$8,4 \cdot 10^3$	3,4
5	1	0,48	306	$6,1 \cdot 10^4$	24,7
7,5	1	0,56	164	$1,1 \cdot 10^5$	43,7

Tableau 2 : Valeurs tirées de la modélisation du module de conservation. Tampon phosphate 100 mM pH 7, T=25°C.

En haut, effet de la concentration en GTA pour une concentration fixe d'oxyHb ( $C_{oxyHb}=5$  mM).

Au milieu, effet de la concentration en GTA pour une concentration fixe d'oxyHb ( $C_{oxyHb}=7,5$  mM).

En bas, effet de la concentration en oxyHb pour une concentration fixe de GTA ( $C_{GTA}=1,0\%$ ).

On constate de nouveau les mêmes phénomènes :

- la concentration de GTA permet de modifier un peu le module et le nombre de sites de réticulation, sans changer le temps de demi-gélification ;
- la concentration d'oxyHb modifie fortement le module et le nombre de sites de réticulation ainsi que le temps de demi-gélification.

Après avoir étudié les gels d'oxyhémoglobine réticulée avec du glutaraldéhyde, il est intéressant de voir si le dopage des gels par des nanoparticules permet aussi de moduler les propriétés des gels.

#### b) Effet des nanoparticules

Il est déjà important de comprendre l'effet des nanoparticules sur les propriétés du gel (module de conservation, temps de demi-gélification), mais il est aussi important de voir si les nanoparticules affectent les effets des concentrations en oxyhémoglobine et en glutaraldéhyde. La Figure 8 et Figure 9 permettent de voir comment la présence de nanoparticules modifie le comportement temporel des différents modules.

Quel que soit le gel, on retrouve le comportement repéré plus haut avec une augmentation rapide du module au temps court avant une augmentation lente au temps long. Afin de mieux comprendre, nous avons ajusté le module de conservation avec le modèle de Hill (Tableau 3).



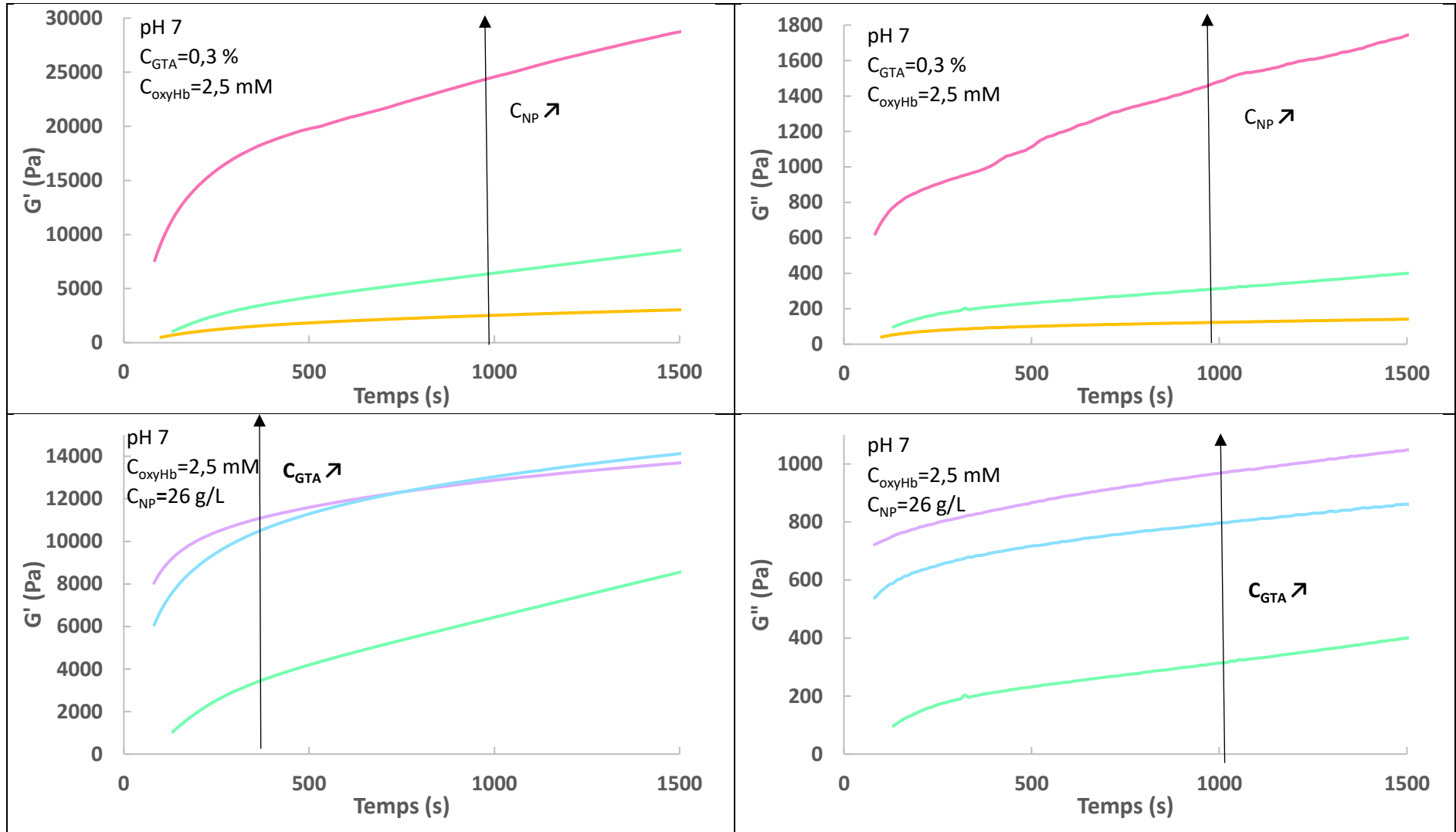


Figure 8 : Module de conservation  $G'$  et de dissipation  $G''$  en fonction du temps. Tampon phosphate 100 mM pH 7,  $T=25^\circ\text{C}$ .

En haut, effet de la concentration en NP pour une concentration fixe de GTA ( $C_{\text{GTA}}=0,3 \%$ ) et en oxyHb ( $C_{\text{oxyHb}}=2,5 \text{ mM}$ ) :  $C_{\text{NP}}$  en jaune 0 g/L, en vert clair 26 g/L et en rose 75 g/L.

En bas, effet de la concentration en GTA pour une concentration fixe d'oxyHb ( $C_{\text{oxyHb}}=2,5 \text{ mM}$ ) et en NP ( $C_{\text{NP}}=26 \text{ g/L}$ ) :  $C_{\text{GTA}}$  en vert clair 0,3 %, en bleu clair 1,0 % et en lavande 3,0 %.

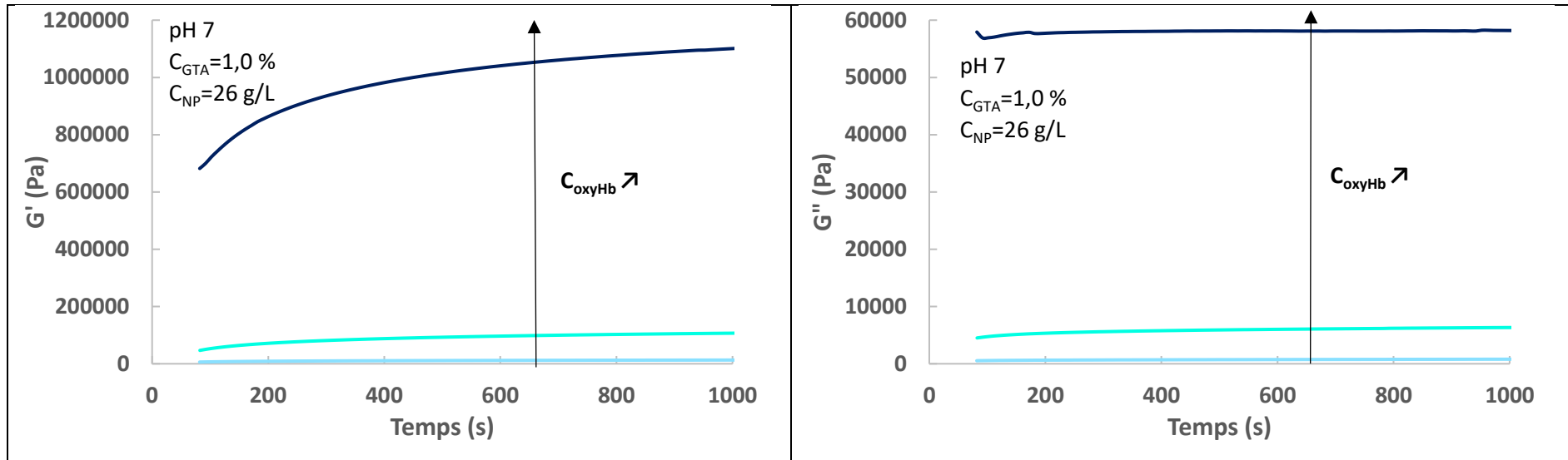


Figure 9 : Module de conservation  $G'$  et de dissipation  $G''$  en fonction du temps. Tampon phosphate 100 mM pH 7.

Effet de la concentration en oxyHb pour une concentration fixe de GTA ( $C_{GTA} = 1,0\%$ ) et en NP ( $C_{NP} = 26\text{ g/L}$ ) :  $C_{oxyHb}$  en bleu clair 2,5 mM, en turquoise 5,0 mM et en bleu foncé 7,5 mM.

$C_{Hb}$ (mM)	$C_{GTA}$ (%)	$C_{NP}$ (g/L)	n	$\theta$ (s)	$G'_{\infty}$ (Pa)	$\nu$ (mol/m <sup>3</sup> )
2,5	0,3	0	0,96	765	$4,6 \cdot 10^3$	1,8
2,5	0,3	26	1,02	1540	$1,7 \cdot 10^4$	6,9
2,5	0,3	75	0,51	4896	$8,2 \cdot 10^4$	33,2

$C_{Hb}$ (mM)	$C_{GTA}$ (%)	$C_{NP}$ (g/L)	n	$\theta$ (s)	$G'_{\infty}$ (Pa)	$\nu$ (mol/m <sup>3</sup> )
2,5	0,3	26	1,02	1540	$1,7 \cdot 10^4$	6,9
2,5	1	26	0,57	297	$2,0 \cdot 10^4$	7,9
2,5	3	26	0,31	599	$2,4 \cdot 10^4$	9,7

$C_{Hb}$ (mM)	$C_{GTA}$ (%)	$C_{NP}$ (g/L)	n	$\theta$ (s)	$G'_{\infty}$ (Pa)	$\nu$ (mol/m <sup>3</sup> )
2,5	1	26	0,57	297	$2,0 \cdot 10^4$	7,9
5	1	26	0,73	191	$1,4 \cdot 10^5$	56,1
7,5	1	26	0,56	82	$1,4 \cdot 10^6$	557,4

Tableau 3 : Valeurs tirées de la modélisation du module de conservation. Tampon phosphate 100 mM pH 7, T=25°C.

En haut, effet de la concentration en NP pour une concentration fixe de GTA ( $C_{GTA}=0,3\%$ ) et en oxyHb ( $C_{oxyHb}=2,5$  mM).

Au milieu, effet de la concentration en GTA pour une concentration fixe d'oxyHb ( $C_{oxyHb}=2,5$  mM) et en NP ( $C_{NP}=26$  g/L).

En bas, effet de la concentration en oxyHb pour une concentration fixe de GTA ( $C_{GTA}=1,0\%$ ) et en NP ( $C_{NP}=26$  g/L).

Les nanoparticules permettent donc une augmentation conséquente du module de stockage ( $C_{NP} \times 3$  donne  $G' \times 5$ ). On peut penser que les protéines en s'adsorbant sur les nanoparticules créent des liaisons non covalentes, qui créent des nouveaux sites de réticulation non-covalents. On constate aussi que le temps de demi-gélification augmente très fortement avec la concentration en nanoparticules ( $C_{NP} \times 3$  donne  $\theta \times 3$ ).

On peut aussi remarquer que les effets constatés auparavant pour la concentration en hémoglobine (effet fort :  $C_{oxyHb} \times 3$  donne  $G' \times 70$  et  $\theta / 3,6$ ) et en GTA (effet modéré :  $C_{GTA} \times 10$  donne  $\theta / 4$ ) sont globalement conservés avec les nanoparticules.

Il a été montré que l'ajout de nanoparticules de silice augmentait la raideur des gels<sup>6,17</sup>. Toutefois, la raideur d'un gel n'est pas mesurée par le module de conservation, bien que les deux valeurs soient liées<sup>18</sup>. Il a été aussi montré que les nanoparticules de silice modifiaient les propriétés de compression et d'extension des gels<sup>19</sup>. Malheureusement, l'effet des nanoparticules sur les propriétés des gels est mal compris. Avec l'addition de nanoparticules de silice, le temps de gélification est réduit et le module de conservation augmente pour certains gels de polyacrylamide<sup>20</sup>. L'ajout de nanoparticules modifie la morphologie des gels<sup>17</sup>. Ainsi, l'ajout de nanoparticules de silice dans des gels d'hectorite provoque des réarrangements structuraux à cause de phénomène d'adsorption aboutissant à des changements dans la rhéologie des gels<sup>21</sup>.

Dans notre cas, il apparaît que les nanoparticules permettent de donner de nouveaux points de réticulation dans notre gel, faisant que nous avons un module de conservation plus fort.

L'augmentation du temps de gélification avec la concentration de nanoparticules montre par contre que l'organisation dans le gel en présence de nanoparticules est plus complexe et que le gel a donc besoin de plus de temps pour arriver à un état d'équilibre.

Les principaux points à retenir pour la rhéologie sont résumés ici. On a une évolution temporelle des gels sur des temps très longs. Les expériences que nous avons faites par la suite ont été réalisées sur des gels allant de la dizaine de minute à l'heure de vieillissement. Nous nous sommes donc placés dans des gammes de temps où l'évolution du gel est très lente. Les valeurs des modules mesurées montrent que ce sont bien des gels. La Figure 10 permet de montrer les effets des composants sur le module de conservation et le temps de demi-gélification.

Effet de la concentration en	Hémoglobine	Glutaraldéhyde	Nanoparticules de silice
sur le Module de conservation $G'$	++	+	++
Temps de demi-gélification $\theta$	--	=	++

Figure 10 : Effet de la concentration en hémoglobine, en glutaraldéhyde et en nanoparticule sur le module de conservation et la demi-gélification. ++ : forte augmentation, + : faible augmentation, = : aucune modification, -- : forte diminution.

Les concentrations en hémoglobine, le glutaraldéhyde et les nanoparticules ont un rôle sur la cinétique de gélification et les propriétés élastiques. Si le glutaraldéhyde n'a que peu d'effets, on voit par contre qu'en modulant les concentrations de nanoparticules et d'hémoglobine, il est possible d'avoir un gel ayant un module précis qui a sa gélification en un temps choisi. Ceci est très intéressant dans les applications biomédicales où l'on veut pouvoir manipuler les précurseurs du gel, mais avoir une prise rapide une fois en place.

Il est désormais temps de voir les propriétés de l'hémoglobine de fixer/libérer le dioxygène.

## II- Propriétés d'oxygénation des gels

En formant un gel, on peut penser que l'hémoglobine peut avoir ses propriétés de fixation du dioxygène modifiées. En effet, il a été montré que le glutaraldéhyde, en formant des polymères d'hémoglobine, modifie déjà les propriétés de fixation/libération de dioxygène<sup>22</sup>. Si l'hémoglobine est dans son état oxygénée, le polymère formé aura une meilleure affinité pour  $O_2$ . Si c'est dans son état désoxygéné, l'affinité pour  $O_2$  sera réduite. Le coefficient de Hill sera par contre proche de 1, indiquant un phénomène non-coopératif. Cela a été expliqué par le fait que l'hémoglobine a une structure figée une fois réticulée et la coopérativité vient normalement de la transition entre un état de faible affinité et un état de forte affinité<sup>23</sup>. Nous avons donc tenté deux expériences à pH 7 (tampon phosphate 100 mM) à température ambiante :

-nous avons pris de l'oxyhémoglobine que nous avons gélifiée dans cet état en rajoutant du glutaraldéhyde. Puis, le gel a été mis dans un tonomètre pour le désoxygéner sous flux d'argon.

-de l'oxyhémoglobine a été mise dans un tonomètre, puis désoxygénée sous flux d'argon. Toujours sur flux d'argon, nous avons rajouté du glutaraldéhyde et avec une agitation douce, nous avons réussi à gélifier le mélange dans l'état désoxygéné. Nous l'avons alors laissé à l'air libre pour oxygéner.

Des schémas détaillant le système et les étapes sont dans la partie Matériels et méthodes.

Il a été impossible de mesurer de façon spectroscopique l'évolution des gels, leur épaisseur et la concentration faisant que la transmission était trop faible à mesurer. Nous avons donc essayé de suivre son état grâce à la couleur du gel en filmant le gel en fonction du temps. La Figure 11 présente ainsi l'évolution d'un gel à 2,5 mM de désoxyHb et 3% de GTA sur 4 jours.

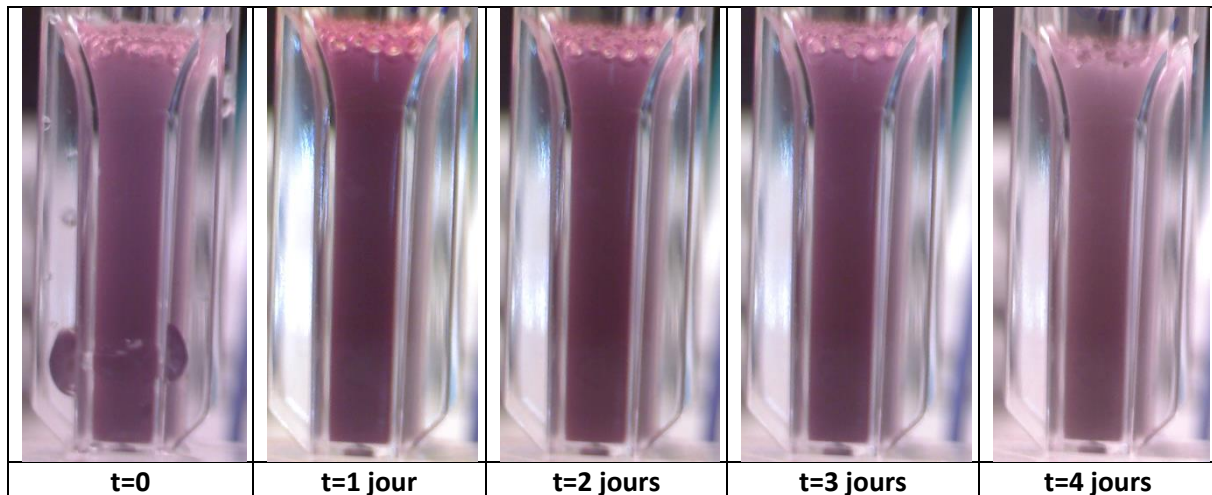


Figure 11 : Evolution de la couleur d'un gel à 2,5 mM de désoxyHb et 3% de GTA sur 4 jours. pH 7, tampon phosphate 100 mM, 25°C.

Comme on peut le constater ici, aucune évolution au niveau de la couleur n'a été constatée sur plusieurs jours. Donc une fois le gel formé, la désoxyhémoglobine n'a plus la capacité de fixer le dioxygène. Pour l'oxyhémoglobine, c'est la même chose (images non présentées), sur 5 jours, il n'y pas de changements de la couleur. Cela signifie que l'oxyhémoglobine ne peut non plus relarguer son dioxygène fixé.

Nous n'avons pas tenté plus d'expériences, la forte concentration en hémoglobine empêche la plupart des mesures en spectroscopie directe et en fenêtrés minces, il y a des problèmes de séchage qui surviennent, empêchant l'étude du gel sur le long terme. Il est donc difficile de trouver d'autres expériences permettant de tester l'activité du gel.

Il est cependant intéressant de comprendre pourquoi l'hémoglobine perd ses propriétés d'oxygénation/de désoxygénation. Pour cela, nous avons décidé d'étudier ce phénomène via le prisme de toutes les modifications que pourraient subir le fer et l'hème.

### III- Modifications de l'hème de l'hémoglobine et de son fer

Nous avons repris les techniques développées dans le chapitre 2.

#### 1) Etude par résonance paramagnétique électronique

Afin d'étudier l'environnement de l'hème avec la gélification par le glutaraldéhyde, nous avons utilisé la résonance paramagnétique électronique. De même que précédemment, nous avons dû utiliser la

forme méthémoglobine afin d'avoir du signal. Les expériences de RPE ont été faites à l'ICMMO (Université Paris-Saclay) avec l'aide du Docteur Christian Herrero. Les expériences ont été faites pour comparer la métHb en solution (déjà étudiée au chapitre 2) avec des gels de métHb réticulés par le GTA à différentes concentrations (Figure 12). Les expériences ont été faites à pH 7 et à 90 K avec l'utilisation d'azote liquide (les mesures à la température de l'hélium liquide se sont heurtées à des problèmes d'approvisionnement).

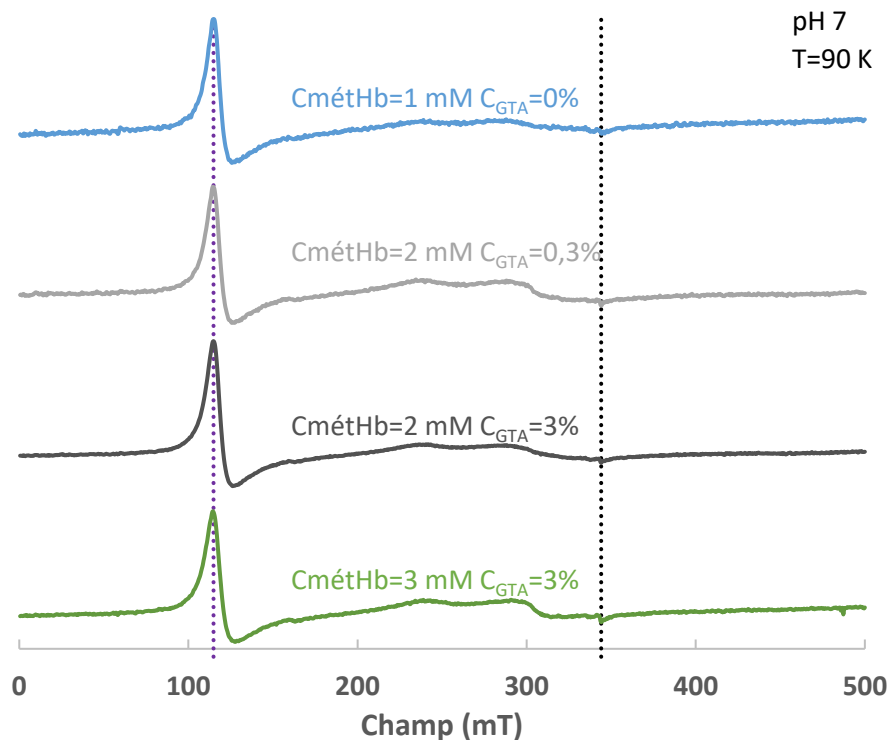


Figure 12 : Spectres RPE du fer de la méthémoglobine, milieu azote liquide,  $T=90\text{ K}$ , pH 7 tampon phosphate 100 mM

En bleu, métHb 1 mM en solution.

En gris clair, gel métHb 2 mM GTA 0,3 %.

En gris foncé, gel métHb 3 mM GTA 0,3 %.

En vert, gel métHb 3 mM GTA 3 %.

Les différentes conditions de gélification ne changent pas les signaux caractéristiques de la forme haut spin avec le facteur  $g_{xy}$  à 5,9 repéré en violet et le facteur  $g_z$  à 2,0 en noir caractéristiques de la méthémoglobine seule. De plus, les formes des différents spectres sont très similaires avec les deux bandes vers 240 et 290 mT.

D'après ces résultats, il n'y a donc aucune différence dans la configuration de l'hème autour du fer ce qui signifie que la gélification ne modifie pas la structure de l'hème, tout du moins pour la forme méthémoglobine. Nous avons donc utilisé comme dans le chapitre précédent la spectroscopie d'adsorption X pour étudier les autres formes de l'hémoglobine.

## 2) Etude par spectroscopie d'adsorption des rayons X

Les expériences ont été effectuées sur la ligne SAMBA du synchrotron SOLEIL avec l'aide du Docteur Andrea Zitolo. Le premier objectif a été d'étudier si la réticulation de l'oxyhémoglobine par le glutaraldéhyde a un effet sur le fer de l'hème.

### a) Etude sans nanoparticule

Pour cela, nous avons décidé de faire varier la concentration d'oxyhémoglobine (2,5 mM, 5 mM et 7,5 mM) comme celle de glutaraldéhyde (0,1 %, 0,3 %, 1 %, 3 %). Les expériences ont été effectuées à pH 7 dans du tampon phosphate 100 mM. La Figure 13 donne les spectres XAS pour ces différents mélanges.

Les différents spectres de l'oxyhémoglobine seule sont identiques quelle que soit la concentration. L'oxyHb seule a été décrite dans le chapitre 2.

Pour la figure C, pour la concentration de 7,5 mM en oxyHb, quelle que soit la concentration en GTA, on n'observe aucune différence. Pour les figures A et B (respectivement 2,5 et 5 mM), il y a des petites différences au maximum du spectre et sur le pré-seuil suivant les concentrations en GTA, qui sont cependant inférieures aux modifications minimales observées dans le cas de l'adsorption. Les spectres sont très largement superposables quelle que soit la concentration en GTA. On peut ainsi conclure qu'il n'y a aucune modification dans la distribution électronique du fer lors de la réaction du GTA avec l'hémoglobine.

D'après notre analyse, la réticulation n'affecte donc pas l'hème et son fer. On peut se demander si la combinaison de la réticulation et de l'adsorption peut modifier plus fortement l'hème que le phénomène de l'adsorption seule. C'est pour cela que d'autres expériences ont été tentées avec des gels dopés aux nanoparticules de silice.

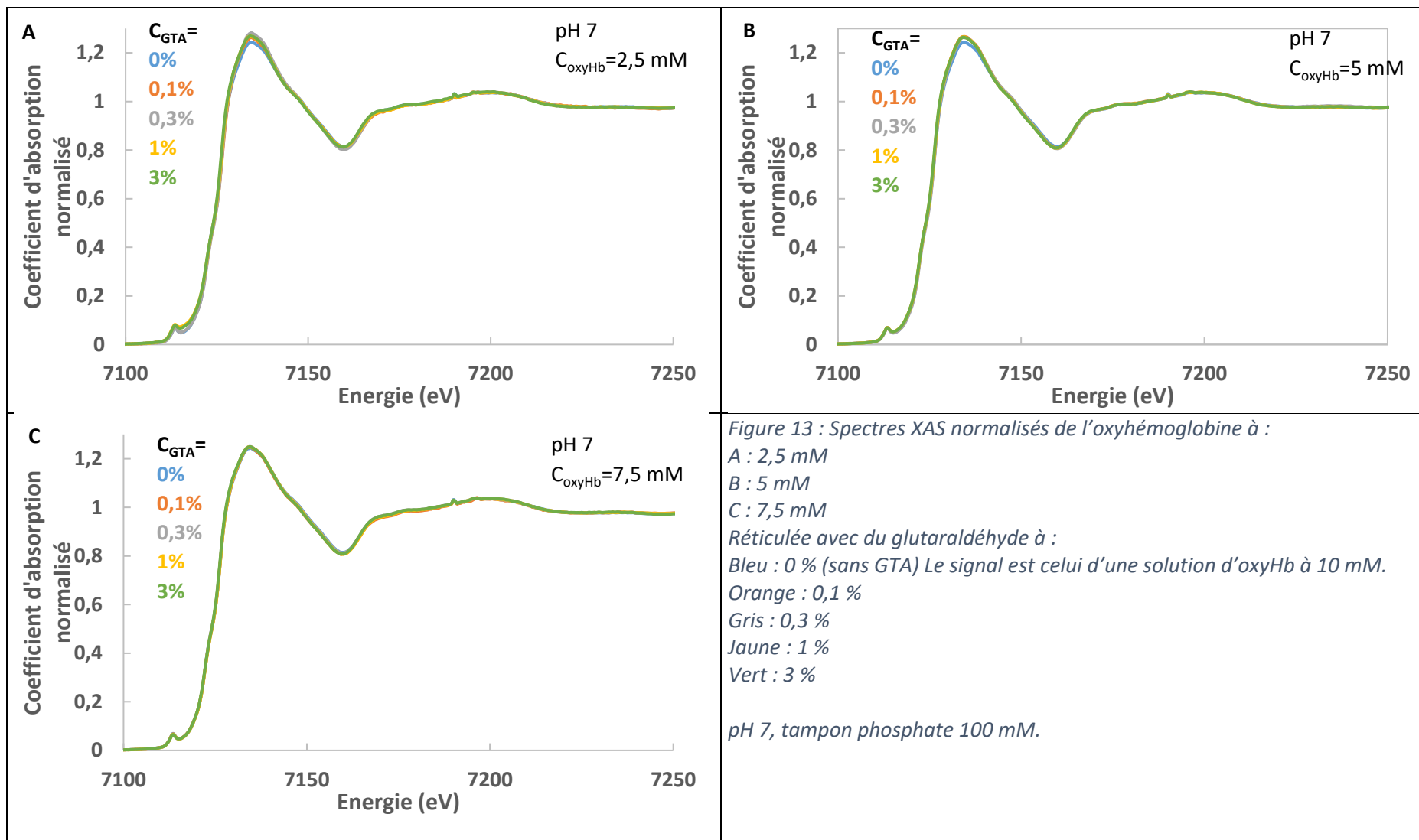
### b) Etude avec nanoparticules

Nous avons comparé :

- des mélanges oxyHb/NP où l'oxyhémoglobine est adsorbée sur les nanoparticules déjà étudiées au chapitre précédent ;
- les mêmes mélanges avec les mêmes concentrations en oxyHb et NP auxquelles on a rajouté du glutaraldéhyde afin de former un gel.

La Figure 14 présente les résultats pour 2,5 mM d'oxyHb, avec 26 ou 75 g/L de NP, sans GTA ou avec 0,3 % de GTA (concentration qui permet la formation d'un gel).

Entre le mélange d'oxyHb avec des NP et le gel correspondant, à 26 ou 75 g/L de NP, on ne voit aucune différence. A 14%, l'adsorption étant tellement faible, il n'y a déjà aucune modification entre le mélange oxyHb/NP et oxyHb libre, faisant que l'équivalent gélifié est identique à oxyHb libre. Pour le mélange à 41% d'oxyHb adsorbée, on ne repère aucune déformation en plus de celle minimale provoquée par l'adsorption. L'adsorption provoque déjà une déformation de la poche de l'hème, mais cette déformation n'est pas affectée par la gélification.





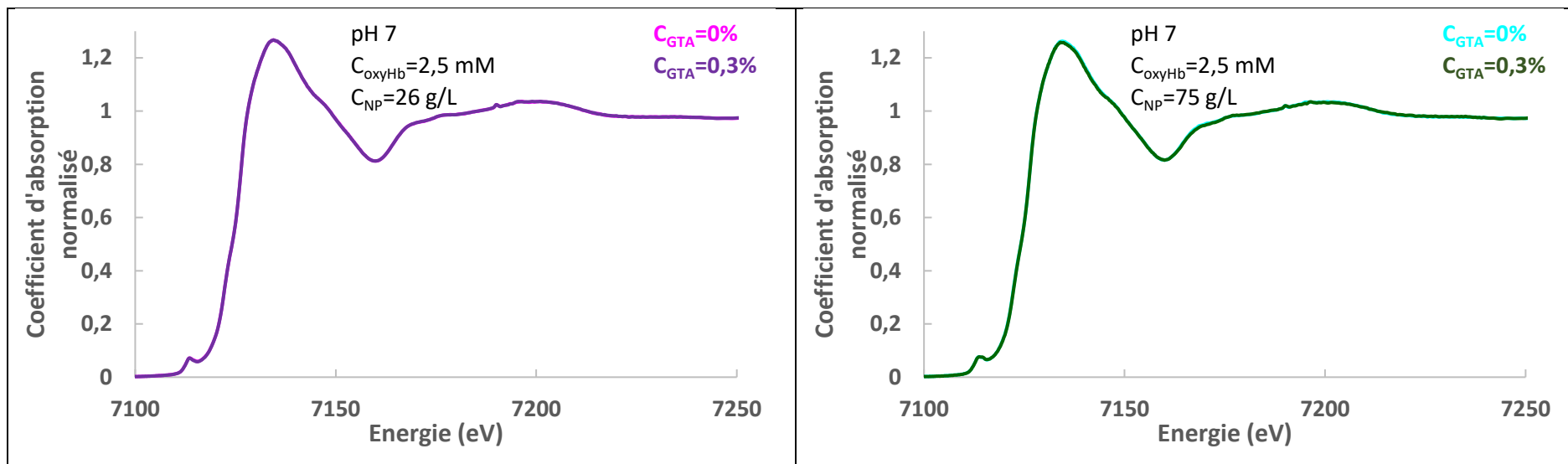


Figure 14 : Spectres XAS normalisés de l'oxyhémoglobine à 2,5 mM dans des conditions telles que :

A gauche :

Rose : sans GTA, avec 26 g/L de NP, soit oxyHb à 14% adsorbée.

Violet : avec 0,3 % de GTA et 26 g/L de NP.

A droite :

Bleu clair : sans GTA, avec 76 g/L de NP, soit oxyHb à 41% adsorbée.

Vert foncé : avec 0,3 % de GTA et 75 g/L de NP.

pH 7, tampon phosphate 100 mM.

Avec ou sans NP, l'hème de l'oxyhémoglobine ne subit pas de changement quand un réseau est créé par réticulation par le glutaraldéhyde. On ne peut donc pas expliquer la perte de l'activité de l'hémoglobine par un changement du fer de l'hème. Les spectres des conditions avec GTA sont identiques à ceux sans GTA et pourtant, les mêmes gels perdent ses capacités de larguer ou fixer le dioxygène.

Afin de pouvoir vérifier que l'hème ne subit pratiquement aucun changement avec la réticulation, il est intéressant d'utiliser le dichroïsme circulaire de la bande de Soret.

### 3) Dichroïsme circulaire de la bande de Soret

Comme pour le chapitre précédent, le dichroïsme circulaire de la bande de Soret permet de renseigner sur l'état de l'hème. Toutefois, nous avons rencontré des difficultés pour réaliser ces mesures liées à différents facteurs.

Le choix dans les épaisseurs de cuvette optique était limité. Pour la plus petite taille existante, le ratio signal/bruit pour des concentrations en oxyHb de 2,5 et 5 mM était trop faible pour donner un signal satisfaisant et acquérir un seul spectre aurait pris des jours. Les cuvettes d'épaisseur supérieure entraînaient un signal qui saturait vu les fortes concentrations utilisées. Au final, seuls les spectres avec la concentration en oxyHb de 7,5 mM dans la cuvette de plus petite épaisseur ont été mesurables en ayant un signal /bruit raisonnable, un temps d'acquisition pas trop long et sans saturation.

Sur la concentration d'oxyHb à 7,5 mM, les spectres avec 1% et 3% de GTA n'ont pas pu être mesurés. En effet, il n'y avait aucun signal mesuré, seulement du bruit bien que le signal ne soit pas saturé. Il semblerait que la diffusion du gel cause cette absence de signal.

Nous n'avons pas pu mesurer l'épaisseur exacte des cuvettes remplies avec le liquide. Les mesures d'épaisseur sont normalement faites soit par spectroscopie infrarouge soit par spectroscopie UV-Visible. Ici, les épaisseurs utilisées entraînaient un signal mesuré trop faible et rendaient donc impossible la mesure. C'est pour cela que les spectres seront montrés en  $\Delta A$  et non en  $\Delta \epsilon$ .

Vu les difficultés à mesurer les spectres de gels sans nanoparticules, nous ne nous sommes pas risqués à faire une analyse plus poussée avec les nanoparticules. La Figure 15 présente ainsi les spectres dichroïques qui ont pu être mesurés.

Le signal de la solution à 0,1 % se superpose à celui de l'oxyhémoglobine seule, montrant l'absence de différence entre les deux. Pour le gel à 0,3%, on a une diminution de l'intensité, avec une forme conservée. Il est difficile de juger si cette baisse de l'intensité vient d'une épaisseur différente étant donné la difficulté des gels à se former dans les cuvettes. D'après les résultats de dichroïsme circulaire de la bande de Soret, le glutaraldéhyde ne modifie pas l'hème.

En conclusion sur l'analyse de l'hème et de son fer, les différentes études tendent à montrer qu'il n'y a pas de différences après réaction du glutaraldéhyde sur l'oxyhémoglobine. Contrairement à l'effet des nanoparticules, il n'y a pas une déformation de la poche de l'hème. Il est donc impossible d'expliquer la perte d'activité *via* cette partie de la protéine. Il faut donc se pencher désormais sur la structure de la globine dans les gels qui pourrait expliquer les différences d'activité.

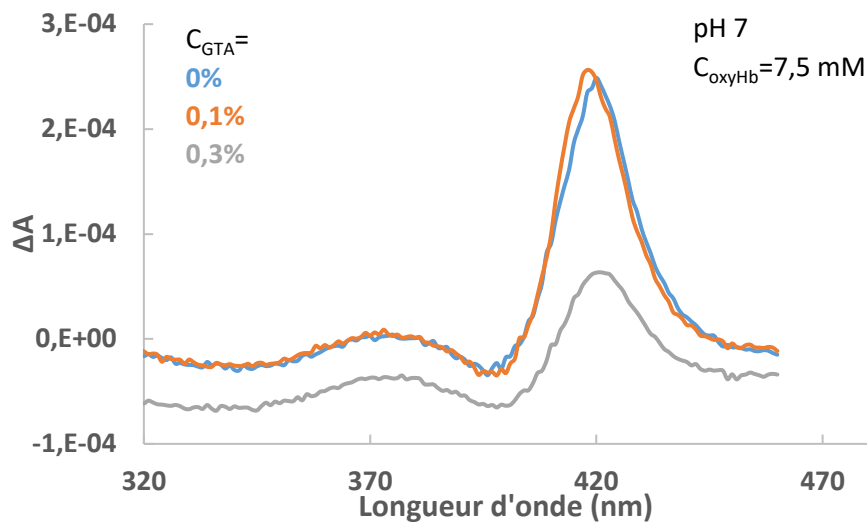


Figure 15 : Spectres de dichroïsme circulaire à 22°C de l'oxyhémoglobine à 7,5 mM réticulée avec du glutaraldéhyde à : bleu : 0 % (sans GTA), orange : 0,1 % et gris : 0,3 %.

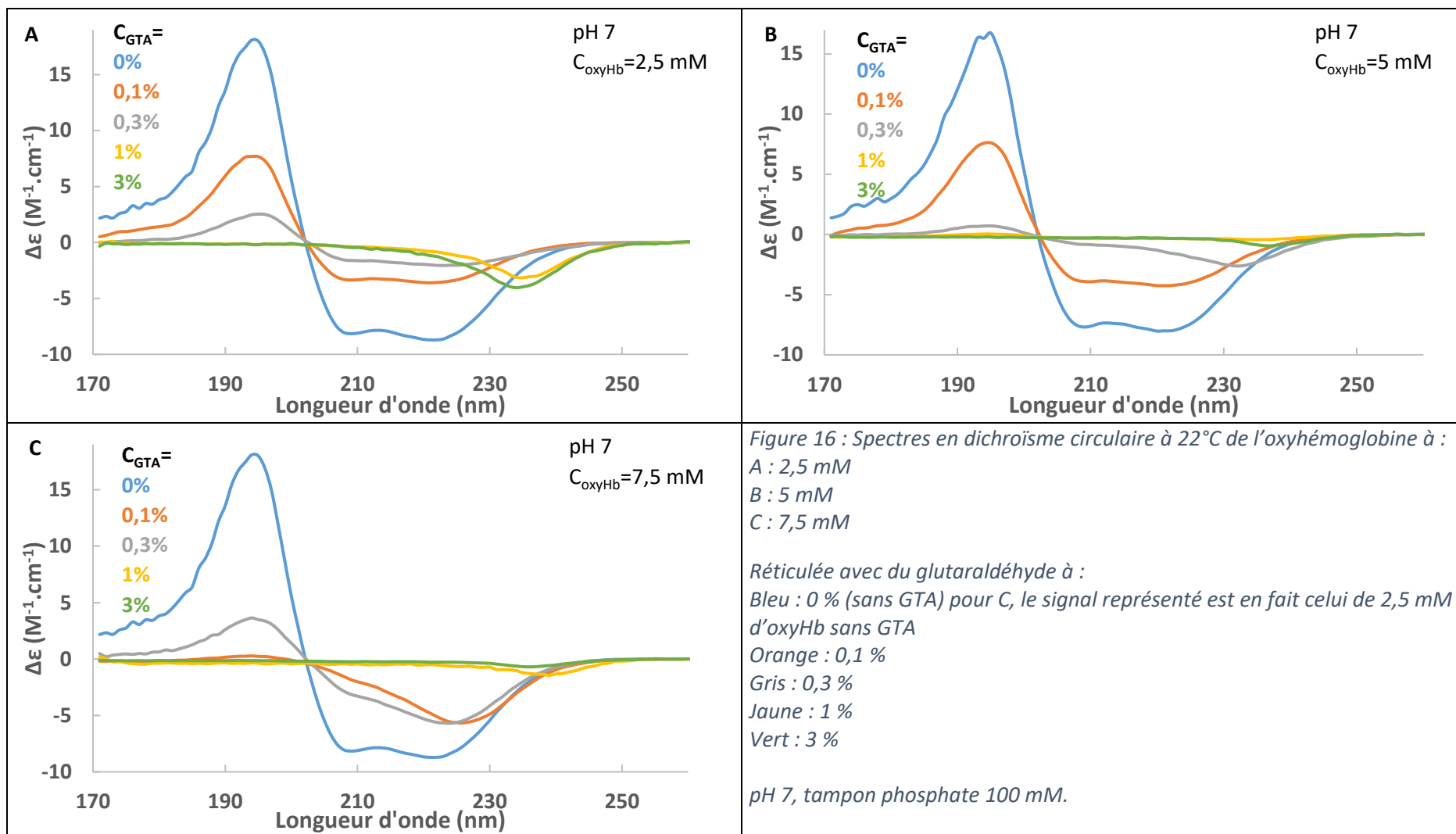
#### IV- Modifications de la globine

##### 1) Etude de la structure secondaire par dichroïsme circulaire

Pour cela, tout comme dans le chapitre précédent, il a été utilisé le dichroïsme circulaire dans l'UV. Les expériences ont été effectuées sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL avec l'aide du Docteur Franck Wien. Les expériences ont été effectuées à pH 7, tampon phosphate 100 mM. Il a d'abord été étudié les modifications des gels sans NP.

##### a) Etude sans nanoparticule

Des mélanges ont été étudiés à différentes concentrations d'oxyHb (2,5 mM, 5 mM et 7,5 mM) et différentes concentrations de GTA (0,1 %, 0,3 %, 1 % et 3 %). Les spectres en dichroïsme circulaire de ces mélanges sont présentés dans la Figure 16 avec les solutions d'oxyHb seule afin de comparer. A noter que le signal de l'oxyHb seule à 7,5 mM n'était pas exploitable, car le signal saturait. Aussi, le signal présenté sur la figure C est celui de l'oxyHb à 2,5 mM afin d'offrir tout de même un élément visuel de comparaison.



On a une évolution qui se reproduit pour les trois concentrations d'oxyHb (sauf pour la condition 7,5 mM/0,1 %). En se référant à une analyse stricte en utilisant les théories du dichroïsme circulaire, on peut voir que :

-à 0,1 %, on a une baisse du signal conséquente comparée à l'hémoglobine seule mais en conservant la forme caractéristique des hélices alpha. L'oxyHb perd en grande partie sa structure en hélices sans que les hélices soient converties en une autre forme ayant un signal connu.

-à 0,3 %, on a encore une baisse de la forme hélice, avec la déformation du signal négatif au-dessus de 220 nm. Cela provient de l'apparition d'une bande négative à ces longueurs d'onde qui ne correspond à aucune forme connue de structure secondaire usuelle.

-à 1 et 3 %, nous avons aucun signal en dessous de 220 nm, ce qui montre que nous n'avons plus du tout de signal venant de structures secondaires classiques. En effet, toute structure secondaire classique a un signal, positif ou négatif en dessous de 220 nm en dichroïsme circulaire. Ce résultat pourrait suggérer qu'il y a une perte totale de la structure secondaire de la protéine dans les gels à ces conditions de GTA. Toutefois, nous devons aussi considérer l'existence de la bande négative décrite précédemment, mais qui a maintenant un extremum entre 230 nm, et 240 nm. Ce maximum est très probablement celui que nous avons repéré à 0,3 % qui continue de se déplacer vers les grandes longueurs d'onde avant de s'établir vers 230-240 nm. Il semble que ce signal est plus important pour 3 % que 1 %, mais il est difficile d'en juger, l'épaisseur de l'échantillon étant difficile à mesurer pour ces conditions.

Les études antérieures sur les polymères d'hémoglobine réticulés par le GTA<sup>24,25</sup> menées par dichroïsme circulaire dans l'UV-Visible afin de quantifier la structure secondaire révèlent qu'il n'y a pas ou peu de changements dans le spectre, indiquant que la structure en hélices est conservée. Pourtant, ce n'est pas ce que l'on trouve ici. Nous avons deux phénomènes concomitants :

-la disparition des différents types de structures secondaires de la protéine avec l'augmentation de la quantité de glutaraldéhyde. Cela concerne surtout la structure en hélices (environ 70 %), mais les autres signaux disparaissent aussi (les 30 % restants). Ce fait est déduit du fait que nous n'avons plus de signal mesurable au final pour les conditions en GTA les plus fortes. Toutefois, il est difficile de concevoir que la protéine se dénature totalement avec la gélification. On peut penser qu'il y ait formation d'une structure secondaire spécifique n'ayant pas de signal dichroïque.

-l'apparition d'un signal entre 225 et 240 nm, pas identique d'une condition à une autre. Ce signal ne correspond à rien de connu dans les structures secondaires. Il existe des hypothèses pour expliquer ce type de signal :

-un signal venant des ponts disulfures. En effet, même si le domaine où apparaissent les ponts disulfures est un sujet contradictoire, les articles donnent un domaine entre 225 et 330 nm<sup>26-28</sup>. Une hypothèse serait que le domaine diffère suivant l'endroit où les ponts disulfures apparaissent dans les protéines. Cela semble peu probable vu le très faible nombre de cystéine dans l'hémoglobine, à moins que l'on considère que l'addition de glutaraldéhyde dans la protéine donne des ponts intramoléculaires ayant des signaux analogues à ceux des ponts disulfures, suivant l'endroit et l'angle où le glutaraldéhyde se fixe. Mais cette hypothèse est improbable.

-une interaction cation- $\pi$  entre un acide aminé chargé comme la lysine et un acide aminé aromatique comme un tryptophane ou un métal chargé et un acide aminé aromatique. Il a été repéré que cette interaction peut donner un signal ayant un maximum à 230 nm<sup>29-31</sup>. On peut penser que l'ajout de glutaraldéhyde peut causer soit la création d'un cation chargé interagissant avec un acide aminé aromatique ou une reconfiguration spatiale de la protéine induisant une interaction du fer de l'hème avec un acide aminé aromatique. Mais dans le cas de l'interaction fer de l'hème-acide aminé aromatique, on aurait vu des différences apparaître en spectroscopie d'absorption X.

Ce nouveau signal à 230 nm pourrait correspondre à un nouveau chromophore chiral qui apparaîtrait à forte concentration de glutaraldéhyde. Comme on le verra dans le chapitre 4, le signal à 230 nm subit une dénaturation thermique semblable à celles des hélices. Ce nouveau signal correspond donc à une structuration particulière puisque cette structure se perd à haute température. On peut donc penser que les hélices ne disparaissent pas, mais que le glutaraldéhyde les distend, créant alors une forme possédant une chiralité et donc un signal dichroïque différent, bien que proche structuralement.

#### b) Etude avec nanoparticules

Les études ont été faites pour toutes les concentrations de glutaraldéhyde déjà utilisées auparavant sur des mélanges à 2,5 mM d'oxyhémoglobine avec deux concentrations de nanoparticules différentes (26 et 75 g/L) et à 5 mM d'oxyhémoglobine avec 75 g/L de nanoparticules. Ces résultats sont présentés Figure 17.

On retrouve le même comportement que pour l'oxyhémoglobine sans nanoparticule pour l'évolution de la concentration en glutaraldéhyde, sauf pour 0,1 % de glutaraldéhyde. En effet, pour cette concentration, on a une baisse très faible, voire aucune différence du signal par rapport à la même concentration sans nanoparticule. Sinon, on a bien les deux effets que nous avons repéré : la baisse jusqu'à l'absence de signaux de la structure secondaire et l'apparition d'un signal négatif vers 230 nm.

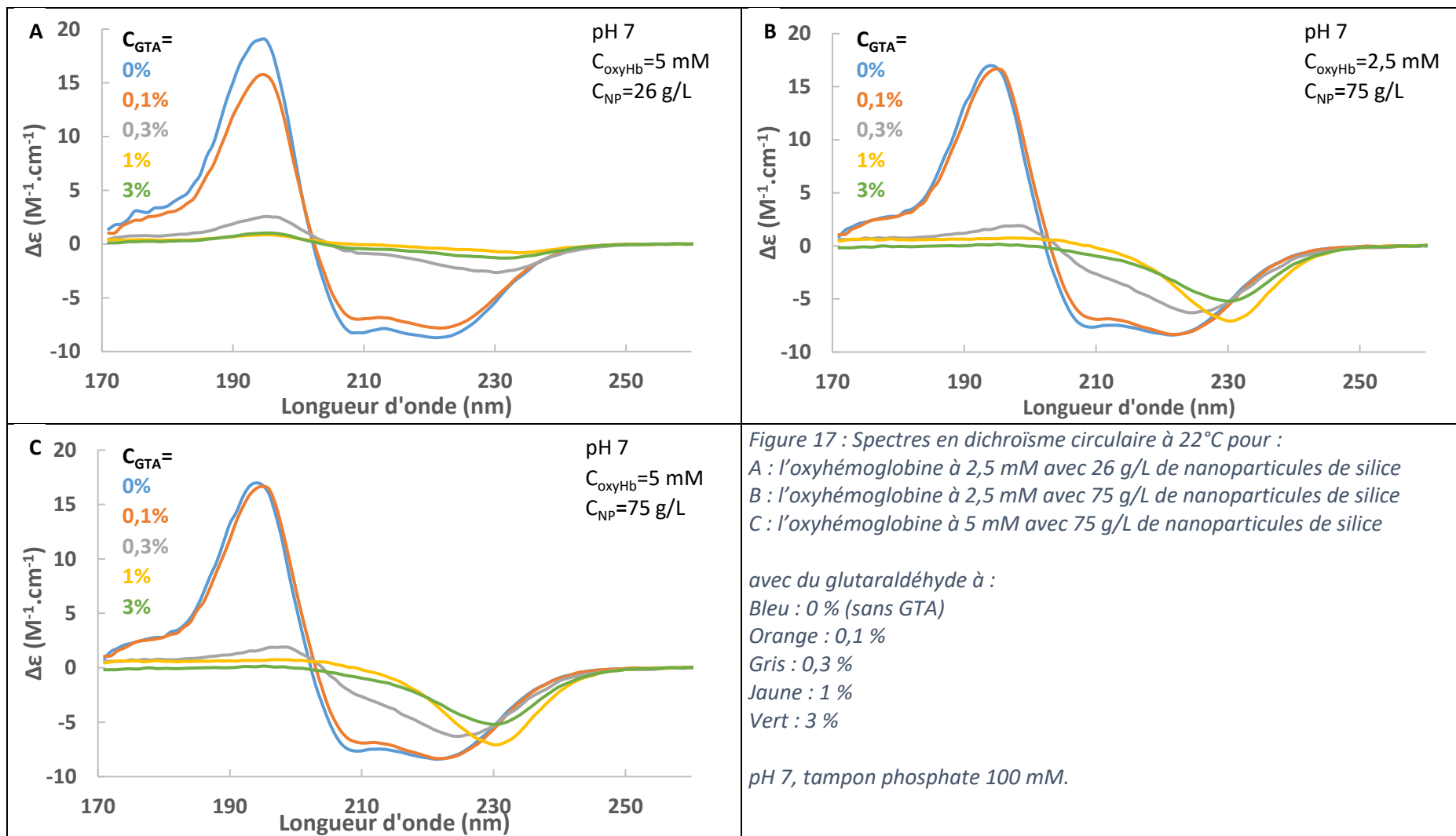
Il est donc difficile de conclure sur les changements de structure secondaire avec le glutaraldéhyde, le dichroïsme circulaire présentant ses limites. L'apparition d'un signal mal connu ne nous permet pas de comprendre les phénomènes en jeu et ne nous permet pas de répondre aux problématiques que nous nous étions posées. Nous avons donc tenté l'étude de la structure secondaire par une autre approche.

## 2) Etude par la diffusion de rayons X aux grands angles (DXGA)

Afin de pouvoir palier les limites du dichroïsme circulaire dans l'UV-Visible et de connaître la structure de l'hémoglobine, des expériences en diffusion de rayons X aux grands angles (DXGA ou WAXS pour wide angle X-ray scattering) ont été effectuées. Il s'agit d'une technique analogue à la DNPA (basée sur la diffusion), étendant le domaine spatial de la technique aux petits angles jusqu'à l'échelle de l'angström.

Les différences majeures sont qu'il s'agit d'une technique où les rayons X interagissent avec les nuages électroniques. Les atomes les plus lourds contribuent plus au signal au contraire des neutrons. Les études peuvent par contre se faire en milieu aqueux classique (non deutéré) sans que la qualité du signal en pâtisse. Toutefois, les rayons X étant énergétiques, ils sont destructeurs envers les échantillons et il faut donc surveiller que la mesure ne se fasse pas dans des conditions où les échantillons sont abimés. De plus, les mesures ont dû être faites en capillaire fin, ce qui ajoute une source d'incertitude de par la difficulté de synthétiser les gels dans des porte-échantillons si petits.

L'intérêt de la DXGA est qu'elle permet d'étudier la structure secondaire, voire tertiaire de ces dernières. A ces vecteurs d'onde, le signal de diffusion obtenu pour des protéines permet d'obtenir des informations supplémentaires sur les structures intramoléculaires telles que la structure des domaines de la protéine, les corrélations entre ces domaines et des informations sur les structures secondaires en présence, dont notamment leur périodicité comme leur compacité. En effet, les ondes diffusées sur cette gamme correspondent à des tailles de l'ordre de l'angström. La Figure 18 présente ainsi les différentes tailles caractéristiques du lysozyme que l'on peut retrouver dans un spectre de diffusion aux grands angles.



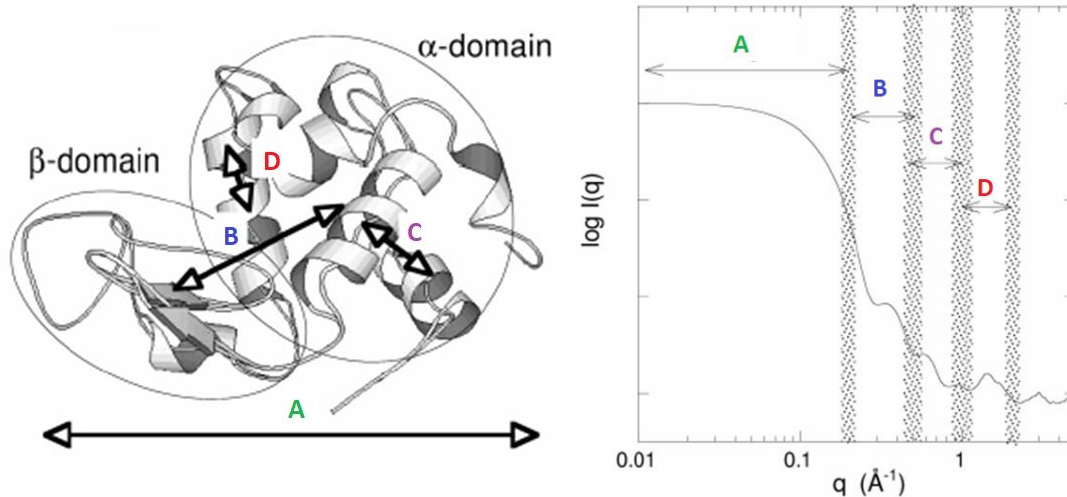


Figure 18 : Simulation d'un spectre en DXPGA de lysozyme et correspondance des différentes zones avec les tailles caractéristiques. Tiré de <sup>32</sup>.

En associant les zones du spectre avec les dimensions caractéristiques, on voit que la zone B correspond aux domaines intramoléculaires tandis que la D correspond aux structures secondaires comme donné en exemples. La diffusion aux grands angles est donc une technique que l'on peut utiliser en complément du dichroïsme circulaire.

Avant de commencer par l'étude expérimentale de l'assemblage NP/oxyHb, il est aussi intéressant de se pencher sur la diffusion aux grand angles de l'oxyhémoglobine seule. Les expériences ont été faites sur la ligne SWING du synchrotron SOLEIL. La Figure 19 présente ainsi le spectre aux grands angles de l'oxyhémoglobine en solution ainsi que les différentes bandes détectables dans les différentes régions définies auparavant.

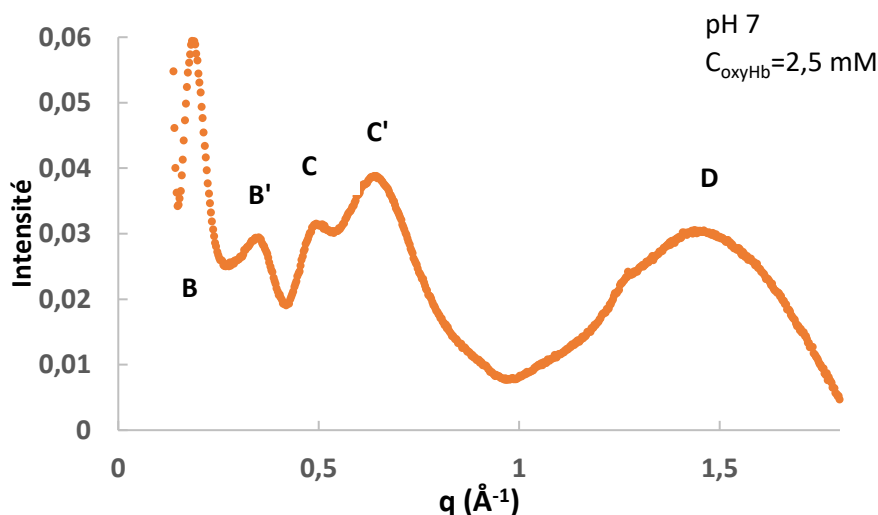


Figure 19 : Spectre DXGA, tampon phosphate 100 mM, pH 7,0 d'une solution d'oxyhémoglobine à 2,5 mM

Le spectre de l'hémoglobine qui a été mesuré ici, est tout à fait identique à celui recensé dans la littérature<sup>33</sup>. Par rapport aux domaines présentés Figure 18, les domaines B et C présentent deux bandes tandis que le domaine A n'en présente aucune. Les bandes d'un même domaine X seront nommés X et X' pour des raisons de clarté.



La bande B correspond à la forme de la molécule, plus précisément la distance de 3,3 nm correspondante à la distance des 2 dimères entre chaînes hétérologues ( $\alpha 1\beta 2$ ) dans le tétramère d'oxyhémoglobine tandis que la bande B' correspond à la forme de la protéine, mais la distance à laquelle elle correspond est non déterminée dans la littérature. On peut penser qu'elle correspond à la distance des 2 dimères entre chaînes hétérologues ( $\alpha 1\alpha 2$ ).

Les bandes C et C' correspondent à la structure interne de la protéine. C' correspond à une distance de 10 Å dans l'espace réel et est présente dans toutes les protéines contenant des assemblages d'hélices. 10 Å correspond à la distance centre à centre des hélices au contact. Cette bande permet donc de juger la présence d'hélices  $\alpha$  dans une protéine.

Pour D, il est indiqué dans la littérature que la bande est attribuée aux distances correspondant à la structure interne de la protéine, notamment aux pas des hélices. Afin de s'en assurer, nous avons effectué des simulations pour plusieurs types d'hélices et d'assemblage d'hélices. On a ainsi simulé par WAXSiS 4 types d'hélices présentés dans la Figure 20.

On retrouve ainsi

- la polyglycine en hélice, l'hélice faite avec le plus simple acide aminé, sans chaîne latérale ;
- la polyisoleucine, une hélice faite avec un seul aminé, mais possédant une chaîne latérale longue, donnant deux diamètres d'hélices ;
- une des hélices de l'hémoglobine de porc, afin de voir si on a des différences avec les hélices précédentes ;
- quatre hélices de l'hémoglobine de porc, afin de voir les interactions entre les différentes hélices.

On repère que pour toutes les hélices, on a un minimum entre 1 et 1,2 Å<sup>-1</sup>. En revanche, on voit qu'on a des différences notables entre les différents types d'hélices aux grands angles, qu'on peut essayer d'interpréter. Pour la polyglycine, on voit un diamètre d'hélice intérieur avec le maximum à 1,7 Å<sup>-1</sup>. Quant à la polyisoleucine, il y a deux maxima, un à 1,3 Å<sup>-1</sup> et un 1,5 Å<sup>-1</sup>, un pour le diamètre et un pour le pas de l'hélice, venant des corrélations entre les chaînes latérales. L'hélice seule de l'hémoglobine a une bande large autour de 1,5 Å<sup>-1</sup> venant des corrélations des chaînes latérales de différentes tailles, idem pour les hélices de l'hémoglobine en interaction. Pour cet assemblage, on voit de plus aux plus petits angles des oscillations venant des interactions des différentes hélices les unes avec les autres. La bande D correspond donc à la fois au pas de l'hélice (vers 4.7 Å), proche de l'ordre de grandeur du pas nominal d'une hélice (5,4 Å) et à son diamètre. Il s'agit donc d'une sonde puissante afin de connaître la présence ou non d'hélices dans notre échantillon et leurs déformations éventuelles.

Afin de nous préparer aux assemblages de l'hémoglobine dans les gels, nous avons aussi simulé par WAXSiS différents types d'assemblages à partir de la maille cristallographique de l'hémoglobine de porc. La Figure 21 présente ainsi ses différents spectres pour ces assemblages et la Figure 22 une représentation de ces assemblages.

On retrouve pour tous les assemblages, les bandes C, C' et D. Le dimère présente la plus grande différence, manquant la bande B vers 0,2 Å<sup>-1</sup>, représentant la distance  $\alpha 1\beta 2$  dans le tétramère d'hémoglobine, ce qui est donc cohérent. Cette bande s'élargit lorsqu'on passe d'un seul tétramère à un assemblage de tétramères compacts. De plus, la bande B' se dédouble.

Avant d'aller étudier les gels avec détails, il faut déjà pouvoir répondre à la question de l'homogénéité du gel dans le capillaire. Pour cela, on a mesuré en DXGA à trois endroits différents un gel d'oxyHb à 2,5 mM réticulé avec du GTA à 0,3%. Les mesures ont été faites à intervalle de 1,2 mm. La Figure 23 présente les différents spectres.

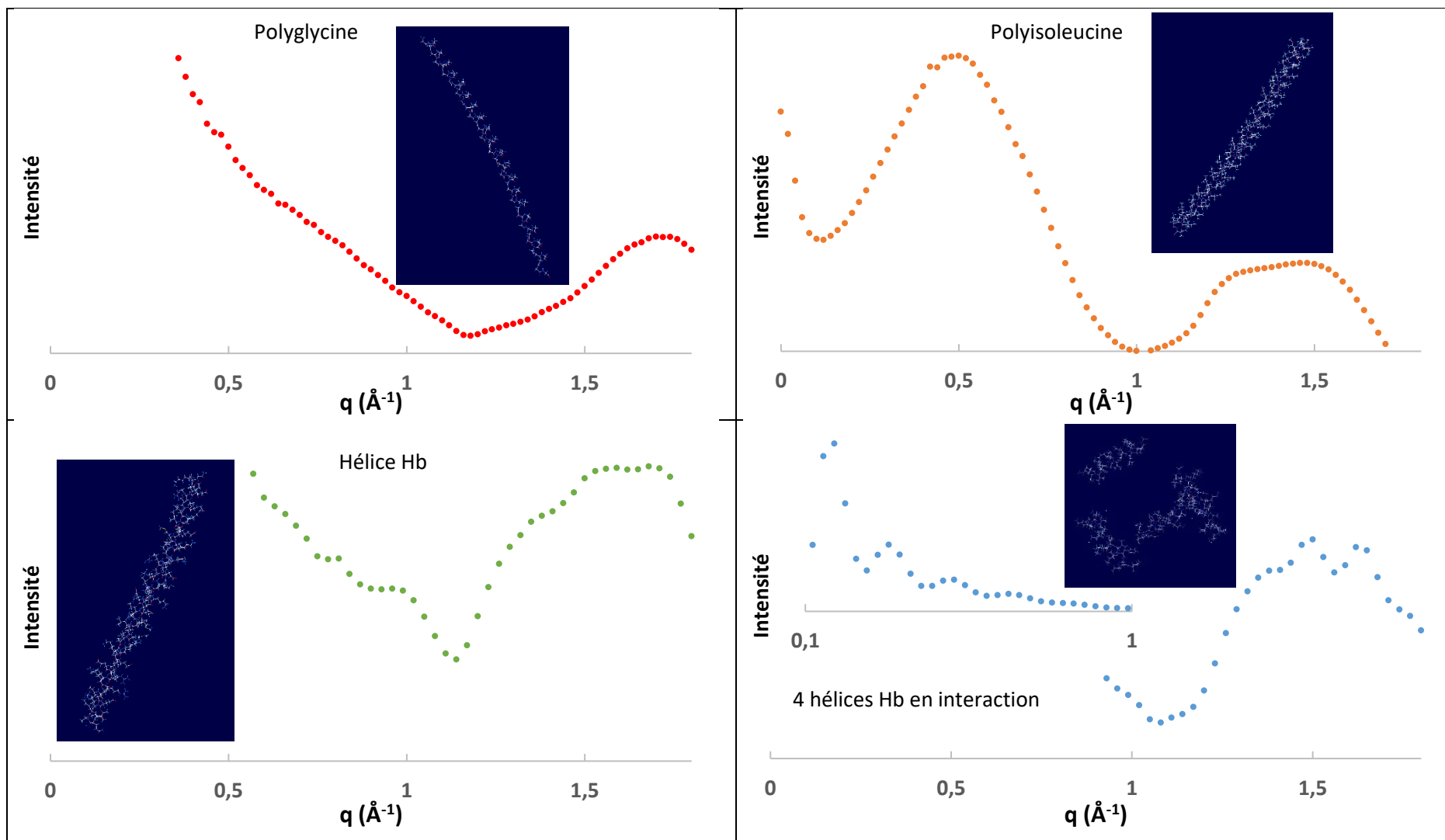
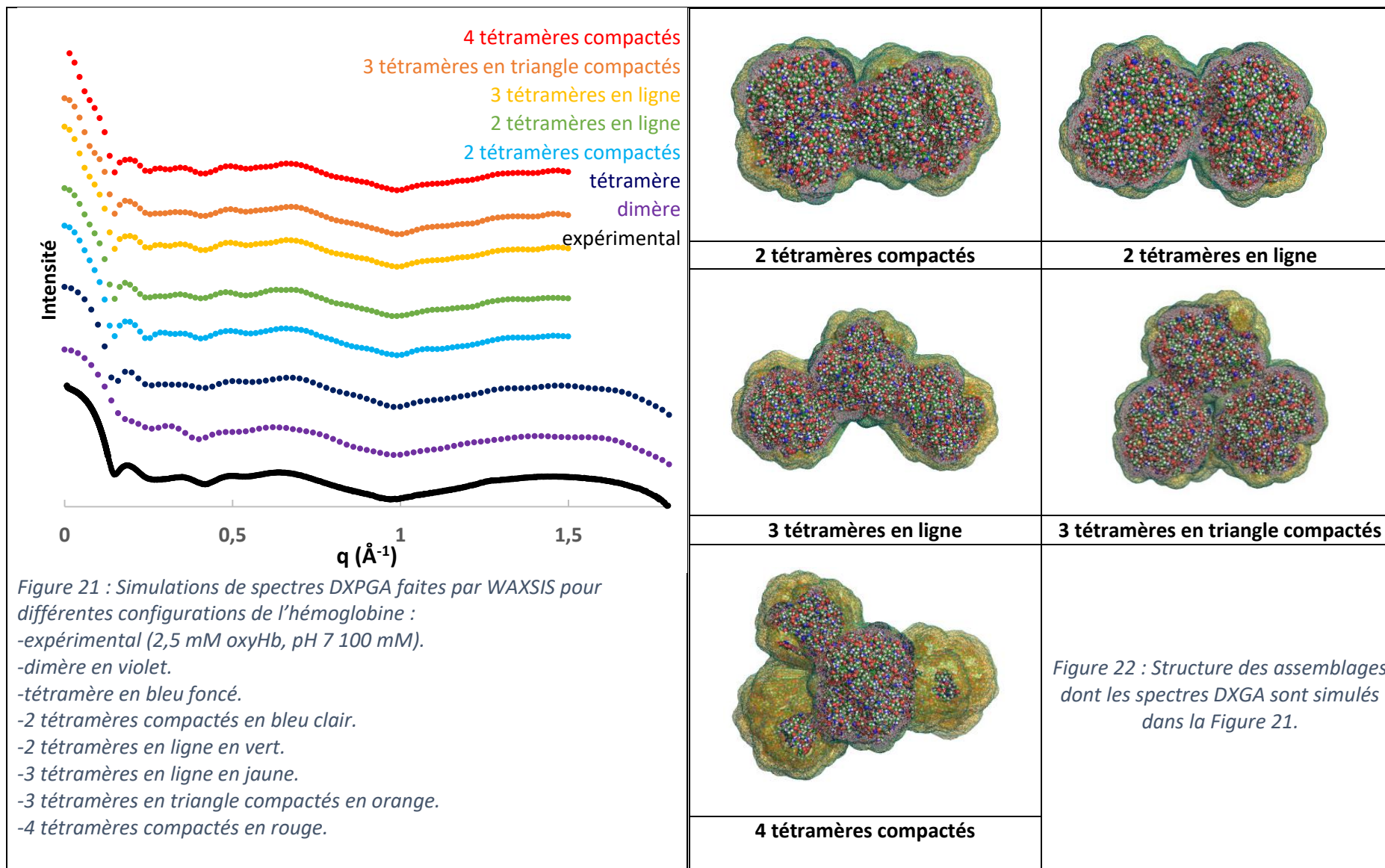


Figure 20 : Simulations de spectres DXPGA faites par WAXSIS pour différents types d'hélices : polyglycine en hélice en rouge, polyisoleucine en hélice en orange, hélice de l'hémoglobine de porc en vert et quatre hélices de l'hémoglobine de porc en bleu.



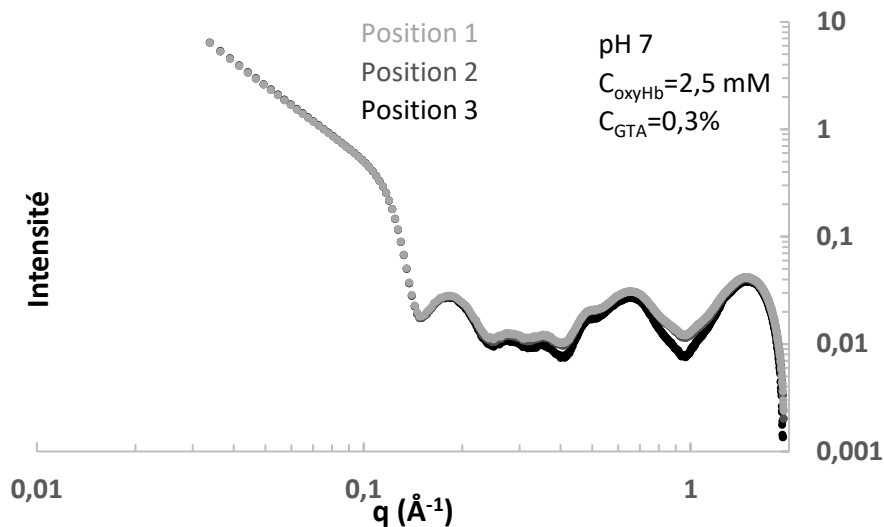


Figure 23 : Spectres DXGA, tampon phosphate 100 mM, pH 7,0 d'un gel d'oxyHb 2,5 mM réticulé avec GTA 0,3% à trois positions dans le capillaire, à intervalle de 1,2 mm. Position 1 en gris clair, position 2 en gris foncé, position 3 en noir, chaque position est séparée de 1,2 mm.

On voit qu'on a les mêmes bandes aux mêmes endroits, sans décalage démontrant tout de même une structure secondaire similaire. La façon de préparer nos gels dans nos capillaires permettent donc d'avoir des gels homogènes sur le capillaire.

Pour l'étude expérimentale des gels, on a sélectionné ceux dans les concentrations limites tant en oxyhémoglobine qu'en glutaraldéhyde, plus un gel comportant des nanoparticules. Parmi ces gels, les gels à 3% de GTA sont particulièrement intéressants afin de comprendre les modifications de la structure secondaire que nous avons vues avec le dichroïsme circulaire dans l'UV. Pour l'étude de l'effet des nanoparticules, le gel avec NP a été comparé à la solution équivalente en concentrations d'oxyHb et de NP. Ce mélange n'a pas été présenté dans le chapitre précédent puisqu'il n'y a que 14% d'oxyHb adsorbée. Il est à noter que les nanoparticules ne présentent pas de signal pour les vecteurs d'onde supérieurs à  $0,5 \text{ \AA}^{-1}$  donc dans le domaine des bandes C et C'. Les résultats sont présentés sur la Figure 24.

Pour les différents gels, on remarque que les intensités ainsi que les positions des bandes varient. Nous voyons aussi la création d'une nouvelle bande pour certains gels. Entre le mélange oxyHb/NP et le gel contenant des NP, nous voyons que la forme est très proche. Nous ne nous risquons pas à interpréter les intensités, mais nous pouvons essayer de comprendre les changements de distances caractéristiques qui se produisent lors de la gélification. Le Tableau 4 et le Tableau 5 donnent les positions des maximums des bandes pour la solution d'oxyHb seule, les différents gels et le mélange oxyHb/NP ainsi que les distances caractéristiques correspondantes.

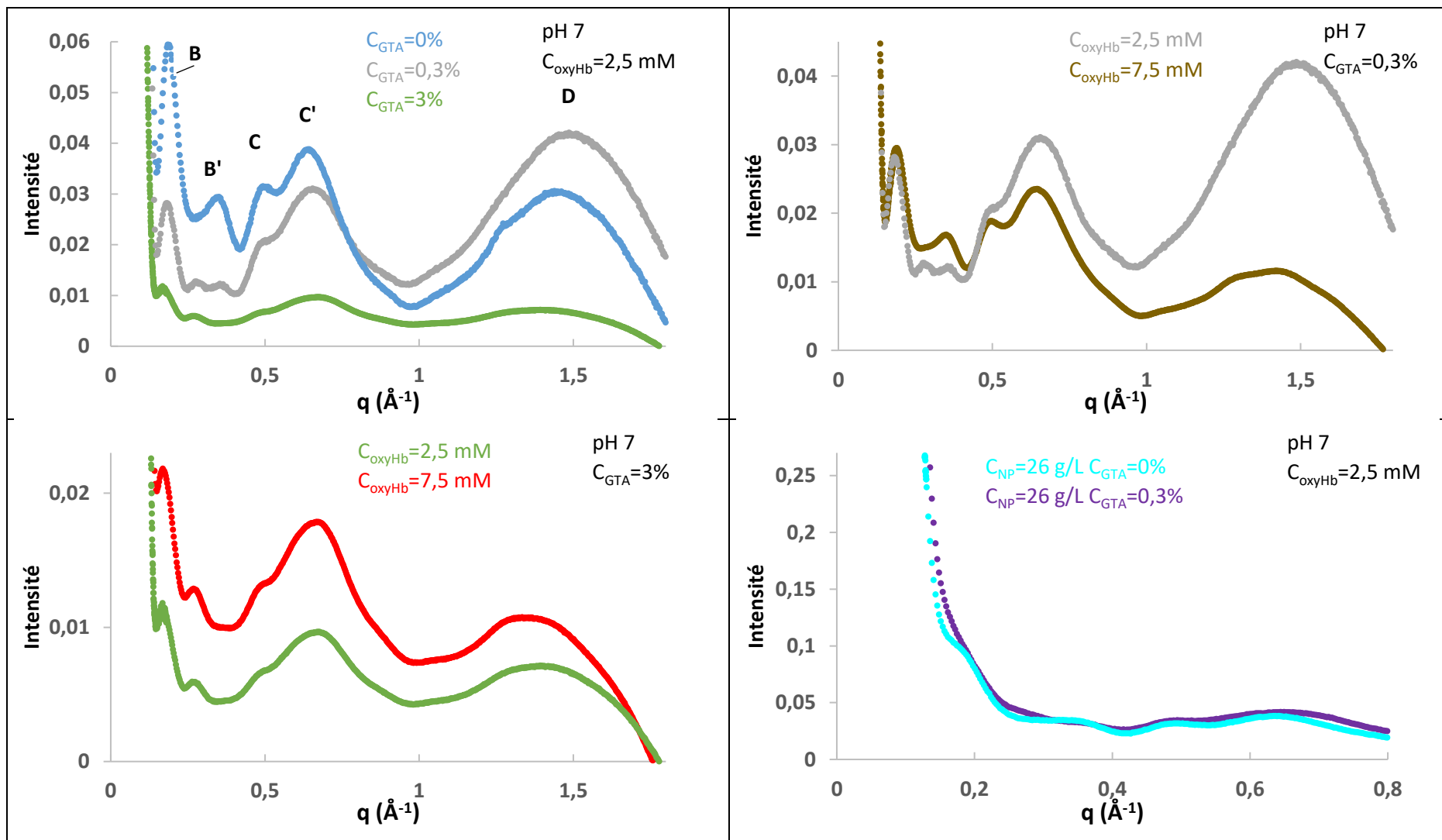


Figure 24 : Spectres DXGA, tampon phosphate 100 mM, pH 7,0 de  
 -solution d'oxyhémoglobine 2,5 mM en bleu.  
 -gel d'oxyHb 2,5 mM réticulé avec GTA 0,3% en gris.  
 -gel d'oxyHb 2,5 mM réticulé avec GTA 3% en vert.

-gel d'oxyHb 7,5 mM réticulé avec GTA 0,3% en marron.  
 -gel d'oxyHb 7,5 mM réticulé avec GTA 3% en rouge.  
 -gel d'oxyHb 2,5 mM adsorbée sur 26 g/L de NP réticulé avec GTA 0,3% en violet.  
 -solution d'oxyHb 2,5 mM adsorbée sur 26 g/L de NP (sans GTA) en cyan.

q (Å <sup>-1</sup> )	B	B'	C	C'	D	
oxyHb 2,5 mM GTA 0%	0,19		0,35	0,49	0,64	1,44
oxyHb 2,5 mM GTA 0,3%	0,18	0,27	0,35	0,49	0,65	1,49
oxyHb 7,5 mM GTA 0,3%	0,19		0,35	0,50	0,64	1,42
oxyHb 2,5 mM GTA 3%	0,18	0,27		0,49	0,67	1,39
oxyHb 7,5 mM GTA 3%	0,17	0,27		0,49	0,67	1,33
oxyHb 2,5 mM NP 26 g/L	0,18		0,35	0,50	0,64	1,52
oxyHb 2,5 mM NP 26 g/L GTA 0,3%	0,18	0,28	0,35	0,50	0,65	1,51

Tableau 4 : Positions des maxima des différentes bandes des spectres DXGA de l'oxyhémoglobine pour les différentes conditions, pH 7, tampon phosphate 100 mM.

r (Å)	B	B'	C	C'	D	
oxyHb 2,5 mM GTA 0%	33,8		18,0	12,7	9,8	4,4
oxyHb 2,5 mM GTA 0,3%	34,5	22,9	17,8	12,8	9,6	4,2
oxyHb 2,5 mM GTA 3%	35,9	23,7		12,8	9,3	4,5

r (Å)	B	B'	C	C'	D	
oxyHb 7,5 mM GTA 0,3%	33,6		18,0	12,7	9,8	4,4
oxyHb 7,5 mM GTA 3%	37,4	23,2		12,9	9,4	4,7

r (Å)	B	B'	C	C'	D	
oxyHb 2,5 mM NP 26 g/L	34,2		17,9	12,5	9,8	4,1
oxyHb 2,5 mM NP 26 g/L GTA 0,3%	35,1	22,8	17,9	12,7	9,7	4,2

Tableau 5 : Dimension dans l'espace réel des maxima des différentes bandes des spectres DXGA de l'oxyhémoglobine pour les différentes conditions, pH 7, tampon phosphate 100 mM.

Si on regarde les tailles caractéristiques entre oxyHb libre et le mélange oxyHb/NP, on ne voit aucune différence. Cela signifie donc que NP ne joue aucun rôle. Les minimes différences que l'on observe ne peuvent être interprétées par des phénomènes d'adsorption. En effet, il n'y a que 14% d'oxyHb adsorbée dans le mélange, ce qui est négligeable.

Sinon, on constate qu'il n'y a aucun changement dans la structure de la protéine à 7,5 mM réticulée avec 0,3 % de glutaraldéhyde par rapport à oxyHb libre. Cela peut s'expliquer par le fait que la proportion de glutaraldéhyde est extrêmement faible par rapport à celle d'oxyhémoglobine (au niveau molaire, 3 GTA pour 2 résidus lysine apparents de Hb).

Une remarque pouvant être faite pour tous les gels est que la bande C ne subit aucun changement notable. La structure interne associée à cette distance n'est pas modifiée par la gélification. Ce point étant traité, il ne sera donc plus abordé dans la suite.

On voit qu'il y a des changements notables dans tous les autres gels (autres que le gel oxyHb 7,5 mM/GTA 0,3%). Il y a donc des modifications de l'oxyhémoglobine avec la gélification. Ainsi, le tétramère subit un étirement puisque la distance  $\alpha 1\beta 2$  associée avec la bande B grandit avec la gélification. Il y a sans doute une élongation au moins dans une des directions associées au tétramère. Quant à la bande B', elle se dédouble. Ce dédoublement correspond à la formation d'assemblages compacts de tétramères vue dans la Figure 21.

Il est intéressant d'étudier les bandes C' et D en même temps, ces deux bandes correspondant aux hélices. Pour la bande D correspondant aux hélices, on voit que le diamètre de l'hélice pour les gels est modifié dans les deux sens par rapport à oxyHb seule. On peut lier cela avec ce qu'on observe avec la bande C'. En effet, on voit que la distance centre à centre des hélices compactées diminue, ce qui montre que les hélices subissent une compression qui pourrait donc avoir lieu dans la direction orthogonale à celle de l'élongation précédemment hypothésée.

Les deux éléments montrent en tout cas que les hélices sont toujours présentes quelle que soit la concentration en glutaraldéhyde. Cela va avec notre hypothèse précédemment donnée pour la partie sur le dichroïsme circulaire dans l'UV. On peut penser que le changement de diamètres et la compression des hélices peuvent modifier la configuration spatiale des acides aminés situés à l'extérieur de l'hélice, modifiant ainsi leur chiralité, faisant disparaître le signal habituel et donnant ce signal inexplicable.

En résumé : dilatation de la protéine (bande B), rapprochement des hélices (bande C') et augmentation du pas (partie droite de la bande D). La protéine est donc étirée, la structure tertiaire étant tout de même conservée.

L'étude de la structure secondaire et tertiaire a montré qu'elles sont majoritairement conservées bien que distendues, il est intéressant de s'intéresser à la structure quaternaire des gels.

### 3) Etude par la diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA)

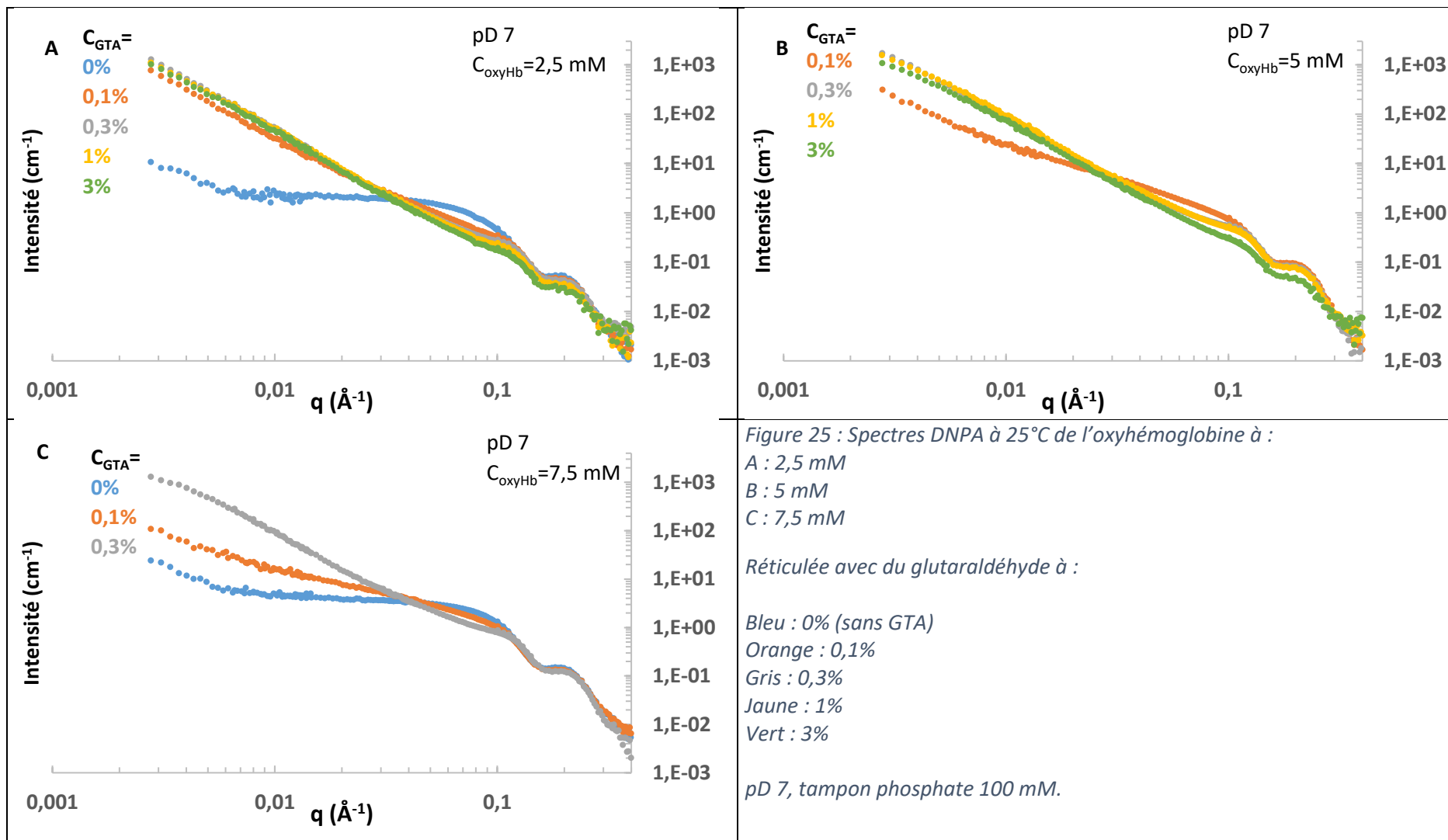
Les expériences de diffusion de neutrons aux petits angles ont été faites au Laboratoire Léon Brillouin sur l'appareil PAXY avec l'aide du Docteur Fabrice Cousin. Nous avons mesuré les gels pour le maximum de concentrations d'oxyhémoglobine, de glutaraldéhyde et de nanoparticules dans le temps qui nous avait été imparti afin d'avoir l'étude la plus complète qui soit pour nos gels. Nous allons d'abord nous intéresser aux gels d'oxyhémoglobine réticulée par le glutaraldéhyde sans nanoparticule.

#### a) Etude sans nanoparticule

Après traitement tel qu'expliqué dans la partie matériel et méthode, nous avons obtenu les spectres pour différentes concentrations d'oxyHb et de GTA. La Figure 25 présente ainsi les spectres DNPA obtenus.

Pour connaître la structure de la protéine, l'intérêt de ces courbes est aux grands vecteurs d'onde. Pour les petits angles, cela correspond à la structuration du gel, ce qui sera étudié plus tard. On voit que pour toute concentration d'oxyhémoglobine en présence de glutaraldéhyde, il n'y a pas de différences au-delà de  $0,12 \text{ \AA}^{-1}$ . Notamment, l'oscillation à  $0,16 \text{ \AA}^{-1}$  est conservée ce qui montre que l'oxyhémoglobine conserve sa forme et sa structure même en formant des polymères à 0,1% de GTA ou en formant des gels pour des concentrations de GTA supérieures ou égales à 0,3%.

Maintenant que nous avons étudié les gels d'oxyhémoglobine seule, on va tenter d'étudier les gels d'oxyhémoglobine contenant des nanoparticules de silice.





## b) Etude avec nanoparticules

L'objectif a été de voir l'influence des nanoparticules sur un gel à concentrations d'oxyHb et de GTA fixées. La Figure 26 représente ainsi les différents spectres que nous avons mesurés avec un rappel du signal des nanoparticules de silice Ludox TM-50 (ce dernier signal provient des travaux de Laurent Marichal<sup>34</sup> s'agissant du même lot utilisé ici).

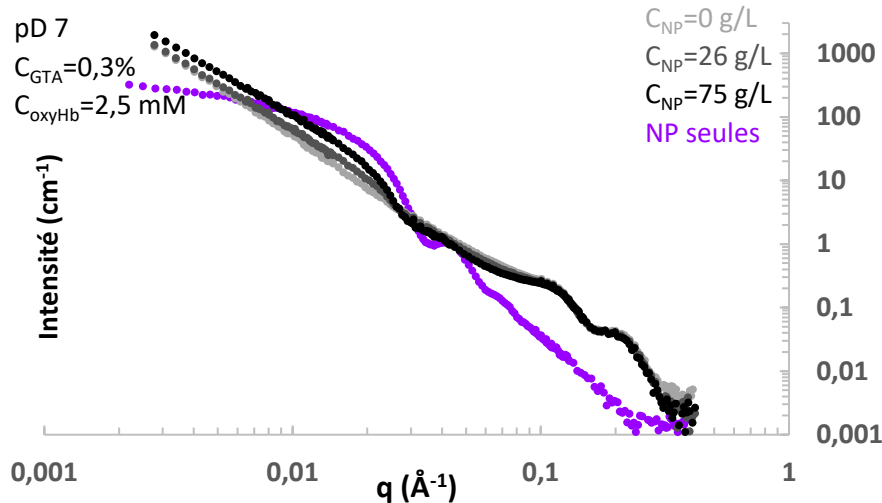


Figure 26 : Spectres DNPA à 25°C de l'oxyhémoglobine à 2,5 mM réticulée avec 0,3% de GTA en présence de NP à : gris clair : 0 g/L (sans NP), gris foncé : 26 g/L, noir : 75 g/L. Signal des NP rappelé en violet. pD 7, tampon phosphate 100 mM.

Au-delà de 0,12 Å<sup>-1</sup>, aucune différence notable n'existe entre les gels avec ou sans nanoparticules. Ainsi, la forme de la protéine est conservée même dans les gels avec NP. On constate aussi que les nanoparticules ne changent ni de forme, ni de rayon dans le gel. En effet, plus on ajoute de nanoparticules, plus le signal est marqué par une bande vers 0,026 Å<sup>-1</sup>, qui est celle des nanoparticules seules. L'analyse du reste du spectre concerne la structure du gel, ce que nous aborderons plus loin dans ce chapitre.

L'étude systématique en DNPA nous a informés que le glutaraldéhyde n'affecte pas la forme de la protéine, cette dernière garde donc sa structuration quaternaire. Nous allons confirmer ce fait par une étude de certains gels par diffusion de rayons X.

### 4) Etude par la diffusion de rayons X aux petits angles (DXPA)

Afin de confirmer le fait que la protéine conserve sa forme au contact du GTA, nous avons mesuré les gels d'oxyhémoglobine réticulée par le glutaraldéhyde que nous avons mesurés en DXGA aux petits angles. Pour l'étude de l'effet des nanoparticules, le gel avec NP a été comparé à la solution équivalente en concentrations d'oxyHb et de NP qui avait été aussi mesurée. La Figure 27 présente ainsi les différents spectres pour l'oxyhémoglobine seule et les différents gels mesurés pour la diffusion aux petits angles.

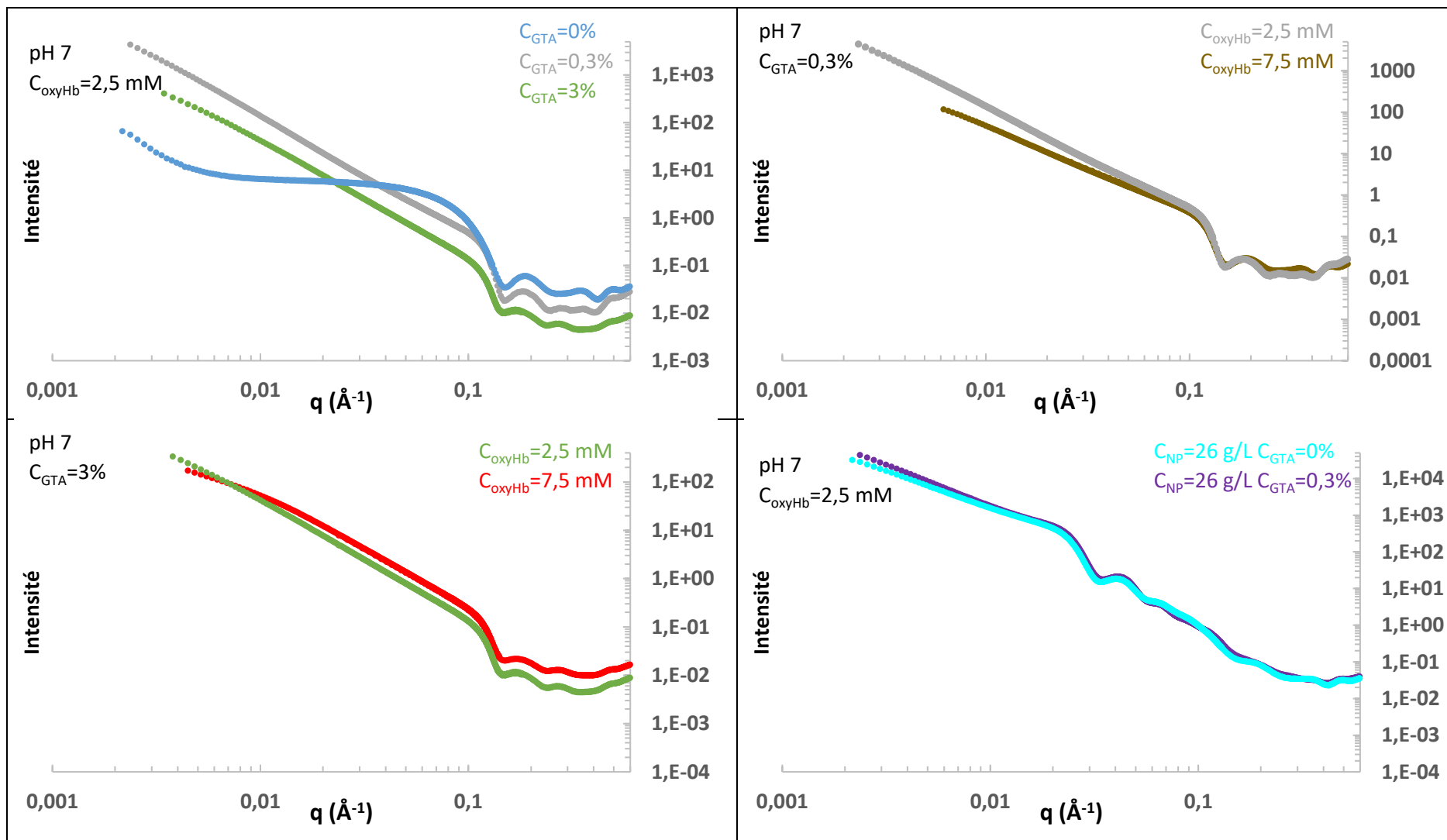


Figure 27 : Spectres DXPA, tampon phosphate 100 mM, pH 7,0 de  
 -solution d'oxyhémoglobine 2,5 mM en bleu.  
 -gel d'oxyHb 2,5 mM réticulé avec GTA 0,3% en gris.  
 -gel d'oxyHb 2,5 mM réticulé avec GTA 3% en vert.

-gel d'oxyHb 7,5 mM réticulé avec GTA 0,3% en marron.  
 -gel d'oxyHb 7,5 mM réticulé avec GTA 3% en rouge.  
 -gel d'oxyHb 2,5 mM adsorbée sur 26 g/L de NP réticulé avec GTA 0,3% en violet.  
 -solution d'oxyHb 2,5 mM adsorbée sur 26 g/L de NP (sans GTA) en cyan.

Pour l'oxyhémoglobine seule, on retrouve aux plus petits angles une remontée en intensité classique des phénomènes d'aggrégation. En ajustant avec une fonction de Guinier aux moyens angles, on trouve un rayon de giration  $R_g$  de 23,65 Å. On retrouve des rayons de giration légèrement différents entre les deux techniques (23,65 Å contre 23 Å précédemment), mais il a déjà été mesuré qu'en DXPA, le rayon de l'oxyhémoglobine est plus grand que celui mesuré en DNPA (24,7 Å contre 23,8 Å<sup>35</sup>). Un facteur de forme de l'oxyhémoglobine a donc été calculé sur toute la gamme d'angles en gardant les points mesurés pour  $q > 0,078 \text{ \AA}^{-1}$  et en gardant les points de l'ajustement de Guinier aux petits angles afin de s'affranchir des remontées parasites. Le spectre Figure 28 présente donc le facteur de structure ainsi calculé, avec l'ajustement de Guignier pour  $R_g=23,65 \text{ \AA}$  et le spectre de l'oxyhémoglobine à  $2,5 \text{ \AA}^{-1}$ .

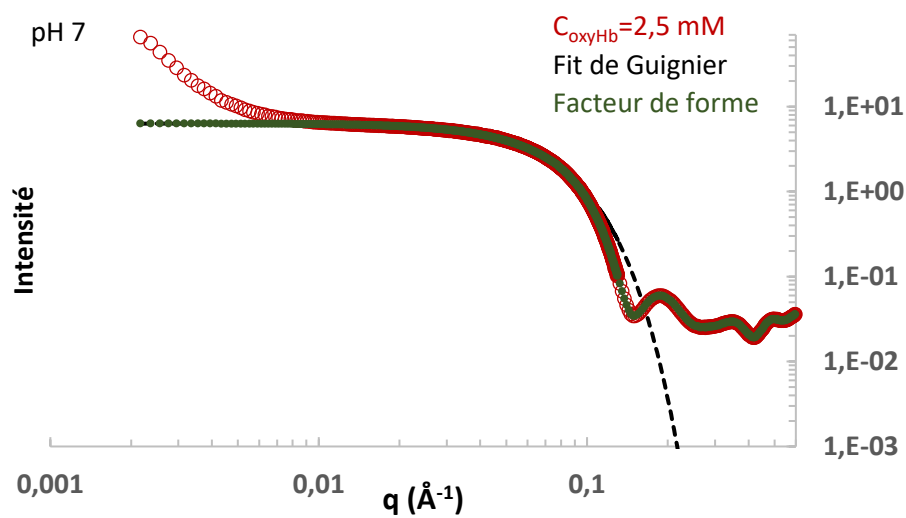


Figure 28 : Spectres DXPA à 25°C de l'oxyhémoglobine à 2,5 mM en bordeaux, de l'ajustement de Guignier en pointillés noirs et facteur de forme de l'oxyhémoglobine en vert foncé, pH 7, tampon phosphate 100 mM.

Afin de voir si le facteur de forme est bien construit et pour voir l'absence de différence entre DNPA et DXPA, on le compare à celui qui a été déterminé pour la diffusion de neutrons. La Figure 29 présente ainsi les facteurs de forme pour les deux techniques.

On voit que les deux facteurs de forme sont très proches dans leur forme. Il y a des différences au niveau de l'intensité, mais cela est lié à la différence de ce qui est mesuré suivant les techniques.

Au final, grâce à la diffusion de neutrons et de rayons X, l'étude de la globine a donc été faite. Il a été indiqué que la structure de l'hémoglobine est conservée tant à son niveau global qu'interne. L'étude en dichroïsme circulaire a montré les limites de la technique et l'utilisation de la diffusion aux grands angles a tout de même permis de pouvoir conclure sur la conservation de la structure secondaire de la globine bien que la structure interne de la protéine subisse des déformations. La perte des propriétés d'oxygénation de l'hémoglobine ne peut s'expliquer par une différence dans la globine avec la gélification.

La dernière question posée par cette thèse pour ce chapitre est la structuration du gel. A quoi ressemble le réseau formé ? C'est donc ce qui va être étudié dans la partie suivante en utilisant les études en diffusion afin d'apporter de nouvelles informations.

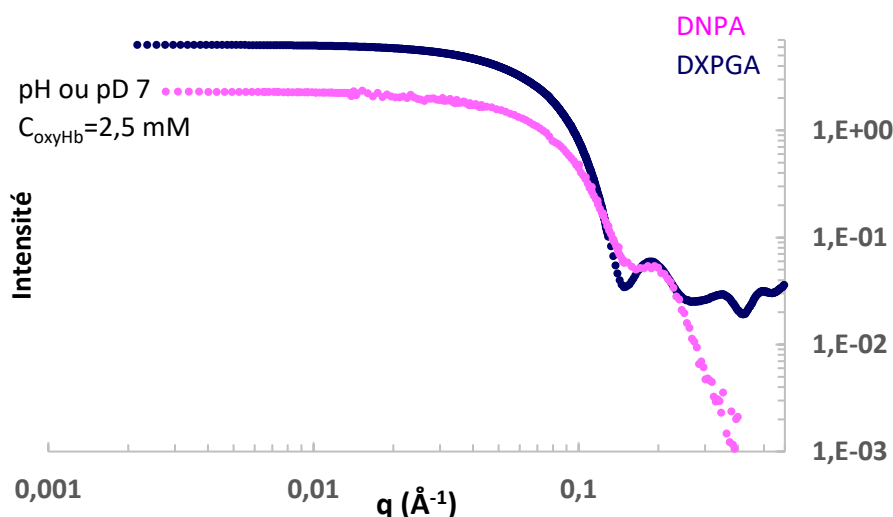


Figure 29 : Facteur de forme de l'oxyhémoglobine tiré du spectre DNPA en rose et facteur de forme tiré du spectre DXPA en bleu foncé de l'oxyhémoglobine à 2,5 mM à 25°C, pH ou pD 7, tampon phosphate 100 mM.

## V- Vers une compréhension de la structure du gel

Dans les deux techniques de diffusion déjà utilisées, il est possible de pouvoir tirer certaines informations en plus des spectres. Nous allons tout d'abord nous pencher sur la diffusion de neutrons aux petits angles.

- 1) Etude de la structure par diffusion de neutrons aux petits angles
  - a) Etude sans nanoparticule

En reprenant la Figure 25, on remarque qu'en plus de la conservation de la forme de la protéine qui a été observée aux plus grands vecteurs d'ondes mesurés, nous avons aussi un pic de corrélation marqué vers 0,13-0,14 Å<sup>-1</sup>. Cela provient très certainement du contact entre protéines dans le gel. En effet, il est très proche du pic observé pour l'hémoglobine au contact quand adsorbée sur les nanoparticules au chapitre 2. Enfin, on remarque qu'à moyens et petits angles, on a une remontée en loi de puissance montrant une organisation du système.

Afin de mieux étudier tout cela, il est obligatoire d'étudier le facteur de structure, comme expliqué dans le chapitre précédent. Pour nos mélanges, gels ou solutions, il s'agit au final de la répétition d'un même objet, la molécule d'oxyhémoglobine, en interaction avec elle-même. Si on considère que la forme de la protéine n'est pas modifiée par la réaction avec le glutaraldéhyde comme on l'a vu juste au-dessus, l'intensité diffusée est en conséquence le produit de la forme de la protéine et de l'interaction entre ces protéines, ces deux phénomènes étant indépendants.

Le facteur de structure tend normalement vers 1 aux grands angles. Si la concentration en oxyhémoglobine était la même dans tous les échantillons identifiés comme étant à 2,5 mM en oxyHb, la division du spectre du gel par celui du facteur de forme devrait tendre vers 1. Il tend en fait vers une constante qui varie assez largement d'un échantillon à l'autre. Ceci montre qu'il y a une forte erreur sur la concentration des échantillons. Cela ne signifie en aucun cas qu'il a eu des erreurs dans la préparation des échantillons, mais cette différence est inhérente à la difficulté de remplissage des

cellules : présence de bulles, possible séchage, hétérogénéités macroscopiques, etc. Les variations d'intensité qu'on pourra trouver ne devront pas être surinterprétées par la suite.

Les facteurs de structure ont donc été normalisés par une constante pour les faire tendre tous vers 1. Ils sont ainsi montrés en échelle log-log, puis en échelle classique avec focus sur les grands angles pour la concentration à 2,5 mM dans la Figure 30.

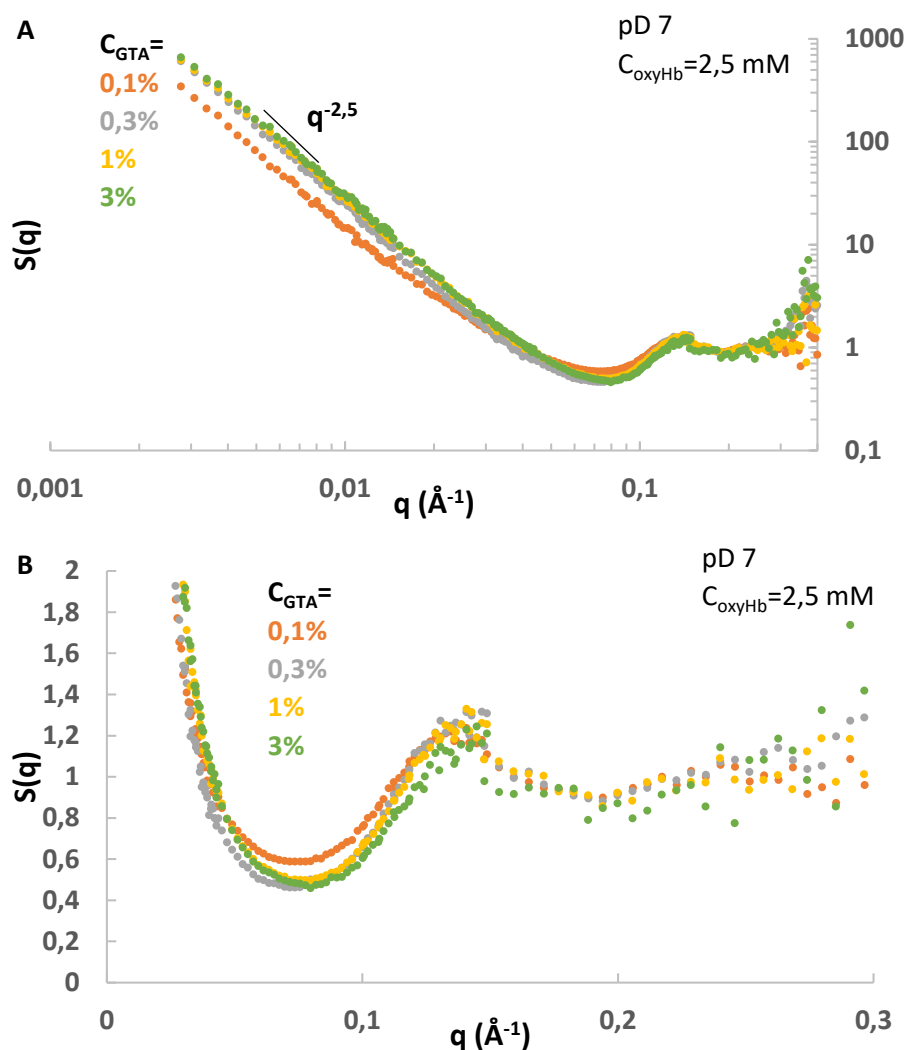


Figure 30 : Facteurs de structure calculés à partir des spectres DNPA à 25°C, pH 7,0 tampon phosphate 100 mM, de l'oxyhémoglobine à 2,5 mM réticulée avec du glutaraldéhyde à : orange 0,1%, gris 0,3%, jaune 1% et vert 3%. A : échelle log-log et B : échelle linéaire avec focus sur les grands angles.

On voit donc que quelle que soit la concentration en glutaraldéhyde :

- une remontée en loi de puissance en  $q^{-2.5}$ , typique des fractales de masse<sup>36</sup>. La loi de puissance suggère la formation d'agrégats, puisque la dimension fractale est de 2,5. Toutefois, l'absence de rupture de pente pour donner une remontée en  $q^{-4}$  (loi de Porod) aux angles intermédiaires nous informe que les agrégats n'ont pas une surface bien définie.
- un pic de corrélation à  $0,135 \text{ \AA}^{-1}$ ;
- un trou de corrélation vers  $0,07 \text{ \AA}^{-1}$ .

Ces deux derniers points tendent à montrer un système de sphères dures, au contact. Dans l'espace réel, cela correspond à 46.5 Å. La distance dans l'espace direct correspond donc exactement à un peu plus que deux protéines en contact, le rayon de giration de l'oxyHb étant de 22 Å. Les protéines seraient donc légèrement étirées comme ce qui avait déjà été montré avec la DXGA avec la distance  $\alpha 1\beta 2$  plus grandes dans les gels. De plus, les protéines sont au contact. Cela veut dire que le réseau est constitué de tétramères d'oxyHb qui se touchent et légèrement distendus. On peut imaginer que les liaisons du GTA peuvent causer cet étirement dans le gel à cause du réseau tendu tout en maintenant la protéine au contact.

Pour la concentration à 0,1%, il faut se rappeler que nous n'avons pas un gel, mais une solution de polymères d'hémoglobine vu la faible concentration en GTA. On observe des différences pour le spectre démontrant une agrégation localement moins forte, mais pas une structure fondamentalement différente. Cela peut être contrintuitif puisqu'il s'agit d'une solution et non d'un gel, mais cela peut s'expliquer par la formation d'un réseau à l'échelle locale dans la solution très proche de celui d'un gel, mais où l'agrégation ne serait pas suffisamment forte afin de former un réseau suffisamment conséquent pour prendre en gel.

Enfin, le maximum du facteur de structure aux petits  $q$  donne une borne minimale du nombre d'agrégations étant donné que la loi de puissance ne s'infléchit pas aux petits  $q$ . Il y a donc *a minima* plusieurs centaines de protéines impliquées dans le processus.

Le calcul du facteur de structure a été aussi effectué pour les concentrations à 5 et 7,5 mM d'oxyhémoglobine avec le facteur de forme tiré du signal de l'hémoglobine seule à 2,5 mM et encore une fois normalisé à 1 aux grands  $q$ . La Figure 31 présente ainsi les différents facteurs de structure.

Pour les concentrations à 5 mM et 7,5 mM en oxyhémoglobine à 0,1% de GTA, on remarque des différences notables par rapport à 2,5 mM d'oxyHb en présence de GTA. Le facteur de structure est très peu marqué, la loi de puissance en  $q^{-2.5}$  n'est conservée qu'aux petits angles et le pic à  $0,135 \text{ \AA}^{-1}$  faible, cela étant très net pour la plus forte concentration en oxyHb, c'est-à-dire 7,5 mM. Cela indique donc que l'hémoglobine n'est pas au contact, qu'il n'y a donc pas de formation de polymères d'hémoglobine ou de polymères de petite taille, faisant qu'il n'y a donc pas un état structuré dense. Cela démontre de plus qu'il y a des protéines en solution. Ce que l'on mesurerait serait alors une combinaison linéaire de protéines seules et de protéines réticulées. Considérant la faible concentration en GTA face à celle d'oxyHb, cela n'est pas étonnant (au niveau molaire, 7,5 mM d'oxyHb/GTA 0,1% donne 1 molécule de GTA pour 2 résidus lysine apparents de Hb)

En revanche, pour toutes les autres concentrations en glutaraldéhyde, on retrouve ce que l'on avait vu pour 2,5 mM d'oxyHb, c'est-à-dire le pic à  $0,135 \text{ \AA}^{-1}$  et un trou de corrélation vers  $0,07 \text{ \AA}^{-1}$ . On a toujours des protéines au contact. La loi de puissance en  $q^{-2.5}$  est conservée, sauf aux très petits angles, où elle s'infléchit légèrement à 5 mM et plus nettement à 7.5 mM. On peut penser que cela provient : (i) soit d'agrégats de taille finie, ou du moins plus lâches qu'à 2.5 mM aux échelles mésoscopiques, (ii) soit de problèmes de diffusion multiple, puisque l'effet est d'autant plus important que la concentration en oxyHb est importante. On peut toutefois écarter cette deuxième hypothèse. En effet, si on regarde les transmissions aux petits angles des différents mélanges, on voit certes apparaître une diminution de la transmission avec l'augmentation de la concentration en oxyHb comme en GTA, mais cette diminution est très faible. Les transmissions restent au dessus de 0,5, signe qu'il n'y a pas de diffusion multiple. On aurait donc des agrégats plus petits qu'à 2,5 mM.

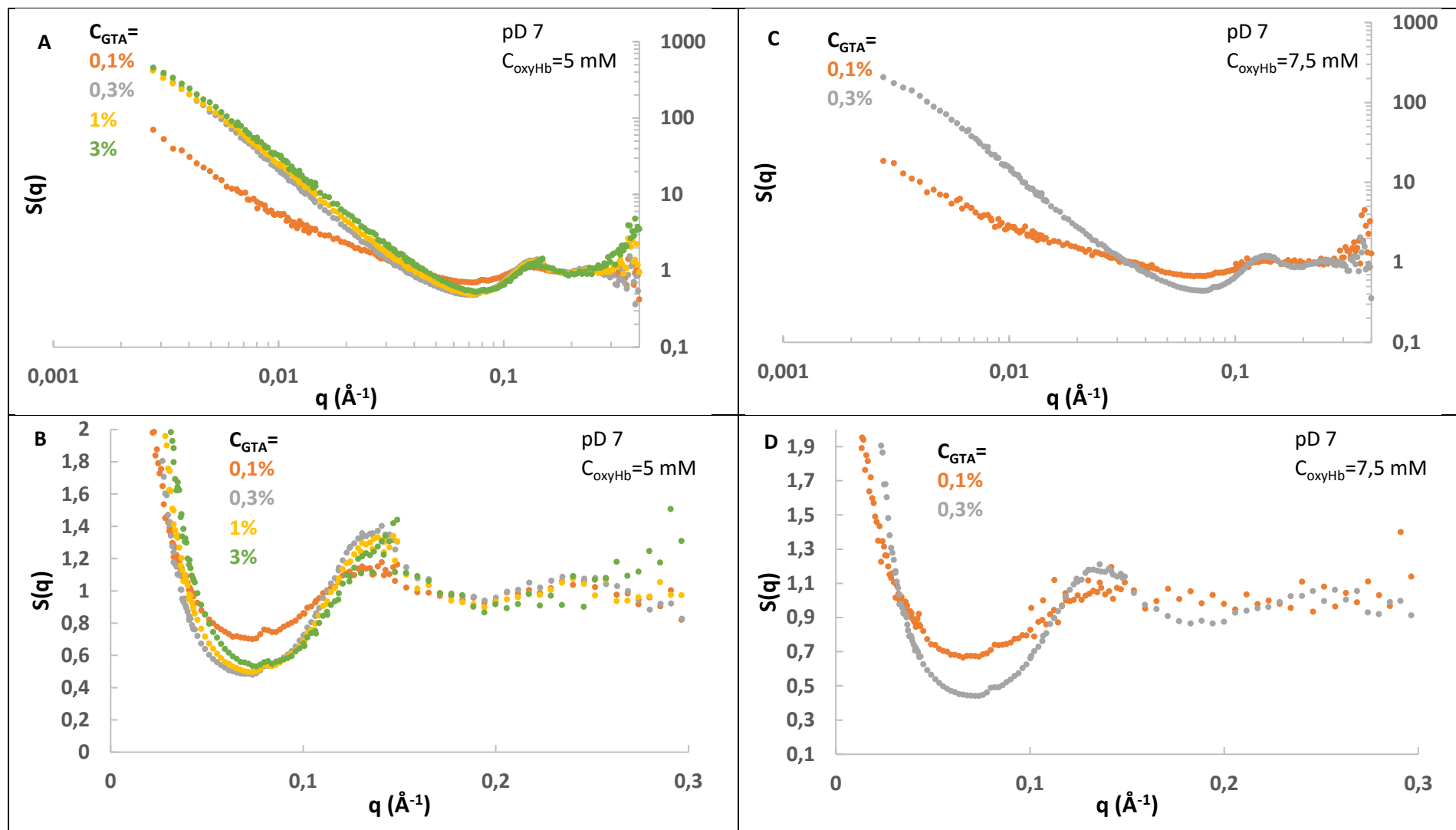


Figure 31 : Facteurs de structure calculés à partir des spectres DNPA à 25°C de l'oxyhémoglobine à 5 mM (à gauche) avec A échelle log-log et B échelle linéaire avec focus sur les grands angles et à 7,5 mM (à droite) avec C échelle log-log et D échelle linéaire avec focus sur les grands angles, réticulée avec du glutaraldéhyde à : Orange : 0,1%, Gris : 0,3%, Jaune : 1% et Vert : 3%.  
 pD 7,0 tampon phosphate 100 mM.

Enfin, si on observe, pour des taux de réticulation faible (GTA 0,1%/oxyHb 2.5 mM, GTA 0.3% pour oxyHb 5 mM et 7.5 mM), on voit apparaître un autre pic vers  $0.24 \text{ \AA}^{-1}$ , ce qui correspond à  $26 \text{ \AA}$  dans l'espace réel. Nous n'avons pas réussi à expliquer cette observation.

En comparant à la littérature, on voit que l'on retrouve des choses assez proches de celles observées sur d'autres gels étudiés en diffusion. Ainsi, Kaieda et collaborateurs<sup>2</sup> ont montré que des protéines réticulées (une protéine inhibitrice de la trypsine, la myoglobine, et une protéine liant les acides gras) par le glutaraldéhyde gardait leur forme identique en solution ou dans le gel. De plus, comme dans leur étude, le seul effet du glutaraldéhyde est de créer des corrélations protéine-protéine. Leur étude ne se penchait pas vraiment sur les propriétés fractales des protéines, mais nous retrouvons comme dans celle de Cousin et collaborateurs<sup>37</sup> un ordre de fractale à 2,5 pour des gels contenant des protéines. D'après les études de Cousin et collaborateurs et de Stauffer et collaborateurs<sup>37,38</sup>, 2,5 est un ordre particulièrement trouvé pour les phénomènes de gélification.

#### b) Etude avec nanoparticules

En reprenant la Figure 26, l'intensité des gels avec nanoparticules montre juste une combinaison du signal des nanoparticules seules et du signal des gels sans NP, les nanoparticules ne modifiant donc pas le gel. On essaye de le confirmer en calculant le facteur de structure des gels avec NP grâce au facteur de forme de la protéine. La Figure 32 montre ainsi les facteurs de structure des mêmes gels.

Sur le signal mesuré, on voit la présence du signal des nanoparticules avec clarté aux petits angles. En effet, le facteur présenté n'est pas celui de la structure de l'assemblage seule, il présente aussi le facteur de forme des NP qui est impossible à extraire parce que les NP interagissent avec l'oxyHb. Mais sinon, le signal est identique à celui sans NP, avec les principales caractéristiques que nous avons relevées précédemment, c'est-à-dire un pic de corrélation à  $0,135 \text{ \AA}^{-1}$ , un trou de corrélation vers  $0,07 \text{ \AA}^{-1}$  et une remontée en loi de puissance. Sur ce dernier point, on voit qu'on diminue l'exposant fractal avec les nanoparticules, diminuant de 2,5 à 2,3 à 75 g/L de nanoparticules. Les agrégats sont donc moins denses.

A cette différence près, les nanoparticules ne modifient aucunement la structure et la forme de l'oxyhémoglobine gélifiée. Les conclusions que nous avons tirées plus haut pour les gels sans nanoparticule s'appliquent donc ici aussi, c'est-à-dire une structuration fractale du gel avec l'oxyHb au contact dans le gel.



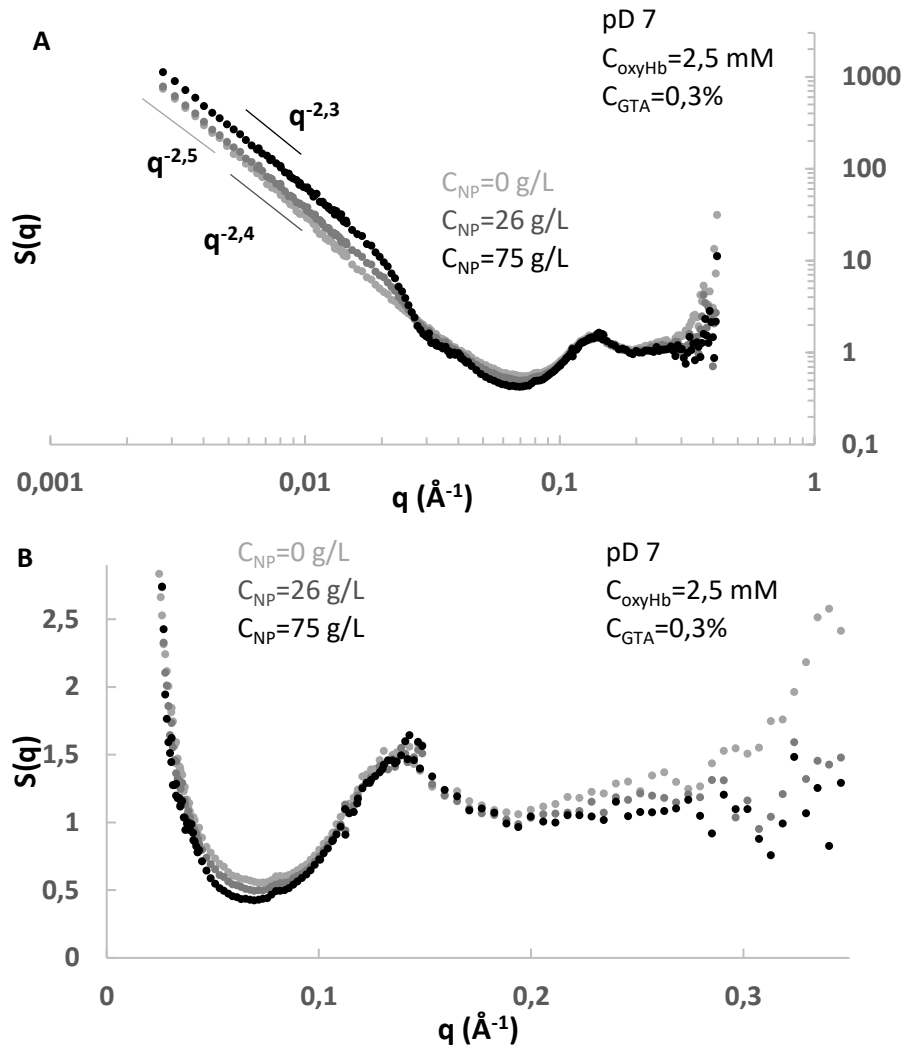


Figure 32 : Facteurs de structure calculés à partir des spectres DNPA à 25°C de l'oxyhémoglobine à 2,5 mM réticulée avec 0,3% en présence de NP à :

- Gris clair : 0 g/L (sans NP)
- Gris foncé : 26 g/L
- Noir : 75 g/L 75 g/L

pD 7,0 tampon phosphate 100 mM

A : échelle log-log et B : échelle classique avec focus sur les grands angles.

## 2) Diffusion de rayons X aux petits angles

Afin de conforter les conclusions sur la structure du gel tirées des signaux de la DNPA, on va utiliser les signaux obtenus en DXPA. L'intérêt est de pouvoir étudier si le gel a la même structure dans deux environnements différents. En effet, la DXPA se fait dans des capillaires de 2 mm, imposant donc un environnement beaucoup plus contraignant que les fenêtres de quartz utilisés en DNPA. En reprenant l'analyse déjà commencé sur la Figure 27, Figure 27 : Spectres DXPA, tampon phosphate 100 mM, pH 7,0 de -solution d'oxyhémoglobine 2,5 mM en bleu. -gel d'oxyHb 2,5 mM réticulé avec GTA 0,3% en gris. -gel d'oxyHb 2,5 mM réticulé avec GTA 3% en vert on voit comme pour la DNPA :

- un pic de corrélation à  $0,13 \text{ \AA}^{-1}$ ,

-à moyens et petits angles, on a une remontée en loi de puissance démontrant une organisation du système.

Toutefois, contrairement à la diffusion de neutrons, il n'y a pas la même loi de puissance pour tous les gels. De plus, aux plus grands angles, nous voyons les signaux déjà étudiés durant l'analyse en DXGA (Figure 24), notamment, pour l'oxyhémoglobine seule la bande à  $0,35 \text{ \AA}^{-1}$ , correspondant à la structure interne de la protéine. Nous rappelons que cette bande se retrouve dans les gels à 0,3%, mais est remplacée à 3% en GTA par une nouvelle bande qui apparaît à  $0,27 \text{ \AA}^{-1}$ . Les deux bandes coexistent pour le gel oxyHb 2,5 mM/GTA 0,3%.

Afin de mieux comprendre ces phénomènes, il est possible de décomposer l'intensité diffusée pour obtenir le facteur de structure, permettant pour les gels d'obtenir des informations sur la structuration. Pour l'obtenir, nous allons utiliser le facteur de forme calculé à la Figure 28. Les facteurs de structure tendant normalement vers 1 aux grands angles, ils ont donc été normalisés par une constante pour les faire tendre tous vers 1. Cette normalisation ne devrait pas être nécessaire pour des gels de mêmes concentrations en oxyhémoglobine, mais comme en diffusion de neutrons, la difficulté de remplissage des capillaires de 2 mm peut expliquer ces différences. Nous rappelons toujours le mélange oxyHb/NP afin de pouvoir comparer au gel avec NP. Les variations d'intensité qu'on pourra trouver ne devront donc pas être surinterprétées par la suite. La Figure 33 présente ainsi les facteurs de structure des différents gels.

Comme on pouvait s'y attendre, on retrouve des informations communes entre la diffusion de neutrons et de rayons X. En effet, sur le facteur de structure des gels par diffusion de rayons X, on retrouve de nouveau :

-une remontée en loi de puissance. Les valeurs sont entre 2,1 et 2,5, montrant la formation d'une fractale de masse. Toutefois, nous n'avons pas une remontée à 2,5 pour tous les gels, contrairement à la diffusion de neutrons. Comme expliqué dans l'étude d'Anitas et collaborateurs<sup>36</sup>, plus bas est l'exposant de fractale de masse, moins la structure est compacte. Cela montre donc que la structure la plus compacte est celle du gel à 2,5 mM en oxyHb et 0,3 % en GTA. Et plus la concentration en oxyhémoglobine et/ou en glutaraldéhyde est élevée, moins la structure est compacte. Les différences entre les deux types de diffusion peuvent venir du fait que ce ne sont pas les mêmes objets qui diffusent suivant les deux techniques.

--un pic de corrélation vers  $0,13 \text{ \AA}^{-1}$  ;

-un trou de corrélation vers  $0,07 \text{ \AA}^{-1}$ .

Ces deux derniers points montrent qu'on a de nouveau des sphères dures au contact. Considérant que la distance dans l'espace direct de  $49 \text{ \AA}$  et que le rayon de giration de l'oxyHb étant de  $23,65 \text{ \AA}$ , on aurait donc deux protéines distendues au contact. Cette valeur est légèrement différente de celle en DNPA, mais le rayon de giration étant plus grand, il est cohérent que cette distance soit elle aussi plus grande.

A côté de cela, nous retrouvons beaucoup de nouveaux pics, témoignant donc de nouvelles distances de corrélations dans le gel qui n'étaient pas présentes avec la diffusion de neutrons. Interpréter ces pics est difficile. Déjà, leur taille dans l'espace réel ne correspond à rien de connu. En outre, l'analyse de pourquoi certains pics sont présents dans certains gels et non dans d'autres est loin d'être triviale. Sans données supplémentaires, il est difficile de conclure sur l'attribution de ces pics. Nous préférons ne pas rentrer dans des analyses spéculatives non fondées.

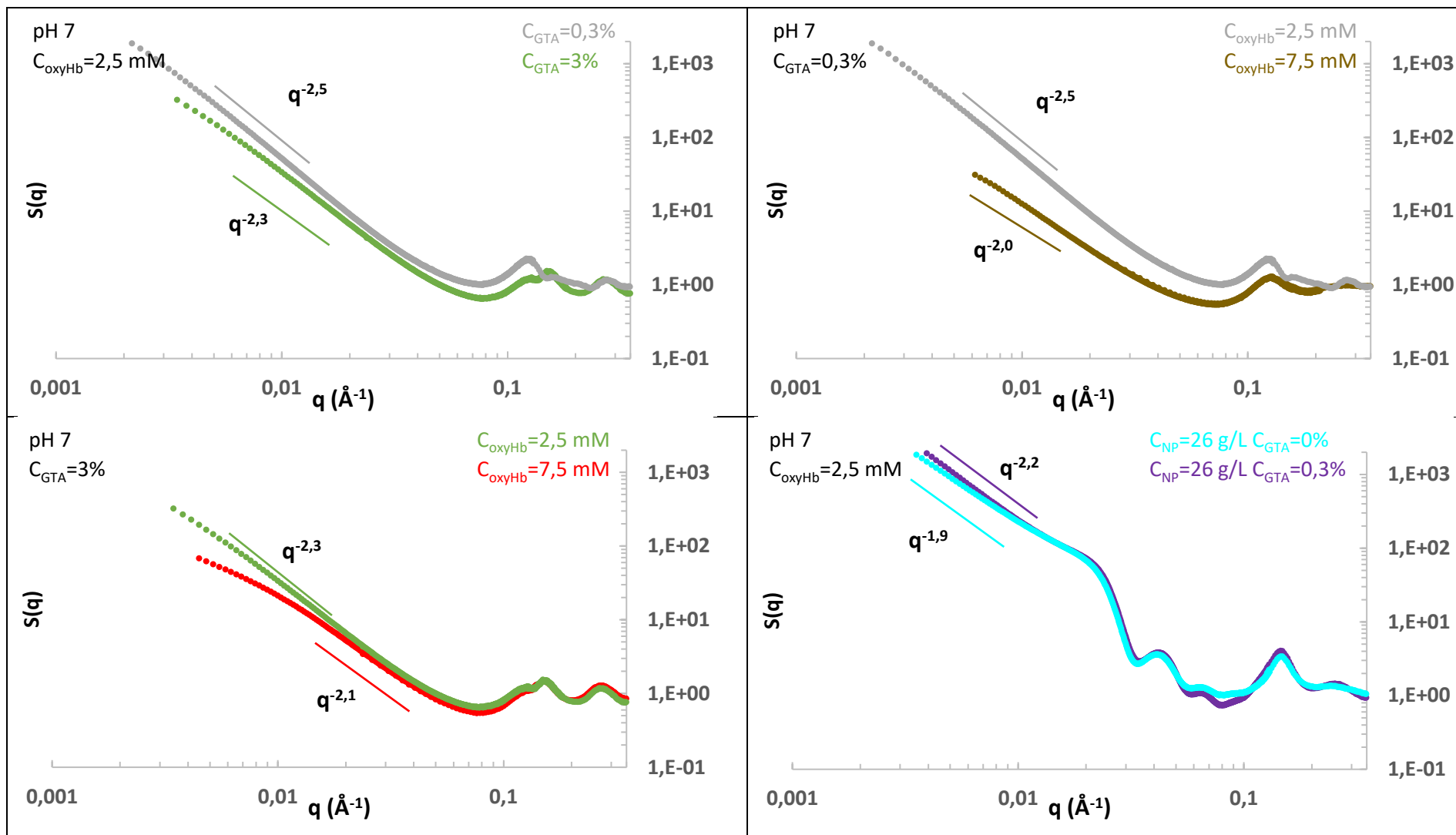


Figure 33 : Facteur de structure tiré des spectres DXPGA, tampon phosphate 100 mM, pH 7,0 de :

-gel d'oxyHb 2,5 mM réticulé avec GTA 0,3% en gris.  
 -gel d'oxyHb 2,5 mM réticulé avec GTA 3% en vert.

-gel d'oxyHb 7,5 mM réticulé avec GTA 0,3% en marron.  
 -gel d'oxyHb 7,5 mM réticulé avec GTA 3% en rouge.  
 -gel d'oxyHb 2,5 mM adsorbée sur 26 g/L de NP réticulé avec GTA 0,3% en violet.  
 -solution d'oxyHb 2,5 mM adsorbée sur 26 g/L de NP (sans GTA) en cyan.

Pour le gel avec nanoparticules, les oscillations à  $0,042$  et  $0,065 \text{ \AA}^{-1}$  viennent du facteur de forme des nanoparticules. On voit aussi une remontée en  $q^{-2,2}$  ce qui montre une structure en fractale de masse moins dense que pour le même gel sans nanoparticule, mais plus que le mélange oxyHb/NP ( $q^{-1,9}$ ). On retrouve dans le mélange oxyHb/NP et le gel avec NP une bande large vers  $0,15 \text{ \AA}^{-1}$  et d'autres bandes ne correspondant à aucune distance connue. La bande à  $0,15 \text{ \AA}^{-1}$  étant grande et large, elle cache sans doute la bande qu'on trouve pour les gels sans NP correspondant aux hémoglobines au contact. Les attributions des bandes étant tout aussi compliquées que pour les gels sans NP, nous ne nous risquons pas à une analyse de celles-ci.

Au final, mises à part ces différences DNPA/DXPA, on retrouve la même logique pour nos gels ici que pour la diffusion de neutrons et dans la littérature. La diffusion nous renseigne donc qu'avec ou sans NP, les molécules d'hémoglobine sont au contact entre elles dans le gel bien que distendues, leur forme étant conservée et la structure du gel donne un ordre fractal proche de ce qui est classiquement trouvé pour des gels<sup>2,37,38</sup>.

Afin de caractériser les gels à des échelles supérieures, on va observer directement les gels à l'aide de clichés prises par microscopie électronique à balayage.

### 3) Prise de clichés par microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage permet d'observer des échantillons à très petite taille. Afin de préparer les échantillons, nous avons gelé nos échantillons dans l'azote liquide, puis fait passer nos échantillons en lyophilisation afin d'éliminer l'eau de nos hydrogels. Enfin, nous avons métallisé des échantillons à l'or sur une épaisseur de  $5 \text{ nm}$  afin d'obtenir des clichés de meilleure qualité. Les expériences ont été faites au LEDNA avec le Docteur Mathieu Pinault après métallisation. La Figure 34 présente ainsi un gel lyophilisé visualisé avec un fort grossissement.

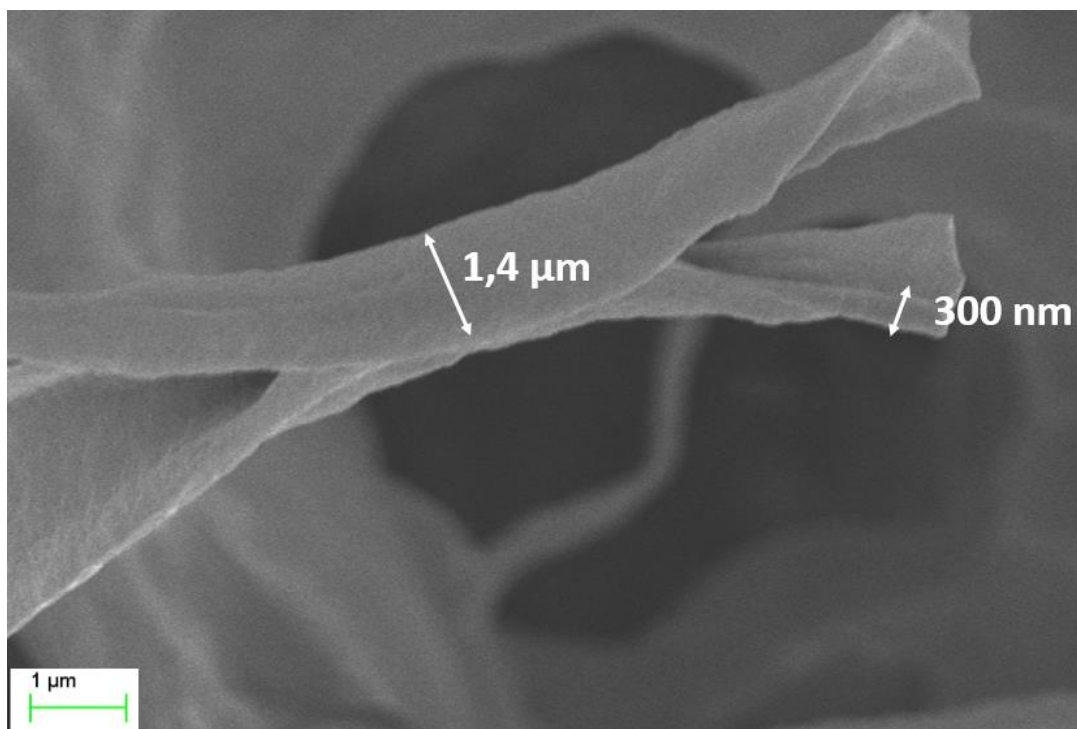


Figure 34 : Cliché d'un gel lyophilisé d'oxyHb  $2,5 \text{ mM}$  réticulée par  $3\%$  de GTA pris par microscopie électronique à balayage. Tampon phosphate  $100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7$ . Métallisé à l'or sur une épaisseur de  $5 \text{ nm}$ .

On voit que notre structure est organisée en fibrilles, tout ayant un diamètre entre 100 et 1500 nm. Mais à ce grossissement, il est par contre difficile de voir la structuration des fibrilles dans le gel. Pour cela, nous avons effectué les expériences sur trois gels en faisant changer la concentration soit de GTA, soit d'oxyHb afin de voir les effets des deux composants sur le gel. Les images sont présentées sur la Figure 35.

On voit qu'on a une structure très poreuse, qui ressemble à des nids d'abeille. Cela avait été déjà observé pour des gels de BSA réticulés avec du glutaraldéhyde<sup>1</sup>. Pour le gel à 2,5 mM d'oxyHb, le réseau est beaucoup moins dense que les gels à 5 mM d'oxyHb, ce qui est logique vu qu'il y a moins de matière. Sur les gels à 5 mM, plus il y a de glutaraldéhyde, plus les parois sont épaisses, la structure a l'air dense, ce qui peut se comprendre étant donné le GTA permet de mieux lier les différents tétramères d'oxyHb qui servent de base au réseau.

Si on regarde les pores, ces zones représentent les endroits où l'eau se trouve normalement. Plus le constituant d'un gel est présent (ici, l'oxyHb), plus la taille de pores est petite<sup>1</sup>. En mesurant la taille de pores, on trouve des diamètres de :

- 5  $\mu\text{m}$  pour le gel à 5 mM d'oxyHb et 0,3 % de GTA ;
- 25  $\mu\text{m}$  pour le gel à 2,5 mM d'oxyHb et 3 % de GTA ;
- 7  $\mu\text{m}$  pour le gel à 5 mM d'oxyHb et 3 % de GTA.

Ces diamètres sont cependant à prendre avec prudence, dans la mesure où la cristallisation de la glace pourrait les créer<sup>39,40</sup>.

Tout cela montre qu'à l'échelle nanométrique, les tétramères d'hémoglobine sont au contact les uns des autres et forment un ordre fractal. L'organisation de ces milliers de tétramères forment un réseau qui fait qu'à l'échelle microscopique, le gel est constitué de fibrilles plus ou moins épaisses qui forment une structuration en pores plus ou moins grands suivant la concentration en hémoglobine.

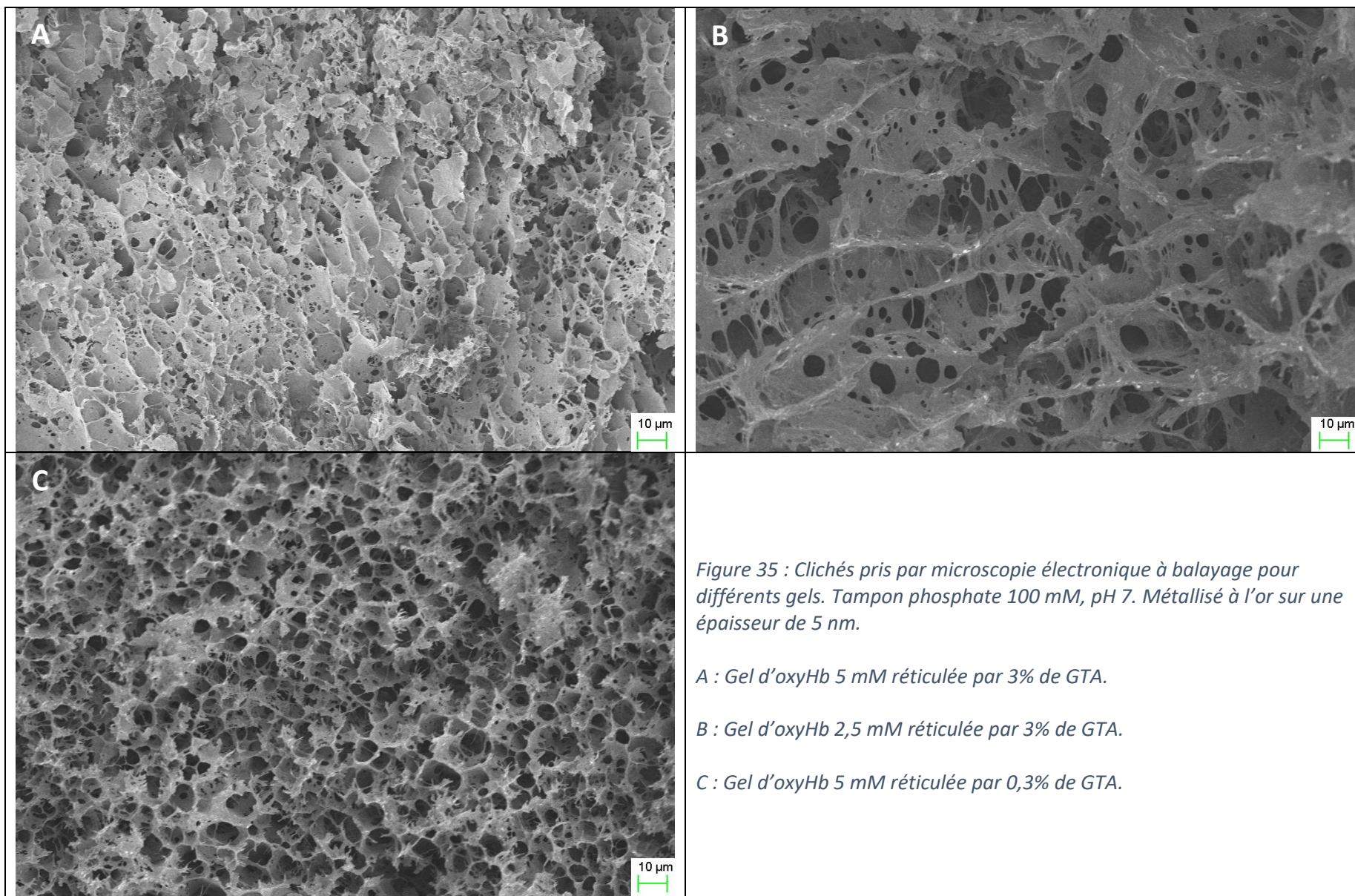


Figure 35 : Clichés pris par microscopie électronique à balayage pour différents gels. Tampon phosphate 100 mM, pH 7. Métallisé à l'or sur une épaisseur de 5 nm.

A : Gel d'oxyHb 5 mM réticulée par 3% de GTA.

B : Gel d'oxyHb 2,5 mM réticulée par 3% de GTA.

C : Gel d'oxyHb 5 mM réticulée par 0,3% de GTA.



## VI- Discussion

Les deux principales originalités de notre travail ont été de faire une étude :

- multiéchelle allant de l'angström jusqu'au micromètre permettant ainsi d'étudier tous les niveaux de structuration de la protéine à la structure du gel. L'utilisation de l'hémoglobine ayant une sonde de petite taille (hème) permet d'étendre la gamme d'échelles étudiées par rapport aux autres protéines.
- de l'activité de la protéine une fois dans le gel. A notre connaissance, aucune étude concernant des gels de protéines ayant des sites de fixation réticulés chimiquement ont permis de connaître si une protéine conserve son activité de fixation une fois gélifiée.

Le premier point est résumé dans la Figure 36 qui permet de montrer toutes les échelles sondées des gels d'hémoglobine réticulés par le glutaraldéhyde durant cette thèse. On voit ainsi la structuration des protéines dans le gel ainsi que la structure des différents niveaux de la protéine.

Les distances caractéristiques du gel détecté en microscopie électronique n'ont pas pu être corroborées en diffusions de rayonnement. En effet, les tailles en présence sont supérieures à 300 nm et correspondent à des vecteurs d'onde inférieurs à  $0,002 \text{ \AA}^{-1}$ , qui sont trop bas pour avoir été mesurés.

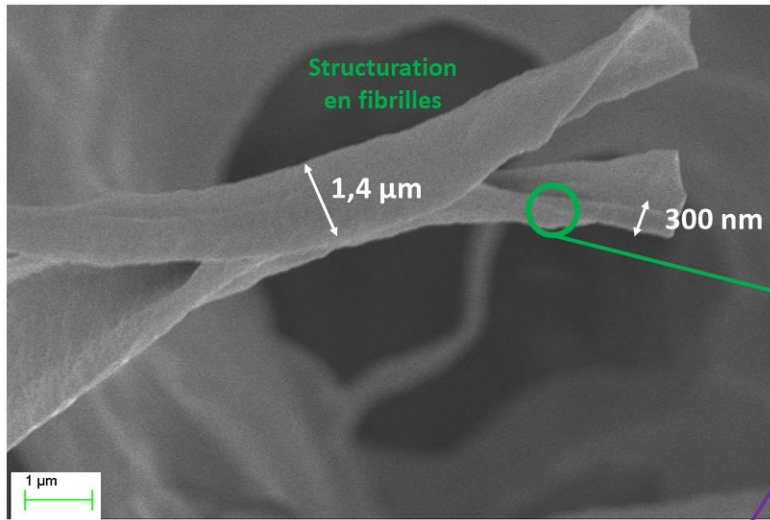
Les études concernant les gels de protéines non-fibreuses (comme le collagène ou la gélatine) réticulées chimiquement sont très peu nombreuses, donnant peu de points de comparaisons. L'étude de Ma et collaborateurs<sup>1</sup> en 2016 nous renseigne sur le fait que la structure des gels étudiés dans cette thèse sont similaires à ceux l'albumine de sérum bovin réticulée par le glutaraldéhyde. Il s'agit de la seule étude sur des gels de protéines globulaires réticulée chimiquement ayant des clichés des gels à l'échelle microscopique. Malheureusement, leur étude ne se centre pas sur les mêmes problématiques que les nôtres, aucune de leur expérience n'essaye de comprendre la structure de la protéine.

L'étude de Kaieda et collaborateurs<sup>2</sup> en 2014 se revendique comme étant la première à étudier la structure des gels de protéines réticulées chimiquement. Avec la diffusion de rayons X aux petits angles effectuée sur des gels réticulés par le glutaraldéhyde pour trois protéines différentes dont notamment la myoglobine, protéine de la même famille que l'hémoglobine, ils ont permis de tirer certaines informations sur la structure du gel ainsi que la structure de la protéine. Ils ont ainsi montré les points suivants :

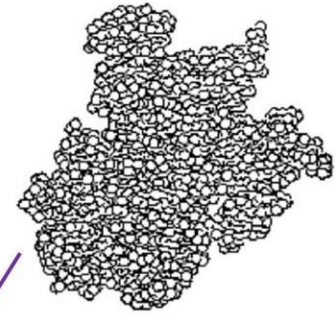
- la structure native de la protéine est conservée dans le gel ;
- les protéines sont presque au contact ;
- les gels sont denses et présentent des clusters ;
- le développement du gel se fait sur des temps allant de quelques minutes à quelques heures.

L'absence de différence sur la structure quaternaire de la protéine et la structuration des gels sont donc en adéquation avec ce qui a déjà été trouvé dans la littérature. Notre travail a donc été vraiment novateur sur les plus petites échelles de structuration de la protéine (secondaire et tertiaire), sur l'étude de l'hème de l'hémoglobine et surtout, sur l'activité de l'hémoglobine. La Figure 37 résume les points communs et différences constatés entre l'hémoglobine libre et celle réticulée gélifiée.

# Structure du gel



Microscopie électronique à balayage



Agrégats très denses  
dimension fractale de 2,5

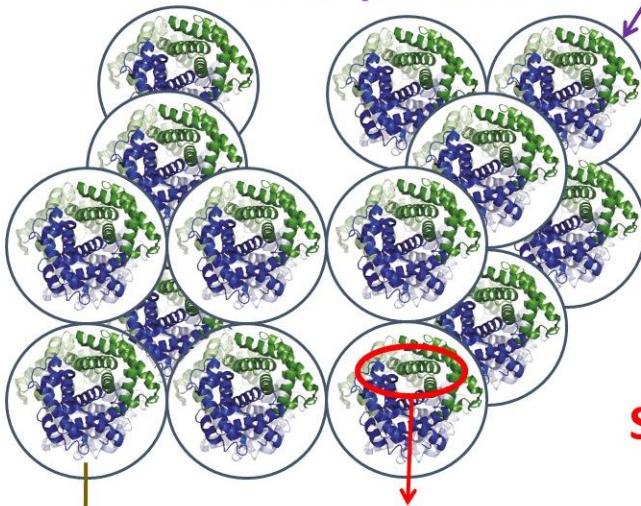
Facteur de structure obtenu par diffusion de rayonnements

Sphères d'hémoglobine au contact

Forme de la protéine conservée

Facteur de forme obtenu par diffusion de rayonnements

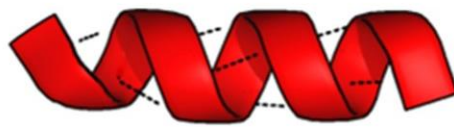
## Structure et organisation de la protéine



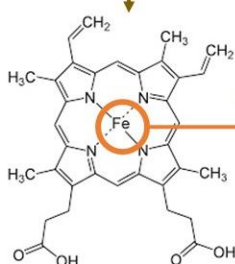
## Structure secondaire et tertiaire

Diffusion de rayonnements aux petits angles

Conservation des hélices secondaires  
Déformation de la structure tertiaire



## Structure de l'hème



Dichroïsme circulaire de la bande de Soret

Pas de changement de la structure de l'hème

Pas de déformation de la poche de l'hème

Spectroscopie d'absorption X

## Fer de l'hème

Résonance paramagnétique électronique

Fer de l'hème inchangé

Pas de changement d'oxydation du fer

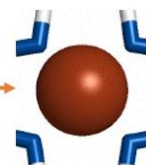


Figure 36 : Schéma récapitulant la structure du gel et de l'hémoglobine aux différents niveaux étudiés



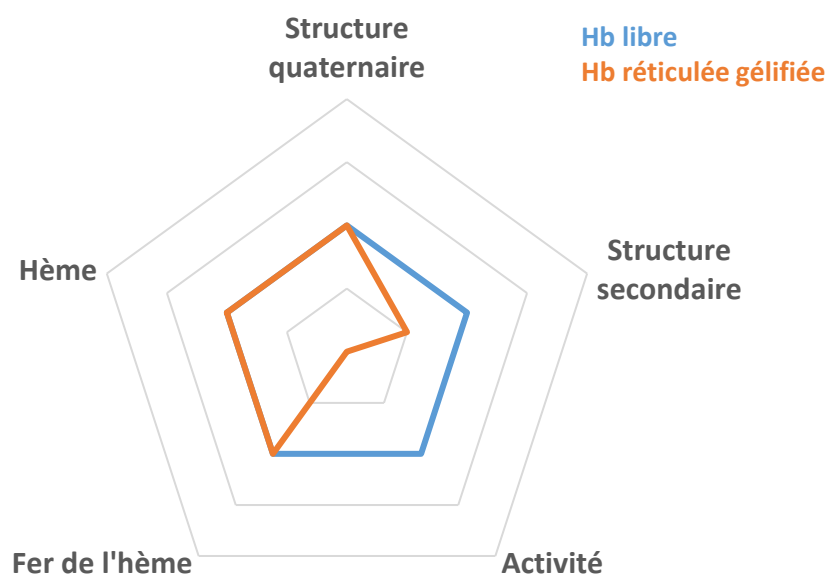


Figure 37 : Points communs et différences entre l'hémoglobine libre et l'hémoglobine réticulée gélifiée

Il n'y a pas d'effet des concentrations en hémoglobine, ou nanoparticules sur la structure de l'hémoglobine dans le gel. L'effet du glutaraldéhyde est plus ambigu en ce qui concerne la structure secondaire, mais les données WAXS nous indiquent qu'elle est probablement intègre.

Si l'étude multi-échelle a été accomplie durant cette thèse, la deuxième problématique des gels concerne l'oxygénation de l'hémoglobine dans les gels. Comme résumé dans la Figure 37, l'hémoglobine une fois gélifiée ne présente plus sa capacité à fixer ou à libérer le dioxygène. Comme nous l'avons fait dans ce chapitre et le précédent, nous avons essayé d'expliquer les modifications sur l'oxygénation d'un point de vue structural et de modifications de l'hème. Ainsi, si l'hémoglobine a son hème et son fer conservé (ainsi que la poche de l'hème), d'après les études de diffusion de rayons X aux grands angles, la structure secondaire est distordue et il semble qu'il y ait des modifications au niveau de la structure tertiaire. De plus, la disparition du signal des hélices et l'apparition d'un signal inconnu en dichroïsme circulaire dans l'UV proche indique qu'il y a sans doute des modifications locales sur les acides aminés. Enfin, la structure quaternaire si elle semble conservée est légèrement étirée au vu du rayon entre protéines au contact trouvé.

Toutefois, bien que Kaieda et collaborateurs aient étudié la structure de la myoglobine gélifiée par le glutaraldéhyde, ils n'ont pas testé les propriétés d'oxygénation de la protéine. Et si aucun article à notre connaissance ne parle de l'activité des gels de protéine avec site de fixation, on peut se pencher sur les effets du glutaraldéhyde sur l'hémoglobine qui sont déjà une source riche d'informations.

Comme abordé dans l'introduction, les principaux articles de la littérature sur l'action du glutaraldéhyde sur l'hémoglobine concernent la formation de polymères d'hémoglobine (PolyHb)<sup>22,24,25,41-45</sup>. Contrairement à ce que l'on a trouvé, Guillochon et collaborateurs<sup>41</sup> ont montré que la forme de PolyHb dans l'état oxygéné ou désoxygéné avant réticulation possédait une affinité plus grande et une perte du comportement coopératif. Les études du groupe de Palmer<sup>22,24,25,42,43</sup> ont montré que l'affinité dépendait de l'état avant réticulation. Ainsi, PolyHb produit à partir d'oxyHb, la forme à forte affinité possédait une plus grande affinité que Hb seule tandis que PolyHb obtenu avec de la désoxyHb, la forme à faible affinité, était moins affine que Hb libre. De plus, la coopérativité était

perdue. Ce phénomène est expliqué par le fait que la structure quaternaire de la protéine est gelée/bloquée, empêchant toute transition entre un état de faible affinité et un état de forte affinité. La différence d'affinité venant donc de l'état initial avant gélification<sup>22</sup>.

Les seules études structurales menées ont été faites par dichroïsme circulaire dans l'UV-Visible afin de vérifier la structure secondaire. Les résultats obtenus<sup>24,25</sup> montrent qu'il n'a pas ou peu de changements dans le spectre, indiquant que la structure en hélices est conservée. Il ne semble pas qu'il y ait eu d'études de la structure de l'hème et de son fer ainsi que de la structure quaternaire. Sur ces bases, nous pouvons constater que les PolyHb obtenus par réticulation grâce au glutaraldéhyde ont une structure quasi-identique à l'hémoglobine seule et possède une activité inhérente à la forme de l'hémoglobine quand elle est gélifiée. Les gels d'hémoglobine ont des différences plus marquées par rapport à l'hémoglobine seule. Pourtant, les ratios GTA/Hb sont proches : 4/1 à 120 /1 pour les gels et 10/1 à 40/1 pour PolyHb<sup>22</sup>. Si on regarde des systèmes analogues comme un conjugué albumine de sérum bovine-hémoglobine<sup>46</sup> réticulé par le glutaraldéhyde, l'étude montre un gain d'affinité et une baisse de la coopérativité. Ces modifications sont analogues avec les PolyHb. Tout cela tend à montrer que les différences proviendraient donc du phénomène de gélification en lui-même et pas de l'action du glutaraldéhyde. Malheureusement, les études sur les hydrogels d'hémoglobine n'abordent pas leur activité<sup>4,47</sup>.

C'est l'occasion de voir d'autres systèmes impliquant l'hémoglobine dans des conditions proches de nos gels afin de pouvoir essayer de comprendre le phénomène de perte d'activité. Pour cela, on s'est tourné vers les études où l'hémoglobine est impliquée dans une matrice solide où elle est contrainte. On s'est ainsi intéressé à :

-l'hémoglobine immobilisée dans des billes d'alginate<sup>48,49</sup>. L'hémoglobine gélifiée ou dans un gel d'une autre matière peut sembler un bon comparatif. Pourtant, l'hémoglobine conserve ses propriétés d'oxygénation dans les gels d'alginate.

-l'hémoglobine immobilisée dans des gels de silice<sup>50-53</sup>. Ce système peut se rapprocher des conditions de l'hémoglobine gélifiée avec l'hémoglobine immobilisée dans un état solide. Pourtant, l'hémoglobine conserve sa réactivité même si elle perd sa coopérativité. Le gel de silice fixe la structure quaternaire, faisant que l'affinité de la forme a été fixée. L'affinité augmente donc pour la forme oxygénée, plus affine, et diminue pour la forme désoxygénée moins affine.

Les formes proches d'un gel ou la réticulation impliquant l'hémoglobine ne nous ont donc pas permis de fournir une explication claire sur la perte d'activité. Pour essayer de comprendre le phénomène, il faut alors chercher des informations dans des systèmes proches. Nous avons donc tenté de trouver de la littérature sur l'activité de systèmes d'enzymes obtenus par réticulation chimique (glutaraldéhyde ou autre). Les enzymes sont des protéines proches de l'hémoglobine car ce sont une classe de protéines avec site de fixation. Les études ne se centrent pas sur la fixation, car souvent impossible à repérer, mais sur leur activité catalytique. Les principaux points à retenir sont :

-l'activité des enzymes immobilisées ne semble suivre aucune règle. L'immobilisation peut augmenter l'affinité comme la diminuer. Ainsi, les activités catalytiques de diverses enzymes varient largement suivant l'enzyme et semblent varier d'un très grand nombre de paramètres<sup>54-57</sup>.

-Chui et Wang<sup>58</sup> ont montré que l'activité enzymatique de la trypsine était inversement proportionnel à la concentration de glutaraldéhyde. Leur explication serait que la réticulation causerait une distorsion de la conformation du site actif de l'enzyme.

-dans certains cas, l'activité enzymatique disparaît. C'est le cas notamment pour l'aspartate aminotransférase qui perd son activité enzymatique, mais qui conserve tout de même sa capacité de former un complexe avec son anticorps<sup>59</sup>.

Ces études indiquent donc que ce n'est pas l'immobilisation qui empêche la fixation d'un ligand sur une protéine et nous renseigne sur quelques éléments régissant la fixation/libération du ligand. Toutes les formes obtenues par réticulation chimique conservent leur activité de fixation, même si l'activité peut être perdue pour les enzymes. Il faut donc se pencher sur les phénomènes qui régissent la fixation/libération d'un ligand.

D'après Eaton et collaborateurs<sup>60</sup>, il y a deux phénomènes concomitants qui régissent la fixation/libération d'un ligand (O<sub>2</sub> ou CO) par l'hémoglobine. D'un côté, il y a l'arrivée du ligand à côté du fer ainsi que son départ. De l'autre, le ligand se trouvant dans la poche de l'hème, c'est la fixation/libération du ligand sur le fer de l'hème. La gélification ne peut pas jouer sur le deuxième point, l'hème et son fer étant intact d'après nos analyses sur l'hème effectuées dans ce chapitre. Toutefois, la gélification forme un réseau très dense comme on l'a vu, et pourrait peut-être limiter la migration du ligand dans le gel. Si le dioxygène ne peut plus migrer dans le gel pour venir à l'hème ou en partir, l'hémoglobine est condamnée à rester dans son état (oxygéné ou désoxygéné). Cette théorie sera abordée à nouveau dans le chapitre 4.

Il faudrait obtenir des informations précises sur la structure de l'hémoglobine dans le gel quant à sa densité pour comprendre si le réseau empêche la possibilité du ligand à se mouvoir. Il faudrait donc préparer des expériences de RMN du solide.

Une autre explication pourrait venir du fait que la protéine est distordue. En effet, on avait déduit une distorsion de la structure tertiaire de la protéine avec la diffusion de rayons X aux grands angles. En outre, l'étude en diffusion de rayonnements aux petits angles avait démontré que si la forme de la protéine était conservée, le rayon de la protéine déduit du modèle des sphères en contact était plus grand que celui mesuré par la loi de Guignier, prouvant une fois de plus que la protéine était distordue. Si ces distorsions ne modifient pas la structure quaternaire, on peut penser tout de même qu'elles peuvent empêcher la protéine de fonctionner normalement.

Le paramètre que nous n'avons pas pris en compte jusqu'à maintenant est la dynamique de la protéine qui joue un très grand rôle dans l'activité de l'hémoglobine<sup>61</sup>. En plus du précédent paragraphe, la gélification peut causer d'autres phénomènes ayant affectés la dynamique de la protéine. Le prochain chapitre explorera certaines approches afin de comprendre la dynamique du gel.

## Bibliographie

- (1) Ma, X.; Sun, X.; Hargrove, D.; Chen, J.; Song, D.; Dong, Q.; Lu, X.; Fan, T.-H.; Fu, Y.; Lei, Y. A Biocompatible and Biodegradable Protein Hydrogel with Green and Red Autofluorescence: Preparation, Characterization and In Vivo Biodegradation Tracking and Modeling. *Sci. Rep.* **2016**, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep19370>.
- (2) Kaieda, S.; S. Plivelic, T.; Halle, B. Structure and Kinetics of Chemically Cross-Linked Protein Gels from Small-Angle X-Ray Scattering. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (9), 4002–4011. <https://doi.org/10.1039/C3CP54219J>.
- (3) Derksen, J. J. Simulations of Thixotropic Liquids. *Appl. Math. Model.* **2011**, *35* (4), 1656–1665. <https://doi.org/10.1016/j.apm.2010.09.042>.

- (4) Lee, C.; Lim, K.; Kim, S. S.; Thien, L. X.; Lee, E. S.; Oh, K. T.; Choi, H.-G.; Youn, Y. S. Near Infrared Light-Responsive Heat-Emitting Hemoglobin Hydrogels for Photothermal Cancer Therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *176*, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.070>.
- (5) Costa, D.; Tougeri, A.; Tielens, F.; Gervais, C.; Stievano, L.; Lambert, J. F. DFT Study of the Adsorption of Microsolvated Glycine on a Hydrophilic Amorphous Silica Surface. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10* (42), 6360–6368. <https://doi.org/10.1039/B806501B>.
- (6) Adibnia, V.; Hill, R. J. Viscoelasticity of Near-Critical Silica-Polyacrylamide Hydrogel Nanocomposites. *Polymer* **2017**, *112*, 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.01.013>.
- (7) Calvet, D.; Wong, J. Y.; Giasson, S. Rheological Monitoring of Polyacrylamide Gelation: Importance of Cross-Link Density and Temperature. *Macromolecules* **2004**, *37* (20), 7762–7771. <https://doi.org/10.1021/ma049072r>.
- (8) Ross-Murphy, P. S. B. Gelation Kinetics—Problems and Prospects. *J. Macromol. Sci. Part B* **2005**, *44* (6), 1007–1019. <https://doi.org/10.1080/00222340500323573>.
- (9) Du, C.; Hill, R. J. Linear Viscoelasticity of Weakly Cross-Linked Hydrogels. *J. Rheol.* **2018**, *63* (1), 109–124. <https://doi.org/10.1122/1.5052160>.
- (10) Jiang, H.; Su, W.; Mather, P. T.; Bunning, T. J. Rheology of Highly Swollen Chitosan/Polyacrylate Hydrogels. *Polymer* **1999**, *40* (16), 4593–4602. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00070-1](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00070-1).
- (11) Moura, M. J.; Figueiredo, M. M.; Gil, M. H. Rheological Study of Genipin Cross-Linked Chitosan Hydrogels. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (12), 3823–3829. <https://doi.org/10.1021/bm700762w>.
- (12) Okay, O.; Oppermann, W. Polyacrylamide–Clay Nanocomposite Hydrogels: Rheological and Light Scattering Characterization. *Macromolecules* **2007**, *40* (9), 3378–3387. <https://doi.org/10.1021/ma062929v>.
- (13) Trompette, J. L.; Fabrègue, E.; Cassanas, G. Influence of the Monomer Properties on the Rheological Behavior of Chemically Crosslinked Hydrogels. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **1997**, *35* (15), 2535–2541. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0488\(19971115\)35:15<2535::AID-POLB15>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0488(19971115)35:15<2535::AID-POLB15>3.0.CO;2-6).
- (14) Clark, A. H.; Ross-Murphy, S. B. The Concentration Dependence of Biopolymer Gel Modulus. *Br. Polym. J.* **1985**, *17* (2), 164–168. <https://doi.org/10.1002/pi.4980170214>.
- (15) Kjønksen, A.-L.; Nyström, B. Effects of Polymer Concentration and Cross-Linking Density on Rheology of Chemically Cross-Linked Poly(Vinyl Alcohol) near the Gelation Threshold. *Macromolecules* **1996**, *29* (15), 5215–5222. <https://doi.org/10.1021/ma960094q>.
- (16) Ofei, T. N.; Lund, B.; Saasen, A.; Sangesland, S.; Richard, K.; Linga, H. A New Approach to Dynamic Barite Sag Analysis on Typical Field Oil-Based Drilling Fluid. *Annu. Trans. Nord. Rheol. Soc.* **2019**, *27*, 10.
- (17) Levin, M.; Sonn-Segev, A.; Roichman, Y. Structural Changes in Nanoparticle-Hydrogel Composites at Very Low Filler Concentrations. *J. Chem. Phys.* **2019**, *150* (6), 064908. <https://doi.org/10.1063/1.5053171>.
- (18) Winter, H. H. The Critical Gel. In *Structure and Dynamics of Polymer and Colloidal Systems*; Borsali, R., Pecora, R., Eds.; NATO Science Series; Springer Netherlands: Dordrecht, 2002; pp 439–470. [https://doi.org/10.1007/978-94-010-0442-8\\_14](https://doi.org/10.1007/978-94-010-0442-8_14).
- (19) Hu, X.; Liang, R.; Li, J.; Liu, Z.; Sun, G. Mechanically Strong Hydrogels Achieved by Designing Homogeneous Network Structure. *Mater. Des.* **2019**, *163*, 107547. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.107547>.
- (20) Liu, Y.; Dai, C.; Wang, K.; Zou, C.; Gao, M.; Fang, Y.; Zhao, M.; Wu, Y.; You, Q. Study on a Novel Cross-Linked Polymer Gel Strengthened with Silica Nanoparticles. *Energy Fuels* **2017**, *31* (9), 9152–9161. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b01432>.

- (21) Kleshchanok, D.; Meester, V.; Pompe, C. E.; Hilhorst, J.; Lekkerkerker, H. N. W. Effects of Added Silica Nanoparticles on Hectorite Gels. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (31), 9532–9539. <https://doi.org/10.1021/jp302472e>.
- (22) Palmer, A. F.; Sun, G.; Harris, D. R. The Quaternary Structure of Tetrameric Hemoglobin Regulates the Oxygen Affinity of Polymerized Hemoglobin. *Biotechnol. Prog.* **2009**, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/btpr.265>.
- (23) Perutz, M. F. Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin: Haem–Haem Interaction and the Problem of Allostery. *Nature* **1970**, *228* (5273), 726–734. <https://doi.org/10.1038/228726a0>.
- (24) Zhang, N.; Jia, Y.; Chen, G.; Cabrales, P.; Palmer, A. F. Biophysical Properties and Oxygenation Potential of High-Molecular-Weight Glutaraldehyde-Polymerized Human Hemoglobins Maintained in the Tense and Relaxed Quaternary States. *Tissue Eng. Part A* **2011**, *17* (7–8), 927–940. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0353>.
- (25) Gu, X.; Bolden-Rush, C.; Cuddington, C. T.; Belcher, D. A.; Savla, C.; Pires, I. S.; Palmer, A. F. Comprehensive Characterization of Tense and Relaxed Quaternary State Glutaraldehyde Polymerized Bovine Hemoglobin as a Function of Cross-Link Density. *Biotechnol. Bioeng.* **2020**, *117* (8), 2362–2376. <https://doi.org/10.1002/bit.27382>.
- (26) Kelly, S.; Price, N. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2000**, *1* (4), 349–384. <https://doi.org/10.2174/1389203003381315>.
- (27) Hider, R. C.; Kupryszewski, G.; Rekowski, P.; Lammek, B. Origin of the Positive 225–230 Nm Circular Dichroism Band in Proteins: Its Application to Conformational Analysis. *Biophys. Chem.* **1988**, *31* (1), 45–51. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(88\)80007-3](https://doi.org/10.1016/0301-4622(88)80007-3).
- (28) Pawitan, J. A. Analysis of the Circular Dichroism Spectra Pattern of the Disulfide Bonds in RNase T1 and Its Mutants. *Med. J. Indones.* **1993**, *2* (1), 8–14. <https://doi.org/10.13181/mji.v2i1.3589>.
- (29) Kamiyama, T.; Miura, T.; Takeuchi, H. His–Trp Cation– $\pi$  Interaction and Its Structural Role in an  $\alpha$ -Helical Dimer of HIV-1 Vpr Protein. *Biophys. Chem.* **2013**, *173–174*, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2013.01.004>.
- (30) Yorita, H.; Otomo, K.; Hiramatsu, H.; Toyama, A.; Miura, T.; Takeuchi, H. Evidence for the Cation– $\pi$  Interaction between Cu<sup>2+</sup> and Tryptophan. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (46), 15266–15267. <https://doi.org/10.1021/ja807010f>.
- (31) Peter, B.; Polyansky, A. A.; Fanucchi, S.; Dirr, H. W. A Lys–Trp Cation– $\pi$  Interaction Mediates the Dimerization and Function of the Chloride Intracellular Channel Protein 1 Transmembrane Domain. *Biochemistry* **2014**, *53* (1), 57–67. <https://doi.org/10.1021/bi401433f>.
- (32) Hirai, M.; Iwase, H.; Hayakawa, T.; Miura, K.; Inoue, K. Structural Hierarchy of Several Proteins Observed by Wide-Angle Solution Scattering. *J. Synchrotron Radiat.* **2002**, *9* (4), 202–205. <https://doi.org/10.1107/S0909049502006593>.
- (33) Makowski, L.; Bardhan, J.; Gore, D.; Lal, J.; Mandava, S.; Park, S.; Rodi, D. J.; Ho, N. T.; Ho, C.; Fischetti, R. F. WAXS Studies of the Structural Diversity of Hemoglobin in Solution. *J. Mol. Biol.* **2011**, *408* (5), 909–921. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.062>.
- (34) Marichal, L.; Giraudon-Colas, G.; Cousin, F.; Thill, A.; Labarre, J.; Boulard, Y.; Aude, J.-C.; Pin, S.; Renault, J. P. Protein-Nanoparticle Interactions: What Are the Protein-Corona Thickness and Organization? *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2019**, *35* (33), 10831–10837. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01373>.
- (35) Schneider, R.; Mayer, A.; Schmatz, W.; Kaiser, B.; Scherm, R. Neutron Small-Angle Scattering from Aqueous Solutions of Oxy- and Deoxyhaemoglobin. *J. Mol. Biol.* **1969**, *41* (2), 231–235. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(69\)90388-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(69)90388-X).
- (36) Anitas, E. M.; Slyamov, A. Structural Characterization of Chaos Game Fractals Using Small-Angle Scattering Analysis. *PLOS ONE* **2017**, *12* (7), e0181385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181385>.

- (37) Cousin, F.; Gummel, J.; Ung, D.; Boué, F. Polyelectrolyte–Protein Complexes: Structure and Conformation of Each Specie Revealed by SANS. *Langmuir* **2005**, *21* (21), 9675–9688. <https://doi.org/10.1021/la0510174>.
- (38) Stauffer, D.; Coniglio, A.; Adam, M. Gelation and Critical Phenomena. In *Polymer Networks*; Dušek, K., Ed.; Advances in Polymer Science; Springer: Berlin, Heidelberg, 1982; pp 103–158. [https://doi.org/10.1007/3-540-11471-8\\_4](https://doi.org/10.1007/3-540-11471-8_4).
- (39) Sornkamnerd, S.; Okajima, M. K.; Kaneko, T. Tough and Porous Hydrogels Prepared by Simple Lyophilization of LC Gels. *ACS Omega* **2017**, *2* (8), 5304–5314.
- (40) Grenier, J.; Duval, H.; BAROU, F.; Lv, P.; David, B.; Letourneur, D. Mechanisms of Pore Formation in Hydrogel Scaffolds Textured by Freeze-Drying. *Acta Biomater.* **2019**, *94*, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.070>.
- (41) Guillochon, D.; Esclade, L.; Remy, M. H.; Thomas, D. Studies on Haemoglobin Immobilized by Cross-Linking with Glutaraldehyde Cross-Linked Soluble Polymers and Artificial Membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct.* **1981**, *670* (3), 332–340. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(81\)90105-7](https://doi.org/10.1016/0005-2795(81)90105-7).
- (42) Buehler, P. W.; Zhou, Y.; Cabrales, P.; Jia, Y.; Sun, G.; Harris, D. R.; Tsai, A. G.; Intaglietta, M.; Palmer, A. F. Synthesis, Biophysical Properties and Pharmacokinetics of Ultrahigh Molecular Weight Tense and Relaxed State Polymerized Bovine Hemoglobins. *Biomaterials* **2010**, *31* (13), 3723–3735. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.072>.
- (43) Cabrales, P.; Sun, G.; Zhou, Y.; Harris, D. R.; Tsai, A. G.; Intaglietta, M.; Palmer, A. F. Effects of the Molecular Mass of Tense-State Polymerized Bovine Hemoglobin on Blood Pressure and Vasoconstriction. *J. Appl. Physiol.* **2009**, *107* (5), 1548–1558. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00622.2009>.
- (44) Buehler, P. W.; Boykins, R. A.; Jia, Y.; Norris, S.; Freedberg, D. I.; Alayash, A. I. Structural and Functional Characterization of Glutaraldehyde-Polymerized Bovine Hemoglobin and Its Isolated Fractions. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (11), 3466–3478. <https://doi.org/10.1021/ac050064y>.
- (45) Eike, J. H.; Palmer, A. F. Effect of Cl<sup>-</sup> and H<sup>+</sup> on the Oxygen Binding Properties of Glutaraldehyde-Polymerized Bovine Hemoglobin-Based Blood Substitutes. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20* (5), 1543–1549. <https://doi.org/10.1021/bp049872l>.
- (46) Hu, T.; Su, Z. A Solid Phase Adsorption Method for Preparation of Bovine Serum Albumin–Bovine Hemoglobin Conjugate. *J. Biotechnol.* **2003**, *100* (3), 267–275. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00246-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00246-8).
- (47) Huang, C.; Bai, H.; Li, C.; Shi, G. A Graphene Oxide/Hemoglobin Composite Hydrogel for Enzymatic Catalysis in Organic Solvents. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (17), 4962. <https://doi.org/10.1039/c1cc10412h>.
- (48) DESSY, A.; PIRAS, A.-M.; CHIELLINI, F. Hemoglobin Loaded Alginate Particles. *J. Biomim. Biomater. Tissue Eng.* **2013**, *18* (1), 1–5.
- (49) Rozanova, S.; Timchenko, N.; Rozanova, E.; Nardid, O. Freezing of Hemoglobin-Loaded Sodium Alginate Microspheres. *J. Exp. Integr. Med.* **2015**, *5* (2), 81. <https://doi.org/10.5455/jeim.290415.or.129>.
- (50) Henry, E. R.; Mozzarelli, A.; Viappiani, C.; Abbruzzetti, S.; Bettati, S.; Ronda, L.; Bruno, S.; Eaton, W. A. Experiments on Hemoglobin in Single Crystals and Silica Gels Distinguish among Allosteric Models. *Biophys. J.* **2015**, *109* (6), 1264–1272. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.037>.
- (51) Viappiani, C.; Bettati, S.; Bruno, S.; Ronda, L.; Abbruzzetti, S.; Mozzarelli, A.; Eaton, W. A. New Insights into Allosteric Mechanisms from Trapping Unstable Protein Conformations in Silica Gels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101* (40), 14414–14419. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405987101>.
- (52) Jones, E. M.; Balakrishnan, G.; Spiro, T. G. Heme Reactivity Is Uncoupled from Quaternary Structure in Gel-Encapsulated Hemoglobin: A Resonance Raman Spectroscopic Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (7), 3461–3471. <https://doi.org/10.1021/ja210126j>.

- (53) Shibayama, N.; Saigo, S. Fixation of the Quaternary Structures of Human Adult Haemoglobin by Encapsulation in Transparent Porous Silica Gels. *J. Mol. Biol.* **1995**, *251* (2), 203–209. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0427>.
- (54) Ottesen, M.; Svensson, B. Modification of Papain by Treatment with Glutaraldehyde under Reducing and Non-Reducing Conditions. *Comptes-Rendus Trav. Lab. Carlsberg* **1971**, *38* (11), 171.
- (55) Tomimatsu, Y.; Jansen, E. F.; Gaffield, W.; Olson, A. C. Physical Chemical Observations on the  $\alpha$ -Chymotrypsin Glutaraldehyde System during Formation of an Insoluble Derivative. *J. Colloid Interface Sci.* **1971**, *36* (1), 51–64. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(71\)90239-6](https://doi.org/10.1016/0021-9797(71)90239-6).
- (56) Habeeb, A. Preparation of Enzymically Active, Water-Insoluble Derivatives of Trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, *119*, 264–268.
- (57) Herzog, V.; Fahimi, H. D. The Effect of Glutaraldehyde on Catalase: Biochemical and Cytochemical Studies with Beef Liver Catalase and Rat Liver Peroxisomes. *J. Cell Biol.* **1974**, *60* (1), 303.
- (58) Chui, W. K.; Wan, L. S. C. Prolonged Retention of Cross-Linked Trypsin in Calcium Alginate Microspheres. *J. Microencapsul.* **1997**, *14* (1), 51–61. <https://doi.org/10.3109/02652049709056467>.
- (59) Patramani, I.; Katsiri, K.; Pistevou, E.; Kalogerakos, T.; Pavlatos, M.; Evangelopoulos, A. E. Glutamic-Aspartic Transaminase — Antitransaminase Interaction: *Eur. J. Biochem.* **1969**, *11* (1), 28–36. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00734.x>.
- (60) Eaton, W. A.; Henry, E. R.; Hofrichter, J.; Mozzarelli, A. Is Cooperative Oxygen Binding by Hemoglobin Really Understood? *Rendiconti Lincei* **2006**, *17* (1–2), 147–162. <https://doi.org/10.1007/BF02904506>.
- (61) Yonetani, T.; Laberge, M. Protein Dynamics Explain the Allosteric Behaviors of Hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1784* (9), 1146–1158. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.04.025>.

# Chapitre 4 :

## Approches des propriétés dynamiques et perspectives

Jusqu'à maintenant, l'étude de la protéine dans le gel s'est surtout centrée sur son activité et sa structure. Pourtant la dynamique des protéines est aussi déterminante dans les interactions protéine-protéine comme protéine-ligand<sup>1</sup> ou l'activité des protéines<sup>2,3</sup>. La dynamique de la protéine intervient à plusieurs niveaux :

-locaux, concernant les atomes et les acides aminés. En effet, les atomes de la protéine peuvent dévier de leur état d'équilibre donnant ainsi des fluctuations aléatoires de la taille ou de l'angle des liaisons. Les chaînes latérales des protéines peuvent quant à elles fluctuer dans leur configuration spatiale ;

-régionaux dans les couplages intra-domaines des résides. Cela se traduit notamment par les interactions entre résidus dans les hélices  $\alpha^4$  et feuillets  $\beta^5$ . Cela est notamment illustré dans le mécanisme qui survient lors de la fixation du dioxygène, occasionnant un changement de la forme de l'hème et du déplacement de l'hélice par la même<sup>6</sup>. Il existe d'ailleurs des corrélations même dans des protéines dénaturées<sup>7</sup>;

-globaux avec la dynamique des mouvements de domaine<sup>8</sup>. Pour comprendre ces mouvements, on peut regarder les différentes structures d'une même protéine, mais il est aussi possible d'utiliser la spectroscopie neutronique à écho de spin<sup>9</sup> ou la dynamique moléculaire<sup>10</sup>. Les mouvements de domaine sont très importants pour beaucoup de protéines comme les protéines motrices<sup>11</sup>, les enzymes<sup>12</sup>, les canaux ioniques<sup>13</sup>, la formation de complexe de protéine<sup>14</sup>, etc.

De nombreuses techniques permettent d'évaluer la dynamique de la protéine : la résonance magnétique nucléaire<sup>15</sup>, la cristallographie aux rayons X<sup>16</sup> surtout à température ambiante<sup>17</sup>, par spectroscopie térahertz<sup>18</sup> ou Raman<sup>19</sup>, par fluorescence<sup>20</sup>, par dichroïsme circulaire<sup>21</sup>, par diffusion élastique et inélastique de neutrons<sup>22</sup> ou par diffusion dynamique de la lumière<sup>5</sup>.

Dire que les trois niveaux sont hermétiques est une erreur : chaque échelle peut avoir un effet sur une autre et les temps des mouvements n'est absolument pas identique suivant les échelles. Mais un consensus est que plus un mouvement est de petite taille, plus son temps caractéristique est petit. La Figure 1 explicite ainsi les temps et tailles caractéristiques de différents phénomènes impliqués dans la dynamique des protéines.

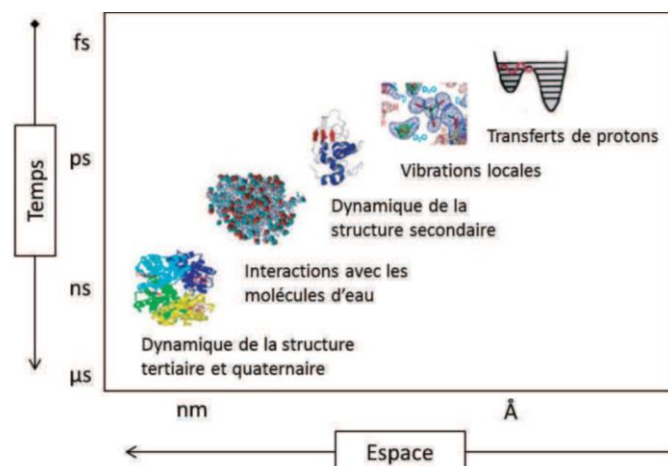


Figure 1 : Principales échelles de temps et d'espace de la dynamique des protéines. Tiré de <sup>23</sup>.



Pour l'hémoglobine, les études concernant le rôle de la dynamique dans la coopérativité et de l'affinité sont anciennes<sup>24</sup>, mais le sujet est toujours discuté<sup>25</sup>. Des études de dynamique moléculaire ont montré qu'il y avait plus de mouvements moléculaires pour la désoxyhémoglobine que pour des hémoglobines ligandées<sup>26</sup>. Les études en résonance magnétique nucléaire montrent que le phénomène est complexe avec certains résidus plus rigides dans la désoxyHb tandis que d'autres résidus sont plus flexibles quand le fer de l'hème est ligandé<sup>27-29</sup>. Au final, les états de basse affinité sont plus flexibles que les états ayant une haute affinité<sup>30</sup>. L'objectif de ce chapitre est de tenter de sonder la dynamique de la protéine dans le gel et de tenter de lier les changements potentiels à la perte d'activité de l'hémoglobine. Pour rappel, la désoxyhémoglobine une fois gélifiée ne fixe pas le dioxygène tandis que l'oxyhémoglobine gélifiée ne relargue pas le dioxygène.

Dans notre cas, la structure, la dynamique et la fixation d'un ligand sont liées. De plus, la relation structure-dynamique permet à la protéine d'adapter et de changer sa conformation en réponse à un stimulus environnemental et d'interagir avec différents ligands suivant les conditions<sup>31</sup>. La notion de flexibilité ramène à l'équilibre entre structure et dynamique<sup>32</sup>. Il a été montré que plus une protéine est thermostable, plus la flexibilité est réduite : plus la gamme de température dans laquelle la protéine est stable et fonctionnelle est haute, plus la structure est rigide afin de compenser les vibrations thermiques de plus en plus forte<sup>33</sup>.

Cette thèse n'ayant pas eu pour objectif initialement d'étudier la dynamique de la protéine dans le gel, nous n'avons pu faire qu'un nombre limité d'expériences, ce qui nous fait présenter ce chapitre comme une perspective. Nous avons toutefois réussi à faire certaines expériences permettant d'aborder les trois échelles explicitées en ce début de chapitre, le but étant d'aller de la plus grande échelle vers la plus petite :

- l'échelle globale en nous intéressant à la structure quaternaire via une expérience en température en diffusion de neutrons. Le but est de voir si la forme de la protéine est conservée à haute température afin de tester la rigidité de la protéine dans le gel.

- l'échelle régionale en nous penchant sur la structure secondaire via une des analyses en température grâce au dichroïsme circulaire dans l'UV-proche.

- l'échelle locale en abordant les vibrations grâce à la mobilité et la densité d'états vibrationnels des atomes d'hydrogène. Cela a été mesuré respectivement par diffusion incohérente élastique de neutrons et diffusion inélastique de neutrons.

Si la dernière étude a permis d'obtenir des informations directement sur la dynamique locale, les deux autres permettent d'obtenir des informations indirectement via la mesure de la thermostabilité des deux échelles. En effet, comme indiqué un peu plus haut, plus une protéine est stable à haute température, plus elle est rigide. On va pouvoir juger la flexibilité de la structure quaternaire et secondaire dans le gel grâce à cela.

## I- Effet de la température sur la structure quaternaire

Afin d'étudier les effets de la gélification sur la rigidité, un gel a donc été étudié à différentes températures. Nous avons décidé d'étudier un gel à 2,5 mM d'oxyhémoglobine réticulée par 0,3% de glutaraldéhyde car il s'agit du gel le plus facile à préparer (car le plus long à gélifier) ce qui nous aurait permis de le comparer à d'autres techniques où la préparation d'un gel serait plus compliquée (capillaire, très petit volume, etc.). La Figure 2 montre ainsi les spectres DNPA pour différentes températures.

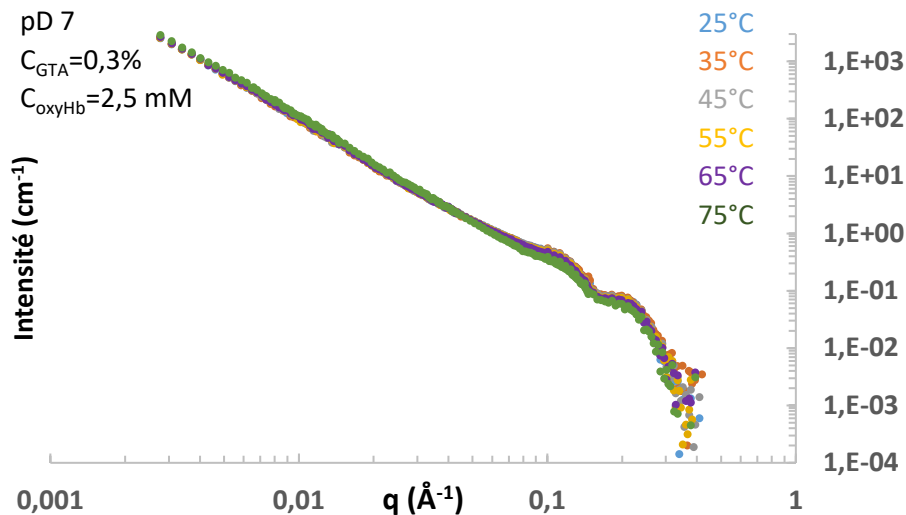


Figure 2 : Spectres DNPA d'un gel d'oxyhémoglobine à 2,5 mM réticulée par 0,3% de glutaraldéhyde : bleu 25°C, orange 35°C, gris 45°C, jaune 55°C, violet 65°C, vert : 75°C. pD 7, tampon phosphate 100 mM.

On voit que quelle que soit la température, la forme du spectre reste la même, gardant sa loi de structure aux petits angles et conservant ses deux bandes classiques de la forme de l'oxyhémoglobine aux grands angles. On peut tout de même voir qu'il y a une diminution de l'intensité de ces bandes avec la température (Figure 3).

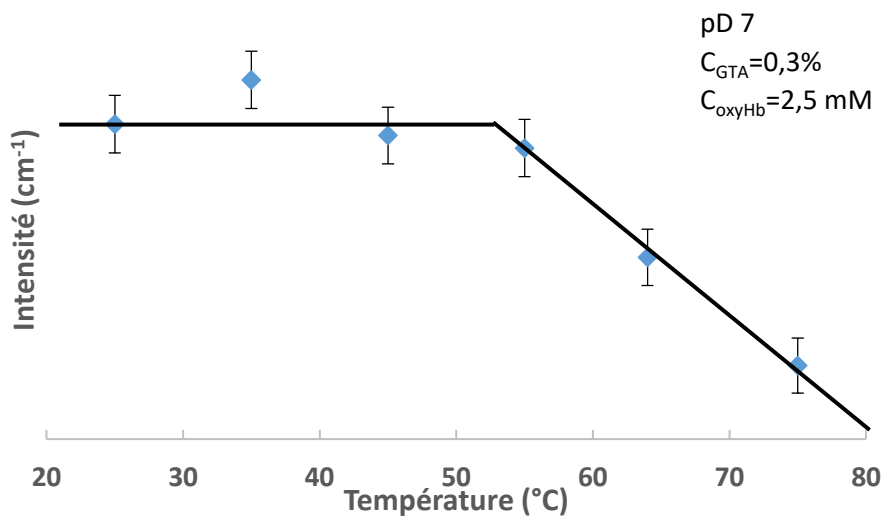


Figure 3 : Intensité de spectres DNPA à 0,206 Å<sup>-1</sup> en fonction de la température d'un gel d'oxyhémoglobine à 2,5 mM réticulée avec 0,3% de glutaraldéhyde. pD 7, tampon phosphate 100 mM.

On voit que l'intensité reste stable jusqu'à 50°C avant de partir sur une diminution linéaire. Il y a une perte partielle de la forme de la protéine dans le gel à partir de 55°C permettant de voir ainsi son domaine de stabilité.

Par la suite, après avoir chauffé le gel à 85°C, nous avons laissé le gel redescendre normalement à température ambiante et nous avons fait une mesure à 25°C afin de voir si la perte de cette forme est irréversible. La Figure 4 présente les spectres de diffusion avant et après chauffage.

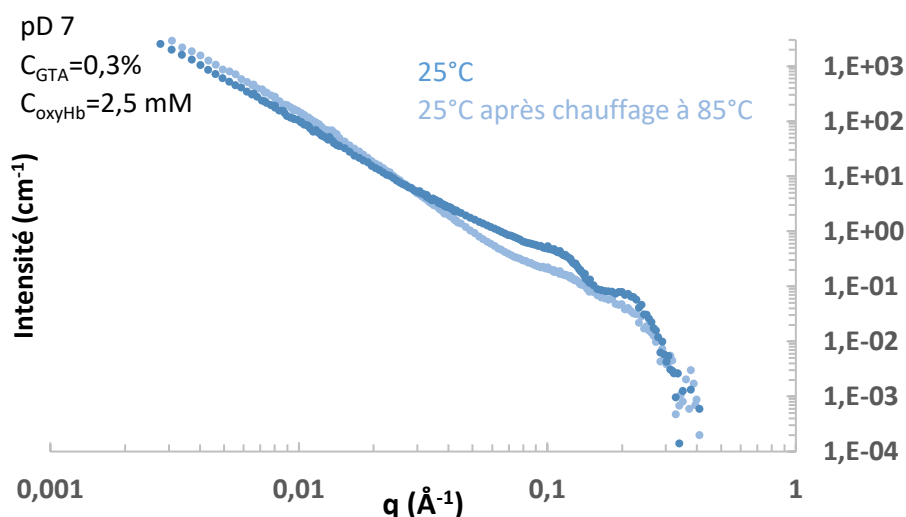


Figure 4 : Spectres DNPA d'un gel d'oxyhémoglobine à 2,5 mM réticulée avec 0,3% de glutaraldéhyde à :  
 Bleu : 25°C.  
 Bleu clair : 25°C après chauffage à 85°C.  
 pD 7, tampon phosphate 100 mM.

Après chauffage à 85°C, il y a une perte de la forme de la protéine vu la presque totale disparition des bandes aux grands angles. On remarque par contre que la remontée aux petits angles est toujours la même, avec une loi en  $q^{-2.5}$ . On a donc une perte très forte de la forme de l'oxyhémoglobine, mais la structure du gel reste la même. On peut penser que le réseau est assez souple pour conserver sa structure.

Il aurait été intéressant de comparer avec l'oxyhémoglobine seule étudiée en température par DNPA afin de voir si elle aussi conserve sa forme sur la même gamme de température. Il n'a pas été possible de le faire sur place par manque de temps de faisceau. De plus, les articles de la littérature abordent la dénaturation thermique, mais ne se centrent pas la structure quaternaire de l'hémoglobine, ce qui rend difficile toute comparaison.

Afin d'en apprendre plus, on va maintenant étudier la structure secondaire dans un gel d'oxyhémoglobine réticulée par le glutaraldéhyde.

## II- Effet de la température sur la structure secondaire

Dans cette partie, nous avons étudié la stabilité thermique de l'oxyhémoglobine dans un gel où elle est réticulée par le glutaraldéhyde. En effet, avec la température, la protéine se déplie peu à peu, perdant sa structure secondaire<sup>34</sup>. A haute température, d'autres phénomènes comme l'agrégation peuvent survenir, empêchant alors le repliement, donnant un dépliement irréversible<sup>35</sup>.

Avec le dichroïsme circulaire dans l'ultra-violet, il est aisé de mesurer la déstructuration de la protéine puisque cette technique permet de mesurer la structure secondaire et que les différentes bandes sont caractéristiques d'un type de structure. Ainsi, en mesurant le spectre en dichroïsme circulaire en montant peu à peu en température, on voit la perte de la structure secondaire et on peut alors quantifier la stabilité thermique. De plus, il a été constaté au chapitre 2 l'existence d'un signal à 230 nm mal connu. Si ce signal est sensible à la température, cela signifie qu'il correspond bien à une nouvelle structure secondaire dans le gel qui a donc aussi sa propre flexibilité.

Pour ajuster les résultats expérimentaux, on considère une transition entre un état N natif de la protéine et un état D où la protéine est dépliée.



A toute température, on mesure pour une longueur d'onde une valeur de signal Y qui est donc la somme des contributions venant de la partie native et de la partie dépliée de la protéine. Cela peut se décomposer tel qu'exposé dans l'équation 1 :

$$Y(\lambda, T) = X_N(T) \cdot Y_N(\lambda) + X_D(T) \cdot Y_D(\lambda) \quad (\text{éq.1})$$

Avec  $Y(\lambda, T)$ , le dichroïsme circulaire de l'échantillon à une température et longueur d'onde donnée ;  
 $-Y_N(\lambda)$ , le dichroïsme circulaire de la protéine totalement dans un état natif à une longueur d'onde donnée ;

$-Y_D(\lambda)$ , le dichroïsme circulaire de la protéine totalement dépliée (ou dénaturée) à une longueur d'onde donnée ;

$-X_N(T)$ , la proportion relative de protéine native ;

$-X_D(T)$ , la proportion relative de protéine dépliée (ou dénaturée).

On a donc :  $X_N(T) + X_D(T) = 1$ .

Souvent,  $Y_D(T) = 0$  vu que la protéine est totalement dépliée à haute température.

Il est donc aisé de mesurer  $X_N(T)$  ou  $X_D(T)$ . Il est alors possible de relier cette proportion relative à des facteurs thermodynamiques par l'équation 2 :

$$X_N(T) = \frac{1}{1 + e^{-\frac{\Delta H}{RT}(1 - \frac{T}{T_m})}} \quad (\text{éq.2})$$

avec  $\Delta H$ , l'enthalpie de transition en J/mol et  $T_m$ , la température de transition en K.

Ces processus ont été développés dans des études antérieures<sup>36,37</sup>. Il s'agit donc d'une courbe en forme de sigmoïde.

Pour certaines protéines, la dénaturation thermique est en plusieurs transitions successives, donnant alors juste une somme sur i transitions du produit de cette expression par un facteur de proportion relative  $\%_i$  avec la somme des  $\%_i$  étant égale à 1. Pour notre étude, nous étudierons des phénomènes en deux transitions donnant l'équation 3 :

$$X_N(T) = \frac{\%_1}{1 + e^{-\frac{\Delta H_1}{RT}(1 - \frac{T}{T_{m1}})}} + \frac{\%_2}{1 + e^{-\frac{\Delta H_2}{RT}(1 - \frac{T}{T_{m2}})}} \quad (\text{éq.3})$$

Pour ce qui nous intéresse ici, les tests ont été faits sur différents mélanges pour étudier l'effet de la gélification à pH 7:

-une solution d'oxyHb à 2,5 mM sans GTA pour servir de témoin de référence ;

-un gel d'oxyHb à 2,5 mM réticulé avec 0,3 % de GTA afin de tester un gel sur lequel il reste encore du signal des hélices ;

-un gel d'oxyHb à 2,5 mM réticulé avec 3 % de GTA afin de tester un gel plus concentré en GTA, sur lequel il ne reste presque plus de signal de structures secondaires et voir si le signal à 230 nm est sensible à la température ;

-un gel d'oxyHb à 5 mM réticulé avec 3 % de GTA afin de voir l'effet de la concentration d'oxyHb et pour voir si le comportement vers 230 nm est similaire au précédent.

Comme précédemment, les expériences ont été effectuées sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL avec l'aide du Docteur Franck Wien. Les spectres ont été mesurés entre 22 et 97°C avec un pas de 3°C dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7. La Figure 5 donne l'évolution des spectres suivant la température.

En plus de la perte de signal habituelle caractéristique des hélices avec la température<sup>38</sup>, on constate avec les figure C et D que le signal vers 230-240 nm est sensible à la température. Ce signal correspond donc à une structure secondaire particulière, ce qui va dans le sens de ce qui a été constaté avec la diffusion de rayons X aux grands angles au chapitre 3. Les hélices subissent donc une déformation, ce qui devait sans doute correspondre à la disparition du signal classique et à l'apparition de ce nouveau signal.

Afin de pouvoir quantifier ces changements, il a été procédé à la mesure des courbes de dénaturation sur les différents extrema des spectres. Pour C, il a été impossible de faire le suivi sur le signal à 194 nm vu le faible intervalle entre le signal maximum et minimum. Pour D, il a été mesuré sur une moyenne autour du minimum vers 240 nm vu que le signal est très bruité. La Figure 6 donne donc les courbes de stabilité thermique avec un modèle théorique comptabilisant deux transitions (Tableau 1).

Pour A, on a pour les trois extrema des courbes très similaires. Pour B, la mesure à 196 nm est différente des deux autres. Pour C et surtout D, le mouvement en deux transitions est bien visible. A partir de ces courbes, il a été mesuré les proportions et les facteurs thermodynamiques des transitions thermiques de l'oxyhémoglobine. Le Tableau 1 donne ainsi ces valeurs pour les différentes conditions.

	oxyHb 2,5 mM sans GTA			oxyHb 2,5 mM GTA 0,3 %			oxyHb 2,5 mM GTA 3 %	oxyHb 5 mM GTA 3 %
	222 nm	209 nm	194 nm	224 nm	211 nm	196 nm	234 nm	Moyenne
% <sub>1</sub>	60 %	57 %	66 %	93 %	93 %	96 %	31 %	59 %
Tm <sub>1</sub> (°C)	72,1	71,9	72,7	82,0	81,4	73,2	60,0	60,9
ΔH <sub>1</sub> (kJ/mol)	225	229	200	97,2	93,5	83,6	277	286
% <sub>2</sub>	40 %	43 %	34 %	7 %	7 %	4 %	69 %	41 %
Tm <sub>2</sub> (°C)	45,6	45,2	41,9	36,1	32,3	28,9	45,1	33,2
ΔH <sub>2</sub> (kJ/mol)	93,4	87,5	105	155	193	442	79,5	237

Tableau 1 : Proportions et facteurs thermodynamiques des transitions thermiques de l'oxyhémoglobine pour les différentes conditions.

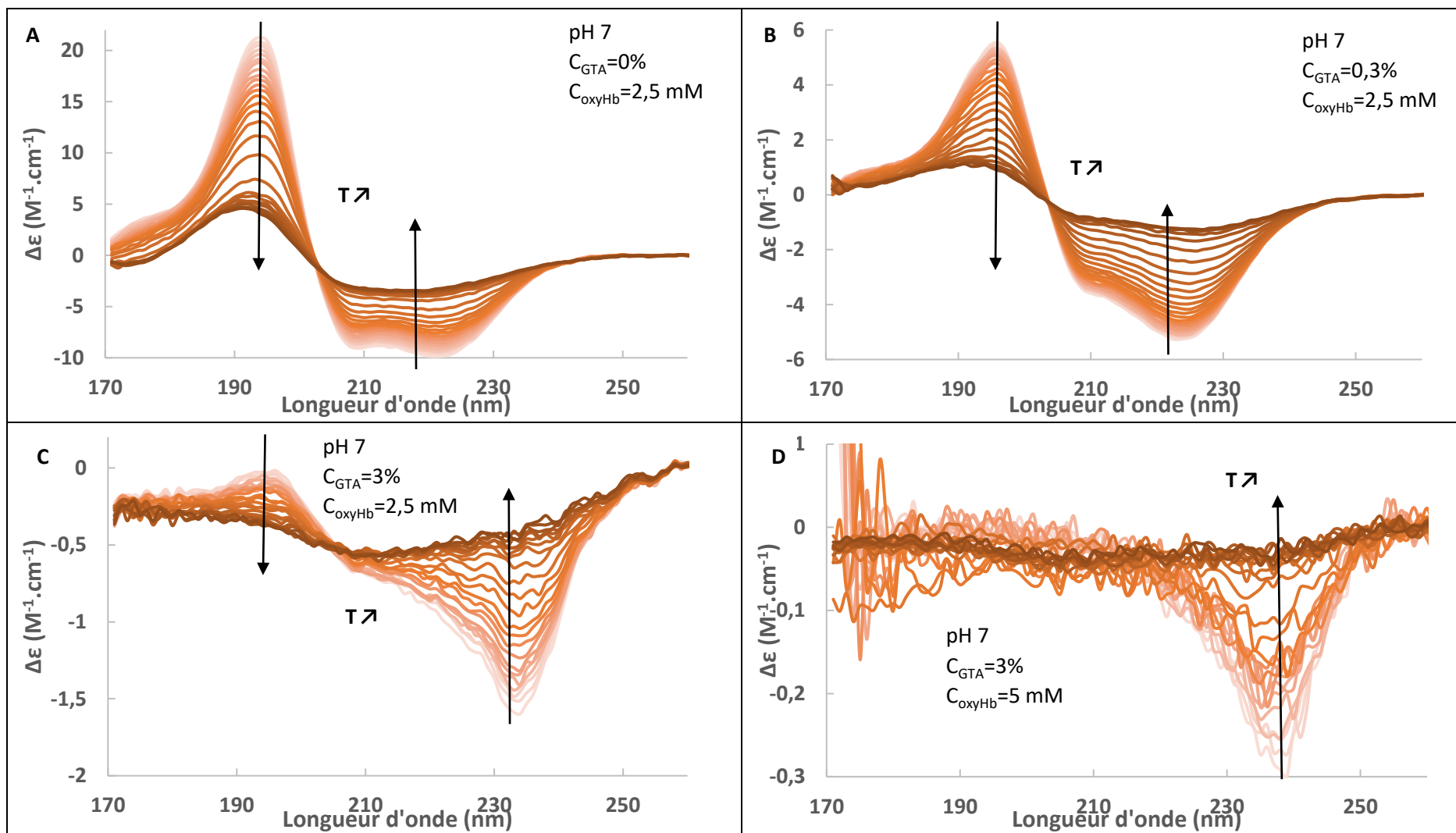


Figure 5 : Spectres en dichroïsme circulaire en température de 22°C (rouge clair) à 97 °C (rouge foncé) avec un incrément de 3°C, pH 7 tampon phosphate 100 mM, pour : A une solution d'oxyHb à 2,5 mM sans GTA, B un gel d'oxyHb à 2,5 mM réticulé avec 0,3 % de GTA, C un gel d'oxyHb à 2,5 mM réticulé avec 3 % de GTA et D un gel d'oxyHb à 5 mM réticulé avec 3 % de GTA.

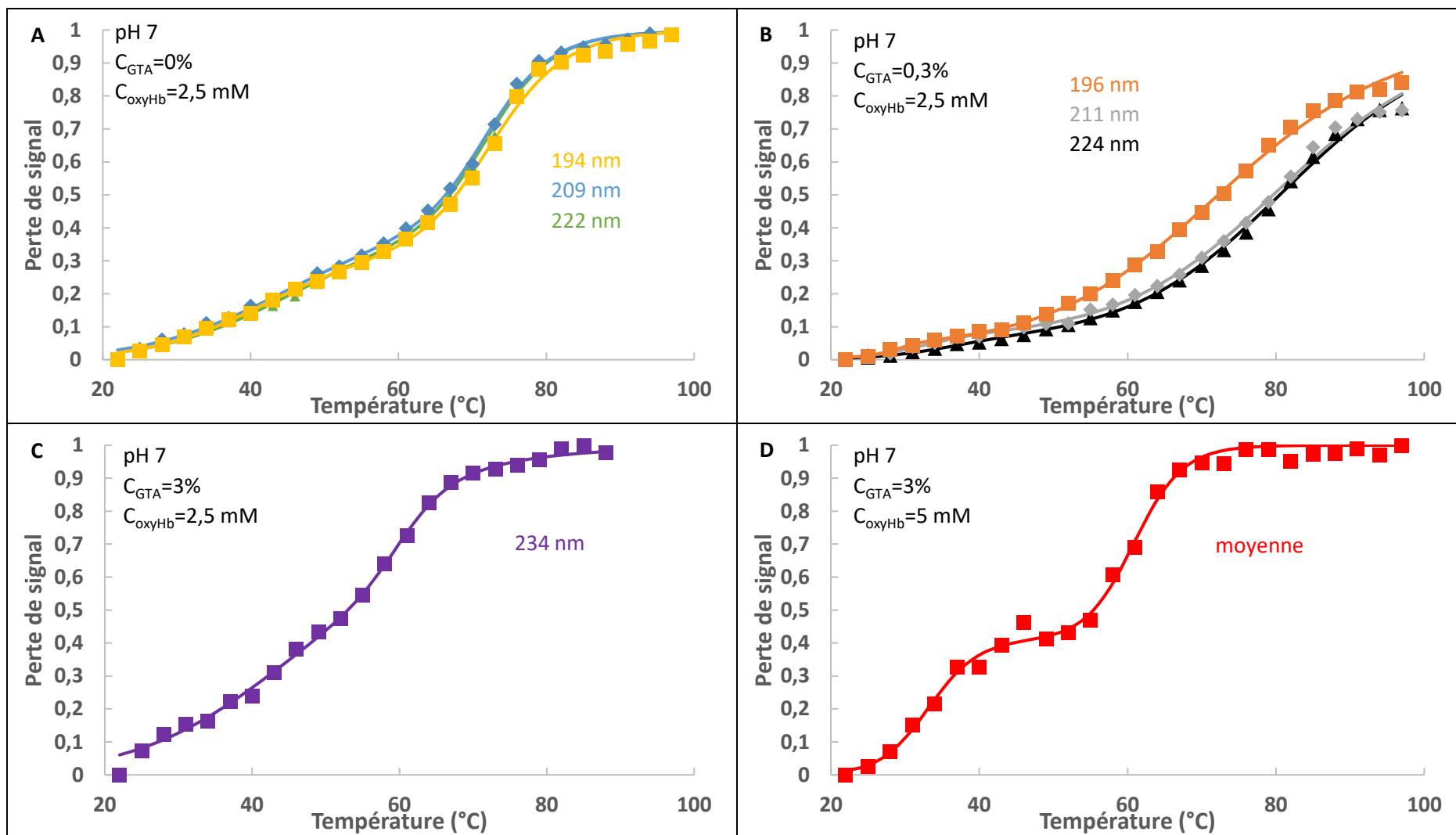


Figure 6 : Courbes de dénaturation thermique à pH 7, tampon phosphate 100 mM pour : A une solution d'oxyHb à 2,5 mM sans GTA mesuré à 194 nm en jaune, 209 nm en bleu, 222 nm en vert ; B un gel d'oxyHb à 2,5 mM réticulé avec 0,3 % de GTA mesuré à 196 nm en orange, 211 nm en gris, 224 nm en noir ; C un gel d'oxyHb à 2,5 mM réticulé avec 3 % de GTA mesuré à 234 nm en violet et D un gel d'oxyHb à 5 mM réticulé avec 3 % de GTA mesuré sur une moyenne de points autour du maximum en rouge.

Pour l'oxyhémoglobine non gélifiée, les températures sont très proches de celles mesurées auparavant (47 et 76 °C)<sup>38</sup> avec deux transitions<sup>39</sup>. Les auteurs expliquent ce processus en décrivant une première perturbation structurale entre 30 et 50°C, caractérisée en premier par un dépliement partiel des hélices les plus exposées, puis, par une agrégation thermique entre 50 et 80°C dominée par le dépliement des structures enfouies et une formation d'agrégats.

Pour les gels, le mécanisme est toujours en deux étapes. Mais il y a un comportement très différent entre les 0,3 et 3% en GTA. Pour oxyHb 2,5 mM/GTA 0,3 %, on mesure sur les signaux correspondants aux hélices et donc à leur dépliement. Le mécanisme est presque en une seule étape avec une transition correspondante à 90 % du signal avec une température de transition vers 80°C. La transition à 80°C est irréversible. Il y a donc une stabilisation de l'hélice. Pour comprendre d'où cela provient, on peut regarder l'enthalpie de transition, qui est plus faible que celle de l'oxyHb seule. Cela indique que soit l'état initial de l'hémoglobine réticulée à 0,3 % avant transition est plus mobile que l'hémoglobine non réticulée, soit l'hémoglobine réticulée après transition est plus rigide.

Pour oxyHb 2,5 mM/GTA 3 % et oxyHb 5 mM/GTA 3 %, on mesure l'évolution sur le signal inconnu et donc pas sur les hélices. Les valeurs tirées des ajustements sont difficilement à analyser. Il vaut mieux revenir à un traitement simple des résultats. Ainsi, à 40°C, l'hémoglobine seule a perdu 14% de son signal, oxyHb 2,5 mM/GTA 3 % 24% de son signal et oxyHb 5 mM/GTA 3 % 35%. Cela montre une déstabilisation pour les gels à 3% de GTA par rapport à l'hémoglobine seule, déstabilisation qui semble accentuer avec la concentration en hémoglobine. Ce signal inconnu avait été analysé comme venant des hélices distordues. Il est alors logique pour des hélices étirées qu'elles soient moins stables que la forme classique d'où l'augmentation de la perte à température constante constatée.

La flexibilité de la structure secondaire est donc affectée par la réticulation. Si à 0,3 % de GTA, le mécanisme est mal compris, pour les gels à 3%, il y a une claire déstabilisation, indiquant que l'hélice distordue n'a pas la même flexibilité que l'hélice classique. Cela montre donc que la concentration en GTA a un effet notable sur la protéine, ce qui n'avait pas été mis en évidence par les études structurales seules.

On va finir cette étude de la dynamique en nous intéressant aux vibrations locales des atomes d'hydrogène.

### III- Etude des vibrations locales

Nous avons étudié les mouvements des atomes d'hydrogène de l'hémoglobine. Les expériences ont été faites à l'institut Laue Langevin sur la ligne IN6-Sharp avec l'aide du Docteur Jean-Marc Zanotti. Nous nous sommes tout d'abord penchés sur la mobilité de l'oxyhémoglobine.

#### 1) Mobilité de l'hémoglobine

Le déplacement carré moyen  $\langle u^2 \rangle$  des atomes de d'hydrogène de l'oxyhémoglobine a été mesuré par diffusion incohérente élastique de neutrons. Les expériences ont été faites en milieu D<sub>2</sub>O,  $\langle u^2 \rangle$  a été mesuré tous les 2 K dans la gamme 4-298 K. La Figure 7 donne ainsi les résultats pour l'oxyhémoglobine libre à 7,5 mM et pour l'oxyhémoglobine gélifiée à 7,5 mM réticulée par le glutaraldéhyde à 1%. Ce gel a été choisi pour sa forte concentration en hémoglobine, permettant d'avoir plus de signal et donc d'accumuler moins longtemps. Nous ne voulions pas de concentration à 0,3% de glutaraldéhyde, la rhéologie nous ayant informé que le gel oxyHb 7,5 mM/GTA 0,3% avait un comportement différent des autres gels. Nous ne voulions pas 3% non plus pour éviter de se retrouver avec trop d'hydrogène



venant du glutaraldéhyde dans le signal mesuré. Enfin, l'absence de tampon a été choisi afin d'éviter de rajouter des atomes d'hydrogène en plus.

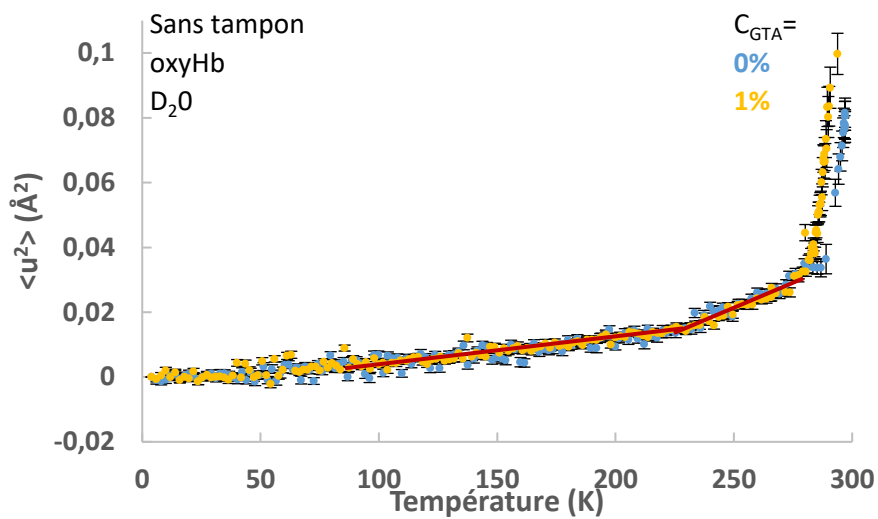


Figure 7 : Déplacement carré moyen  $\langle u^2 \rangle$  en fonction de la température de l'oxyhémoglobine à 7,5 mM seule en bleu et réticulée par 1% de glutaraldéhyde (gel) en jaune en milieu deutéré mesurée par diffusion incohérente de neutrons.

On constate que pour l'oxyhémoglobine libre, le déplacement carré moyen augmente de façon linéaire jusqu'à environ 220 K. Au-delà, on a une augmentation rapide du déplacement carré moyen. On a donc une transition démontrant une modification de la dynamique de la protéine vers 220 K. Ce phénomène, nommé transition dynamique des protéines, se retrouve pour toutes les protéines en solution<sup>40</sup>.

Pour expliquer ce phénomène, si on se réfère à l'interprétation de Doster et collaborateurs<sup>41</sup>, en dessous de 200 K, les atomes d'hydrogène de la protéine ne peuvent accéder qu'à leur position d'équilibre et vibrent autour de celle-ci de façon harmonique. Au-dessus de 200 K, les atomes d'hydrogène ont plus d'énergie et peuvent accéder à d'autres positions, l'harmonicité est alors perdue. Pour comprendre le phénomène, la Figure 8 permet de comprendre les mouvements décrits.

Ainsi, les vibrations  $\beta$  entre minima locaux sont centrées sur la position d'équilibre des atomes. Il s'agit de vibrations harmoniques, se passant seulement à des températures basses. En augmentant la température, la transition dynamique a alors lieu, permettant de nouveaux déplacements nécessitant plus d'énergie correspondant aux déplacements  $\alpha$  indiqués.

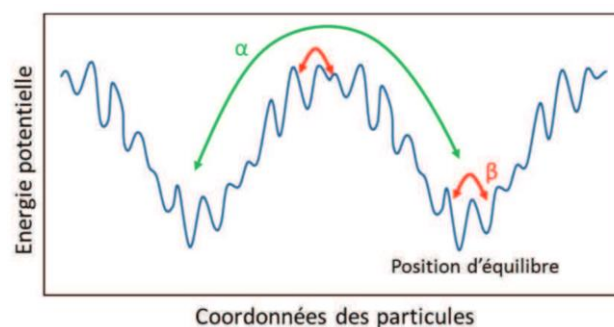


Figure 8 : Courbe d'énergie potentielle d'une protéine. Tiré de <sup>23</sup>.

Par extension, pour la protéine entière, la transition dynamique indique le passage d'un nombre limité de distributions à un grand nombre de conformations pouvant être atteintes. La flexibilité est d'ailleurs assurée par les transitions entre minima à l'échelle atomique. Cette dernière permet les mouvements collectifs à plus grande échelle concomitants à l'activité de la protéine<sup>42,43</sup>.

Au final, on retrouve un comportement de l'hémoglobine libre observé par Stadler et collaborateurs<sup>44</sup>.

Quant au gel, on observe que l'oxyhémoglobine ne perd pas sa transition dynamique, même réticulée et servant de base au réseau d'un gel. Ce résultat est assez surprenant au premier abord. Devineau et collaborateurs<sup>22</sup> avaient ainsi montré que la myoglobine, protéine très proche de l'oxyhémoglobine perdait sa transition dynamique quand elle est adsorbée sur des nanoparticules. Ici, de 0 à 280 K, aucune différence notable tant au niveau de l'amplitude ou du comportement n'est repérable pour les deux états de l'oxyhémoglobine. De plus, on observe même que l'oxyhémoglobine dans le gel a un déplacement carré moyen environ 40% supérieur à 293 K, montrant ainsi que les atomes d'hydrogène de l'hémoglobine dans le gel ont plus de mobilité que ceux dans l'hémoglobine libre, ce qui est tout de même assez contraintif.

Cela permet en tout cas de lever l'ambiguïté sur l'étude en dichroïsme circulaire du gel à 0,3% de glutaraldéhyde dans la sous-partie précédente. On peut ainsi dire que la stabilisation constatée provient de la plus grande souplesse de l'hélice de l'hémoglobine réticulée par rapport à celle de l'hémoglobine seule.

Après avoir mesuré la mobilité de l'oxyhémoglobine libre et à l'état de gel, nous avons mesuré la distribution en énergie des modes de vibration.

## 2) Densité d'états vibrationnels

On a ainsi utilisé les neutrons pour sonder les mouvements des atomes d'hydrogène de la protéine, ces derniers oscillant autour de leur position d'équilibre à une certaine fréquence.

Un mode normal de vibration caractérise un mode où tous les atomes d'une molécule vibrent à la même fréquence, passant tous simultanément par leur position d'équilibre respective, mais avec des directions ou des amplitudes différentes. La densité d'états vibrationnels donne les quantités de ces modes de vibration en fonction de la fréquence.

En plus de la diffusion inélastique de neutrons, il est également possible de sonder la densité d'états vibrationnels d'une protéine par spectroscopie infrarouge ou Raman. Toutefois, la diffusion de neutrons a comme avantage de ne pas posséder de règles de sélections. De plus, elle possède un grand pouvoir pénétrant des neutrons. Ses deux caractéristiques font qu'il est possible de sonder tous les modes de vibration pour toutes les fréquences possibles, notamment à basse fréquences (en dessous de  $300\text{ cm}^{-1}$ ). En effet, pour ces fréquences, les mouvements concernent un grand nombre d'atomes d'hydrogène et ont une amplitude conséquente. Ils auraient un rôle dans les mouvements de domaine d'après certaines études. Ils auraient aussi un rapport à l'activité de la protéine, certaines enzymes changeant de conformation lorsqu'un ligand se fixe par exemple<sup>45-47</sup>. C'est pour ces raisons qu'il est important de comprendre si la gélification provoque des différences au niveau de ces modes normaux.

La mesure de la densité d'états vibrationnels de l'oxyhémoglobine à 7,5 mM en solution et en gel réticulée par 1% de glutaraldéhyde en milieu deutéré a été faite par diffusion inélastique de neutrons à 298 K. Les résultats sont montrés dans la Figure 9. Nous avons choisi le même gel que précédemment.

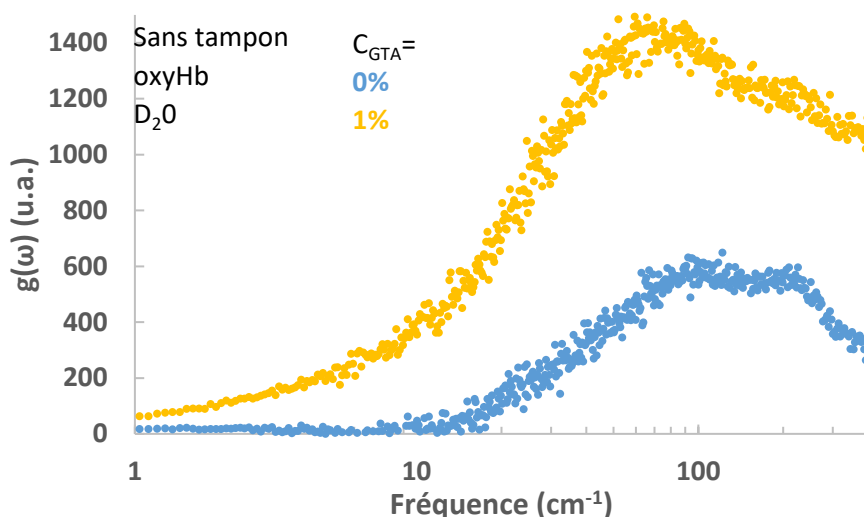


Figure 9 : Densité d'états vibrationnels  $g(\omega)$  de l'oxyhémoglobine à 7,5 mM seule en bleu et réticulée par 1% de glutaraldéhyde (gel) en jaune en milieu deutéré mesurée par diffusion inélastique de neutrons à 298 K.

Pour l'oxyhémoglobine seule, on voit une forme avec deux bandes, une ayant son maximum à  $105 \text{ cm}^{-1}$  tandis que l'autre l'a vers  $220 \text{ cm}^{-1}$ . Les études des densités d'état vibrationnels de protéines ne sont pas courantes. On peut tout de même constater que la forme de la courbe est très proche de celle de la myoglobine en solution<sup>22</sup>. Notre oxyhémoglobine en solution a donc une densité d'états vibrationnels classiques pour une protéine.

En revanche, on constate que l'oxyhémoglobine une fois gélifiée n'a plus du tout le même comportement. En effet, il n'y a qu'une seule bande vers les basses fréquences avec son maximum à  $70 \text{ cm}^{-1}$ . De plus, on voit que la densité d'état vibrationnels est beaucoup plus forte pour l'état gel, les maxima respectifs ayant ainsi un rapport 2,5. Une étude ayant portée sur la densité d'états vibrationnels dans des gels désordonnés<sup>48</sup> ont aussi montré une augmentation à basse fréquence. Ils ont montré que le couplage translation-rotation augmentaient à basse fréquence. En effet, les états de basse fréquence se peuplent de modes transverses venant du fait que les particules peuvent effectuer des rotations en plus des déplacements de translation, ce qui n'est pas possible dans l'état non gélifiée vu que les particules ne sont pas liées les unes avec les autres.

#### IV-Perspectives

La structure quaternaire comme secondaire réagit à la température. Le signal dichroïque inconnu réagit d'ailleurs à la température comme une structure secondaire classique. De plus, la protéine garde sa transition dynamique. Il semble donc que la mobilité dans le gel est conservée. Celle-ci est même accrue dans le gel comme on le constate avec l'augmentation du nombre de modes de vibration. Cela est d'ailleurs contrintuitif vu que la gélification devrait figer la protéine et la protéine dans le gel devrait donc être moins mobile. Ces études ont aussi montré que la mobilité n'est pas la même d'un gel à l'autre, ce qui n'avait pas été constatée dans l'étude structural du chapitre précédent.

Au final, ces études ne sont qu'une première approche d'expériences, mais aux différents niveaux, l'hémoglobine réticulée dans un gel conserve voire amplifie sa dynamique. L'explication de la perte d'activité à cause de la rigidité de la protéine semble donc être une fausse piste et il faudrait se pencher

sur l'hypothèse précédemment donnée dans la discussion du chapitre 3 que les gaz ne puissent pas migrer dans le gel. Pour cela, plusieurs expériences pourraient être tentées :

-des expériences de photodissociation sur la carboxyhémoglobine (carboxyHb : hémoglobine ayant le fer de l'hème fixant le monoxyde de carbone). Les expériences ont montré qu'après la dissociation du CO du fer, le monoxyde de carbone a une haute probabilité de se fixer à nouveau au fer (phénomène de recombinaison géminée), mais a aussi la possibilité de s'échapper<sup>49</sup>. Cela peut être suivi par spectroscopie UV-Visible, les spectres de désoxyHb et carboxyHb étant différents<sup>50</sup>. Si nos gels présentent l'impossibilité pour les gaz de migrer à l'intérieur, le suivi cinétique ne devrait présenter que la recombinaison. Par comparaison à la carboxyHb libre, on pourrait récupérer des informations importantes.

-dans l'hémoglobine sans fer (globine-porphyrine), la porphyrine présente un signal de fluorescence<sup>51</sup>. Cette fluorescence peut être éteinte par le dioxygène et elle est donc dépendante de la migration du dioxygène<sup>52</sup>. En suivant la fluorescence de la globine-porphyrine libre et de la porphyrine-globine gélifiée, on pourrait ainsi voir si la migration du dioxygène est conservée une fois que l'hémoglobine est gélifiée.

-il a été montré qu'en mélangeant des chaînes  $\alpha$  sans ligand avec des chaînes  $\beta$  portant du monoxyde de carbone marqué de manière isotopique par du carbone 13 ( $\beta$ -<sup>13</sup>CO) ou inversement ( $\alpha$ -<sup>13</sup>CO avec des chaînes  $\beta$  sans ligand), on voit qu'il y a un échange donnant au final un mélange où les deux chaînes portent du <sup>13</sup>CO (50%  $\beta$ -<sup>13</sup>CO / 50%  $\alpha$ -<sup>13</sup>CO). Cela a été mesuré par RMN (les deux chaînes portant le <sup>13</sup>CO n'ayant pas le signal) et il faut plusieurs heures pour arriver à l'échange de gaz<sup>53</sup>. En partant sur la même base, si on gélifie le mélange contenant un type de chaîne portant <sup>13</sup>CO et l'autre sans ligand juste après sa préparation, on pourrait suivre le signal en RMN et voir si l'équilibre dans le gel survient toujours ou non.

Ces expériences ont des verrous pratiques. Ainsi, la préparation de la globine-porphyrine n'est pas simple et aux concentrations où on prépare les gels, les phénomènes de réabsorption risquent de gêner la mesure. Pour les mesures en photodissociation, il faut préparer des gels suffisamment fins afin de pouvoir avoir de la lumière qui puisse traverser afin de mesurer l'absorbance et que le flash cause la dissociation sur toute l'épaisseur. L'expérience la plus simple à mettre en place pour les gels serait au final celle sur les chaînes portant <sup>13</sup>CO malgré son apparente complexité.

## Bibliographie

- (1) Dobbins, S. E.; Lesk, V. I.; Sternberg, M. J. E. Insights into Protein Flexibility: The Relationship between Normal Modes and Conformational Change upon Protein-Protein Docking. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105* (30), 10390–10395. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802496105>.
- (2) Yonetani, T.; Kanaori, K. How Does Hemoglobin Generate Such Diverse Functionality of Physiological Relevance? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2013**, *1834* (9), 1873–1884. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.04.026>.
- (3) Bhabha, G.; Lee, J.; Ekiert, D. C.; Gam, J.; Wilson, I. A.; Dyson, H. J.; Benkovic, S. J.; Wright, P. E. A Dynamic Knockout Reveals That Conformational Fluctuations Influence the Chemical Step of Enzyme Catalysis. *Science* **2011**, *332* (6026), 234–238. <https://doi.org/10.1126/science.1198542>.
- (4) Sandhu, K. S.; Dash, D. Dynamic Alpha-Helices: Conformations That Do Not Conform. *Proteins* **2007**, *68* (1), 109–122. <https://doi.org/10.1002/prot.21328>.
- (5) Aggeli, A.; Fytas, G.; Vlassopoulos, D.; McLeish, T. C.; Mawer, P. J.; Boden, N. Structure and Dynamics of Self-Assembling Beta-Sheet Peptide Tapes by Dynamic Light Scattering. *Biomacromolecules* **2001**, *2* (2), 378–388. <https://doi.org/10.1021/bm000080z>.

- (6) Everse, J. Heme Proteins. In *Encyclopedia of Biological Chemistry*; Lennarz, W. J., Lane, M. D., Eds.; Elsevier: New York, 2004; pp 354–361. <https://doi.org/10.1016/B0-12-443710-9/00304-5>.
- (7) Bu, Z.; Cook, J.; Callaway, D. J. E. Dynamic Regimes and Correlated Structural Dynamics in Native and Denatured Alpha-Lactalbumin<sup>11</sup> Edited by M. F. Moody. *Journal of Molecular Biology* **2001**, *312* (4), 865–873. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5006>.
- (8) Bu, Z.; Callaway, D. J. E. Chapter 5 - Proteins MOVE! Protein Dynamics and Long-Range Allostery in Cell Signaling. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Donev, R., Ed.; Protein Structure and Diseases; Academic Press, 2011; Vol. 83, pp 163–221. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381262-9.00005-7>.
- (9) Bu, Z.; Biehl, R.; Monkenbusch, M.; Richter, D.; Callaway, D. J. E. Coupled Protein Domain Motion in Taq Polymerase Revealed by Neutron Spin-Echo Spectroscopy. *PNAS* **2005**, *102* (49), 17646–17651. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503388102>.
- (10) Potestio, R.; Pontiggia, F.; Micheletti, C. Coarse-Grained Description of Protein Internal Dynamics: An Optimal Strategy for Decomposing Proteins in Rigid Subunits. *Biophysical Journal* **2009**, *96* (12), 4993–5002. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.03.051>.
- (11) Howard, J. Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton. **2001**.
- (12) Kamerlin, S. C. L.; Warshel, A. At the Dawn of the 21st Century: Is Dynamics the Missing Link for Understanding Enzyme Catalysis? *Proteins* **2010**, *78* (6), 1339–1375. <https://doi.org/10.1002/prot.22654>.
- (13) Gerstein, M.; Lesk, A. M.; Chothia, C. Structural Mechanisms for Domain Movements in Proteins. *Biochemistry* **1994**, *33* (22), 6739–6749. <https://doi.org/10.1021/bi00188a001>.
- (14) Callaway, D. J. E.; Matsui, T.; Weiss, T.; Stingaciu, L. R.; Stanley, C. B.; Heller, W. T.; Bu, Z. Controllable Activation of Nanoscale Dynamics in a Disordered Protein Alters Binding Kinetics. *J Mol Biol* **2017**, *429* (7), 987–998. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.003>.
- (15) Ishima, R.; Torchia, D. A. Protein Dynamics from NMR. *Nature Structural Biology* **2000**, *7* (9), 740–743. <https://doi.org/10.1038/78963>.
- (16) Davis, I. W.; Arendall III, W. B.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S. The Backrub Motion: How Protein Backbone Shrugs When a Sidechain Dances. *Structure* **2006**, *14* (2), 265–274.
- (17) Fraser, J. S.; van den Bedem, H.; Samelson, A. J.; Lang, P. T.; Holton, J. M.; Echols, N.; Alber, T. Accessing Protein Conformational Ensembles Using Room-Temperature X-Ray Crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108* (39), 16247–16252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111325108>.
- (18) Turton, D. A.; Senn, H. M.; Harwood, T.; Laphorn, A. J.; Ellis, E. M.; Wynne, K. Terahertz Underdamped Vibrational Motion Governs Protein-Ligand Binding in Solution. *Nature Communications* **2014**, *5* (1), 3999. <https://doi.org/10.1038/ncomms4999>.
- (19) Balakrishnan, G.; Weeks, C. L.; Ibrahim, M.; Soldatova, A. V.; Spiro, T. G. Protein Dynamics from Time Resolved UV Raman Spectroscopy. *Current Opinion in Structural Biology* **2008**, *18* (5), 623–629. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.06.001>.
- (20) Day, R. N.; Schaufele, F. Fluorescent Protein Tools for Studying Protein Dynamics in Living Cells: A Review. *J Biomed Opt* **2008**, *13* (3), 031202. <https://doi.org/10.1117/1.2939093>.
- (21) Jas, G. S.; Kuczera, K. Equilibrium Structure and Folding of a Helix-Forming Peptide: Circular Dichroism Measurements and Replica-Exchange Molecular Dynamics Simulations. *Biophysical Journal* **2004**, *87* (6), 3786–3798. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.045419>.
- (22) Devineau, S.; Zanotti, J.-M.; Loupiac, C.; Zargarian, L.; Neiers, F.; Pin, S.; Renault, J. P. Myoglobin on Silica: A Case Study of the Impact of Adsorption on Protein Structure and Dynamics. *Langmuir* **2013**, *29* (44), 13465–13472. <https://doi.org/10.1021/la4035479>.
- (23) Devineau, S. Adsorption des protéines sur les nanomatériaux. Biochimie et physico-chimie d'un nouveau stress. phdthesis, Université Paris Sud - Paris XI, 2013.
- (24) Gelin, B. R.; Karplus, M. Mechanism of Tertiary Structural Change in Hemoglobin. *PNAS* **1977**, *74* (3), 801–805. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.3.801>.

- (25) Yuan, Y.; Tam, M. F.; Simplaceanu, V.; Ho, C. New Look at Hemoglobin Allostery. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (4), 1702–1724. <https://doi.org/10.1021/cr500495x>.
- (26) Yonetani, T.; Laberge, M. Protein Dynamics Explain the Allosteric Behaviors of Hemoglobin. *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1784* (9), 1146–1158. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.04.025>.
- (27) Song, X.; Yuan, Y.; Simplaceanu, V.; Sahu, S. C.; Ho, N. T.; Ho, C. A Comparative NMR Study of the Polypeptide Backbone Dynamics of Hemoglobin in the Deoxy and Carbonmonoxy Forms <sup>†</sup>. *Biochemistry* **2007**, *46* (23), 6795–6803. <https://doi.org/10.1021/bi602654u>.
- (28) Song, X.; Simplaceanu, V.; Ho, N. T.; Ho, C. Effector-Induced Structural Fluctuation Regulates the Ligand Affinity of an Allosteric Protein: Binding of Inositol Hexaphosphate Has Distinct Dynamic Consequences for the T and R States of Hemoglobin <sup>†</sup>. *Biochemistry* **2008**, *47* (17), 4907–4915. <https://doi.org/10.1021/bi7023699>.
- (29) Lukin, J. A.; Kontaxis, G.; Simplaceanu, V.; Yuan, Y.; Bax, A.; Ho, C. Quaternary Structure of Hemoglobin in Solution. *PNAS* **2003**, *100* (2), 517–520. <https://doi.org/10.1073/pnas.232715799>.
- (30) Lal, J.; Maccarini, M.; Fouquet, P.; Ho, N. T.; Ho, C.; Makowski, L. Modulation of Hemoglobin Dynamics by an Allosteric Effector. *Protein Science* **2017**, *26* (3), 505–514. <https://doi.org/10.1002/pro.3099>.
- (31) Skjærven, L.; Reuter, N.; Martinez, A. Dynamics, Flexibility and Ligand-Induced Conformational Changes in Biological Macromolecules: A Computational Approach. *Future Medicinal Chemistry* **2011**, *3* (16), 2079–2100. <https://doi.org/10.4155/fmc.11.159>.
- (32) Nevin Gerek, Z.; Kumar, S.; Banu Ozkan, S. Structural Dynamics Flexibility Informs Function and Evolution at a Proteome Scale. *Evol Appl* **2013**, *6* (3), 423–433. <https://doi.org/10.1111/eva.12052>.
- (33) Vihinen, M. Relationship of Protein Flexibility to Thermostability. *Protein Eng Des Sel* **1987**, *1* (6), 477–480. <https://doi.org/10.1093/protein/1.6.477>.
- (34) Saha, P.; Manna, C.; Chakrabarti, J.; Ghosh, M. Reversible Thermal Unfolding of a YfdX Protein with Chaperone-like Activity. *Scientific Reports* **2016**, *6* (1), 29541. <https://doi.org/10.1038/srep29541>.
- (35) Strucksberg, K. H.; Rosenkranz, T.; Fitter, J. Reversible and Irreversible Unfolding of Multi-Domain Proteins. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1774* (12), 1591–1603. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.09.005>.
- (36) Ramsay, G.; Eftink, M. R. A Multidimensional Spectrophotometer for Monitoring Thermal Unfolding Transitions of Macromolecules. *Biophysical Journal* **1994**, *66* (2), 516–523. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80803-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80803-3).
- (37) Rodnin, M. V.; Posokhov, Y. O.; Contino-Pépin, C.; Brettmann, J.; Kyrychenko, A.; Palchevskyy, S. S.; Pucci, B.; Ladokhin, A. S. Interactions of Fluorinated Surfactants with Diphtheria Toxin T-Domain: Testing New Media for Studies of Membrane Proteins. *Biophysical Journal* **2008**, *94* (11), 4348–4357. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.126235>.
- (38) Sanchez-Guzman, D.; Giraudon-Colas, G.; Marichal, L.; Boulard, Y.; Wien, F.; Degrouard, J.; Baeza-Squiban, A.; Pin, S.; Renault, J. P.; Devineau, S. *In Situ* Analysis of Weakly Bound Proteins Reveals Molecular Basis of Soft Corona Formation. *ACS Nano* **2020**, *14* (7), 9073–9088. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c04165>.
- (39) Yan, Y.-B.; Wang, Q.; He, H.-W.; Zhou, H.-M. Protein Thermal Aggregation Involves Distinct Regions: Sequential Events in the Heat-Induced Unfolding and Aggregation of Hemoglobin. *Biophysical Journal* **2004**, *86* (3), 1682–1690. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74237-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74237-X).
- (40) Ringe, D.; Petsko, G. A. The ‘Glass Transition’ in Protein Dynamics: What It Is, Why It Occurs, and How to Exploit It. *Biophysical Chemistry* **2003**, *105* (2), 667–680. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(03\)00096-6](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(03)00096-6).
- (41) Doster, W.; Cusack, S.; Petry, W. Dynamical Transition of Myoglobin Revealed by Inelastic Neutron Scattering. *Nature* **1989**, *337* (6209), 754–756. <https://doi.org/10.1038/337754a0>.

- (42) Frauenfelder, H.; Petsko, G. A. Structural Dynamics of Liganded Myoglobin. *Biophysical Journal* **1980**, 32 (1), 465–483. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(80\)84984-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(80)84984-8).
- (43) Jacrot, B.; Cusack, S.; Dianoux, A. J.; Engelman, D. M. Inelastic Neutron Scattering Analysis of Hexokinase Dynamics and Its Modification on Binding of Glucose | *Nature*. *Nature* **1982**, 300 (5887), 84–86. <https://doi.org/10.1038/300084a0>.
- (44) Stadler, A. M.; Garvey, C. J.; Bocahut, A.; Sacquin-Mora, S.; Digel, I.; Schneider, G. J.; Natali, F.; Artmann, G. M.; Zaccai, G. Thermal Fluctuations of Haemoglobin from Different Species: Adaptation to Temperature via Conformational Dynamics. *Journal of The Royal Society Interface* **2012**, 9 (76), 2845–2855. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0364>.
- (45) Yon, J. M.; Perahia, D.; Ghéllis, C. Conformational Dynamics and Enzyme Activity. *Biochimie* **1998**, 80 (1), 33–42. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(98\)80054-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(98)80054-0).
- (46) Brooks, C. L.; Brünger, A.; Karplus, M. Active Site Dynamics in Protein Molecules: A Stochastic Boundary Molecular-Dynamics Approach. *Biopolymers* **1985**, 24 (5), 843–865. <https://doi.org/10.1002/bip.360240509>.
- (47) Tama, F.; Sanejouand, Y.-H. Conformational Change of Proteins Arising from Normal Mode Calculations. *Protein Eng Des Sel* **2001**, 14 (1), 1–6. <https://doi.org/10.1093/protein/14.1.1>.
- (48) Rovigatti, L.; Kob, W.; Sciortino, F. The Vibrational Density of States of a Disordered Gel Model. *J. Chem. Phys.* **2011**, 135 (10), 104502. <https://doi.org/10.1063/1.3626869>.
- (49) Alpert, B.; El Mohsni, S.; Lindqvist, L.; Tfibel, F. Transient Effects in the Nanosecond Laser Photolysis of Carboxyhemoglobin: “CAGE” Recombination Annd Spectral Evolution of the Protein. *Chemical Physics Letters* **1979**, 64 (1), 11–16. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(79\)87265-6](https://doi.org/10.1016/0009-2614(79)87265-6).
- (50) Loupiac, C.; Kruk, N.; Valat, P.; Alpert, B. Protein Relaxation without a Geminate Phase in Nanosecond Photodissociated CO Carp Hemoglobin. *Chemical Physics Letters* **1999**, 302 (5), 627–632. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(99\)00136-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(99)00136-0).
- (51) Sebban, P.; Coppey, M.; Alpert, B.; Lindqvist, L.; Jameson, D. M. FLUORESCENCE PROPERTIES OF PORPHYRIN-GLOBIN FROM HUMAN HEMOGLOBIN. *Photochemistry and Photobiology* **1980**, 32 (6), 727–731.
- (52) Jameson, D. M.; Gratton, E.; Weber, G.; Alpert, B. Oxygen Distribution and Migration within Mbdes Fe and Hbdes Fe. Multifrequency Phase and Modulation Fluorometry Study. *Biophysical journal* **1984**, 45 (4), 795–803.
- (53) Loupiac, C.; Pin, S.; Vezin, H.; Alpert, B. <sup>13</sup>CO Exchange Process between the Hemoglobin Irons Observed with <sup>13</sup>C NMR. *Chemical Physics Letters* **2001**, 344 (5), 457–462. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(01\)00826-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(01)00826-0).

# Chapitre 5 :

## Matériels et méthodes

### Récapitulatif de la forme des échantillons

Le Figure 2 donne les formes, taille et volume des échantillons pour les différentes techniques.

Technique	Adsorption Hb sur NP	Gel Hb
Isotherme d'adsorption	Tube Eppendorf 0,5 mL ou 1,5 mL	
Diagramme de gélification		Tube Eppendorf 0,5 mL
Tonométrie	Tonomètre avec chemin optique 1 cm (4 mL)	Cuvette plastique (1 mL)
RPE	Capillaire 2 mm (1 mL)	Capillaire 2 mm (1 mL)
Spectroscopie absorption	Porte-échantillon SAMBA disque de rayon d'environ 1 cm (1 mL)	Porte-échantillon SAMBA disque de rayon d'environ 1 cm (1 mL)
Dichroïsme circulaire Soret	Cuvette quartz suprasil 1 mm (1 mL)	Fenêtre quartz 0,01 mm (10 $\mu$ L déposés)
Dichroïsme circulaire UV	Fenêtres CaF <sub>2</sub> 1 à 100 $\mu$ M (10 $\mu$ L)	Fenêtres CaF <sub>2</sub> 1 à 100 $\mu$ M (10 $\mu$ L)
DNPA	Cuvette quartz 2 mm (1 mL)	Fenêtre quartz 2 mm (1 mL)
DXPGA	Capillaire borosilicace 2 mm (0,1 mL)	Capillaire borosilicace 2 ou 3 mm (0,1 mL)
Cryo-MET	Gouttelette sur grille de carbone (4 $\mu$ L)	
MEB		Fragment de gel de quelques mm de rayon sur scotch carbone (100 $\mu$ L)
Rhéologie		Disque de 12 mm de diamètre 1 mm d'épaisseur (125 $\mu$ L)
Diffusion élastique et inélastique de neutrons		Tube aluminium de 1 cm de diamètre (7 mL)

Tableau 1 : Présentation du conditionnement de l'échantillon pour chaque technique (taille et volume).



## I- Origine des produits et production des composés de base

### 1) Produits chimiques et petits matériels utilisés

Le Tableau 2 donne les produits et matériels usuels utilisés dans la thèse.

Produits	Marque	Référence
<b>Produits secs</b>		
Glucose (>99,5%)	Sigma	G7528
Citrate de sodium (>99%)	Sigma	S1804
Acide citrique (>99,5%)	Sigma	27487
Chlorure de sodium (>99%)	Sigma	S9625
Dihydrogénophosphate de sodium (>99%)	VWR	231-449-2
Hydrogénophosphate de sodium (>99%)	VWR	231-448-7
Acétate d'ammonium (>98%)	Sigma	A7330
Carbonate de sodium (>99%)	Sigma	S7795
Dithionite de sodium (>85%) (hydrosulfite de sodium)	VWR	1.06505.1000
Nitrite de sodium (>97%)	Merck	
<b>Nanoparticules</b>		
LUDOX TM-50 Sigma	Sigma	420778
<b>Produits liquides</b>		
D <sub>2</sub> O (99,90% D)	Eurisotop	
Glutaraldéhyde (25%)	Sigma	G6257
Solution multiéléments 2	Claritus PPT	CLMS-2
Solution multiéléments 4	Claritus PPT	CLMS-4
<b>Capillaire et cuve optique</b>		
Cuves CaF <sub>2</sub> (diverses tailles de 1 à 100 µm d'épaisseur)	Hellma	
Cuves quartz Suprasil 1 cm	Hellma	104-B-10-40
Cuves quartz Suprasil 1 mm	Hellma	100-1-40
Cuves quartz Suprasil 2 mm	Hellma	100-2-40
Fenêtres quart Suprasil 0,01 mm	Hellma	106-QS.0.01
<b>Divers</b>		
Roue d'agitation	Stuart	<b>SB3</b>
Concentrateur protéine	Millipore	Amicon Ultra-15 15ML - 30 KDa
Membrane de dialyse seuil de rétention de 3.5 kDa	Spectrum Labs	Spectra/Por®3
Résine AGR501-X8	Bio-Rad	
Filtre en cellulose de 0,45 µm de porosité	Dutscher ScientificR	146561
Appareil de production d'eau ultra-pure	Millipore	Milli-Q

Tableau 2 : Produits et petits matériels ayant été utilisés dans cette thèse.

Par la suite, se référer à ce tableau quand un produit spécifique est mentionné.

## 2) Préparation et purification de l'hémoglobine

L'hémoglobine porcine est obtenue à partir de sang frais de porc obtenu aux Établissements Guy Harang à Houdan. L'autorisation d'utilisation de sang de porc à des fins de recherche a été délivrée par la Direction Départementale de la Protection des Personnes de l'Essonne (Courcouronnes). L'extraction et la purification de Hb ont été faites suivant une version modifiée de la méthode de Perutz<sup>1</sup>.

Une solution anticoagulante composée d'acide citrique à 4,8 g/L, de citrate de sodium à 13,2 g/L et de glucose à 14,7 g/L est ajoutée au sang de porc dans la proportion d'un volume pour quatre volumes directement après la collecte ; le but est de stabiliser le sang le temps du transport. Arrivé au laboratoire, le sang est centrifugé (4000 g, 10 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 afin de compenser le volume éliminé et garantir l'équilibre osmotique. Après agitation manuelle et homogénéisation à la baguette en verre, le culot globulaire est centrifugé de nouveau (4000 g, 5 min, 4°C). Ces étapes de centrifugation/aspiration sont répétées 4 fois en tout. Les hématies sont ensuite hémolysées par choc osmotique en ajoutant de l'eau milli-Q à 4°C dans le culot globulaire lavé (1 volume pour 3 volumes). Les membranes des hématies sont précipitées par ajout de tampon phosphate 2,8 M à pH=7,0 dans la solution d'hématies hémolysées (1 volume pour 5 volumes). La solution est alors centrifugée (25000 g, 30 min, 4°C) et le culot contenant les membranes est éliminé.

Le surnageant contenant l'hémoglobine est placé dans une membrane de dialyse de 3.5 kDa et mis à dialyser. Quatre dialyses d'au minimum deux heures sont effectuées dans 40 volumes d'eau afin d'éliminer tous les sels en solution. La solution d'hémoglobine est alors centrifugée (25000 g, 10 min, 4°C) afin d'éliminer le reste de membranes et l'hémoglobine précipitée. Le 2,3-biphospho-glycérate, effecteur de l'hémoglobine qui diminue son affinité pour l'oxygène, est éliminé par passage de la solution d'hémoglobine sur une colonne désionisante contenant la résine AG®501-X8<sup>2</sup>. Une dernière centrifugation est alors effectuée (25000 g, 10 min, 4°C). La solution d'hémoglobine purifiée est conservée à 6°C dans des flacons remplis et étanches afin de conserver la forme oxygénée de l'hémoglobine.

A chaque utilisation ultérieure, la solution est centrifugée à 16000 g, 5 min, 4°C avant que sa concentration soit mesurée.

La forme désoxygénée est préparée soit :

-sous flux d'argon dans la solution pour les expériences d'oxygénation des solutions ;

-par ajout de la quantité minimale de dithionite de sodium pour obtenir un spectre de la forme totalement désoxygénée pour les expériences nécessitant une forme désoxygénée stable sur une heure.

La forme méthémoglobine est préparée par ajout de nitrite de sodium. La quantité est celle minimum pour obtenir un spectre de la forme totalement méthémoglobine suivie d'une dialyse dans une membrane de 3.5 kDa, de 2 heures (1 volume dans 200 volumes) afin d'éliminer les sels.

La qualité des échantillons est vérifiée et leurs concentrations d'hémoglobine sont mesurées en absorption UV-Visible (spectres donnés en introduction figure 15) :

- à 576 nm pour oxyHb ( $15150 \text{ L/mol/cm}^3$ ) ;
- à 630 nm pour métHb en tamponnant à pH 7 ( $3780 \text{ L/mol/cm}^4$ ) ;
- à 560 nm en désoxyHb ( $13800 \text{ L/mol/cm}^4$ ).

Les mesures sont faites dans des cuvettes de quartz de chemin optique 1 cm.

Pour certaines utilisations, l'hémoglobine a été concentrée grâce aux concentrateurs amicon en centrifugeant pendant 1/2h à 7500 g.

### 3) Nanoparticules de silice

Les nanoparticules (NP) de silice utilisées dans cette thèse sont les Ludox TM-50. Il s'agit d'un colloïde de NP sphériques monodisperses. Les différents ions stabilisant la suspension colloïdale sont éliminés par dialyse dans une membrane de 3.5 kDa, contre de l'eau à 4°C (1 volume contre 40). 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 en cellulose de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosité.

Ces nanoparticules ont été mesurées en DNPA et DXPGA dans la thèse de Laurent Marichal et ont permis de reporter un rayon de giration de 12,7 nm et une surface spécifique de  $107 \text{ m}^2/\text{g}$ . La mesure de la concentration en NP a été faite en mettant des volumes précis de solutions de NP dans des tubes préalablement tarés. Après évaporation à 90°C en étuve sur une nuit, on a mesuré la masse des tubes ne contenant plus que les NP. Connaissant la masse de NP et le volume mis au départ, on remonte simplement à la concentration.

Les solutions sont conservées à 4°C pendant deux semaines. Après deux semaines, les nanoparticules commencent à s'agréger et sont éliminées comme déchets « nano ».

### 4) Tampons

Trois tampons ont été préparés :

- le tampon phosphate à pH/pD 7 ou 7,4 à des concentrations de 1 ou 2 M. La concentration d'utilisation était de 100 mM. Pour obtenir les solutions mères, des masses de dihydrogénophosphate de sodium et d'hydrogénophosphate de sodium ont été dissoutes dans des quantités prévues pour obtenir le pH souhaité ;
- le tampon carbonate de sodium à pH 9 à une concentration de 1 M. La concentration d'utilisation était de 100 mM ;
- le tampon acétate d'ammonium à pH 9 à une concentration de 50 mM. La concentration d'utilisation était de 5 mM.

Pour les deux derniers tampons, une quantité du sel correspondant a été dissoute dans de l'eau pour obtenir la concentration souhaitée. Puis, le pH a été ajusté par ajout d'acide chlorhydrique concentré ou de soude concentrée.

## 5) Deutération

Pour les expériences nécessitant des solutions deutérées, l'échange des protons labiles de l'hémoglobine a été fait selon le protocole suivant. Une solution de Hb concentrée a été préalablement dialysée dans une membrane de dialyse de 3.5 kDa à deux reprises pendant 24 h dans 12 volumes de (selon l'expérience) à 10°C :

-D<sub>2</sub>O pure (99,9% de <sup>2</sup>H) ;

-tampon phosphate 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pD = 7,4 ;

-tampon phosphate 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pD = 7,0.

Le potentiel deutérium des tampons a été fait en utilisant le pH lu sur un pH-mètre (pH\*) et en utilisant la relation entre pD et pH\* ( $pD = pH^* + 0.4$ )<sup>5</sup>.

Pour les Ludox, la solution commerciale de Ludox a quant à elle été dialysée dans une membrane de dialyse 3.5 kDa une fois contre 40 volumes de D<sub>2</sub>O, puis a été diluée et filtrée comme expliqué précédemment. Seul le GTA concentré utilisé est resté en eau légère, le glutaraldéhyde en version deutérée n'étant pas disponible.

## II- Techniques de caractérisation fondamentale

### 1) Spectroscopie UV-Visible

Les spectres d'absorbance sont obtenus sur un spectrophotomètre UV-visible Shimadzu UV-2450 ou 2600 à double faisceau. La spectrophotométrie a été utilisée de façon usuelle en transmission afin d'obtenir l'absorbance, chaque spectre mesuré a eu une ligne de base mesurée sur le solvant utilisé.

Pour certaines utilisations, on a utilisé une sphère d'intégration ISR-2200 afin de mesurer toute la lumière et ainsi, récupérer les photons diffusés par le milieu, ce qui a permis d'obtenir des spectres sans phénomène de diffusion aux petites longueurs d'ondes<sup>6</sup>.

Une sphère d'intégration permet la réorientation de tous les rayonnements sans perte d'énergie vers un photomultiplicateur, permettant ainsi la mesure de toute la lumière après passage de l'échantillon à analyser. La correction de la ligne de base est mesurée sans échantillon à l'entrée de la sphère. Un échantillon blanc standard (pastille de sulfate de baryum) est placé à sa sortie, permettant ainsi aucune perte de lumière. La mesure en absorbance (ou transmission) se fait avec le tonomètre à l'entrée, le standard blanc à la sortie (toujours pour ne perdre aucune lumière). La sphère d'intégration permet alors de mesurer la lumière transmise et celle diffusée simultanément (Figure 1).

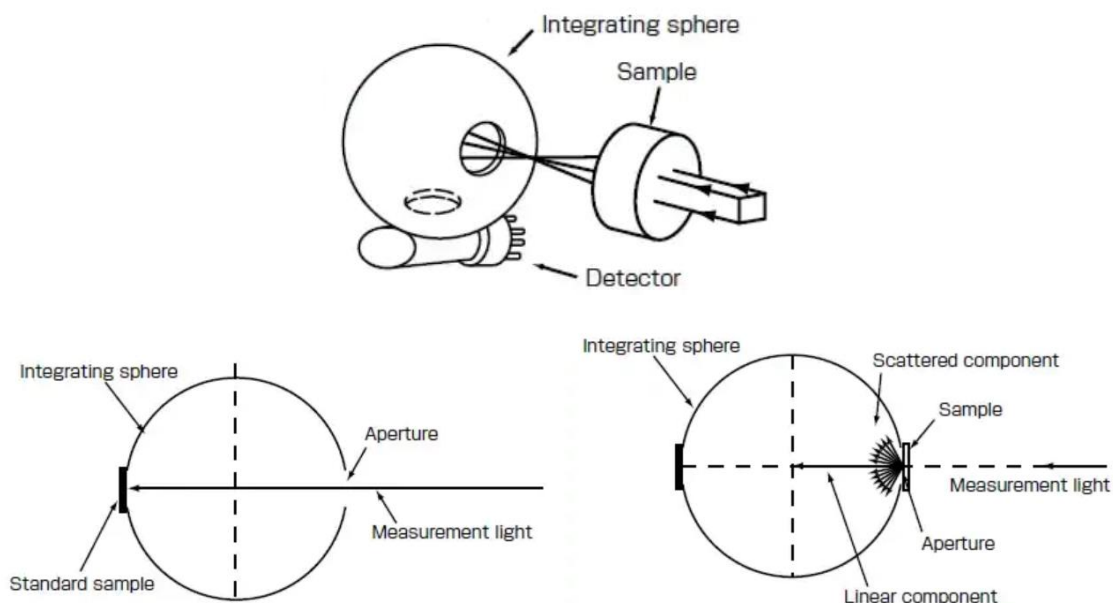


Figure 1 : En haut, disposition d'une sphère d'intégration dans l'espace. A gauche, dispositif de mesure de la ligne de base. A droite, dispositif de mesure en transmission. Tiré de <sup>7</sup>.

## 2) Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif

Afin de connaître la composition atomique des nanoparticules, il a été effectué des mesures de spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif. L'appareil utilisé est un iCAP Q ThermoElectron. Les expériences ont été faites avec Elodie Barruet. Pour la préparation des NP de silice afin de les passer en ICM-MS, il a fallu d'abord les dissoudre. Pour cela, on a pris une solution de NP d'environ 15 g/L et le protocole appliqué est une variante d'un protocole trouvé dans la littérature<sup>8</sup>. L'échantillon a été préparé comme tel :

- 1/10 de solution de nanoparticules de silice à étudier ;
- 1/20 d'acide fluorhydrique à 48% pour dissoudre les nanoparticules ;
- on complète avec de l'eau distillée.

On laisse sous agitation une nuit. L'échantillon est dilué par 100 avec de l'acide nitrique 2% avant d'être passé dans le spectromètre de masse. Deux expériences ont été faites :

- une expérience qualitative où on a regardé tous les atomes se trouvant dans les nanoparticules de silice afin de connaître la composition ;
- une expérience quantitative où on a mesuré la concentration de fer et de silice par dosage. La calibration externe est effectuée à partir de dilutions de solutions multiéléments 2 et 4 (Tableau 2).

Toutes les dilutions (échantillons et standards) ont été préparées par pesée.

### III-Préparation des échantillons pour caractérisation

Les modes de préparation des échantillons sont données dans cette partie, les détails des échantillons préparés sont donnés dans les chapitres 2, 3 et 4. Idem pour les températures.

#### 1) Préparation des mélanges Hb/NP et mesure des isothermes

La Figure 2 donne ainsi le protocole pour obtenir le mélange Hb/NP tamponné.

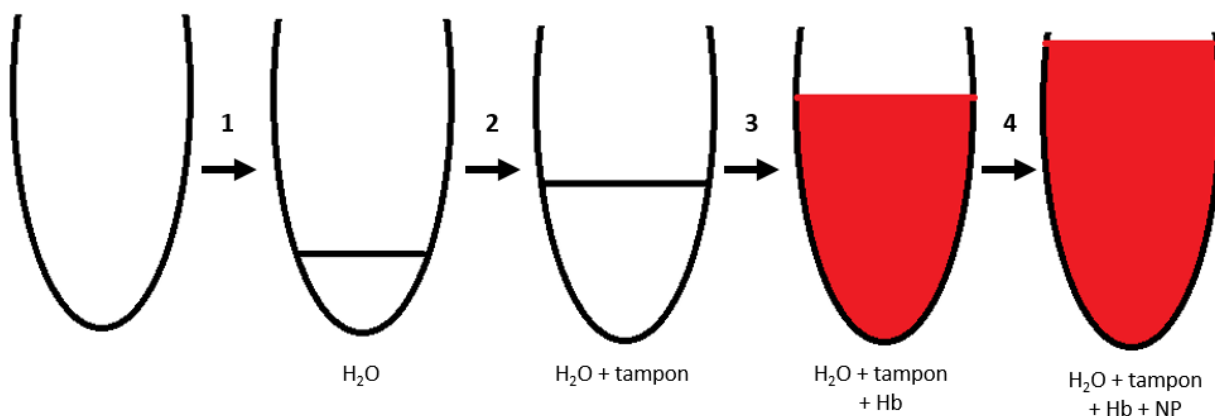


Figure 2 : Protocole afin d'obtenir un mélange Hb/NP.

1 : ajout de l'eau qui doit servir à diluer à la bonne concentration ;

2 : ajout du tampon concentré afin de tamponner le milieu ;

3 : ajout de la solution de Hb. On l'ajoute dans cet ordre afin d'avoir une solution suffisamment diluée en tampon pour éviter un choc salin ;

4- ajout de la solution de NP concentrée.

Les expériences sont faites à température ambiante. Les proportions dépendent de l'échantillon voulu. Le Tableau 3 donne ainsi les proportions usuelles et les concentrations mères usuelles pour préparer les échantillons. Ces proportions sont typiques de tout ce qui a été fait dans cette thèse.

$C_{\text{tampon}}$ voulu mM	$C_{\text{tampon}}$ mère mM	% en volume
100	1000	10%
100	2000	5%
5	100	5%

$C_{\text{Hb}}$ voulu mM	$C_{\text{Hb}}$ mère mM	% en volume
1	2	50%
2,5	7	36%

$C_{\text{NP}}$ voulu g/L	$C_{\text{NP}}$ mère g/L	% en volume
26	120	22%
40	120	33%
75	250	30%
120	250	48%

Tableau 3 : Proportions en volume et concentrations mères usuelles des composants des mélanges suivant les concentrations souhaitées pour l'échantillon.

Après préparation, les solutions sont agitées sur roue pendant 2h le temps que le phénomène d'adsorption soit complet<sup>9</sup>. Les solutions sont alors prêtes à être utilisées pour les expériences ou pour en faire des gels tels que détaillés dans les chapitres de résultats.

Pour les mesures d'isothermes, afin de faire sédimenter les NP, les solutions sont centrifugées pendant 10 minutes à 50 000 g. On mesure alors la concentration de Hb du surnageant par spectrophotométrie

UV visible. Connaissant la concentration en Hb mis dans le tube au départ comme celle de NP, on peut alors construire l'isotherme d'adsorption tel que détaillé dans le chapitre 2.

## 2) Préparation des gels d'hémoglobine et diagramme de gélification

Pour préparer les gels avec ou sans nanoparticules, on utilise toujours des tubes de 0,5 ou 1,5 mL, la préparation est la même que celle présentée dans la sous-partie précédente, on ajoute seulement du glutaraldéhyde en plus (Figure 3).

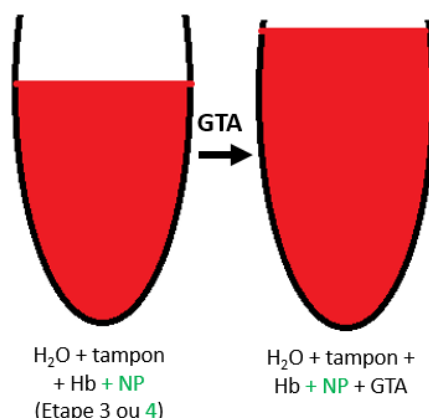


Figure 3 : Protocole afin d'obtenir les gels d'hémoglobine.

En partant des solutions préparées à l'étape 3 de la Figure 2 si gel sans nanoparticules ou à l'étape 4 après agitation sur roue pendant 2h si le gel avec nanoparticules, ajout de la quantité de glutaraldéhyde par trois aspirations/rejets de la solution afin d'homogénéiser la solution.

Les proportions dépendent de l'échantillon voulu. Le Tableau 4 donne ainsi les proportions usuelles et les concentrations mères usuelles pour préparer les échantillons. Ces proportions sont typiques de tout ce qui a été fait dans cette thèse.

$C_{Hb}$ voulue mM	$C_{Hb}$ mère mM	% en volume	$C_{tampon}$ voulue mM	$C_{tampon}$ mère mM	% en volume	$C_{NP}$ voulue g/L	$C_{NP}$ mère g/L	% en volume	$C_{GTA}$ voulue %	$C_{GTA}$ mère %	% en volume
2,5	12	21%	100	1000	10%	26	120	22%	0,1	0,3	33%
5	12	42%	100	2000	5%	75	250	30%	0,3	1	30%
7,5	12	63%							1	3	33%
									3	10	30%

Tableau 4: Proportions en volume et concentrations mères usuelles des composants suivant les concentrations souhaitées pour l'échantillon.

Le pourcentage en volume du glutaraldéhyde a toujours été supérieur à 10% afin d'assurer la meilleure homogénéité dans le gel.

Pour déterminer les diagrammes de gélification, les gels sont préparés dans des tubes de 0,5 mL. On applique alors le protocole de la Figure 4 après 5 minutes.

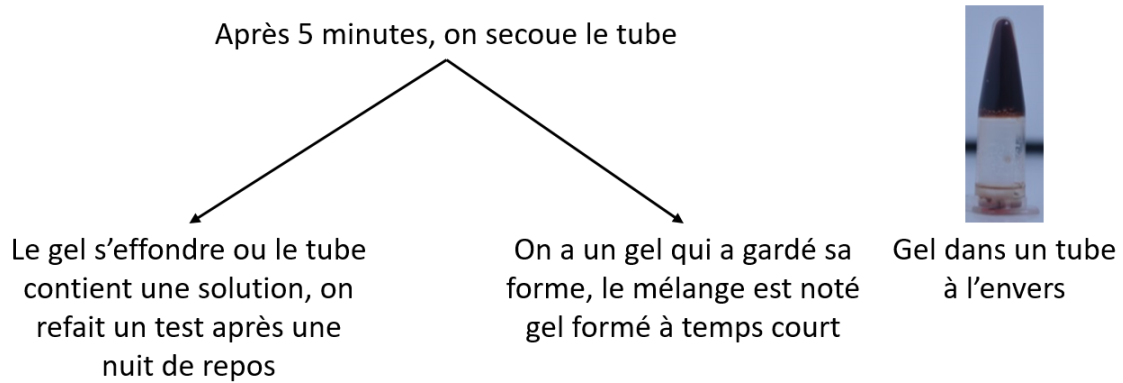


Figure 4 : Protocole pour déterminer les gels formés à temps court.

Après une nuit de repos, tout ce qui n'est pas un gel formé à temps court peut alors être déterminé par le protocole de la Figure 5.

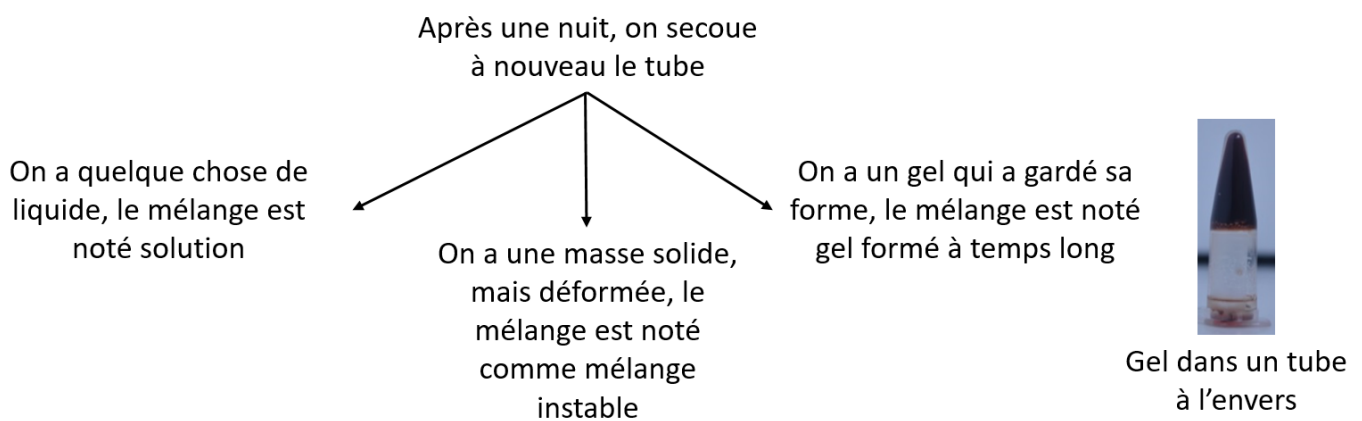


Figure 5 : Protocole pour déterminer les gels formés à temps longs, les solutions et les mélanges instables.

On peut alors déterminer les gels formés à temps long, les solutions et les mélanges instables. On peut alors tracer les diagrammes de gélification tels que présentés dans le chapitre 3.

## IV-Oxygénation de l'hémoglobine

### 1) Courbes d'oxygénation des mélanges Hb/NP

L'oxygénation de solutions de Hb avec ou sans NP a été mesurée par tonométrie à 25°C : Hb est désoxygénée sous un léger flux d'argon sous agitation douce. Le dégazage de 5 mL de solution prend une à deux heures dans un tonomètre de 70 mL tel que montré dans la Figure 6.





Figure 6 : Photo d'un tonomètre avec solution de Hb. Images tirées de <sup>10</sup>.

Des volumes contrôlés d'air (1 mL pour les solutions avec NP, 2 mL pour les solutions sans NP suivant l'affinité du mélange) sont ensuite ajoutés aux solutions désoxygénées à l'aide d'une seringue Hamilton étanche aux gaz, agitées durant cinq minutes afin d'arriver à un équilibre, puis un spectre d'absorbance est mesuré permettant d'évaluer l'état d'oxygénation de la solution. Les différents spectres mesurés durant l'oxygénation sont présentés dans le chapitre 2.

La pression partielle en oxygène de la solution est calculée en fonction du volume d'air ajouté et de la pression atmosphérique pour une teneur en oxygène de l'air de 21%. La fraction d'oxyHb est calculée à partir de l'absorbance de plusieurs longueurs d'onde du spectre entre 500 et 600 nm comparée aux mêmes longueurs d'onde des spectres de la solution de Hb totalement oxygénée et désoxygénée. Les longueurs d'ondes proches des points isobestiques sont écartées, car n'apportant pas d'informations. Cette technique permet d'obtenir une meilleure statistique, donnant des courbes d'oxygénation plus lisses, moins bruitées.

Les concentrations des solutions et conditions physico-chimiques sont décrites dans le chapitre 2. Les mesures sont réalisées dans des tonomètres ayant des cuves en quartz avec un trajet optique de 1 cm. L'acquisition des spectres des solutions contenant des NP est faite avec une sphère d'intégration (Figure 7 et Figure 1) permettant de recueillir toute la lumière dont celle diffusée par les NP, ce qui n'aurait pas été possible avec le montage classique de spectroscopie UV-Visible.



Figure 7 : Tonomètre placé dans une sphère d'intégration. Images tirées de <sup>10</sup>.

## 2) Oxygénation/désoxygénation des gels

Pour les gels d'oxyhémoglobine, ils ont été préparés à l'air libre avec de l'oxyHb dans des cuvettes plastiques de 1 mL. Des expériences de désoxygénation ont été tentées pour des temps allant de plusieurs heures à plusieurs jours. La Figure 8 présente un schéma du montage utilisé.

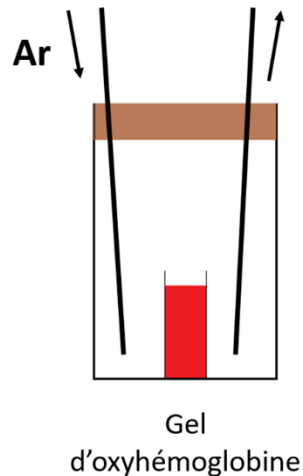


Figure 8 : Schéma du système utilisé pour la désoxygénation des gels d'oxyhémoglobine : enceinte hermétique en verre recouvert d'un bouchon à jupe où une aiguille permettait de faire rentrer un flux d'argon tandis qu'une autre aiguille servait à laisser échapper les gaz.

Pour les gels de désoxyhémoglobine, les solutions (sans GTA) ont été préparées à l'air libre avec de l'oxyHb dans des cuvettes plastiques de 1 mL. Puis on a placé la cuvette dans l'enceinte hermétique recouverte d'un bouchon à jupe où une aiguille permettait de faire rentrer un flux d'argon tandis qu'une autre aiguille servait à laisser échapper les gaz jusqu'à désoxygénation totale (environ 2 heures). On a alors retiré les aiguilles et on a ajouté le volume de GTA avec une seringue et une aiguille, tout en provoquant des aspirations-rejets avec la seringue afin d'homogénéiser le système. On a ensuite sorti la cuvette contenant le gel de désoxyHb et on a testé l'oxygénation pour des temps allant de plusieurs heures à plusieurs jours. La Figure 9 présente ainsi les étapes dans la préparation du gel de désoxyhémoglobine.

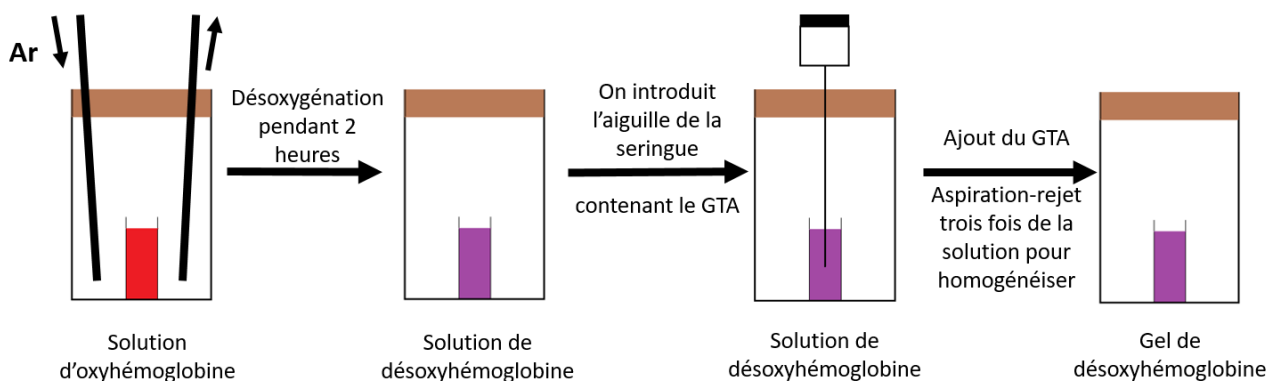
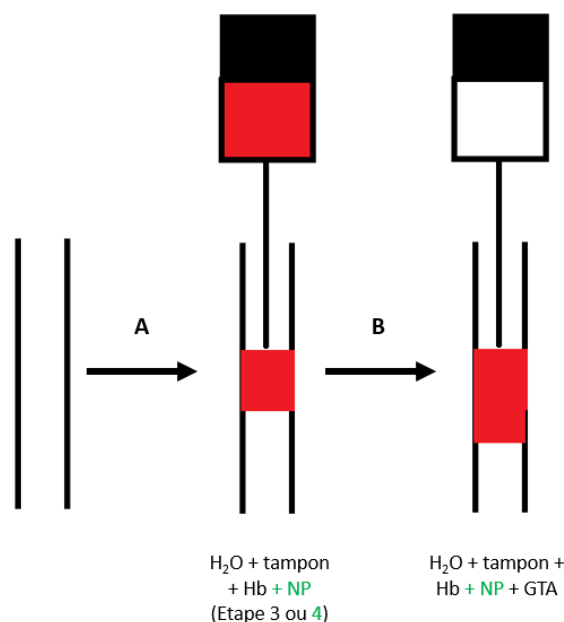


Figure 9 : Schéma des étapes pour la préparation d'un gel de désoxyhémoglobine.

## V- Caractérisation de l'hème et de son fer

### 1) Résonance paramagnétique électronique

Les échantillons ont été préparés dans des capillaires spéciaux RPE de 2 mm. Le remplissage du capillaire est décrit sur la Figure 10, l'étape A présente comment remplir un capillaire d'une solution Hb/NP avec une seringue et une aiguille. L'étape B permet d'obtenir un gel afin de l'étudier.



*Figure 10 : Remplissage du capillaire avec une seringue et une aiguille*

*A : ajout des solutions préparées à l'étape 3 de la Figure 2 si gel sans nanoparticules ou à l'étape 4 après agitation sur roue pendant 2h si le gel avec nanoparticules*

*B : ajout de la quantité de glutaraldéhyde par trois aspirations/rejets de la solution afin d'homogénéiser la solution.*

L'appareil utilisé est de la marque Bruker ELEXSYS E500 équipé d'un résonateur Bruker ER 4116DM. Les expériences à 77 K ont été faites avec un cryostat à flux continu ESR 900 utilisant de l'azote liquide et un système de contrôle de ITC 503, les deux de la marque Oxford. Les expériences à 10 K ont été faites avec un cryostat à hélium liquide Oxford ESR9. Les échantillons ont été gelés dans l'azote liquide avant d'être plongé dans les cryostats.

### 2) Spectroscopie d'absorption X

Les expériences de XANES ont été effectuées sur la ligne Samba du synchrotron Soleil<sup>11</sup>. Les mélanges Hb/NP ont été préparés préalablement et mis au dernier moment dans des porte-échantillons d'environ 1 mL tel que présentés sur la Figure 11. La gélification quant à elle, est faite en rajoutant le GTA à la solution préalablement préparée contenant Hb, tampon et potentiellement NP dans le porte-échantillon. Le porte-échantillon est usiné pour avoir des trous de volume de 1 mL (voir Figure 11). Une couche de kapton est mise d'un côté transformant les trous en récipient dans lequel on prépare l'échantillon.



Figure 11 : Porte-échantillon pour des expériences XAS sur une canne. Tiré de <sup>11</sup>.

Les échantillons ont alors été congelés dans de l'azote liquide par trempage, puis ils ont été mis dans le cryostat où la température est régulée à 20 K. Pour nos expériences, le nombre de photons transmis était très faible dû à des échantillons très diffusants, les expériences ont donc été faites en fluorescence. Un filtre en manganèse a été rajouté afin d'éviter la saturation du signal de fluorescence.

Le fer de l'échantillon subissant une réduction sous le rayon du faisceau (phénomène de photoréduction), pour chaque échantillon, l'acquisition d'un spectre est répétée à 8 emplacements différents de l'échantillon gelé afin d'en éviter la photoréduction. Chaque mesure a duré environ une demi-heure afin d'avoir une accumulation et donc un ratio signal sur bruit correct.

Les spectres, après avoir retiré leur ligne de base, sont normalisés, puis sont fusionnés (en éliminant ceux présentant des aberrations liées à des problèmes de mesure) à l'aide du logiciel Athena. Les signaux présentant des combinaisons linéaires sont traités comme indiqué dans le chapitre 2.

### 3) Dichroïsme circulaire de la bande de Soret

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 pour les solutions de Hb/NP. Pour les gels, une fenêtre en quart de 0,01 mm a été utilisée. La haute tension est restée en dessous de 900 V afin d'éviter la saturation du signal. Les échantillons ont été thermostatés à 25°C. Les mesures ont été faites sur la gamme de la bande de 300 à 500 nm.

Chaque spectre a sa ligne de base corrigée en soustrayant le signal du tampon utilisé. Pour les solutions Hb/NP, il a été possible de normaliser par rapport à l'épaisseur et la concentration en monomère.

## VI- Caractérisation de la globine

### 1) Dichroïsme circulaire dans l'UV-Visible

Les expériences ont été effectuées sur la ligne DISCO de SOLEIL<sup>12</sup>. Les échantillons ont été préparés préalablement, puis introduits dans le porte-échantillon. Pour les gels, le mélange Hb, tampon et potentiellement NP a été introduit d'abord dans la cuvette, puis le GTA est rajouté. Les portes-

échantillons sont des fenêtres en  $\text{CaF}_2$ . L'épaisseur variait de 1 à 100  $\mu\text{m}$  suivant la concentration hémoglobine afin d'éviter la saturation.

Pour les mesures, les fenêtres sont mises dans un montage similaire à celui présenté Figure 13. Chaque mesure est répétée 3 fois sur la gamme 170-250 nm. Les échantillons ont été thermostatés à 22°C. Pour les mesures en température, trois mesures tous les 3°C ont été réalisées entre 22 à 97°C.

L'épaisseur des échantillons est obtenue grâce à la spectroscopie UV-visible et la loi de Beer-Lambert en connaissant la concentration en hémoglobine, le coefficient d'extinction molaire de l'hémoglobine et en mesurant l'absorbance.

Les spectres en dichroïsme circulaire ont été traités selon la méthode suivante :

- faire les moyennes des différents spectres ;
- soustraire le signal du tampon, NP ou GTA suivant le cas ;
- remettre la ligne de base à zéro ;
- lisser les spectres obtenus ;
- normaliser par rapport à l'épaisseur, la concentration en monomère et en nombre d'acides aminés.

## 2) Diffusion de neutrons aux petits angles

Un montage simplifié de diffusion de neutrons est présenté sur la Figure 12.

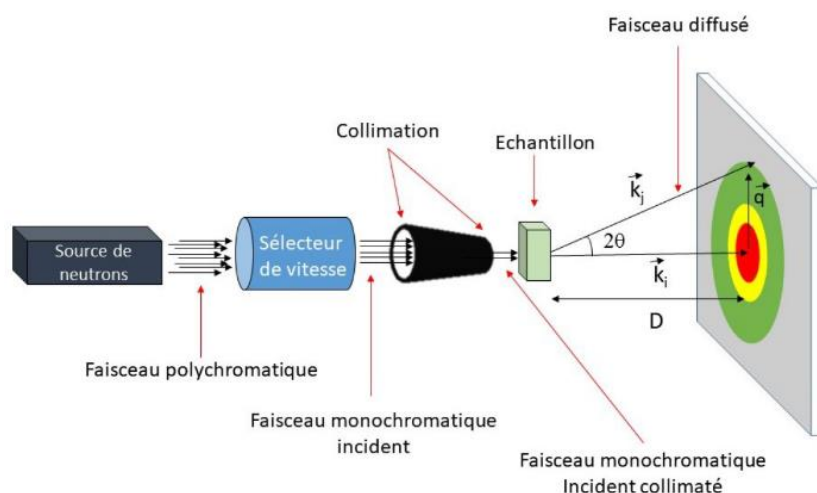


Figure 12 : Schéma décrivant une expérience de diffusion de neutrons aux petits angles. Tiré de <sup>13</sup>.

Les mesures ont été réalisées sur le spectromètre PAXY au Laboratoire Léon Brillouin (CEA-CNRS), sur le réacteur Orphée à Saclay. Les échantillons ont été préparés en solution aqueuse contenant 100 % de  $\text{D}_2\text{O}$  afin d'optimiser la diffusion des protéines et des LUDOX. Les échantillons sont préparés, puis placés dans des cuves en quartz Suprasil de 2 mm (800  $\mu\text{L}$ ) pour les solutions de Hb et les mélanges Hb/NP. Les gels de Hb contenant des NP ou non, ont été préparés directement dans des fenêtres en quartz tel que schématisé dans la Figure 13. On met d'abord le mélange eau/tampon/Hb et potentiellement NP et on rajoute ensuite la quantité de glutaraldéhyde afin de gélifier.

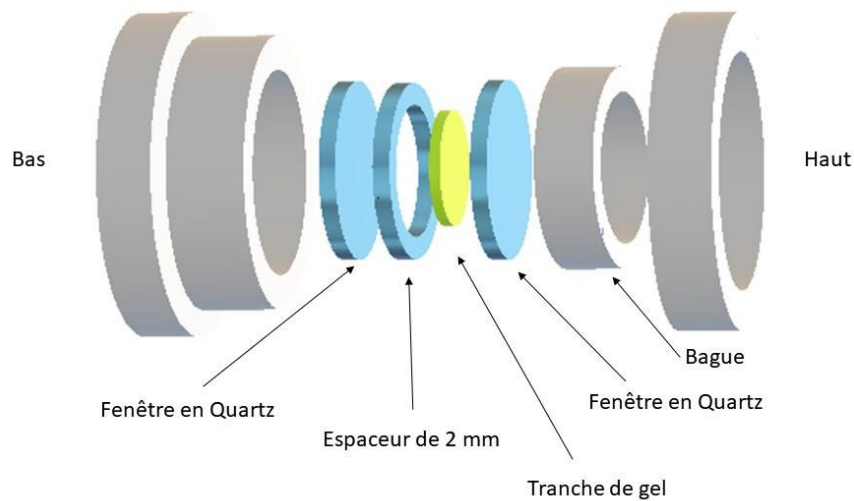


Figure 13 : Schéma des fenêtres en quartz utilisé pour les gels en DNPA. Tiré de <sup>13</sup>.

Ces cuves sont ensuite placées sur un passeur d'échantillon thermostaté à 25°C. Une expérience a été faite pour étudier un gel en température tous les 10°C de 25°C à 75°C. Après chauffage à 85°C, un spectre a été mesuré à 25°C pour vérifier l'état de l'échantillon.

Chaque échantillon a été passé avec quatre configurations (longueur d'onde du faisceau incident et distance échantillon/détecteur) afin d'étudier la gamme de q. Les données ont ainsi été acquises pendant 10 minutes pour chaque configuration.

Les données brutes ont alors été traitées avec la procédure suivante à l'aide du logiciel PASINET :

- intégration angulaire des spectres 2D à partir de la position du faisceau incident ;
- soustraction du signal des supports et du bruit de fond ;
- normalisation des hétérogénéités de réponse du détecteur par la courbe d'un échantillon de référence (eau).

Tout ce travail est résumé par l'équation 1 avec I, intensité ; éch, échantillon ; T, transmission ; e, épaisseur ; CV, cuve vide ; bdf, bruit de fond.

$$I = \frac{\frac{I_{éch} - I_{bdf}}{T_{éch} e_{éch}} - \frac{I_{CV} - I_{bdf}}{T_{CV} e_{CV}}}{\frac{I_{H_2O} - I_{bdf}}{T_{H_2O} e_{H_2O}} - \frac{I_{CV} - I_{bdf}}{T_{CV} e_{CV}}}$$

(éq.1)

Après ce traitement, on fusionne les différentes configurations et on soustrait la diffusion incohérente par itération jusqu'à obtention d'un spectre conforme.

### 3) Diffusion de rayons X aux petits et grands angles

Les expériences de DXPGA ont été effectuées sur la ligne SWING du synchrotron Soleil<sup>14</sup>. Le montage de la ligne est analogue à celle de la diffusion de neutrons (Figure 12). Les échantillons sont préparés dans des capillaires en verre borosilicaté de 2 ou 3 mm comme indiqué sur la Figure 10. L'énergie du faisceau était de 16 keV et deux distances échantillon-détecteur ont été utilisées : 6,20 m pour les grands angles et 0,52 m pour les petits angles.

La gamme de  $q$  totale analysée est comprise entre  $3 \cdot 10^{-3}$  et  $2,5 \text{ \AA}^{-1}$ . Pour chaque échantillon, les conditions sont, pour les grands angles 200 mesures avec 250 ms de mesure, séparées de 125 ms pour chaque mesure, et pour les petits angles, 200 fois avec 125 ms de mesure et 63 ms de séparation pour chaque mesure.

Les résultats ont été traités avec Foxtrot :

- intégration angulaire des spectres 2D à partir de la position du faisceau incident ;
- soustraction du signal des supports et du bruit de fond ;
- application d'un facteur pour ajuster le signal en WAXS sur la bosse de l'eau, qui est ici prise comme référence ;
- fusion des données aux petits et grands angles.

## VII- Caractérisation par prises de clichés

### 1) Cryo-microscopie électronique en transmission

Les échantillons tels que décrits dans le chapitre 2 ont été préparés. Une goutte de  $4 \mu\text{L}$  a été préparée sur une grille de carbone qui a été plongée dans de l'éthane liquide. L'échantillon a alors été placé dans un cryomicroscope électronique à transmission JEOL 2010F, situé au Laboratoire de physique des solides (Université Paris-Saclay). Les échantillons ont été observés avec un grossissement de 60 000. Les images ont été prises par une caméra CCD Gatan Ultrascan 4K.

### 2) Microscopie électronique à balayage

Les échantillons tels que décrits dans le chapitre 3 ont été obtenus en les gelant dans de l'azote liquide, puis en lyophilisant pendant une nuit. Les échantillons ont été alors récupérés et ont été déposés sur des scotchs carbone. Les échantillons sont métallisés à l'or sur une épaisseur de 5 nm.

Les expériences ont été effectuées sur un microscope Ultra 55 Carl Zeiss, situé au LEDNA (NIMBE, CEA Saclay). La tension utilisée est comprise entre 3 et 10 kV. Les images sont obtenues à partir des électrons rétrodiffusés.

## VIII- Dynamique par diffusion élastique et inélastique de neutrons

Les expériences ont été effectuées sur la ligne IN6-Sharp de l'Institut Laue. Les échantillons tels que décrits au chapitre 4 ont été préparés dans un tube en aluminium spécifique ayant un volume de 8 mL. Toutes les expériences ont été faites en milieu deutéré afin de pouvoir avoir un rapport signal sur bruit correct.

Les spectres ont été mesurés en utilisant une longueur d'onde incidente de 5,12 Å, soit une résolution de 70 µeV. Les angles vont de 0,26 à 2,05 Å<sup>-1</sup>.

Pour la mesure du déplacement carré moyen, les mesures ont été réalisées avec un cryostat à hélium, en faisant une acquisition de 4 K à 298 K tous les 2 K pendant 5 minutes. Les différents spectres ont été normalisés par rapport au spectre à 4 K. Chaque point a été mesuré par le logiciel QENSH.

La mesure de la densité d'états vibrationnels a été faite à 298 K pour chaque échantillon, le solvant seul (D<sub>2</sub>O) et la cuve vide. Les échantillons ont été mesurés quelques heures chacun, le temps nécessaire pour obtenir un signal non bruité. La densité d'états vibrationnels a été mesurée pour les deux échantillons et traitée avec l'aide des logiciels de la ligne. On a alors mesuré la densité d'états vibrationnels de l'hémoglobine seule en utilisant l'équation 2 :

$$g_{Hb}(\omega) = (g_{\text{échantillon}}(\omega) - g_{CV}(\omega)) - x \cdot (g_{D_2O}(\omega) - g_{CV}(\omega)) \quad (\text{éq.2})$$

Pour le gel, il n'est pas possible de séparer les hydrogènes de l'hémoglobine de celle du glutaraldéhyde donc on utilise l'équation 3 :

$$g_{Hb+GTA}(\omega) = (g_{\text{échantillon}}(\omega) - g_{CV}(\omega)) - y \cdot (g_{D_2O}(\omega) - g_{CV}(\omega)) \quad (\text{éq.3})$$

x et y sont mesurés à partir de la concentration volumique d'hydrogène pour chaque échantillon en utilisant la densité respective de chaque composant (Hb, D<sub>2</sub>O, GTA).

## IX-Caractérisation du gel par rhéologie

Les expériences de rhéologie ont été faites au Laboratoire Léon Brillouin. Le rhéomètre utilisé est de la marque Anton Paar MC320. Les échantillons décrits au chapitre 3 ont été directement préparés sur le module plan-plan de 12 mm de diamètre pour une épaisseur de 1 mm comme indiqué sur la Figure 14. Le volume était de 125 µL, ce qui donne bien un disque de 12 mm de diamètre et 1 mm d'épaisseur.

Le module est régulé en température à 25°C. Les mesures en oscillation décrites au chapitre 3 ont été effectuées à une fréquence de 10 rad/s et avec une amplitude de 0,5 %. Entre la mise en contact du mélange avec le glutaraldéhyde et le lancement de la mesure, le temps nécessaire au rapprochement, une minute environ, ne peut servir à la mesure. Autour de l'échantillon, des chiffons mouillés permettent de créer une atmosphère saturée en eau afin de limiter les phénomènes de séchage ont été mis. Chaque échantillon est mesuré entre une et deux heures, jusqu'à temps que le phénomène de séchage soit apparent. Les mesures présentées sont coupées afin de ne présenter que le phénomène de gélification et non le phénomène de séchage.



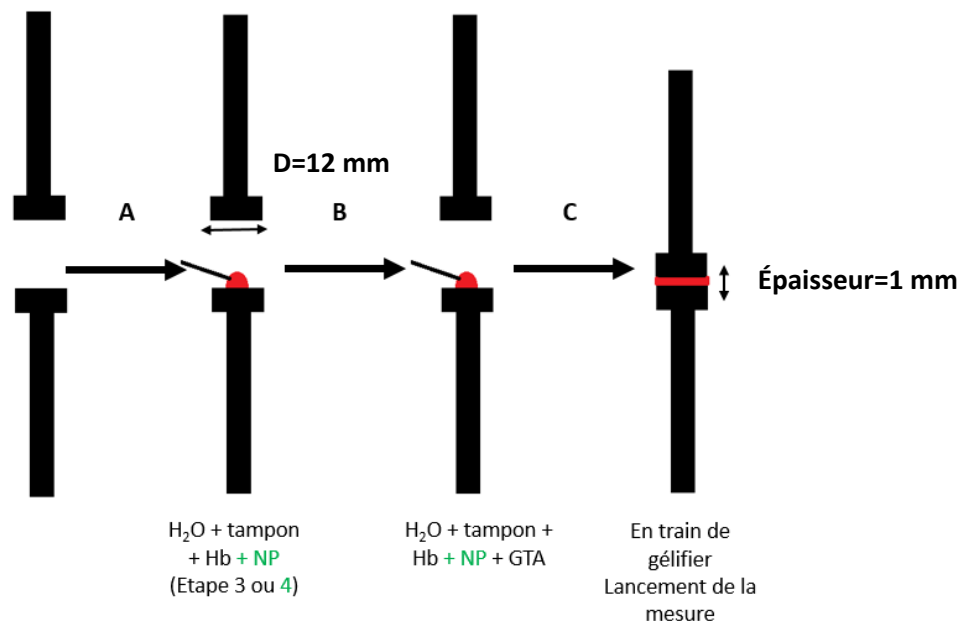


Figure 14 : Préparation du gel

A : ajout des solutions préparées à l'étape 3 de la Figure 2 si gel sans nanoparticules ou à l'étape 4 après agitation sur roue pendant 2h si le gel avec nanoparticules de la Figure 2

B : ajout de la quantité de glutaraldéhyde par trois aspirations/rejets de la solution afin d'homogénéiser la solution

C : le mélange gélifie pendant que le deuxième plan se rapproche pour donner une épaisseur de 1 mm et lancement de la mesure.

## Bibliographie

- (1) Perutz, M. F. Preparation of Haemoglobin Crystals. *Journal of Crystal Growth* **1968**, 2 (1), 54–56. [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(68\)90071-7](https://doi.org/10.1016/0022-0248(68)90071-7).
- (2) Jelkmann, W.; Baufer, C. What Is the Best Method to Remove 2,3-Diphosphoglycerate from Hemoglobin? *Anal Biochem* **1976**, 75 (2), 382–388. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90092-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90092-0).
- (3) Banerjee, R.; Alpert, Y.; Leterrier, F.; Williams, R. J. Visible Absorption and Electron Spin Resonance Spectra of the Isolated Chains of Human Hemoglobin. Discussion of Chain-Mediated Heme-Heme Interaction. *Biochemistry* **1969**, 8 (7), 2862–2867.
- (4) Meng, F.; Alayash, A. I. Determination of Extinction Coefficients of Human Hemoglobin in Various Redox States. *Anal Biochem* **2017**, 521, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.01.002>.
- (5) Glasoe, P. K.; Long, F. A. USE OF GLASS ELECTRODES TO MEASURE ACIDITIES IN DEUTERIUM OXIDE <sup>1,2</sup>. *J. Phys. Chem.* **1960**, 64 (1), 188–190. <https://doi.org/10.1021/j100830a521>.
- (6) Nonoyama, A.; Garcia-Lopez, A.; Garcia-Rubio, L. H.; Leparç, G. F.; Potter, R. L. Hypochromicity in Red Blood Cells: An Experimental and Theoretical Investigation. *Biomed Opt Express* **2011**, 2 (8), 2126–2143. <https://doi.org/10.1364/BOE.2.002126>.
- (7) Integrating Spheres <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/support/analysis-basics/fundamentals-uv/integratingspheres.html> (accessed Dec 17, 2020).
- (8) Barahona, F.; Geiss, O.; Urbán, P.; Ojea-Jimenez, I.; Gilliland, D.; Barrero-Moreno, J. Simultaneous Determination of Size and Quantification of Silica Nanoparticles by Asymmetric

- Flow Field-Flow Fractionation Coupled to ICPMS Using Silica Nanoparticles Standards. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (5), 3039–3047. <https://doi.org/10.1021/ac504698j>.
- (9) Marichal, L.; Giraudon-Colas, G.; Cousin, F.; Thill, A.; Labarre, J.; Boulard, Y.; Aude, J.-C.; Pin, S.; Renault, J. P. Protein-Nanoparticle Interactions: What Are the Protein-Corona Thickness and Organization? *Langmuir* **2019**, *35* (33), 10831–10837. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01373>.
- (10) Devineau, S. Adsorption des protéines sur les nanomatériaux. Biochimie et physico-chimie d'un nouveau stress. phdthesis, Université Paris Sud - Paris XI, 2013.
- (11) Ligne SAMBA <https://www.synchrotron-soleil.fr/fr/lignes-de-lumiere/samba> (accessed Nov 15, 2020).
- (12) Ligne DISCO <https://www.synchrotron-soleil.fr/fr/lignes-de-lumiere/disco> (accessed Nov 15, 2020).
- (13) Maire du Poset, A. Hydrogels de Polygalacturonate Réticulés Par Les Ions Fe<sup>2+</sup> : Impact Du Mode d'association Local Sur Les Mécanismes de Gélification, Contrôle de La Structure Multi-Échelle et Des Propriétés Mécaniques. These de doctorat, Bourgogne Franche-Comté, 2018.
- (14) Ligne SWING <https://www.synchrotron-soleil.fr/fr/lignes-de-lumiere/swing> (accessed Nov 15, 2020).

# Chapitre 6 :

## Conclusions et ouvertures

Cette thèse a permis de répondre en grande partie aux questions qui avaient été définies sur les gels d'hémoglobine réticulée par le glutaraldéhyde dopés aux nanoparticules de silice Ludox TM-50. Pour cela, de nombreuses techniques ont été utilisées afin de comprendre les règles contrôlant la formation des assemblages, l'activité de l'hémoglobine dans ces assemblages et un soin tout particulier a été pris afin de caractériser les différents niveaux de structuration de l'hémoglobine et des assemblages. Enfin, une étude exploratoire de la dynamique de l'hémoglobine dans les gels a été menée. Concernant la compréhension de l'adsorption de l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice, cette étude était primordiale afin de compléter ce qui était déjà connu avant de passer aux gels nanocomposites.

Il a été montré notamment que la forme de l'hémoglobine a une action sur l'adsorption en plus d'autres phénomènes comme le pH ou la deutération. De plus, l'hémoglobine conserve sa coopérativité et l'affinité pour le dioxygène augmente avec l'adsorption. Si la structure de la globine est conservée, une faible perte de la structure hélicoïdale et une légère restructuration de la structure tertiaire a été constatée. L'apport de cette étude tient dans l'étude du fer et de l'hème qui n'avait jamais été faite. Le fer conserve ainsi sa distribution électronique tandis qu'on a relevé un changement de conformation dans les chaînes latérales de l'hème ayant engendré une déformation de la poche. Ces modifications seraient à l'origine du changement d'affinité. Et enfin, la structuration des assemblages a été élucidée : les hémoglobines adsorbées sur des nanoparticules peuvent être assimilées à des sphères dures au contact les unes avec les autres.

Concernant les assemblages Hb/NP/GTA, on a vu comment utiliser les concentrations des différentes espèces en jeu afin de moduler l'état du système à la fin, notamment pour obtenir des gels ayant les modules de conservation et un temps de gélification voulus. Nous avons alors mené des études qui n'avaient encore jamais été effectuées sur des gels de protéine obtenus par réticulation chimique. Dans le cas de l'hémoglobine, on a ainsi constaté que l'activité de la protéine est perdue une fois le gel obtenu aux concentrations de glutaraldéhyde utilisées. De plus, ceci ne peut pas être expliquée par une modification de la protéine puisque l'hème ne change pas et que la globine, bien que distordue, conserve sa forme et sa structuration. Enfin, la structuration du gel a mis en lumière des fibrilles et une organisation en nid d'abeille. Les études ont montré que les nanoparticules ne causaient aucune modification sur l'hémoglobine autre que celles que l'on souhaitait (paramètre de la gélification).

Enfin, la dynamique de l'hémoglobine dans le gel a été abordée. Les études que nous avons faites semblent dire que l'hémoglobine conserve sa flexibilité, notamment en conservant sa transition dynamique. Des différences ont bien été repérées, mais elles sont usuelles des réseaux des gels et ne pourraient donc avoir aucun lien avec la perte de l'activité dans le gel.

Différentes expériences ont été proposées dans les différents chapitres afin de compléter les études qui ont déjà été faites. Toutefois, à partir des résultats actuels, il est aussi possible de proposer de nouvelles expériences afin d'aller plus loin dans le potentiel des gels.

Ainsi, la caractérisation des propriétés électriques du gel a été commencée au moment du stage de Sonia Domingues (IUT de Chimie d'Orsay). Des expériences en EIS (Spectroscopie d'Impédance Electrochimique) ont été effectuées, celles-ci permettant de calculer l'impédance totale des gels. La Figure 1 présente ainsi des courbes mesurées en EIS au jour 0 pour différentes concentrations d'oxyHb.

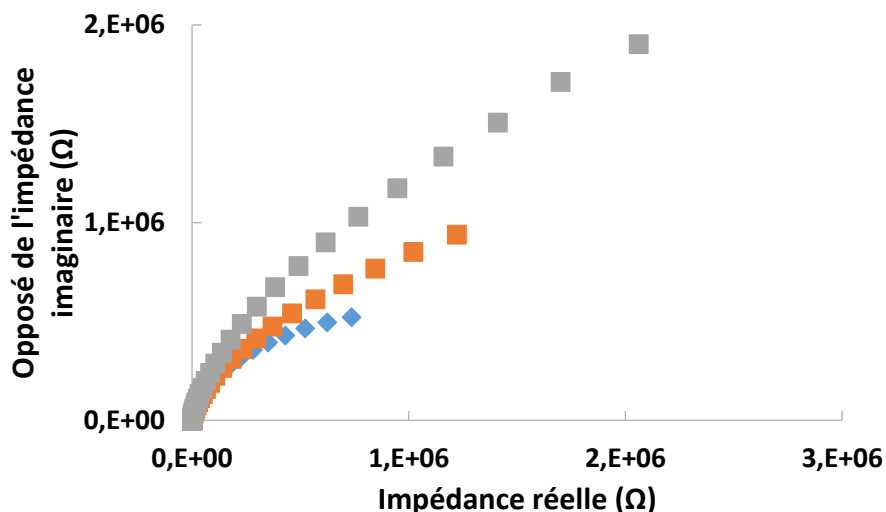


Figure 1 : Courbes EIS de gels à 0,3% de GTA, d'oxyHb à :  
2,5 mM (gris), 5 mM (orange) et 7,5 mM (bleu).  
L'acquisition a été faite juste après gélification (Jour 0) à pH 7, tampon phosphate 100 mM.

Des courbes intensité-potentiel ont aussi été mesurées à l'aide d'un source-mètre. (Figure 2).

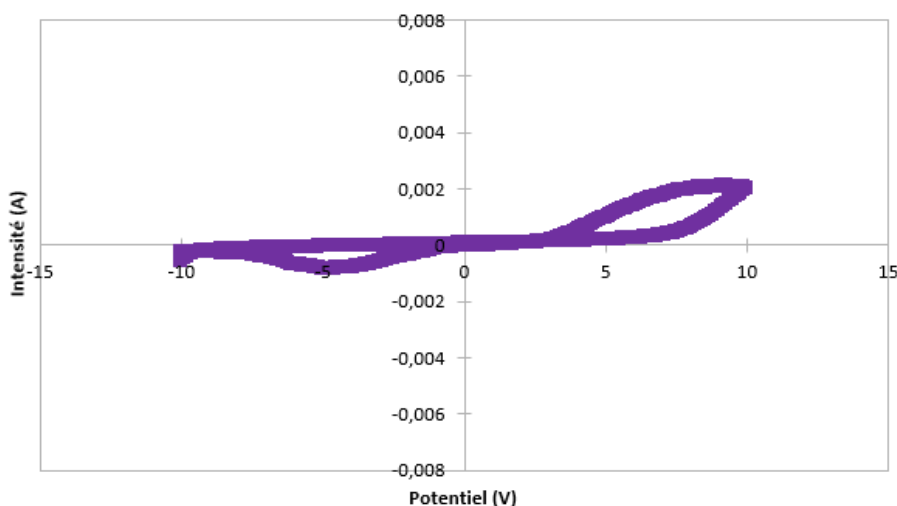


Figure 2 : Courbes intensité-potentiel du gel à 2,5 mM d'oxyHb, 0,3% de GTA au jour 4.

Au final, les principaux résultats obtenus sont que :

- il a été possible de surveiller le vieillissement des gels à l'aide de ces mesures, la conductivité s'améliorant avec le temps ;
- la forme de l'hémoglobine (oxyHb ou métHb) modifie la conductivité ;
- le cyclage électrochimique permet de stocker des charges dans le gel.

Ces tests mériteraient d'être complétés et analysés, raison pour laquelle nous ne présentons pas les résultats dans cette thèse.

En outre, si les gels ont eu leur rhéologie étudiée en s'intéressant à leur module de conservation et de perte durant la gélification, il serait intéressant de mener les expériences en fonction de la fréquence et de la contrainte sur les gels à l'équilibre. Toutefois, il faudrait résoudre les problèmes de séchage en utilisant un système imposant une atmosphère saturée en humidité. En parallèle, il serait important de mener des mesures en compression<sup>1</sup> et en extension<sup>2</sup> des gels afin de voir les limites de leur élasticité.

En plus de ces études supplémentaires sur notre système, il est possible d'aller plus loin dans la fonctionnalisation de nos gels. En effet, l'intérêt principal de ce travail a été de montrer qu'il est possible d'obtenir des gels de protéine nanocomposites. L'étape d'après serait de doper les gels avec des nanoparticules ayant différentes formes et/ou composition afin de leur donner de nouvelles propriétés. Comme on l'a vu dans l'introduction, l'utilisation des nanoparticules avec leur grande réactivité donne beaucoup de propriétés que les gels ne peuvent pas avoir normalement. Comme on a vu, cela permettrait notamment de moduler les propriétés rhéologiques ou de donner des capacités d'adsorption de liquide plus grande aux gels. Il est donc possible que d'autres doctorants/stagiaires viennent dans l'équipe afin d'étudier des gels nanocomposites fonctionnels en utilisant des nanoparticules plus complexes.

Cela a déjà été tenté dans l'équipe. On a ainsi effectué des études sur des gels d'hémoglobine dopés aux nanotubes d'oxyde de zinc au moment du stage d'Amine Khitous (Master de Chimie-Physique à l'Université Paris-Saclay). Cela nous a notamment appris qu'au contact des nanotubes de ZnO, l'hémoglobine se déposait pour certaines conditions de pH et de tampon. Ainsi, la Figure 3 présente un mélange Hb/ZnO après centrifugation. On voit au fond du tube, le dépôt des nanoparticules en blanc et au-dessus, en rouge, l'hémoglobine qui a précipité.

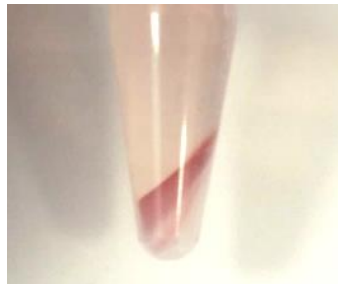


Figure 3 : Mélange hémoglobine/nanotubes ZnO après centrifugation (ZnO au fond du tube en blanc et Hb au-dessus en rouge).

On en a conclu que les nanotubes relarguaient des ions zinc qui causaient ces dépôts. L'utilisation d'autres nanomatériaux impose l'utilisation d'éléments non dénaturants pour les protéines. Il est donc primordial d'étudier l'effet du nanomatériel sur la protéine et de trouver les conditions ne modifiant pas la protéine. L'étude a montré qu'une fois les bonnes conditions trouvées, il est tout à fait possible de doper les gels. La Figure 4 présente ainsi le diagramme de gélification pour une concentration de 2,5 mM d'oxyhémoglobine pour différentes concentrations de glutaraldéhyde et de nanotubes d'oxyde de zinc.

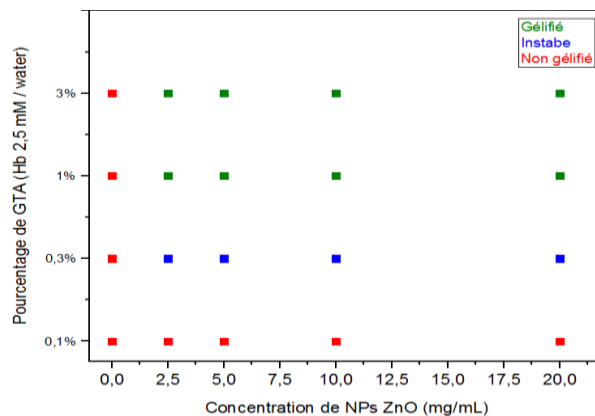


Figure 4 : Diagramme de gélification de l'oxyhémoglobine pour différentes concentrations de glutaraldéhyde et de nanotubes d'oxyde de zinc, pH 7 tampon bis-tris.

Un compromis pour éviter que les protéines soient abimées par les nanoparticules pourrait être l'utilisation des nanoparticules Turbobeats<sup>3</sup>, composé d'un cœur métallique (cobalt dans notre cas) recouvert de carbone ou de silice. En utilisant des Turbobeats avec une couche de silice, cela permet de retomber sur l'interaction hémoglobine/silice bien étudiée tout en utilisant des nanoparticules magnétiques. Des tests sur des gels d'albumine de sérum bovin dopés à des Turbobeats ont montré que les gels possédaient un magnétisme fort permettant d'utiliser des aimants pour déplacer le gel (Figure 5). Cette expérience montre bien qu'il est possible de fonctionnaliser les gels de protéines nanocomposites.

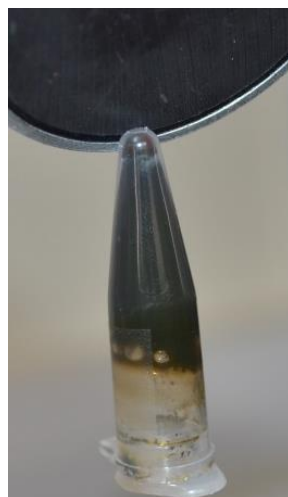


Figure 5 : Gel de BSA dopé aux Turbobeats suspendu par l'attraction d'un aimant.

Une possibilité pour garder l'activité de l'hémoglobine serait de faire des gels conjugués d'albumine et d'hémoglobine. Le but alors serait de faire le gel en deux étapes. Une possibilité serait de faire un gel d'albumine, puis de faire rentrer l'hémoglobine libre par migration dans le gel. Une autre possibilité serait de faire de la chimie click sur l'albumine pour qu'elle puisse réagir spécifiquement avec d'autres protéines d'albumine, de rajouter de l'hémoglobine dans le mélange avant de lancer la gélification. Cela permettrait de donner ainsi un gel d'albumine possédant dans des mailles amples des protéines d'hémoglobine non réticulée et ayant encore une activité. Ces solutions permettraient de surmonter le problème de la gélification sur l'activité des protéines.

Enfin, une autre possibilité serait l'intégration de photochrome permettant ainsi de donner des propriétés optiques aux gels. Ainsi, un diaryléthène peut être intégré à une phase solide et donner des propriétés de fluorescence<sup>4</sup>. Ainsi, le (2Z)-2,3-Bis(2,4,5-triméthyl-3-thiényl)-2-butènedinitrile abrégé en CMTE oscille entre une forme jaune et rouge<sup>5</sup> et a été intégré avec succès à des films et nanoparticules de protéine, leur assurant de nouvelles propriétés optiques. Les gels ainsi formés pourraient alors servir de commutateur optique. Cela serait possible vu que l'hémoglobine a des zones dans l'UV dans lesquelles elle n'absorbe que peu.

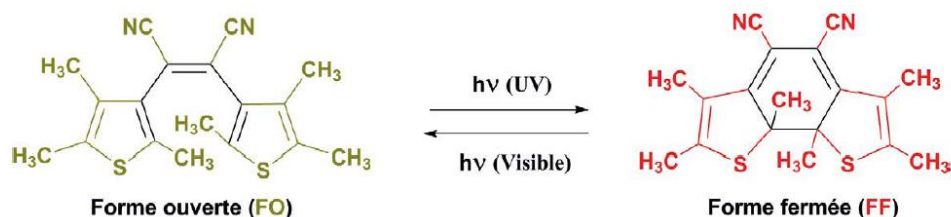


Figure 6 : Equilibre entre les deux formes du (2Z)-2,3-Bis(2,4,5-triméthyl-3-thiényl)-2-butènedinitrile ou CMTE. Tiré de <sup>5</sup>.

Pour aller plus loin, il serait intéressant d'apporter cette fonction directement par la molécule qui réticule. Ainsi, cela est possible en associant :

-une fonction azobenzène qui oscille entre le jaune et le rouge suivant la longueur d'onde (de la même façon que dans la Figure 6) et qui garde son activité même intégrée dans un support solide<sup>6</sup> ;

-des fonctions benzaldéhyde, extrêmement réactive avec beaucoup de fonctions et pouvant réticuler et donner des gels<sup>7</sup>.

Cela serait possible en utilisant une molécule comme le (E)-4,4'-(Diazène-1,2-diyl)dibenzaldéhyde. L'avantage encore est que le passage de la forme jaune à rouge est déclenché par une lumière dans le visible vers 360 nm dans laquelle l'hémoglobine n'absorbe que peu. Cela permettrait sans doute d'obtenir un gel possédant des propriétés de commutateur optique sans avoir à rajouter un chromophore extérieur au système protéine/réticulant.

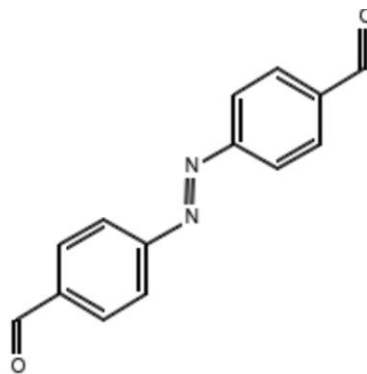


Figure 7 : Le (E)-4,4'-(Diazène-1,2-diyl)dibenzaldéhyde est un azobenzène possédant deux fonctions benzaldéhyde.

Pour terminer, il faudrait étudier la biocompatibilité de nos gels. En effet, si on veut utiliser les gels dans des applications médicales, il est important de comprendre la toxicité de nos gels. L'hémoglobine de par son statut de protéine commune à beaucoup d'espèces donne à penser qu'elle serait relativement inoffensive pour l'organisme, ce n'est pas le cas du glutaraldéhyde et des nanoparticules. Si les gels de protéine à base de glutaraldéhyde semble être sans danger<sup>8</sup>, ce n'est pas le cas des nanoparticules qui ont une toxicité<sup>9</sup>. En effet, l'exposition aux nanoparticules engendre de façon sûre des effets négatifs sur la santé (ANSES, 2014). A très fortes concentrations en nanoparticules atmosphériques, il y a une augmentation des risques de cancers ainsi que des maladies respiratoires et cardiovasculaires<sup>10</sup>. Le risque majeur induit par les nanoparticules est leur internalisation. En effet, elles ont la propriété de passer les barrières biologiques et donc les membranes cellulaires. *In vitro*, l'internalisation est sûre et a été démontrée à plusieurs reprises<sup>11</sup>. Mais *in vivo*, le lien est plus difficile à mettre en œuvre. Formant des couronnes de molécules dans l'organisme notamment avec les protéines comme on a vu, elles développent une nouvelle identité biologique. Combinant une petite taille et ce « passeport » biologique, elles pourraient passer les barrières cellulaires et épithéliales. Leurs effets sont divers<sup>12-14</sup> et la compréhension totale de leur toxicité est toujours mal connue. Pour ce qui concerne les nanoparticules de silice de 20-25 nm, une étude sur des souris a montré qu'elles sont éliminées au bout de deux semaines sans provoquer de toxicité. Ce résultat ne suffit pas pour exclure toute toxicité des gels nanocomposites.

Il est donc nécessaire d'étudier la biocompatibilité des gels d'hémoglobine sans nanoparticules pour s'assurer de ce qui a été déjà constaté par Ma et collaborateurs<sup>8</sup> et des gels nanocomposites afin de s'assurer que leur ajout ne provoque un danger en se dispersant dans l'organisme vivant.

## Bibliographie

- (1) Liu, J.; Li, Z.; Lin, Q.; Jiang, X.; Yao, J.; Yang, Y.; Shao, Z.; Chen, X. A Robust, Resilient, and Multi-Functional Soy Protein-Based Hydrogel. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2018**, *6* (11), 13730–13738. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01450>.
- (2) Wu, J.; Li, P.; Dong, C.; Jiang, H.; Bin Xue; Gao, X.; Qin, M.; Wang, W.; Bin Chen; Cao, Y. Rationally Designed Synthetic Protein Hydrogels with Predictable Mechanical Properties. *Nature Communications* **2018**, *9* (1), 620. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02917-6>.
- (3) TurboBeads <http://www.turbobeads.com/> (accessed May 16, 2019).
- (4) Kasatani, K.; Kambe, S. Photochromic Reaction and Fluorescence of Dithienylethenes in the Solid State. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1999**, *122* (1), 11–15. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(99\)00016-7](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(99)00016-7).
- (5) Bon, C.; Piard, J.; Aubert, P.; Giraudon, G.; Yannis, C. Étude d'un Photochrome de La Famille Des Diaryléthènes B-Étude Cinétique (Expérimental). *Bulletin des Physiciens* **2017**, *11*, 619–640.
- (6) Norikane, Y.; Tanaka, S.; Uchida, E. Azobenzene Crystals Swim on Water Surface Triggered by Light. *CrystEngComm* **2016**, *18* (38), 7225–7228. <https://doi.org/10.1039/C6CE00738D>.
- (7) Damiri, F.; Bachra, Y.; Bounacir, C.; Laaraibi, A.; Berrada, M. Synthesis and Characterization of Lyophilized Chitosan-Based Hydrogels Cross-Linked with Benzaldehyde for Controlled Drug Release. *Journal of Chemistry* **2020**, *2020*, 10. <https://doi.org/10.1155/2020/8747639>.
- (8) Ma, X.; Sun, X.; Hargrove, D.; Chen, J.; Song, D.; Dong, Q.; Lu, X.; Fan, T.-H.; Fu, Y.; Lei, Y. A Biocompatible and Biodegradable Protein Hydrogel with Green and Red Autofluorescence: Preparation, Characterization and In Vivo Biodegradation Tracking and Modeling. *Sci Rep* **2016**, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep19370>.
- (9) Nel, A. E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano–Bio Interface. *Nat Mater* **2009**, *8* (7), 543–557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>.
- (10) Rai, P. Multifaceted Health Impacts of Particulate Matter (PM) and Its Management: An Overview. *Environmental Skeptics & Critics* **2015**, *4*.
- (11) Bannunah, A. M.; Vllasaliu, D.; Lord, J.; Stolnik, S. Mechanisms of Nanoparticle Internalization and Transport Across an Intestinal Epithelial Cell Model: Effect of Size and Surface Charge. *Mol. Pharmaceutics* **2014**, *11* (12), 4363–4373. <https://doi.org/10.1021/mp500439c>.
- (12) Chen, Z.; Meng, H.; Xing, G.; Chen, C.; Zhao, Y.; Jia, G.; Wang, T.; Yuan, H.; Ye, C.; Zhao, F.; Chai, Z.; Zhu, C.; Fang, X.; Ma, B.; Wan, L. Acute Toxicological Effects of Copper Nanoparticles in Vivo. *Toxicology Letters* **2006**, *163* (2), 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.10.003>.
- (13) Zhang, X.-D.; Wu, H.-Y.; Wu, D.; Wang, Y.-Y.; Chang, J.-H.; Zhai, Z.-B.; Meng, A.-M.; Liu, P.-X.; Zhang, L.-A.; Fan, F.-Y. Toxicologic Effects of Gold Nanoparticles in Vivo by Different Administration Routes. *Int J Nanomedicine* **2010**, *5*, 771–781. <https://doi.org/10.2147/IJN.S8428>.
- (14) Park, E.-J.; Park, K. Oxidative Stress and Pro-Inflammatory Responses Induced by Silica Nanoparticles in Vivo and in Vitro. *Toxicology Letters* **2009**, *184* (1), 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.10.012>.



## Annexe : Articles publiés

- Marichal, L.; Giraudon-Colas, G.; Cousin, F.; Thill, A.; Labarre, J.; Boulard, Y.; Aude, J.-C.; Pin, S.; Renault, J. P. Protein-Nanoparticle Interactions: What Are the Protein-Corona Thickness and Organization? *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2019**, *35* (33), 10831–10837.
- Sanchez-Guzman, D.; Giraudon-Colas, G.; Marichal, L.; Boulard, Y.; Wien, F.; Degrouard, J.; Baeza-Squiban, A.; Pin, S.; Renault, J. P.; Devineau, S. *In Situ* Analysis of Weakly Bound Proteins Reveals Molecular Basis of Soft Corona Formation. *ACS Nano* **2020**, *14* (7), 9073–9088.

**Titre :** Caractérisation multiéchelle d'assemblages d'hémoglobine : de l'adsorption sur les nanoparticules aux gels nanocomposites

**Mots clés :** hydrogels, assemblages, hémoglobine, nanoparticules, glutaraldéhyde, nanocomposite

**Résumé :** Les gels de protéine nanocomposites sont un sujet encore peu développé dans la littérature malgré de nombreuses applications allant de l'immobilisation d'enzyme aux prothèses en passant par les gels alimentaires. La protéine permet d'assurer la biocompatibilité des gels tandis que l'ajout des nanoparticules a pour but de moduler les propriétés mécaniques des gels.

Nous avons donc décidé de nous intéresser aux gels d'hémoglobine réticulée chimiquement et dopés aux nanoparticules. L'hémoglobine (Hb) a été choisie pour sa grande abondance et ses propriétés de fixation du dioxygène. Les gels seront obtenus par réticulation par le glutaraldéhyde (GTA), un dialdéhyde très réactif. Les gels seront dopés par des nanoparticules de silice (NP) afin de comprendre déjà l'effet sur le gel du dopage par des nanoparticules modèles.

La première partie de la thèse portera sur l'adsorption de l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice afin de lever les dernières inconnues sur ce phénomène déjà étudié. Il sera mesuré les isothermes d'adsorption ainsi que l'activité de l'hémoglobine adsorbée. Les structures de l'hème, de la globine et de l'assemblage Hb/NP seront étudiées avec détails.

Par la suite, les études se porteront sur les gels sans et avec nanoparticules afin d'élucider les effets de la gélification et du dopage respectivement. On déterminera les concentrations en Hb, GTA et NP permettant d'obtenir un gel. Puis, comme pour les assemblages Hb/NP, nous nous intéresserons à l'activité et à la structure de Hb (hème et globine). La structuration du gel sera de plus étudiée. Des études sur les propriétés élastiques des gels seront aussi menées et nous finirons sur la dynamique de la protéine gélifiée. Quand il sera possible, l'effet des concentrations des différents composants sera déterminé.

Pour toutes ces études, il a été utilisé un vaste panel de techniques de caractérisation classique des protéines ou des gels. Beaucoup d'expériences ont été effectuées sur grands instruments (diffusion de rayonnement, spectroscopie d'adsorption X, dichroïsme circulaire). Des techniques plus accessibles comme la résonance paramagnétique électronique, la rhéologie ou la microscopie électronique ont aussi été employées.

Les aspects les plus novateurs de cette thèse ont été l'effet de l'adsorption sur l'hème et la compréhension de la structure de la protéine gélifiée, deux aspects qui n'avaient pas été traités.

**Title :** Hemoglobin assemblies multiscale characterisation: from adsorption on nanoparticles to nanocomposite gels

**Keywords :** hydrogels, assemblies, hémoglobine, nanoparticules, glutaraldehyde, nanocomposite

**Abstract:** Nanocomposite protein gels are still an underdeveloped subject in the literature despite many applications ranging from enzyme immobilization to prostheses to food gels. The protein ensures the gel biocompatibility while the addition of the nanoparticles will modulate the gel mechanical properties. We decided to focus on chemically cross-linked hemoglobin gels doped with nanoparticles. Hemoglobin (Hb) was chosen for its high abundance and its oxygen binding properties. The gels will be obtained by crosslinking with glutaraldehyde (GTA), a very reactive dialdehyde. The gels will be doped with silica nanoparticles (NP) in order to understand the effect of doping with model nanoparticles on the gel. The first part of the work will focus on the hemoglobin adsorption on silica nanoparticles in order to resolve the remaining unknowns on this phenomenon, which has already been studied.

The adsorption isotherms as well as the activity of the adsorbed hemoglobin will be measured. The structures of the heme, globin and the Hb/NP assembly will be studied in details.

Subsequently, works will focus on gels without and with nanoparticles in order to respectively elucidate the effects of gelation and doping.

We will determine the concentrations of Hb, GTA and NP to obtain a gel. Then, as with the Hb/NP assemblies, we will look at the activity and structure of Hb (heme and globin).

The structuring of the gel will also be studied. Works on the gel elastic properties will also be carried out and we will finish on the dynamics of the gelled protein. When possible, the concentration effect for the different components will be determined.

For all these studies, a large panel of conventional technics to characterize proteins or gels was used. Many experiments have been performed in synchrotrons and neutron research centers (radiation scattering, X-ray absorption spectroscopy, circular dichroism). Electronic paramagnetic resonance, rheology or electron microscopy, which are more accessible technics have also been employed.

The most innovative aspects of this work were the effect of adsorption on heme and the understanding of the gelled protein structure, two aspects that had not been addressed until now.