



HAL
open science

Physico-chimie des interactions de plastiques microstructurés avec des protéines ou des peptides modèles par des approches expérimentales et *in silico*

Florent Saudrais

► **To cite this version:**

Florent Saudrais. Physico-chimie des interactions de plastiques microstructurés avec des protéines ou des peptides modèles par des approches expérimentales et *in silico*. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASF028 . tel-04119636

HAL Id: tel-04119636

<https://theses.hal.science/tel-04119636>

Submitted on 6 Jun 2023

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

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

Physico-chimie des interactions
de plastiques microstructurés avec
des protéines ou des peptides modèles par
des approches expérimentales et *in silico*

*Physico-chemistry of interactions between microstructured plastics and
proteins or model peptides by experimental and in silico approaches*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 571, Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie
Graduate School : Chimie. Référent : Faculté des Sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **NIMBE (Université Paris-Saclay, CEA, CNRS)**,
sous la direction de **Serge PIN**, directeur de recherche,
le co-encadrement de **Yves BOULARD**, directeur de recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 18 avril 2023, par

Florent SAUDRAIS

Composition du Jury

| | |
|--|------------------------|
| Claire SMADJA Professeure, Université Paris-Saclay | Présidente |
| Ali ASSIFAOU Maître de conférences HDR, Université de Bourgogne | Rapporteur & Examineur |
| Bertrand FRIGUET Professeur, Sorbonne Université, UMR 8256 | Rapporteur & Examineur |
| Marie CARRIERE Directrice de recherche CEA HDR, Université Grenoble Alpes | Examinatrice |
| Arnaud PARENTY Maître de conférences, Université de Lille | Examineur |
| Chantal PREVOST Chargée de recherche HDR, Sorbonne Université | Examinatrice |

Remerciements

Je remercie d'abord tous les membres de mon jury de thèse : Ali Assifaoui, Bertrand Friguet, Marie Carriere, Arnaud Parenty, Chantal Prevost et Claire Smadja. Merci pour le temps que vous avez accordé à la lecture de mon manuscrit et pour vos questions, remarques et conseils lors de ma soutenance.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Serge Pin et Yves Boulard, pour m'avoir accepté dans ce projet. Ils m'ont introduit à de nombreuses techniques, aidé à interpréter mes résultats, et soutenu pendant des périodes difficiles. Leur encadrement a été essentiel pour le bon déroulement de cette thèse, grâce à leur expertise et leur soutien. Leur complémentarité m'a de plus permis d'apporter à cette thèse une richesse qui n'aurait pas été possible avec un seul directeur.

Je remercie de plus le CEA pour avoir financé ma thèse.

Je remercie particulièrement Jean-Philippe Renault, qui a beaucoup participé à mon travail et a été pour moi comme un troisième directeur de thèse, participant constamment pour enrichir nos discussions. J'adresse aussi des remerciements particuliers à Marion Schvartz dont la thèse, ayant eu lieu en même temps que la mienne et portant sur un sujet adjacent, nous a permis de partager certaines expériences et résultats afin d'aller plus loin que ce que nous aurions pu faire séparément.

Merci à Stéphanie Devineau pour m'avoir initié aux expériences de spectroscopie Raman, et pour avoir consacré du temps à m'expliquer comment traiter les données d'imagerie. Merci également pour sa participation lors de nos expériences au synchrotron, en particulier en dichroïsme circulaire.

Merci à Laura Pieri pour m'avoir appris à synthétiser l'alpha-synucléine, nous permettant de travailler sur une protéine complémentaire à celles que nous avons déjà.

Merci à Jorge Vieira pour m'avoir présenté l'accélérateur linéaire d'électrons, et pour m'avoir permis de l'utiliser régulièrement sous sa supervision.

Merci aux personnels du synchrotron SOLEIL, en particulier à Franck Wein pour son encadrement lors des mesures de dichroïsme circulaire et Frederic Jamme pour son encadrement lors des expériences d'imagerie.

Merci à Guillaume Brotons et à Camille Loupiac pour avoir fait partie de mon comité de thèse et apporté leurs conseils pour le bon déroulement de ma thèse.

Je remercie tous les membres du NIMBE/LIONS pour m'avoir accueilli et accompagné pendant ces années. La variété des connaissances du laboratoire m'a permis de toujours trouver de l'aide pour aborder de nouvelles techniques expérimentales, et je n'aurai pas pu espérer une meilleure ambiance de travail. Merci à Elodie Collard pour son implication dans l'organisation et le bon fonctionnement du laboratoire. Merci à Clémentine Colas pour m'avoir introduit à l'impression 3D et aidé lors des difficultés techniques avec l'imprimante.

Je tiens à remercier tous les membres du thésarium : Marion Callau, Maxime Durelle, Gaël Giraudon-Colas, Lucie Huart, Yanis Levieux-Souid, Marie-Claire Pignié, Estelle Puel, Jade Raimbault et Karol Rakotozandry. Merci non seulement pour votre aide mais aussi pour avoir apporté une bonne ambiance de travail, et l'occasion de se détendre un peu pendant les coups durs.

Je remercie également Mona Rysak pour son excellent travail lors de son stage, qui a fortement aidé au développement des simulations de dynamique moléculaire.

Je remercie enfin les membres de mon entourage. Ma famille, en particulier ma mère Marie et ma sœur Sarah, pour m'avoir accompagné toutes ces années. Mes amis pour m'avoir soutenu et accompagné aux restaurants, en particulier Mae, My-An et Valentin. Merci aussi à ceux qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de ma thèse : les Fluffy Foxes, qui ont toujours été prêts à m'aider pendant les moments les plus difficiles, et mes camarades de Lunar Squad, les meilleurs organisateurs de fêtes en réalité virtuelle.

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| Chapitre 1 - Introduction | 1 |
| 1. Contexte | 1 |
| 1.1. L'importance du plastique dans la société | 1 |
| 1.2. Le devenir des plastiques après utilisation | 3 |
| 1.3. Le vieillissement des plastiques | 6 |
| 1.4. Présentation des micro- et nanoplastiques (MNPs) | 7 |
| 1.5. Les MNPs dans la nature | 9 |
| 1.6. Les études de la toxicité des MNPs | 11 |
| 2. Interactions des plastiques avec l'environnement à différentes échelles | 12 |
| 2.1. L'adsorption de protéines et des peptides sur des surfaces | 12 |
| 2.2. La notion d'éco-corona | 14 |
| 2.3. Formation de la corona protéique | 15 |
| 2.4. Composition de la corona protéique | 17 |
| 2.5. Effets de la corona sur les protéines | 18 |
| 3. Les études par dynamique moléculaire | 20 |
| 3.1. Principe de la dynamique moléculaire | 20 |
| 3.2. Développement et application aux biomolécules | 21 |
| 3.3. Simulation de protéines en présence de polymères | 21 |
| 4. Problématiques abordées par ce travail | 23 |
| 4.1. Comment étudier les interactions de protéines avec des microparticules non chargées ? | 23 |
| 4.2. Comment varie l'affinité des protéines pour les MNPs en fonction des propriétés des protéines et du plastique ? | 23 |
| 4.3. Quels sont les effets des MNPs sur les protéines ? | 24 |
| 4.4. A l'échelle moléculaire, comment se déroule l'adsorption de protéines sur des MNPs ? | 24 |
| 4.5. Quels sont les effets du vieillissement du plastique sur ces interactions avec les peptides et protéines ? | 24 |
| 5. Choix des systèmes étudiés | 25 |
| 5.1. Les peptides | 25 |
| 5.2. L'albumine du sérum bovin | 25 |
| 5.3. L'hémoglobine porcine | 26 |
| 5.4. L' α -synucléine | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 5.5. Le polyéthylène et le polypropylène | 27 |
| Bibliographie | 30 |
| Chapitre 2 – Matériel et Méthodes | 40 |
| 1. Produits chimiques et petits matériels utilisés | 40 |
| 2. Méthodes d'analyse des protéines et des microparticules de plastique | 41 |
| 2.1. Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) | 41 |
| 2.2. Spectroscopie ATR-FTIR | 42 |
| 2.3. Spectroscopie photoélectrique à rayons X (XPS) | 43 |
| 2.4. Spectroscopie Raman | 43 |
| 2.5. Spectrophotométrie UV-visible | 45 |
| 2.6. Turbiscan | 46 |
| 2.7. Spectrofluorimétrie | 47 |
| 2.8. Microfluorimétrie | 48 |
| 2.9. Dynamic Light Scattering (DLS) | 49 |
| 2.10. Dichroïsme circulaire | 49 |
| 3. Plastiques microstructurés utilisés | 50 |
| 3.1. Microparticules de plastique | 50 |
| 3.2. Filtre en polypropylène | 51 |
| 3.3. Vieillessement des microplastiques | 51 |
| 4. Protéines et peptides utilisés | 53 |
| 4.1. Peptides | 53 |
| 4.2. Albumine de sérum bovin (BSA) | 55 |
| 4.3. Hémoglobine | 57 |
| 4.4. Alpha-synucléine | 44 |
| 5. Mise en contact des protéines et peptides avec les plastiques microstructurés | 63 |
| 5.1. Préparation des échantillons | 63 |
| 5.2. Contact avec les microparticules de plastique | 63 |
| 5.3. Contact avec les filtres en PP | 64 |
| 5.4. Contact avec des tubes en PE | 66 |
| 5.5. Pertes sur différents tubes | 68 |
| 6. Mesures d'impact des microparticules de plastique sur les protéines | 68 |
| 6.1. Isothermes d'adsorption | 68 |

| | |
|---|------------|
| 6.2. Tonométrie | 70 |
| 7. Simulations | 75 |
| 7.1. Génération des peptides et de la première nanoparticule de PE | 75 |
| 7.2. Paramètres des simulations et analyse des trajectoires avec la première nanoparticule de PE | 77 |
| 7.3. Génération des nanoparticules de PE pour les études sur HPC | 78 |
| 7.4. Paramètres des simulations et analyse des données avec les nanoparticules de PE sur HPC | 79 |
| Bibliographie | 80 |
| Chapitre 3 – Interactions de protéines modèles avec les microplastiques | 83 |
| 1. Caractérisation des microplastiques | 84 |
| 1.1. Morphologie | 84 |
| 1.2. Structure chimique | 88 |
| 1.3. Homogénéité | 90 |
| 1.4. Surface | 93 |
| 2. Mise en contact | 96 |
| 2.1. Méthode de mise en contact | 96 |
| 2.2. Fragilisation des protéines sur roue | 101 |
| 3. Isothermes d'adsorption des protéines modèles sur des microplastiques | 105 |
| 4. Dispersion des plastiques en solution par les protéines | 111 |
| 5. Etat des protéines dans la corona | 114 |
| 5.1. Imagerie Raman de l'hémoglobine sur des microparticules de plastique | 114 |
| 5.2. Oxygénation de l'hémoglobine adsorbée sur filtre en polypropylène | 127 |
| 5.3. Imagerie de fluorescence de la BSA adsorbée sur les plastiques | 131 |
| 6. Etat des protéines en solution après mise en contact avec les plastiques | 133 |
| 6.1. Suivi de l'agrégation des protéines après la mise en contact | 133 |
| 6.2. Etude de la structure secondaire des protéines dans la dispersion | 136 |
| 6.3. Oxygénation de l'hémoglobine après mise en contact avec les microplastiques | 142 |
| 7. La méthode de mise en contact a-t-elle une influence sur les interactions plastique/protéines ? | 145 |
| 7.1. Déplacement du plastique dans une solution protéique avec une interface air/liquide | 146 |
| 7.2. Circulation d'une solution protéique sur une surface de plastique sans interface air/liquide | 152 |
| Bibliographie | 157 |

| | |
|---|------------|
| Chapitre 4 – Effets du vieillissement des plastiques sur les interactions avec les protéines | 161 |
| 1. Préparation et caractérisation des microplastiques vieillis | 161 |
| 1.1. Caractérisations du vieillissement des plastiques | 162 |
| 1.2. Méthodes de vieillissement testées | 163 |
| 1.3. Caractérisation des plastiques vieillis | 167 |
| 2. Isothermes d’adsorption des protéines modèles sur des microparticules de plastique vieillis | 177 |
| 3. Dispersion des plastiques vieillis en solution par les protéines | 181 |
| 4. Etat des protéines dans la corona | 183 |
| Bibliographie | 190 |
| Chapitre 5 – Etude par simulation des interactions de peptides modèles avec des nanoplastiques | 193 |
| 1. Calculs de dynamique moléculaire sur un système nanoparticule-peptide | 194 |
| 1.1. Premières simulations, systèmes explorés et paramètres utilisés | 194 |
| 1.2. Influence du modèle d’eau sur le peptide | 205 |
| 1.3. Etude de l’influence de la nanoparticule | 216 |
| 2. Des simulations aux expériences sur deux peptides modèles | 231 |
| Bibliographie | 237 |
| Chapitre 6 – Conclusions et Perspectives | 240 |
| Bibliographie | 250 |
| Annexes | 251 |

Chapitre 1 : Introduction

1. Contexte

1.1. L'importance du plastique dans la société

Le terme plastique peut désigner deux types d'objets:

- Les polymères utilisés, généralement avec des additifs, pour fabriquer des objets. Ceci comprend des matériaux comme le polypropylène (PP), le polyéthylène (PE) et le polystyrène (PS).
- D'une façon plus générale, pour désigner tout matériau organique moderne.

Dans le cadre de cette thèse, nous parlerons de plastiques pour désigner uniquement les polymères plastiques.

La première matière plastique découverte est le caoutchouc, utilisé en Amérique du nord avant l'arrivée des européens puis introduit en Europe par Charles Marie de La Condamine en 1736. Le caoutchouc n'a commencé à être vraiment utilisé qu'à partir de 1839, lorsque Charles Goodyear découvre que, en le chauffant avec du soufre, on obtient un matériau élastique¹. Ce matériau sera utilisé pour produire des bottes, des tuyaux, des pneus et de nombreux autres objets du quotidien. La première matière plastique artificielle synthétisée est la Parkésine, présentée en 1862 par Alexander Parkes dans le cadre de l'Exposition Internationale de Londres². La Parkésine, produite en traitant de la cellulose avec de l'acide nitrique et un solvant (comme une huile animale), a été très utilisée dans la fabrication de manches de couteau, de jouets et de balles de tennis de table. L'industrialisation de la production du plastique a commencé en 1907 avec la production de la bakélite. Le XX^{ème} siècle verra ensuite le début de la production industrielle de différents plastiques comme le polychlorure de vinyle (PVC), le polypropylène et le polyéthylène, aux propriétés variées et aux applications nombreuses. L'historique de ces découvertes est illustré Figure 1.1.

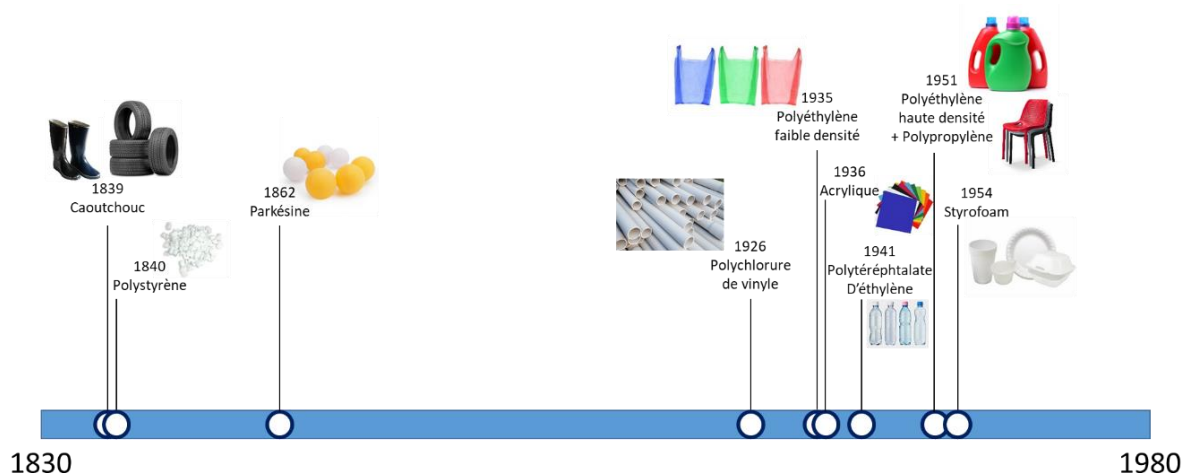


Figure 1.1 : Historique de l'utilisation des plastiques.

La quantité de plastiques produits a depuis augmenté exponentiellement, comme illustré Figure 1.2. En effet, autant de plastiques ont été produits entre 2006 et 2019 (13 ans) qu'entre 1950 et 2006 (56 ans)³. Au total plus de 350 Mt de plastiques sont produites par an⁴.

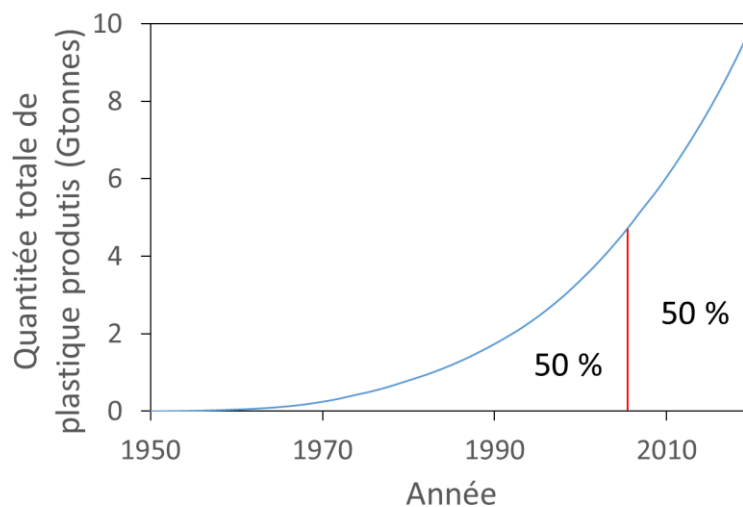


Figure 1.2 : Evolution de la quantité de plastiques produits en milliards de tonnes.
Le trait rouge vertical indique l'année à partir de laquelle la moitié de la quantité de plastiques a été produite (2006).
Données tirées de Plastic Pollution³.

Ils présentent des avantages importants comme leur durabilité. Ainsi, les objets en plastique peuvent généralement être utilisés ou conservés pendant de longues durées sans modification de leurs propriétés. Ces propriétés présentent une grande variété en fonction des plastiques considérés. Certains peuvent par exemple être souples ou rigides en fonction de leur densité, être thermodurcissables ou non, ou être transparents.

Pour améliorer encore ces propriétés, ou pour obtenir des plastiques plus adaptés pour des applications spécifiques, des additifs sont utilisés. Ils correspondent à des composés introduits dans les polymères pour modifier leurs propriétés physiques ou chimiques. Les additifs les plus utilisés sont les plastifiants, correspondant à plus de la moitié des additifs utilisés par l'industrie en 2014⁵. Ils permettent d'augmenter la flexibilité des plastiques en s'insérant entre les chaînes de polymères. Une grande partie des plastifiants actuellement utilisés sont des phtalates, un groupe de produits chimiques composés d'un noyau benzénique et de deux groupements ester placés en ortho. Certains additifs permettent de maintenir les propriétés des plastiques comme les arylamines, des antioxydants qui permettent de protéger les plastiques exposés aux rayonnements UV du soleil. Il existe aussi des stabilisants thermiques, par exemple à base d'huile de soja époxydée, qui permettent de maintenir la forme et la structure du plastique lorsque celui-ci est chauffé. Ces additifs, antioxydants et stabilisants thermiques, sont souvent utilisés pour les emballages alimentaires.

Cette variété des plastiques et des additifs en fait des matériaux particulièrement polyvalents. Des millions de tonnes de plastique sont ainsi produites et utilisées par différents secteurs industriels chaque année, comme présenté Figure 1.3.

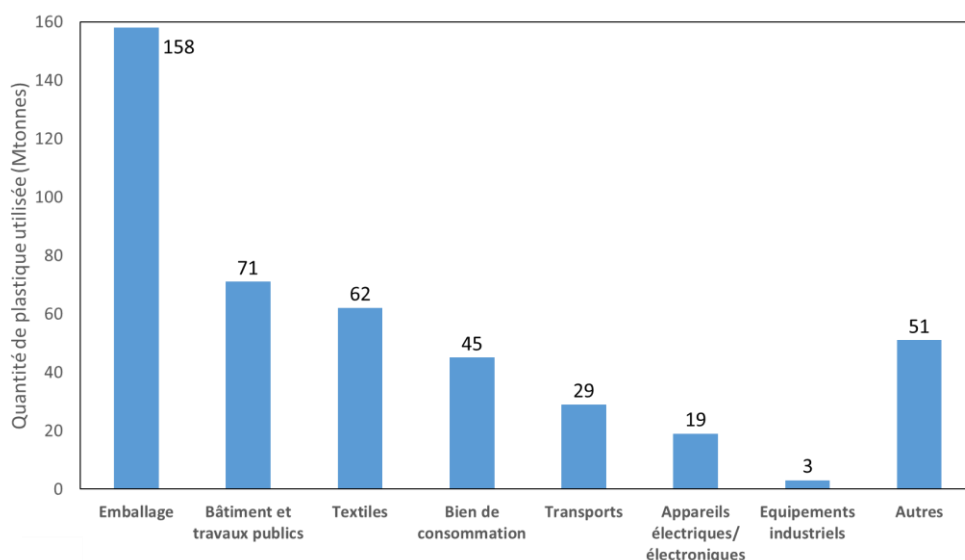


Figure 1.3 : Quantités de plastiques utilisées dans le monde par différents secteurs industriels en 2017. Données tirées de l'Atlas du Plastique 2020⁶.

La principale utilisation des plastiques est pour les emballages, puisqu'il est simple de leur donner une forme adaptée pour contenir n'importe quel objet. De plus, leur durabilité permet de les protéger sur de longues durées. Les plastiques étant hydrophobes, ils sont souvent utilisés dans le secteur du bâtiment comme revêtement ou joints pour étanchéifier les toits, façades ou fenêtres.

1.2. Le devenir des plastiques après utilisation

La longévité des plastiques est l'un de leurs avantages majeurs, mais aussi une source de problèmes. En effet, ils ne sont généralement pas biodégradables, ce qui signifie qu'ils ne peuvent pas être décomposés par les microorganismes présents dans la nature. Ces plastiques peuvent ainsi rester dans l'environnement pendant plusieurs siècles, où ils s'accumulent donc au fil des ans. Leur accumulation sur le long terme est donc une source majeure de pollution. Il a été estimé qu'en 2015, un total d'environ 6300 Mt de déchets plastiques ont été générés⁷. Ces déchets peuvent être traités de plusieurs façons.

La décharge

La majorité des déchets plastiques continue d'être rejetée dans des décharges, comme plus de 75% des déchets plastiques en 2018⁸. Cette méthode n'est toutefois pas soutenable sur le long terme, puisque la longue durée de vie des plastiques combinée avec la forte quantité de déchets produit fait que ceux-ci s'accumulent rapidement, résultant en des montagnes de plastique comme nous pouvons le voir Figure 1.4. Au rythme actuel, il est estimé que 12 000 Mt de plastiques seront dans des décharges d'ici 2050⁷.



Figure 1.4 : Photographie d'une décharge de plastiques.

Ces décharges restent de plus une source de pollution. En effet, les additifs présents sur les plastiques peuvent par exemple passer dans l'eau de pluie puis contaminer les nappes phréatiques⁹. A terme, les décharges peuvent donc affecter la qualité de l'eau potable dans les zones environnantes. En plus de cela, les plastiques en décharge produisent des gaz à effet de serre, contribuant ainsi au réchauffement climatique¹⁰.

La valorisation énergétique

Une partie importante des plastiques, de l'ordre de 16% des déchets produits en 2018⁸, est valorisée énergétiquement. Les produits de la pyrolyse des plastiques peuvent être récupérés pour être convertis en méthanol ou en carburant¹¹. Les plastiques peuvent également être incinérés, et la chaleur ainsi dégagée peut être utilisée pour produire de l'électricité.

Le principal inconvénient de cette méthode est la pollution de l'air qu'elle cause. En effet, lors de leur combustion, les déchets plastiques peuvent relâcher des polluants tels que des dioxines, des furanes et des biphényles polychlorés¹².

Le recyclage

Le recyclage des déchets plastiques consiste à obtenir, à partir d'objets structurés en plastique, des matières premières utilisables pour la fabrication de nouveaux objets. Cette méthode est actuellement privilégiée, puisqu'elle permet à la fois d'éviter la pollution causée par les décharges ou la pyrolyse des plastiques et de manufacturer de nouveaux produits plastiques d'une façon plus économique et écologique. Malgré ces avantages, moins de 9% des déchets plastiques ont été recyclés en 2018⁸. Une raison de ce faible pourcentage est que leur recyclage est plus complexe à mettre en œuvre que leur incinération ou leur dépôt dans des décharges.

Dans un premier temps, il est important de trier les déchets, ce qui nécessite généralement la mise en place de plusieurs étapes. Par exemple, les métaux peuvent être extraits par magnétisme puis les déchets restants peuvent être séparés en fonction de leur densité par flottaison. Dans un second temps, une fois les plastiques triés, ceux-ci peuvent être recyclés par des procédés mécaniques ou chimiques. Le recyclage mécanique consiste à réduire les plastiques en granulés, puis à les mélanger avec un polymère vierge de la même famille et des additifs pour stabiliser le matériau obtenu. Cette méthode est simple et efficace mais elle n'est pas adaptée à certains plastiques (en particulier les fibres), et l'accumulation des additifs limite le nombre de cycles de recyclage auxquels le plastique peut être soumis. Par exemple, le PP est généralement recyclé une unique fois pour obtenir des

vêtements ou des équipements de terrain de jeux¹³. Des procédés de recyclage chimiques sont donc nécessaires pour pouvoir recycler une plus grande partie des déchets. Ces procédés sont utilisables pour des plastiques présentant de faibles enthalpies de dépolymérisation tels que le nylon-6, le polytéréphtalate d'éthylène et le carbonate de propylène¹¹. Les chaînes de ces polymères peuvent être rompues par hydrolyse, transestérification ou transamidation pour revenir aux monomères qui peuvent être utilisés pour préparer de nouveaux objets en plastique. Après ces réactions, il reste nécessaire de séparer les monomères désirés des additifs initialement présents dans les plastiques, ainsi que des autres monomères pouvant être présents lorsque les matériaux recyclés sont des mélanges de plastiques¹¹. Pour que cette purification soit rentable, il est nécessaire que les plastiques recyclés soient relativement purs, ce qui limite une fois de plus les applications de ces méthodes.

Les quantités de déchets plastiques générés ont augmenté de façon exponentielle depuis 1950 avec les quantités de plastiques produits. Initialement la quasi-totalité des déchets étaient disposés dans des décharges, mais leur incinération et leur recyclage sont de plus en plus privilégiés, et des efforts sont faits pour augmenter les proportions de déchets concernés, comme présenté Figure 1.5.

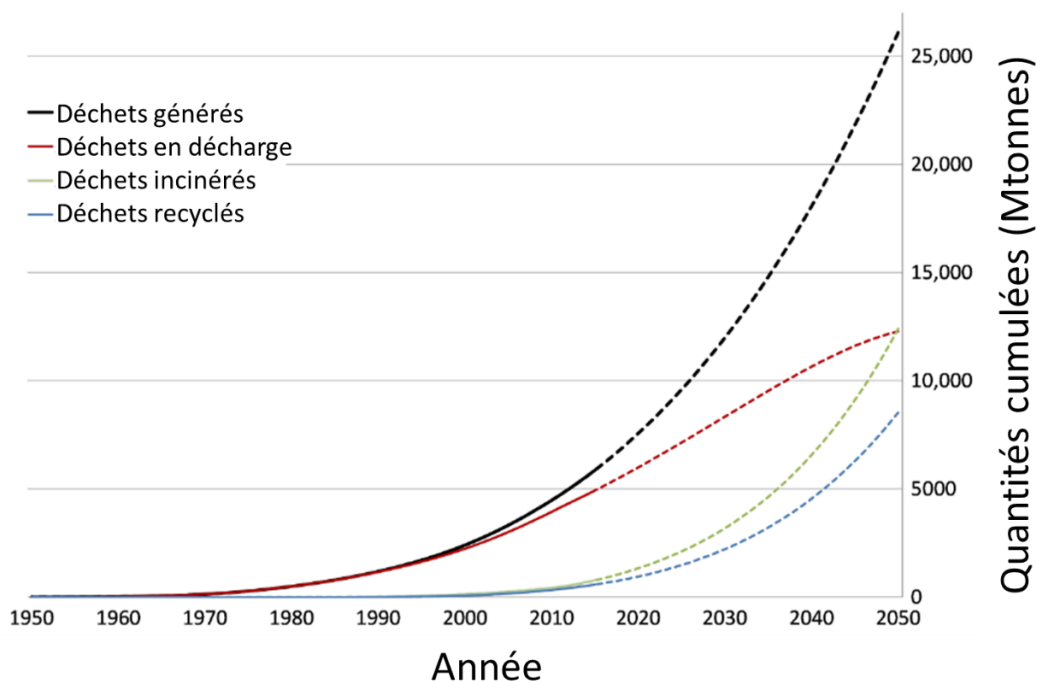


Figure 1.5 : Evolution des quantités totales de déchets plastiques produits et des méthodes de traitements. Les lignes entières correspondent aux données de 1950 à 2015, les lignes en pointillés correspondent aux projections jusqu'à 2050. Adapté de *Production, use, and fate of all plastics ever made*⁷.

Une quantité de plastiques importante mais plus difficile à déterminer précisément est directement rejetée dans la nature, accidentellement ou par négligence. Les objets en plastique étant régulièrement transportés en bateau dans des conteneurs, certains peuvent finir dans l'océan en cas d'accidents ou de mauvaises conditions météorologiques. C'est par exemple ce qui est arrivé au MSC Zoe en janvier 2019, qui a perdu 342 conteneurs dans la mer du nord à cause de vents forts¹⁴. Des quantités importantes de déchets plastiques continuent malheureusement d'être rejetés directement dans la nature. Les quantités de déchets plastiques dans la nature sont telle qu'il s'est formé le « vortex de déchets du Pacifique nord »¹⁵. Il s'agit d'une zone très large, dont la surface est estimée à environ 1,6 millions de km², dans laquelle flotte environ 5 kg/km² de déchets, comme illustré Figure 1.6.



Figure 1.6 : Vue du vortex de déchets du Pacifique nord.

D'autres sources de déchets plastiques dans la nature peuvent être moins impressionnantes car peu visibles, mais non moins problématiques. En particulier, il est estimé que plusieurs milliers de tonnes de microfibrilles de plastique sont rejetées chaque année dans les eaux usées des machines à laver¹⁶.

Globalement, des quantités importantes de plastique finissent ainsi dans la nature. Ces plastiques peuvent alors être soumis à différents environnements pendant des années, ce qui est susceptible de modifier leurs propriétés.

1.3. Le vieillissement des plastiques

Les plastiques présents dans la nature sont soumis à des facteurs environnementaux, comme les rayonnements UV et/ou les forces mécaniques en milieu aquatique, qui causent leur vieillissement. L'énergie apportée par les rayonnements UV et l'énergie thermique peuvent causer le vieillissement par différentes voies. Les voies de vieillissement du PE et du PP sont respectivement présentées Figure 1.23 et Figure 1.24. D'une façon générale, les principaux effets de ces vieillissements chimiques sont l'oxydation du polymère, formant par exemple des groupements hydroxyle, carboxyle ou ester, et la rupture de liaisons¹⁷.

Le vieillissement des plastiques peut également modifier leur structure cristalline¹⁸. Ces changements de structure dépendent du mode de vieillissement du plastique, par exemple un vieillissement thermique peut augmenter le taux de cristallinité du plastique par recuit. Ces changements de structure peuvent alors affecter les propriétés mécaniques des plastiques, les rendant ainsi potentiellement plus rigides et cassants.

Ces modifications favorisent l'adsorption de composés polaires et apolaires sur les plastiques vieillis, et ce par des mécanismes différents¹⁹. Dans le cas des composés polaires, le vieillissement des plastiques peut permettre la formation de liaisons hydrogène. Dans le cas des composés apolaires, ce phénomène est principalement dû au changement de l'agencement des chaînes de polymère qui ralentit la cinétique de désorption.

Les ruptures de liaisons chimiques causées par le vieillissement, ainsi que les dégradations causées par les forces mécaniques appliquées au plastique, ont pour conséquence la formation de particules de

plastiques les nanofeuillets et microfouillets sont instables, se repliant pour former des tubes, tandis que les fibres et particules sont stables à l'échelle microscopique et nanoscopique.

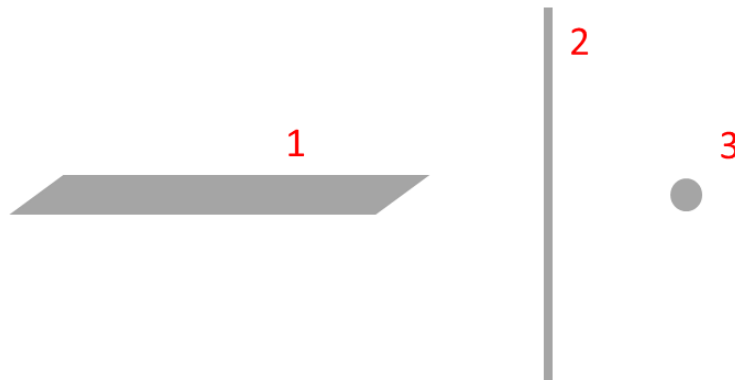


Figure 1.8 : Schématisation des différents types de nano-objets en fonction du nombre de dimensions nanoscopiques. De gauche à droite, un nanofeuillet (1 dimension nanoscopique), une nanofibre (2 dimensions nanoscopiques) et une nanoparticule (3 dimensions nanoscopiques).

Une propriété importante des MNPs est leur grande surface spécifique par rapport aux objets macroscopiques. La surface spécifique d'un matériau correspond à sa surface par unité de masse. Pour un matériau sphérique de masse volumique ρ et de diamètre d , la surface spécifique S est donnée par l'équation 1 :

$$S = \frac{6}{\rho \times d} \quad (eq. 1)$$

Nous remarquons que cette surface spécifique est inversement proportionnelle au diamètre des particules, d'où les fortes valeurs observées dans le cas des micro- et nanoparticules. Cette grande surface spécifique est à l'origine de la plupart des propriétés caractéristiques des MNPs. En effet, les plastiques ne sont généralement pas chimiquement actifs, leurs interactions avec d'autres objets vont donc généralement se faire par des phénomènes de surface comme l'adsorption. Les effets causés par ces interactions vont donc être proportionnels à la surface de plastique disponible, qui est particulièrement importante dans le cas des MNPs.

Certains MNPs sont utilisés en industrie, par exemple dans des produits de beauté²² pour modifier leur texture ou servir d'exfoliant. Plus généralement, les MNPs peuvent être utilisés dans divers produits de nettoyage pour leurs propriétés abrasives. Une fois ces produits utilisés puis rejetés, les MNPs qu'ils contiennent sont donc introduits directement dans la nature, on parle alors de MNPs primaires.

Comme présenté à la fin de la partie précédente, des MNPs peuvent également résulter de la dégradation des plastiques macroscopiques²⁰. On parle alors de MNPs secondaires. Comme les quantités de déchets plastiques d'une façon générale, les quantités de MNPs dans la nature augmentent de façon exponentielle depuis plusieurs décennies, comme illustré Figure 1.9.

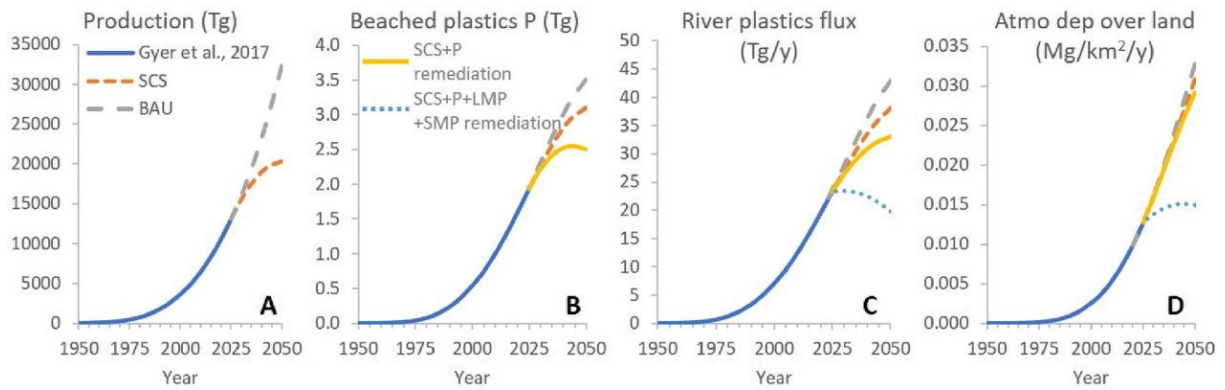


Figure 1.9 : Représentations des estimations de 1950 à 2015 puis des projections de 2015 à 2050, des (A) quantités de plastiques produits, (B) quantités de macroplastiques échoués, (C) flux annuels de plastiques dans les rivières et (D) quantités de microplastiques atmosphériques déposés annuellement. Les courbes bleues pleines correspondent aux estimations de 1950 à 2015. Quatre scénarios sont considérés pour les estimations.

Le scénario 1 correspond à l'absence de mesure pour réduire la production de déchets plastiques (pointillés gris).
Le scénario 2 évalue l'application de mesures réalistes pour limiter la production de déchets plastiques (pointillés oranges).

Le scénario 3 correspond au scénario 2 combiné à un nettoyage annuel de 3% des déchets plastiques macroscopiques dans la nature (trait plein jaune).

Le scénario 4 correspond au scénario 3 combiné à un nettoyage annuel de 3% des déchets plastiques macro-, micro- et nanoscopiques dans la nature (pointillés bleus).

Tiré de A mass budget and box model of global plastics cycling, degradation and dispersal in the land-ocean-atmosphere system²¹.

Ainsi, il est estimé que les quantités de MNPs dans la nature vont continuer d'augmenter, et ce même si des mesures sont prises pour réduire/arrêter notre production de déchets plastiques²¹. Il est donc fondamental de déterminer les effets que ces particules peuvent avoir sur l'environnement.

1.5. Les MNPs dans la nature

Les MNPs se trouvent partout dans la nature, dans les océans²³, même dans les glaces des pôles²⁴. Les principaux plastiques retrouvés dans la nature sont le polyéthylène, le polypropylène, et le polychlorure de vinyle²⁵. Ceux-ci sont rejetés sous forme de déchets ménagers et industriels, parfois directement dans les océans ou dans les sols depuis lesquels ils peuvent rejoindre les nappes phréatiques. En plus d'être présents dans l'eau, des MNPs peuvent être rejetés dans l'atmosphère, en particulier lors de la combustion de matière plastique. Ces particules, une fois dans l'eau ou dans l'atmosphère, peuvent alors être ingérées ou inhalées par les animaux et l'Homme. Ces phénomènes sont résumés Figure 1.10.

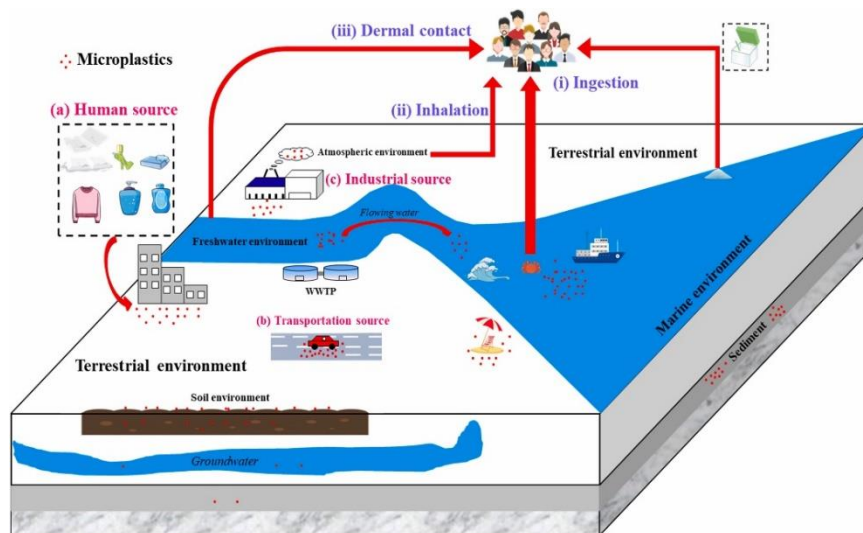


Figure 1.10 : Sources de MNPs dans l'environnement et voies d'exposition à l'Homme.
Tiré de Environmental source, fate, and toxicity of microplastics²⁶.

Les MNPs retrouvés dans la nature peuvent être primaires (microplastiques dans les produits cosmétiques, microfibrilles de plastique dans l'eau de lessive^{27,28}) ou secondaires²⁹. Il est difficile de les doser précisément afin de connaître leur concentration dans la nature à cause de leur faible taille, de leur faible réactivité et de leur diversité³⁰. Certaines méthodes de comptage sont actuellement étudiées, par exemple le couplage de MNPs à des nanoparticules d'or suivi par leur comptage par spectroscopie de masse³¹. Malgré ces développements en cours, la pollution par les MNPs reste plus difficile à gérer que la pollution des plastiques macroscopiques. En effet, tandis que de nombreuses opérations sont réalisées pour extraire avec succès des tonnes de plastiques macroscopiques de la nature avec des filets, les MNPs sont plus difficiles à extraire. De plus, puisque les MNPs ne sont généralement pas visibles directement, il peut être plus difficile de convaincre la population de l'importance de leur extraction.

Les MNPs présents dans l'eau peuvent être ingérés par des organismes marins³² tels que le zooplancton, comme le montre la photo Figure 1.11, ce qui les introduit dans la chaîne alimentaire^{33,34}. Ces planctons peuvent donc être ingérés par des poissons qui seront à leur tour consommés par l'Homme, introduisant ainsi des MNPs dans l'organisme humain. Les MNPs peuvent également être ingérés par l'Homme par d'autres biais, par exemple en se déposant directement sur la nourriture depuis les emballages alimentaires^{35,36}.

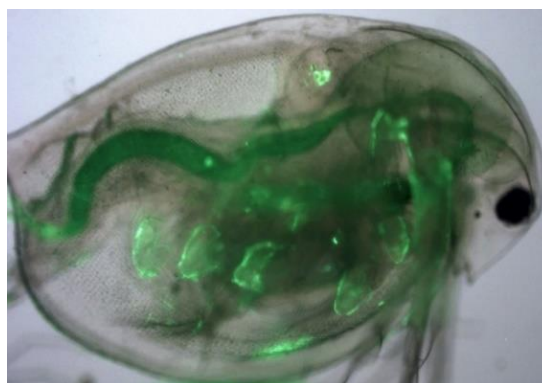


Figure 1.11 : Photographie d'un zooplancton ayant ingéré des MNPs.

A cause de leur omniprésence, de grandes quantités de microplastiques sont ingérées chaque année jusqu'à $4,7 \times 10^3$ particules par personnes via l'eau potable et jusqu'à $3,0 \times 10^7$ par inhalation³⁷. Ces MNPs peuvent de plus s'accumuler en cas d'exposition chronique^{38,39}, il est donc particulièrement important de connaître leurs effets potentiels sur l'organisme.

1.6. Les études de la toxicité des MNPs

Puisque nous savons que les MNPs sont ingérés par l'Homme, il est important de se renseigner sur leur potentielle toxicité, qui est pour le moment peu connue. La toxicité des nanoparticules est un sujet complexe, dont l'étude est rendue encore plus compliquée par le manque de méthodes standards⁴⁰.

Les MNPs peuvent être des vecteurs pour des espèces toxiques, par exemple pour le Pb(II)⁴¹, avec lequel ils ont une forte affinité. Le danger que les MNPs représentent peut donc être influencé par les milieux qu'ils ont traversés, et par le pré-coating qui en résulte. En particulier, les MNPs dans la nature sont souvent couverts par un biofilm composé de différentes bactéries. Ces biofilms augmentent généralement la capacité d'autres polluants à s'adsorber sur ces particules de plastique⁴². Certains MNPs peuvent de plus contenir des additifs toxiques⁴³. Un exemple d'additif dangereux est le bisphénol A, utilisé comme antioxydant dans les plastifiants et le PVC, et qui peut nuire à la fertilité⁴⁴. Suite aux études de la toxicité de ce composé, son utilisation a été interdite en France pour tout contenant alimentaire en 2015. Les phtalates sont un autre groupe de plastifiants utilisés dans le PVC qui peuvent nuire à la fertilité et au développement des nouveaux-nés⁴⁵.

En dehors des considérations au sujet des additifs, des études ont été réalisées sur différents organismes pour étudier les effets de l'ingestion de MNPs. Chez l'humain, il a par exemple été montré que les microplastiques peuvent déclencher des réponses immunitaires^{46,47} ou gêner la digestion⁴⁸. Chez certains poissons, l'ingestion de nanoparticules de polystyrène a causé d'importants changements de comportement⁴⁹, et des microplastiques ont perturbé le développement d'embryons d'oursin⁵⁰. Globalement, une grande variété d'effets a pu être observée suite à l'ingestion de MNPs en fonction de l'organisme, de la nature du plastique et de la taille des particules. La plupart des expériences dans le domaine ne montrent pas d'augmentation de la mortalité chez les organismes ayant ingéré des MNPs, mais les effets observés peuvent tout de même inquiéter et confirmer l'intérêt que nous devons leur apporter.

La petite taille des MNPs leur permet de traverser les parois du corps, ainsi ils peuvent atteindre le cerveau de certains animaux après ingestion orale⁵¹, ou passer dans le reste de l'organisme⁵². Récemment, des microparticules de plastique ont d'ailleurs été détectées dans la veine saphène humaine⁵³. Ceci confirme que des MNPs ingérés peuvent passer dans le sang et interagir avec les protéines sériques, résultant en une toxicité potentielle en cas de modification de la structure et de la fonction de ces dernières.

A l'échelle cellulaire, des effets cytotoxiques des nanoplastiques ont déjà été observés. Il a par exemple été montré que les microparticules de PP, en particulier celles de moins de 20 μm , peuvent réduire de façon significative la viabilité de cellules mononuclées sanguines périphériques⁵⁴. Pour ces systèmes, la perte de viabilité est causée par une augmentation de la quantité de dérivés réactifs de l'oxygène, qui résulte de l'absorption cellulaire de particules de PP. Une étude similaire réalisée sur des microparticules de PVC et d'acrylonitrile butadiène styrène a de plus montré que ces particules peuvent déclencher des réponses immunitaires⁴⁶. Plus précisément, ces particules causent la production d'interleukine 6, qui régule habituellement l'inflammation aigüe, et de facteurs de nécrose

tumorale, qui peuvent induire une nécrose programmée. L'ingestion de MNPs, et leur passage au travers des parois du corps, peut donc représenter un réel danger pour l'organisme.

Bien que ces effets soient connus, les mécanismes physico-chimiques à leur origine restent à ce jour relativement incompris. En effet, les études généralement réalisées sont des observations de toxicologie sur des organismes complets²⁶, et étudient rarement les interactions de protéines spécifiques avec des MNPs. De plus, la plupart de ces études sont réalisées sur du polystyrène^{55,56}, bien que ce plastique soit produit en moins grandes quantités que le PE et le PP. Cette surreprésentation des particules de polystyrène s'explique par le fait qu'il est facile de les synthétiser à des tailles variées, et que leur surface peut présenter des charges facilitant son passage en solution dans l'eau. De plus, afin de maîtriser la charge du PS, ces particules sont souvent fonctionnalisées avec des groupements carboxyle pour que la surface soit négativement chargée ou des groupements amine pour qu'elle soit positivement chargée⁵⁷. Dans ces cas, les interactions observées ne sont donc pas vraiment représentatives des interactions avec un plastique hydrophobe.

Les MNPs n'étant pas réactifs chimiquement, leur potentielle toxicité est causée à l'échelle moléculaire par des interactions aux interfaces entre les plastiques et les biomolécules.

2. Interactions des plastiques avec l'environnement à différentes échelles

La corona est un objet essentiel pour comprendre les interactions entre protéines et MNPs. Il s'agit d'un revêtement de protéines qui se forme spontanément lorsque des microparticules ou nanoparticules sont introduites dans un milieu biologique.

Pour comprendre la corona nous devons étudier sa formation, sa composition, et son effet sur les protéines, qu'il s'agisse des protéines qui composent la corona ou de celles qui restent en solution.

2.1. L'adsorption de protéines et des peptides sur des surfaces

L'adsorption d'un objet, ici d'une protéine, correspond à sa fixation sur une surface solide. Cette fixation peut être causée par différentes interactions, comme les interactions de van der Waals, ou par la formation de liaisons entre la protéine et la surface. L'adsorption de protéines sur des surfaces a commencé à être étudiée au début en 1916 par J. M. Nelson et Edward G. Griffin qui ont montré que l'invertase, une protéine qui catalyse l'hydrolyse du saccharose, s'adsorbe sur le charbon⁵⁸. L'adsorption de protéines sur des surfaces hydrophobes, en particulier de carbone, continue aujourd'hui d'être étudiée principalement sur des nanotubes de carbone⁵⁹ et sur du graphite⁶⁰.

Plusieurs études réalisées sur des protéines modèles ont montré que l'adsorption de ces protéines sur des surfaces a un effet sur leur activité. Un outil souvent utilisé pour évaluer les interactions entre un adsorbant et un adsorbant est l'isotherme d'adsorption. Il s'agit de la courbe représentative à une température donnée de la quantité d'adsorbant en fonction de sa concentration dans la phase liquide. Il a été observé que les isothermes d'adsorption de protéines peuvent généralement être décrites par le modèle de Langmuir, initialement développé pour décrire l'adsorption d'un gaz sur une surface⁶¹. L'étude de ces isothermes a permis de mettre en évidence un impact important du pH sur le phénomène d'adsorption de protéine, à commencer par l'adsorption de l'ovalbumine sur une

membrane de collodion⁶². Certaines études ont de plus observé des modifications de la structure des protéines adsorbées voire leur dénaturation, notamment sur des surfaces hydrophobes⁶³. Puisque la fonction d'une protéine est intrinsèquement liée à sa structure, leur adsorption pourrait donc nuire à leur fonction.

Un modèle pour expliquer l'adsorption de protéines par une surface est le modèle de Norde⁶⁴. D'après ce modèle, la capacité d'une surface à adsorber des protéines dépend de l'hydrophobicité de la surface ainsi que de la charge et de la stabilité de la structure de la protéine. La charge d'une protéine dépend de son point isoélectrique par rapport au pH de la solution, la protéine étant chargée positivement si le pH est inférieur à son point isoélectrique et négativement si le pH est supérieur. La stabilité correspond à la proportion de la structure conservée lors de l'adsorption, ainsi une protéine est considérée comme « molle » si une partie de la structure est perdue lors de l'adsorption et « dure » si la structure est conservée. L'impact de ces propriétés est résumé Tableau 1.1.

| 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 1.1 : Prédiction de l'adsorption (A) ou de la non-adsorption (NA) d'une protéine sur une surface d'après le modèle de Norde⁶⁴.

En particulier, d'après ce modèle toutes les protéines s'adsorbent sur les surfaces hydrophobes, comme les plastiques. Cette affinité résulte d'interactions hydrophobes entre la surface et la protéine, l'adsorption de cette dernière causant une déshydratation de la surface, qui prédominent par rapport aux effets de répulsion électrostatique. Dans le cas des surfaces hydrophiles, Norde stipule qu'il n'y a pas d'effet de déshydratation, les mécanismes d'adsorption sont donc différents. Lorsque les protéines et la surface sont de charges opposées, les interactions électrostatiques permettent l'adsorption des protéines. Si les protéines et la surface sont de même charge, un autre moteur de l'adsorption serait la perte de structure de la protéine adsorbée. Ce processus est favorisé par un gain d'entropie conformationnelle par la protéine, mais n'est applicable que si celle-ci est « molle ».

Ce modèle sera revu à plusieurs reprises, à commencer en 1994 par Haynes⁶⁵. Un paramètre supplémentaire est alors considéré pour l'adsorption : lors de son adsorption, la protéine peut perdre une partie de sa structure secondaire et ainsi augmenter le nombre de degrés de liberté de la chaîne peptidique. Ceci conduit à un gain d'entropie de la protéine, et favorise donc son adsorption. Ce critère est sujet à discussion puisque, d'après ce modèle, la protéine « s'étale » sur la surface afin d'augmenter l'air de contact, ce qui pourrait stabiliser sa conformation et conduire à une perte d'entropie, défavorable à l'adsorption. Pour déterminer quels mécanismes conduisent à l'adsorption sur une surface hydrophile, il est donc nécessaire d'analyser la dynamique de la protéine adsorbée en plus de sa structure.

Plus récemment, Czeslik complète le modèle d'adsorption de Norde par des données thermodynamiques de l'adsorption des protéines⁶⁶. Ces travaux montrent que le gain d'entropie associé à la modification de la conformation des protéines adsorbées n'est pas mesuré. En particulier, la mobilité des résidus tryptophane des protéines adsorbées par la silice est diminuée, ce qui correspond à une perte d'entropie. Czeslik conclut ainsi que le gain d'entropie par perte de structure

n'est probablement pas un facteur d'adsorption, et propose que l'adsorption peut s'expliquer par une augmentation du nombre d'interactions entre la surface et la protéine lors de l'étalement de celle-ci. Cette interprétation met en avant la contribution enthalpique dans l'adsorption mais n'explique pas la contribution entropique favorable qui a été mesurée par microcalorimétrie sur plusieurs systèmes lors de l'adsorption⁶⁷. Les mécanismes impliqués dans l'adsorption de protéines sur des surfaces ne sont donc pas encore complètement connus.

Dans le cas des peptides, la faible taille et le manque de structure de ces derniers limite l'impact potentiel des gains et pertes d'entropie sur l'adsorption. Comme pour les protéines, les peptides s'adsorbent sur les surfaces hydrophobes, et cette adsorption s'explique par les interactions hydrophobes entre la surface et les peptides⁶⁸. Avec une surface hydrophile, les peptides suivent le même comportement que des protéines « dures » d'après le critère de Norde, leur adsorption dépend donc de leur charge et de celle de la surface^{69,70}.

2.2. La notion d'éco-corona

Lorsque nous considérons une micro- ou nanoparticule, l'adsorption de protéines et d'autres molécules ou composés organiques peut recouvrir la particule, formant une éco-corona. L'éco-corona comprend de nombreuses espèces moléculaires, qui dépendent principalement de la taille de la particule et de l'environnement dans lequel elle se trouve. Par exemple, dans le cas d'une microparticule de plastique dans l'environnement, nous observons principalement la formation d'un biofilm. Ce biofilm peut comprendre de nombreuses espèces, en particulier différentes bactéries (pseudomonadota, cyanobacteriota, bacillota...)⁷¹ et, en fonction de l'environnement, du pollen⁷² ou des algues⁷³.

Si l'on considère une nanoparticule de plastique de quelques nanomètres de diamètre, donc de très petite taille par rapport aux bactéries, la notion de corona de bactérie ne s'applique plus. Pour les nanoparticules de plastique dans l'organisme, un autre type de corona sera observé, composée principalement de biomolécules, et en particulier de protéines.

Ces deux cas sont représentés Figure 1.12.

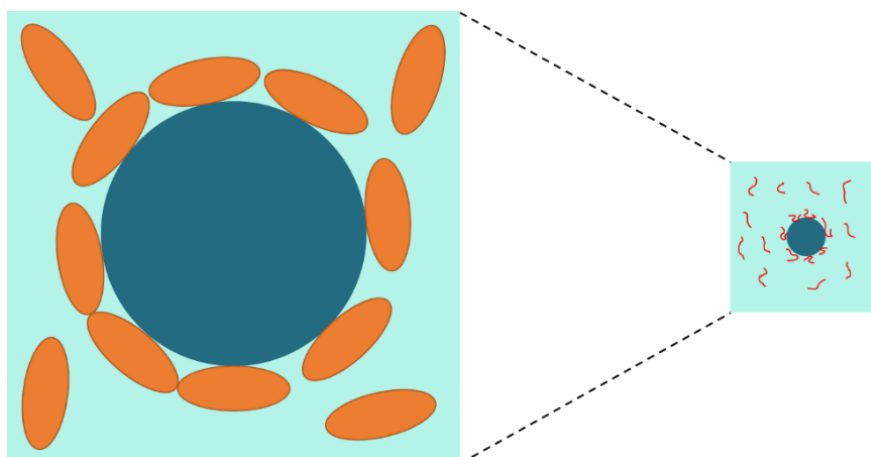


Figure 1.12 : Représentation schématique de différentes formes d'éco-corona en fonction de la taille de la particule. À gauche, une microparticule de quelques μm de diamètre avec une corona de bactéries, à droite, une nanoparticule de quelques nm de diamètre avec une corona de protéines.

Il est également possible de former une corona de peptides sur des microparticules de plastique. Des procédés sont d'ailleurs mis au point pour détecter et extraire des microparticules de plastique en les entourant d'une corona de peptides⁷⁴, il s'agit donc également d'objets dont l'étude est pertinente.

Il existe ainsi une variété de coronas, en fonction de la taille des particules considérées et du milieu dans lequel ces particules se trouvent. Ces différentes coronas, ainsi que l'historique de leur découverte, sont représentées Figure 1.13.

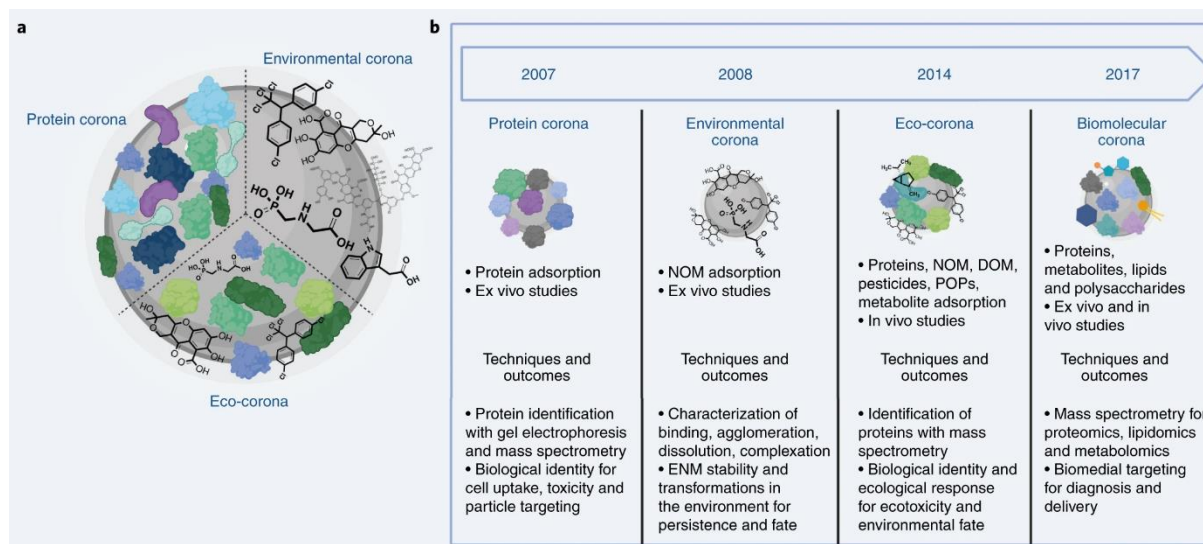


Figure 1.13 : Représentation des différents types de corona, avec les années de leur découverte et leur composition. NOM pour matière organique naturelle, DOM pour matière organique dissoute et POP pour polluants organiques résistants. Tiré de Environmental dimensions of the protein corona⁷².

Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi d'étudier uniquement des coronas de protéines et de peptides. En effet, celles-ci sont représentatives de systèmes pertinents, peuvent avoir un impact toxicologique en affectant la structure des protéines adsorbées ou environnantes, et sont plus simples à modéliser. Une corona protéique peut aussi se former sur une microparticule de plastique, et pas uniquement sur une nanoparticule, ce sont donc pareillement des objets pertinents à étudier⁷².

2.3. Formation de la corona protéique

Lors de son introduction en milieu biologique, une microparticule ou nanoparticule va rapidement s'entourer d'une couronne de protéines, comme illustré Figure 1.14.

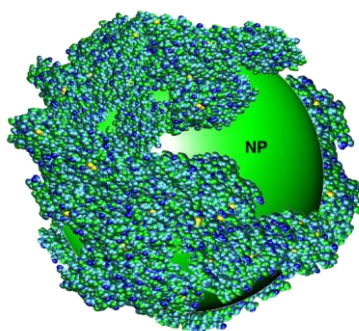


Figure 1.14 : Représentation d'une corona de protéines autour d'un nanoplastique.

Cette corona de protéines a véritablement commencé à être étudiée en 2007⁷⁵, et le nombre de publications sur le sujet s'est rapidement amplifié^{76,77}. La formation de la corona a été étudiée avec de nombreux types de nanoparticules hydrophiles, comme des particules de silice^{78,79}, d'or⁸⁰ ou de TiO₂. Malgré les études d'adsorption de protéines sur des nanofeuillets et nanotubes de carbone hydrophobes, les études de corona sur des micro- et nanoparticules hydrophobes comme les MNPs sont peu communes. Les propriétés de la corona de protéines sont donc moins connues sur les particules de plastique. Les propriétés de la corona dépendent donc des propriétés de surface de la nanoparticule. En fonction des traitements apportés à la surface il est même possible d'empêcher la formation d'une corona⁸¹.

L'adsorption des protéines par la particule peut résulter, en fonction de la nature de cette particule, de la formation de liaisons covalentes, d'interactions électrostatiques, de liaisons hydrogène, de forces de van der Waals ou d'interactions hydrophobes/hydrophiles⁸². Lorsqu'une protéine est adsorbée sur une surface, cette protéine peut se réarranger pour maximiser la surface de contact⁸³. La cinétique de l'adsorption et du réarrangement de la protéine peut alors influencer la structure de la corona, comme représenté Figure 1.15.

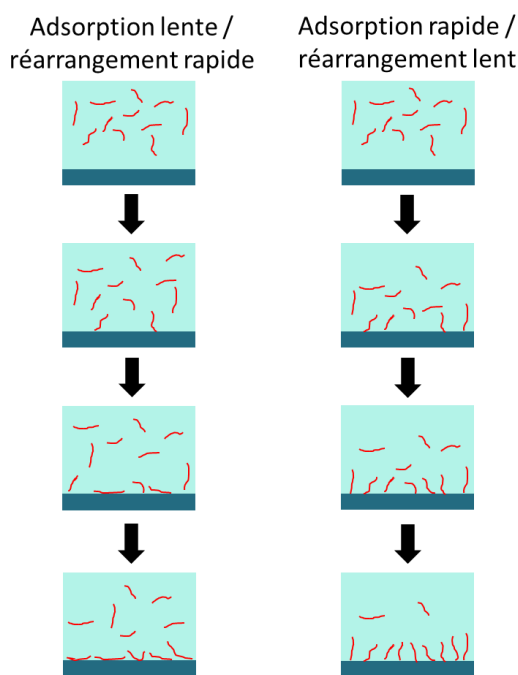


Figure 1.15 : Représentation schématique de l'influence de la cinétique d'adsorption des protéines sur une surface et de leur cinétique de réarrangement tridimensionnel sur la structure de la corona.

Comme nous pouvons le voir, si le réarrangement est rapide par rapport à l'adsorption des protéines, celles-ci vont avoir le temps de se réarranger avant que d'autres protéines soient adsorbées pour occuper l'espace alentour. Il en résulte une corona compacte et uniforme, dont le rayon est relativement faible. Inversement, si l'adsorption des protéines est rapide par rapport à leur réarrangement, celles-ci ne pourront pas maximiser leur surface de contact avant que l'espace alentour ne soit occupé par d'autres protéines. Il en découle une corona plus hétérogène et de plus grand rayon. Ce type de comportement est observable sur les isothermes d'adsorption des protéines, puisque celles-ci permettent d'observer la quantité de protéines par unité de surface des particules

lorsque celles-ci sont saturées. Les particules seront saturées par une plus faible quantité de protéines si celles-ci s'adsorbent lentement, puisque chaque protéine va occuper une plus grande surface.

La corona peut également modifier les propriétés des microparticules et nanoparticules. En particulier la corona de protéines permet aux MNPs de passer en solution, et dans certaines situations peut causer leur précipitation^{84,85}. Ceci peut d'ailleurs être utilisé pour extraire des nanoplastiques en milieu aqueux⁸⁶.

2.4. Composition de la corona protéique

La corona est un objet complexe dont la structure et la composition dépendent des protéines présentes, de leurs affinités pour les particules considérées, et de leurs cinétiques d'adsorption. Sa composition dépend de nombreux paramètres, notamment de la taille et de la composition de la nano- ou microparticule^{87,88}. Elle peut de plus se décomposer en deux couches, une hard corona stable et en interaction directe avec la particule, et une soft corona instable qui n'interagit pas directement avec la particule. Les propriétés de ces composantes sont résumées Figure 1.16.

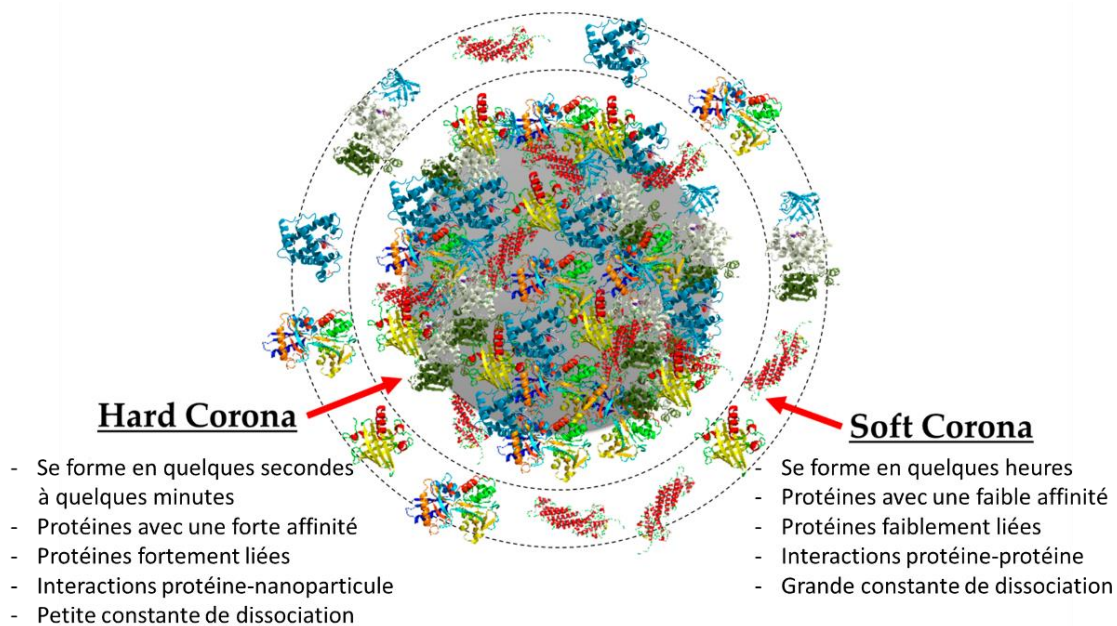


Figure 1.16 : Représentation schématique et caractéristiques de la hard corona et de la soft corona.
Adapté de *Hard and Soft Protein Corona of Nanomaterials : Analysis and Relevance*⁸².

2.4.1. Hard corona

La hard corona est la couche intérieure, fortement liée à la particule et donc plus stable. Dans cette corona, la conformation des protéines est plus largement modifiée pour un nanoplastique que pour un microplastique⁸⁹. La composition de la hard corona est tout de même susceptible de changer, en particulier lorsqu'elle passe d'un milieu à un autre⁹⁰. La hard corona comprend les protéines ayant une forte affinité pour la nanoparticule, et se forme en une durée de quelques secondes à quelques minutes⁸².

2.4.2. Soft corona

La soft corona est la couche extérieure, indirectement liée à la particule et soumise à des changements à mesure que le milieu et les conditions changent⁹¹. Les protéines de la soft corona peuvent ne pas interagir avec la particule directement, mais seulement avec les protéines directement liées à celle-ci. La formation de la soft corona est un phénomène dynamique qui peut prendre plusieurs heures. Une fois que le système atteint l'équilibre, les protéines dans la soft corona sont celles qui ont une plus faible affinité pour la nanoparticule⁸².

L'étude de la corona est complexe car sa composition et ses propriétés *in vitro* diffèrent généralement de ce qu'elles sont *in vivo*^{92,93}.

2.5. Effets de la corona sur les protéines

L'adsorption de protéines sur une particule de plastique peut les affecter de nombreuses façons, présentées Figure 1.17. Malgré l'absence de réactions chimiques entre les protéines et le plastique dans la plupart des cas, leur adsorption peut déformer les protéines, et donc affecter leur fonction qui est fortement liée à leur structure. L'adsorption de nombreuses protéines sur un petit espace peut également causer leur agrégation ou leur fibrillation.

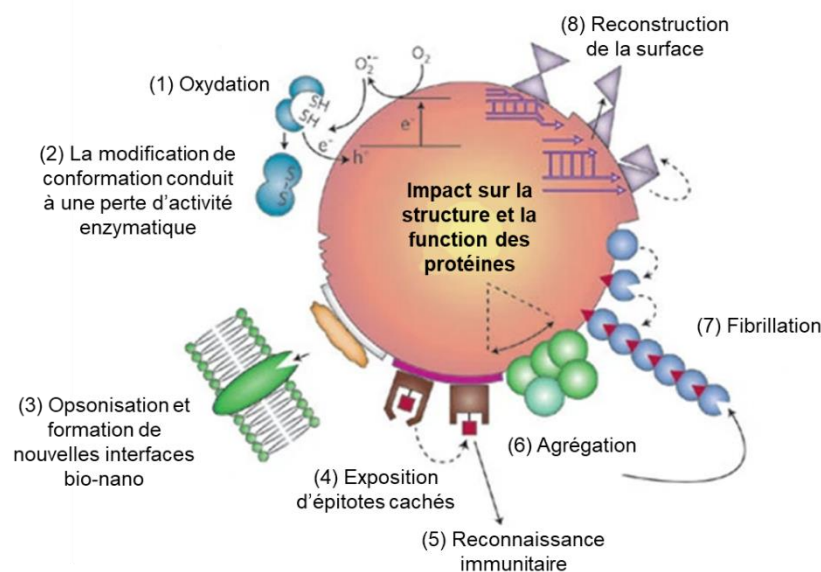


Figure 1.17 : Effets protéiques potentiels des interactions d'une protéine avec une nanoparticule. Adapté de *Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface*⁹⁴. La numérotation n'indique pas d'ordre chronologique.

Les effets d'oxydation et de modifications de structure des protéines peuvent aussi être observés lors de l'adsorption d'une protéine sur une surface classique, bien qu'ils puissent être affectés par le fait que les surfaces des particules ne sont généralement pas planes. Dans le cas d'une corona de protéines, d'autres effets peuvent être observés comme l'agrégation et la fibrillation des protéines. L'activité des protéines peut également être modifiée par la concentration locale de protéines sur la particule⁹⁵. Cet effet peut réduire l'activité de la protéine si celle-ci, à cause d'une trop forte concentration locale et d'une déformation éventuelle lors de l'adsorption, bloque l'accès aux sites actifs des protéines. Inversement, il peut être observé un effet d'avidité, correspondant à la somme

des forces d'interaction entre une macromolécule et un ligand fixé sur plusieurs sites. Dans le cas d'une corona, l'avidité peut être augmentée par rapport à celle des protéines individuelles à cause de la forte concentration locale en sites actifs. Ces effets sont illustrés Figure 1.18.

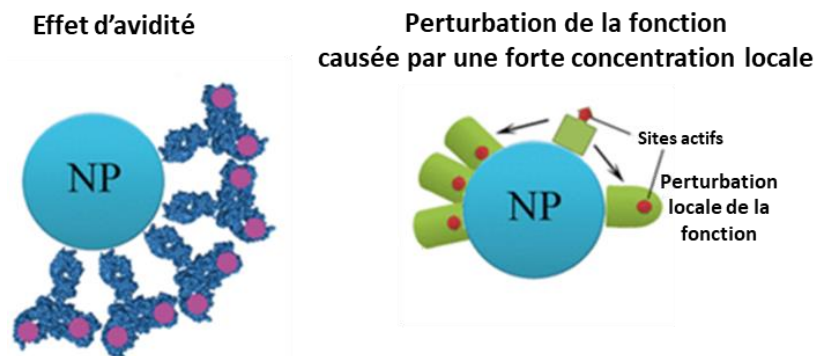


Figure 1.18 : Effets causés par la proximité de protéines adsorbées sur une nanoparticule, adaptée de *Molecular Interaction of Proteins and Peptides with Nanoparticles*⁹⁵.

Cette densité de protéines adsorbées ajoute de plus une source supplémentaire de déformation de la structure secondaire des protéines, rendant donc plus probable une modification de l'activité des protéines. Des études ont déjà montré l'influence de certaines nanoparticules sur les protéines, par exemple les nanoparticules de silice affectent fortement l'activité de l'hémoglobine adsorbée à sa surface⁹⁶. Une fois de plus, ces travaux sont plus rares sur des particules hydrophobes, ceux-ci étant plutôt réalisés sur des nanotubes de carbone⁵⁹ et sur du graphite⁶⁰, d'où l'intérêt de cette thèse.

Pour une corona, seule une partie des protéines restent fonctionnelles puisque celles se trouvant dans les couches internes deviennent inaccessibles⁹⁷. Si une grande quantité de particules est présente et les protéines forment plusieurs couches, cela peut donc avoir un impact sur l'efficacité des protéines, c'est-à-dire sur la quantité de protéines nécessaire pour que celles-ci puissent remplir leur fonction.

Les coronas de plusieurs particules peuvent de plus interagir entre elles, causant par exemple l'agrégation de ces objets⁹⁸⁻¹⁰⁰. Ceci a déjà été observé avec des MNPs, pour lesquels cette agrégation dépend fortement de la charge des protéines étudiées⁸⁴. La présence d'une corona de protéine, ou plus généralement d'une éco-corona, peut également avoir un impact environnemental. Ainsi, les MNPs ont plus de chances d'être ingérés par des organismes marins une fois couverts d'une corona¹⁰¹.

Tous ces effets peuvent être réversibles ou non, en fonction de la façon dont la structure des protéines est modifiée. Si leur structure est modifiée de façon irréversible, l'accumulation de MNPs sur le long terme serait d'autant plus problématique. En plus de ces effets des MNPs sur les protéines, causés par des interactions directes, des interactions indirectes peuvent également être envisagées. En effet, les protéines qui n'interagissent pas directement avec les MNPs peuvent interagir avec leur corona, causant potentiellement une modification de leur structure ou une agrégation. De plus, si l'adsorption des protéines est réversible, il est possible que celles-ci conservent des modifications de leur structure suite à leur adsorption. Ces protéines modifiées pourraient alors interagir avec d'autres protéines en solution et ainsi les modifier à leur tour. De la même façon, si des protéines ayant commencé à s'agréger à la surface de la particule sont relarguées, elles pourront servir de noyau de nucléation pour causer l'agrégation d'autres protéines en solution. Ces effets potentiels des interactions entre nanoparticule et protéine sont résumés Figure 1.19.

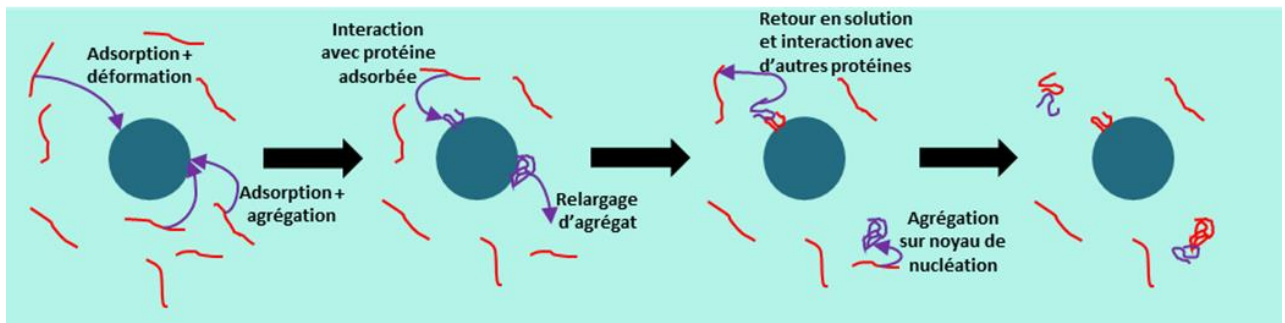


Figure 1.19 : Représentation schématique des différentes interactions directes et indirectes entre une nanoparticule et des protéines, et de leurs effets protéiques. Les flèches violettes indiquent les déplacements des protéines entre chaque étape. A chaque étape, les protéines ayant été affectées par la nanoparticule sont représentées en violet.

3. Les études par dynamique moléculaire

3.1. Principe de la dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire est une technique permettant de simuler l'évolution au cours du temps d'un système de particules. Pour cela, à partir d'un système défini à un instant donné par la position et la vitesse de ces particules ainsi que leur potentiel d'interaction, la somme des forces appliquées à chaque particule est calculée. Les vitesses de ces particules sont alors modifiées en suivant la seconde loi de Newton. Pour simuler le déplacement des particules, le temps est discrétisé selon un pas de temps défini au début de la simulation, le changement de position d'une particule entre deux pas de temps dépendant de sa vitesse initiale et de la durée du pas de temps. Une fois les positions modifiées, les forces appliquées aux particules sont à nouveau calculées et le procédé est répété pour un nombre de pas de temps défini en début de simulation. Ce principe est représenté Figure 1.20.

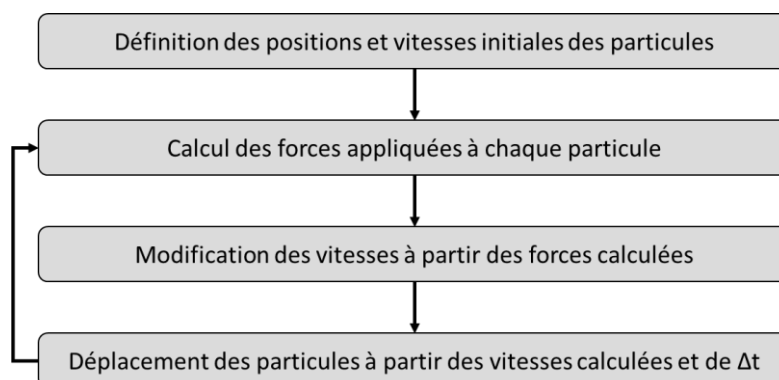


Figure 1.20 : Schéma du principe des simulations de dynamique moléculaire.

Afin de limiter les temps de calculs de ces systèmes, des champs de force sont utilisés pour représenter les potentiels d'interaction entre particules. Ces champs de force définissent les interactions entre particules liées ou non-liées en fonction de leurs paramètres. En fonction des systèmes étudiés différents paramètres peuvent être adaptés pour décrire les propriétés importantes des particules. De la même façon, en fonction des phénomènes observés, différents champs de force peuvent être adaptés.

Lorsque les systèmes étudiés sont simulés dans l'eau, plusieurs modèles peuvent être utilisés pour la représenter. Pour permettre des calculs plus rapides, il est possible d'utiliser des modèles dits implicites, dans lesquels l'eau est représentée comme un milieu continu¹⁰². Pour des simulations plus précises, ou pour des phénomènes pour lesquels l'eau joue un rôle important, des modèles explicites permettent de simuler les molécules d'eau individuellement. Plusieurs modèles d'eau ont été développés, paramétrant l'eau avec, entre autre, différentes valeurs de taille des liaisons, de charges partielles et d'angles de liaison¹⁰³. Différents modèles permettent une meilleure approximation de différentes propriétés de l'eau, par exemple le modèle SPC/E permet une bonne représentation de la densité de l'eau mais une plus faible constante diélectrique que les valeurs expérimentales¹⁰⁴ tandis que le modèle TIP3P présente une densité plus faible mais une constante diélectrique plus proche de la valeur expérimentale¹⁰⁵.

3.2. Développement et application aux biomolécules

La dynamique moléculaire a commencé à être développée dans les années 1970 pour l'étude de protéines^{106,107}. Historiquement, le lysozyme a été l'un des premiers systèmes simulés et reste à ce jour l'un des plus étudiés. Ceci s'explique par le fait que cette protéine est très accessible, et donc très utilisée pour les études expérimentales. Elle permet ainsi de facilement comparer les résultats des simulations à des résultats expérimentaux. Elle présente de plus une structure intéressante, comportant des hélices, des feuillettes et des zones déstructurées¹⁰⁸, tout en ayant une taille relativement faible (129 acides aminés) qui permet de limiter les temps de calcul. L'une des principales applications des simulations de dynamique moléculaire est l'étude de systèmes biologiques. Les paramètres des premiers champs de force utilisés ont ainsi souvent été développés de façon empirique pour reproduire les propriétés de biomolécules observées expérimentalement.

La mise en place de ces champs de force est complexe, puisque ceux-ci doivent permettre de préserver les structures secondaires des protéines (hélices, feuillettes...) mais ne pas les surreprésenter¹⁰⁹ ou les stabiliser au point d'empêcher leur modification lors de réactions¹¹⁰. Les paramètres utilisés ont été améliorés au cours du temps pour permettre aux champs de force récents d'être très cohérents avec les observations expérimentales¹¹¹. Un exemple de champ de force régulièrement utilisé pour la simulation de protéines et d'autres biomolécules est CHARMM¹¹². C'est un des plus anciens champs de force, initialement paramétré pour les acides aminés dans les années 1980 puis mis à jour à plusieurs reprises, jusqu'en 2006, et plusieurs variations ont été développées. Ces variations sont généralement spécialisées pour simuler des biomolécules particulières, comme des protéines ou de l'ADN. L'utilisation de ces champs de force spécialisés a permis une meilleure compréhension du comportement des biomolécules. En particulier, de nombreuses études ont été réalisées pour étudier le repliement des protéines, et la validité des résultats obtenus a été confirmée expérimentalement¹¹³.

Avec le développement de calculateurs plus puissants, il a été possible d'utiliser des champs de force plus précis et de travailler sur des champs de force plus complexes. Par exemple, des champs de force polarisables ont commencé à être établis. Ceux-ci nécessitent l'accès à des calculateurs particulièrement développés ou des temps de calcul plus longs, mais constituent une évolution notable des méthodes de simulations des protéines¹¹⁴.

3.3. Simulation de protéines en présence de polymères

L'utilisation d'un champ de force très spécialisé est plus difficile dans le cas d'un système composé de plusieurs espèces différentes. En particulier, lors de la simulation d'une nanoparticule de plastique en présence d'un peptide ou d'une protéine, il est important d'utiliser un champ de force capable de décrire convenablement à la fois le plastique et le peptide ou la protéine.

L'étude de ces systèmes est encore nouvelle, et aucun champ de force n'a, à notre connaissance, été paramétré spécifiquement pour les décrire. Utiliser un champ de force trop spécialisé pour décrire le plastique ou pour décrire les protéines pourrait respectivement causer une mauvaise description de la protéine ou du plastique. Dans le cadre de simulations d'interactions entre des protéines et des surfaces hydrophobes, plusieurs champs de force peuvent être utilisés, comme les champs de force CVFF^{60,115}, CHARMM27⁵⁹ et OPLS-AA¹¹⁶. CVFF est un champ de force généraliste tout-atome, et CHARMM27 est une variation du champ de force CHARMM présenté précédemment. Généralement, les systèmes simulés sont des protéines en présence d'une surface plane, ce qui est plus simple à modéliser que des protéines en présence d'une nanoparticule de plastique complète mais également moins représentatif de la réalité.

Les premières simulations de dynamique moléculaire sur des systèmes composés de nanoparticules de plastique en présence de biomolécules¹¹⁷ utilisent soit des champs de force optimisés pour les biomolécules, comme le champ de force GROMOS¹¹⁸, soit des champs de force généralistes comme COMPASS¹¹⁹ ou OPLS-AA¹²⁰. Afin de déterminer avec certitude le champ de force le plus adapté, il sera nécessaire de réaliser un plus grand nombre de simulations et de comparer les résultats obtenus à des résultats expérimentaux¹¹⁷.

Ces premières études ont déjà permis d'observer à l'échelle moléculaire les interactions de plastiques avec des protéines et des peptides. Hollóczki et Gehrke ont ainsi mis en contact un peptide structuré avec des nanoparticules de différents plastiques en utilisant le champ de force OPLS-AA et le modèle d'eau SPC/E, et observé différents effets en fonction du plastique considéré, comme illustré Figure 1.21.

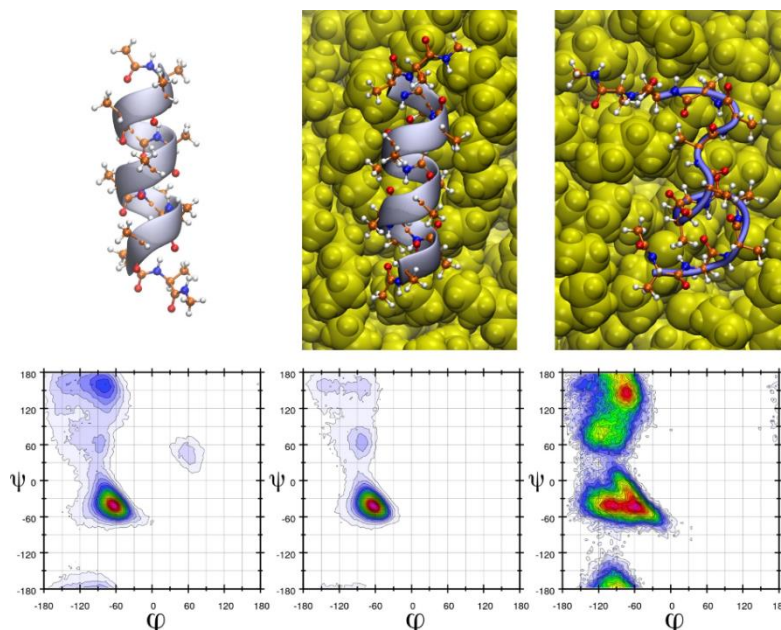


Figure 1.21 : Structures 3D (au-dessus) et diagrammes de Ramachandran (en-dessous, les populations étant indiquées par un code couleur rouge > bleu > blanc) d'un peptide en l'absence de plastique (à gauche), en présence d'une nanoparticule de polyéthylène (au milieu) et en présence d'une nanoparticule de nylon-6,6 (à droite).
Tiré de *nanoplastics can change the secondary structure of proteins*¹²¹.

Ces observations ont montré que des nanoparticules de plastique de même taille, 5 nm dans cette étude, peuvent avoir un impact important sur la structure des protéines. Ici, la nanoparticule complètement hydrophobe de PE semble favoriser les structures en hélice tandis que la nanoparticule hydrophile de nylon-6,6 cause une perte de cette structure. Ce type de simulation permet donc de mettre en évidence certains effets présentés par les nanoplastiques, en particulier la façon dont ils peuvent dénaturer les protéines en affectant leur structure.

4. Problématiques abordées par ce travail

4.1. Comment étudier les interactions de protéines avec des microparticules de plastique non chargées ?

Généralement, les études de formation de corona se font sur des micro- et nanoparticules hydrophiles. Travailler sur des matériaux hydrophobes introduit de nouvelles difficultés, à commencer par la mise en contact avec les protéines. En effet, puisque les particules de plastique sont hydrophobes, elles vont naturellement rester à la surface de la solution ou précipiter en fonction de leur densité, nous devons trouver un moyen de les disperser en solution avec les protéines.

Les études trouvées dans la littérature portent principalement sur l'observation directe de la toxicité de particules de polystyrène, généralement greffées, sur des organismes. Afin d'observer des systèmes plus représentatifs des plastiques produits, nous avons décidé de travailler avec des particules de PP et de PE, qui sont les plastiques les plus présents dans la nature¹²². De plus, nous allons chercher à observer et comprendre la physico-chimie de ces interactions. La réalisation de ces études va nécessiter la mise en place de nouveaux protocoles.

4.2. Comment varie l'affinité des protéines pour les MNPs en fonction des propriétés des protéines et du plastique ?

Comme expliqué précédemment, le modèle de Norde indique que toutes les protéines devraient être adsorbées par les microparticules de plastique, celle-ci étant hydrophobes, mais cette hypothèse est-elle vérifiée expérimentalement ? Et si toutes les protéines sont adsorbées, observons-nous tout de même des différences d'affinité ou de quantités adsorbées en fonction de la charge ou de la stabilité structurale des protéines ?

Pour déterminer cela, nous avons réalisé des mesures d'isothermes d'adsorption et des mesures de stabilité sur des solutions de protéines de charges et de niveaux de stabilité structurale différents. Des suivis de la transmittance et de la rétrodiffusion au cours du temps sur des suspensions de microparticules de plastique nous ont également permis de déterminer l'influence de ces propriétés sur la stabilisation de microparticules de plastique en solution.

Dans la nature, les microparticules de plastique sont généralement vieilles, ce qui modifie leurs propriétés de surface. Est-ce que ces modifications affectent de façon notable leurs interactions avec les protéines ?

Nous avons fait vieillir des microparticules de plastique en laboratoire, afin d'obtenir des plastiques similaires à ce qui est présenté dans le paragraphe 1.4 de ce chapitre. Nous avons alors répété sur ces particules certaines des expériences réalisées avec les microparticules de plastique non vieilles pour comparer les résultats obtenus.

4.3. Quels sont les effets des MNPs sur les protéines ?

Nous avons présenté différents effets que les microplastiques peuvent avoir sur les protéines, en particulier leur déstructuration et leur agrégation, mais est-ce que ceux-ci sont observés expérimentalement ?

Nous avons observé directement des protéines adsorbées par spectroscopie Raman et par imagerie de fluorescence, dans le but de tirer des informations sur la structure de la corona pour ces protéines. En particulier nous avons réalisé des mesures de DLS pour observer la formation d'agrégats de protéine en solution. En étudiant une protéine comme l'hémoglobine, qui se lie de façon réversible à un ligand gazeux, nous avons également étudié l'impact des microparticules de plastique sur sa fonction. Les protéines ont été observées en solution et adsorbées sur le plastique pour étudier les effets directs et indirects des microplastiques.

4.4. A l'échelle moléculaire, comment se déroule l'adsorption de protéines sur des MNPs ?

L'adsorption de protéines sur des microparticules est souvent observée, mais quelles interactions causent cette adsorption ? En particulier, est-ce que cette adsorption se fait sur des zones ou des acides aminés particuliers ?

Afin de comprendre les interactions fondamentales entre protéines et MNPs, nous avons réalisé des simulations de dynamique moléculaire. La simulation de ce type de système étant nouvelle, nous avons dû déterminer quels protocoles suivre pour les générer et les simuler. Afin de mettre en place ces protocoles, et pour observer de façon directe l'impact de différents acides aminés sur ces interactions, nous avons choisi de travailler dans un premier temps sur des peptides plutôt que sur des protéines. Pour comparer les résultats de ces simulations à des résultats expérimentaux, des expériences supplémentaires ont été réalisées sur ces mêmes peptides.

4.5. Quels sont les effets du vieillissement du plastique sur ses interactions avec les peptides et protéines ?

Après vieillissement, les MNPs présentent de nouveaux groupements en surface et des structures différentes. Est-ce que ces modifications impactent les interactions entre MNPs et protéines ou peptides, et si oui comment ?

Une première étape pour répondre à cette problématique est d'établir un protocole pour faire vieillir les MNPs de façon contrôlée et reproductible. Après cette étape de vieillissement, nous avons répété sur les MNPs vieillis les mêmes expériences réalisées sur les MNPs non vieillis et comparé les résultats obtenus. De plus, nous avons généré *in silico* des nanoparticules de plastique vieilles pour observer les interactions de ces particules avec des peptides à l'échelle atomique. Ainsi, nous avons pu voir comment les peptides interagissent avec les atomes d'oxygène présents à la surface de la particule.

5. Choix des systèmes étudiés

Cette thèse, qui porte sur les interactions de microparticules de plastique avec des protéines modèles, s'inscrit dans le cadre d'un plus grand projet visant à mieux comprendre les interactions entre plastiques et milieux biologiques. En particulier, ce travail a été réalisé simultanément avec celui de Marion Schwartz, qui a réalisé une thèse portant sur les effets des MNPs sur des mélanges complexes de protéines. Les deux thèses ont été réalisées en travaillant avec les mêmes stocks de microparticules de PE et de PP.

Nous avons travaillé sur trois protéines modèles : l'albumine du sérum bovin (BSA), l'hémoglobine et l' α -synucléine. Ces protéines permettent des analyses complémentaires puisqu'elles possèdent différentes capacités à se réorganiser et différents points isoélectriques. Nous avons également travaillé sur des peptides, dont la plus faible taille est appropriée pour réaliser des simulations et permet d'étudier l'impact d'acides aminés spécifiques.

5.1. Les peptides

Comme les protéines, les peptides s'adsorbent sur les microparticules de plastique⁷⁴. Les effets de nanoparticules sur des peptides ont été étudiés, mais surtout dans le cas de nanoparticules métalliques^{123,124}, celles-ci présentant un intérêt particulier dans le domaine médical¹²⁵. Ces études ont montré une forte affinité des peptides comprenant un cycle aromatique pour ces nanoparticules.

La faible taille des peptides en fait des objets de choix pour les simulations, permettant de travailler sur des systèmes de taille relativement limitée et permettant ainsi des simulations sur des durées raisonnables même en utilisant un cluster local. De plus, avec des séquences judicieusement choisies, nous pourrions tirer des informations sur l'influence de chaque acide aminé sur les interactions avec les particules de plastique.

Dans le cadre des simulations informatiques nous avons généré 20 peptides différents, un pour chaque acide aminé. Le modèle général de ces séquences est SGGXGGXGGXGGS, où X est un acide aminé différent pour chaque peptide. Ce modèle a été choisi parce que G est le plus petit acide aminé et S est le plus petit acide aminé polaire. Nous obtenons ainsi des peptides pour lesquels la gêne stérique autour de l'acide aminé X est minimisée, et qui peuvent être produits expérimentalement. Nous avons ainsi obtenu des échantillons de deux de ces peptides, correspondant aux acides aminés W et Y, sur lesquels il nous a été possible de comparer des résultats expérimentaux aux résultats des simulations.

Les propriétés de ces peptides et les raisons de ces choix sont détaillées dans le chapitre 2.

5.2. L'albumine du sérum bovin

La BSA est considérée comme une protéine de référence, très utilisée et facilement accessible. Son rôle biologique est le transport de différents composés dans le sang, et elle contribue à maintenir le pH sanguin. L'affinité des principes actifs de médicaments avec cette protéine peut fortement influencer leur efficacité¹²⁶. Il en résulte donc que cette protéine est très étudiée et que ses propriétés sont bien connues, ce qui permettra une meilleure analyse de l'influence des microparticules de

plastique sur cette protéine en comparant nos résultats aux données de références disponibles dans la littérature, ou à des résultats d'expériences similaires.

Cette protéine est constituée d'une seule chaîne de 583 acides aminés, qui présente 3 domaines homologues mais de structures différentes. Il s'agit d'une protéine globulaire. Pour reprendre la terminologie du modèle de Norde, il s'agit donc d'une protéine dure. De plus, son point isoélectrique étant autour de 4,8, cette protéine est légèrement chargée à pH 7,0, qui est le pH auquel nous réaliserons la plupart de nos expériences. Les principales caractéristiques de la BSA sont présentées dans le chapitre 2.

5.3. L'hémoglobine porcine

L'hémoglobine est une protéine présente dans le sang et dont le rôle est de transporter l'oxygène dans les organismes. Puisque sa fonction consiste à fixer le dioxygène, il est possible d'évaluer son activité par des expériences de tonométrie, que nous présenterons dans le chapitre 3. Comme la BSA, l'hémoglobine est une protéine globulaire, correspondant donc à une protéine dure. Son point isoélectrique est de 7,0, cette protéine sera donc neutre lors d'expériences réalisées à pH 7,0. Ainsi, la comparaison des résultats obtenues pour de mêmes expériences réalisées sur l'hémoglobine et sur la BSA pourra donner des informations sur l'influence de la charge de la protéine sur ses interactions avec les particules de plastique.

L'hémoglobine est composée de 4 chaînes polypeptidiques, 2 chaînes α et 2 chaînes β . Chacune de ces chaînes contient un hème, qui est un noyau tétrapyrrole (porphyrine) au centre duquel se trouve un atome de fer. Cet atome de fer est le site de liaison du dioxygène dont la fixation réversible permet sa circulation par le sang dans l'organisme et sa libération au niveau des tissus. La structure de l'hémoglobine de porc, et en particulier de son hème, est identique à celle de l'hémoglobine humaine¹²⁷, et de grandes quantités d'hémoglobine de porc peuvent être obtenues à faible coût à partir de sang de porc proposé par des abattoirs. Ces critères, ainsi que la possibilité de suivre son activité, en fait une protéine particulièrement intéressante pour ces études.

Lors de nos études nous allons travailler avec 3 formes différentes de l'hémoglobine :

-L'hémoglobine oxygénée (ou HbO₂) correspond à l'hémoglobine dont l'atome de fer est lié à un ligand dioxygène. Il s'agit de la forme de l'hémoglobine présente dans le sang au contact de l'air.

-L'hémoglobine désoxygénée (ou désoxyHb) correspond à l'hémoglobine dont l'atome de fer n'est plus lié au dioxygène. Cette forme de l'hémoglobine peut être obtenue par désoxygénation de l'hémoglobine ou en utilisant un réducteur comme l'hydrosulfite de sodium¹²⁸.

-La méthémoglobine (ou metHb) que nous avons utilisée, correspond à l'hémoglobine dont l'atome de fer est oxydé avec un ligand aqua (aquometHb Hb⁺(H₂O)) ou hydroxy (hydroxymetHb Hb⁺(HO⁻)). En solution, l'équilibre des deux formes dépend du pH. La metHb peut être obtenue en utilisant un oxydant comme le nitrite de sodium¹²⁹. Nous pouvons aussi noter qu'une solution d'hémoglobine conservée en présence d'air va naturellement s'oxyder pour former de la metHb. Il est important de noter que, tandis que l'hémoglobine peut passer de sa forme oxygénée à sa forme désoxygénée de façon réversible, la formation de méthémoglobine se fait de façon irréversible, empêchant une future oxygénation ou désoxygénation de l'hémoglobine.

Les principales caractéristiques de l'hémoglobine sont présentées dans le chapitre 2.

5.4. L' α -synucléine

L' α -synucléine est une protéine partiellement désorganisée, qui a tendance à s'agréger¹³⁰ et dont l'agrégation est liée à la maladie de Parkinson¹³¹. L'étude de cette protéine est complémentaire à celles de la BSA et de l'hémoglobine dont les structures tertiaires et secondaires sont bien définies. En effet il s'agit cette fois d'une protéine molle d'après le modèle de Norde, là où l'hémoglobine et la BSA sont des protéines dures. Son point isoélectrique est proche de celui de la BSA, ces deux protéines auront donc une charge similaire à pH 7,0. Comparer la BSA à l' α -synucléine va donc nous permettre de tirer des informations sur l'importance de la taille et de la stabilité structurale d'une protéine à charge similaire. Les principales caractéristiques de l' α -synucléine sont présentées dans le chapitre 2.

5.5. Le polyéthylène et le polypropylène

Dans le cadre de cette thèse nous avons travaillé sur les deux plastiques les plus couramment utilisés : le polyéthylène et le polypropylène, représentés Figure 1.22.

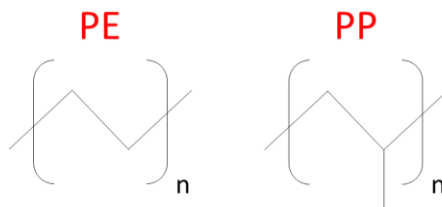


Figure 1.22 : Formules topologiques du PE (à gauche) et du PP (à droite).

Le polyéthylène a été synthétisé pour la première fois en 1898 par Engen Bamberger, et a commencé à être produit industriellement en 1939. En fonction des méthodes de fabrication, il est possible de synthétiser du polyéthylène de différentes densités, ce qui affecte ses propriétés¹³². Le PE de faible densité (de 0,91 g/cm³ à 0,94 g/cm³) a généralement une faible cristallinité et résistance thermique, ainsi qu'une flexibilité importante et la possibilité d'être transparent. Ces propriétés en font un matériau adapté pour la fabrication de bouteilles, de sacs ou de films plastiques. Le PE de forte densité (de 0,95 g/cm³ à 0,97 g/cm³) a une plus grande rigidité et un taux de cristallinité plus important qui le rend plus rigide et moins transparent. Ce matériau peut être utilisé pour la fabrication de containers et de tuyaux. Les rayonnements UV et le chauffage peuvent causer le vieillissement du PE par oxydation, comme présenté Figure 1.23.

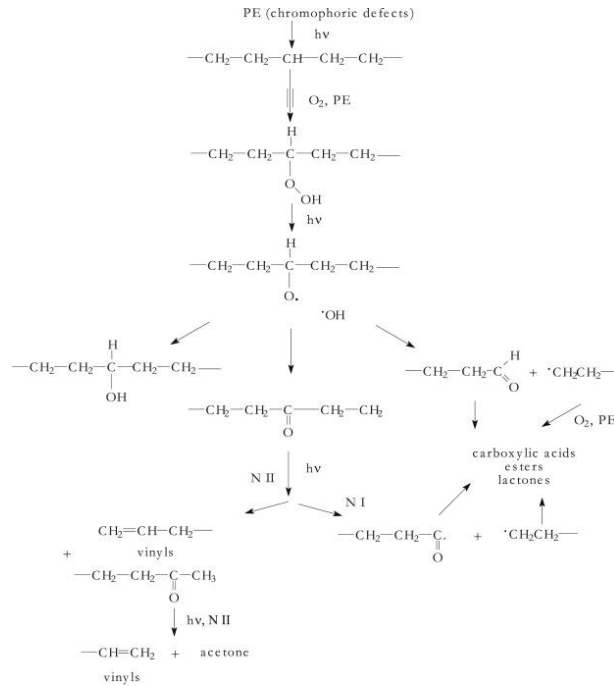


Figure 1.23 : Représentation des différentes voies de vieillissement du polyéthylène dans le cas d'une photo-oxydation. Tiré de Photo- and thermal-oxidation of polyethylene: Comparison of mechanisms and influence of unsaturation content¹³³.

Le polyéthylène pur ne contient pas de double liaison, mais en pratique le polyéthylène produit comprend des impuretés telles que des chromophores (doubles liaisons) qui permettent d'amorcer son oxydation. Une fois le plastique oxydé par le dioxygène de l'air un radical $\text{CO}\cdot$ est formé et, en fonction de la voie de vieillissement suivie, peut conduire à la formation de différents groupements. Les PE vieillissent peuvent ainsi contenir des groupements carbonyle, carboxyle, ester ou hydroxyle. Les composés obtenus en plus grande quantité dépendent des conditions du vieillissement, par exemple un vieillissement thermique facilite l'accumulation de cétones. Par exemple, les réactions de Norrish (notées N I et N II Figure 1.23), qui causent la formation de vinyle, d'acides carboxyliques et d'esters à partir de cétones, nécessitent l'adsorption de photons et n'ont donc pas lieu lors d'une thermo-oxydation¹³³.

Le polypropylène a été synthétisé pour la première fois en 1951 par Robert Banks et Paul Hogan, et a commencé à être produit commercialement en 1957. Il s'agit d'un plastique léger et bon marché utilisé pour des applications variées comme la production d'emballages alimentaires, de textiles ou de jouets. Il est souvent utilisé en laboratoire pour produire des tubes et embouts de pipette, son caractère inerte lui permettant de ne pas réagir avec les composés avec lesquels il entre en contact. De la même façon que le polyéthylène, le polypropylène dans la nature peut être oxydé, comme représenté Figure 1.24.

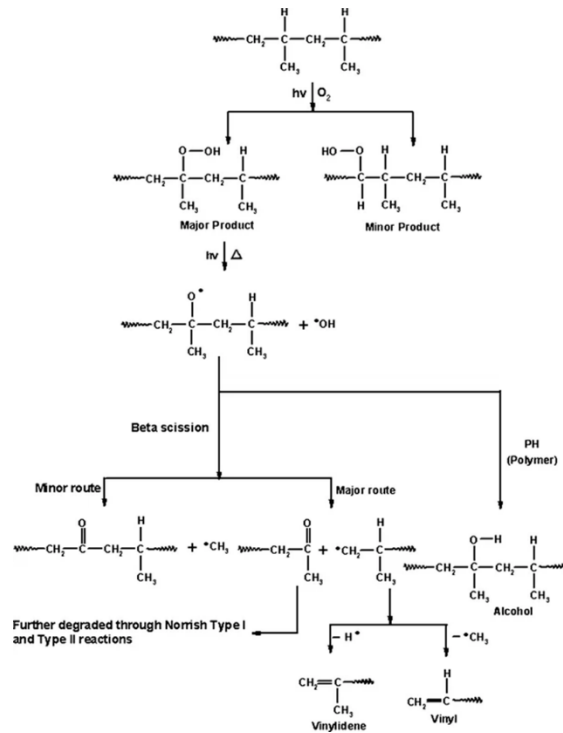


Figure 1.24 : Représentation des différentes voies de vieillissement du polypropylène dans le cas d'une photo-oxydation. Tiré de *Natural Weathering Studies of Polypropylene*¹³⁴.

Les voies de vieillissement du polypropylène sont similaires à celles du polyéthylène. En particulier, sa photo-oxydation est amorcée par des chromophores présents dans le plastique et cause la formation de groupements carbonyle, carboxyle, ester ou hydroxyle. Ici aussi les proportions de ces composés suite au vieillissement dépendent des conditions de vieillissement, par exemple de la possibilité pour les réactions de Norrish d'avoir lieu.

Globalement ces deux plastiques sont très polyvalents et ont donc de nombreuses applications, comme illustré Figure 1.25.

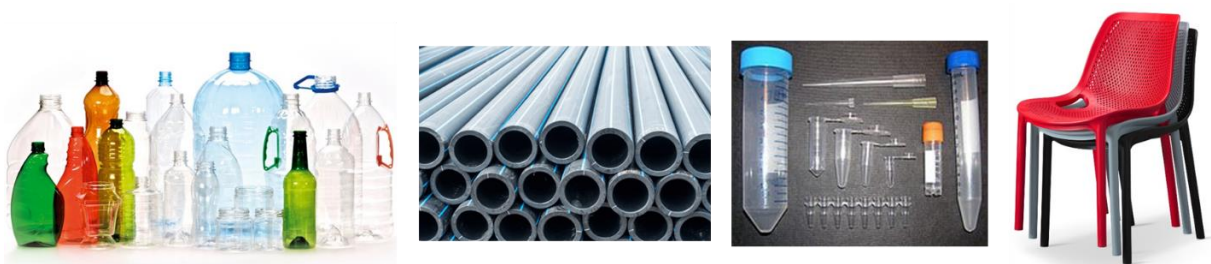


Figure 1.25 : Quelques exemples d'utilisation de plastiques, de gauche à droite : bouteilles en PE faible densité, tuyaux en PE forte densité, matériel de laboratoire en PP et chaises en PP.

La diversité de leurs applications, ainsi que leurs faibles coûts de production, en font les deux plastiques les plus utilisés⁷. En 2017, le PE représentait 36% de la production mondiale de plastiques et le PP 21%. Ceci en fait des systèmes dont l'étude est particulièrement importante pour mieux comprendre les effets des MNPs correspondants dans la nature. Les propriétés de ces plastiques seront développées plus en détail au début du chapitre 3, lors des mesures réalisées sur nos échantillons.

Bibliographie

- (1) Goodyear, C. Improvement in India-Rubber Fabrics. US3633A, June 15, 1844. <https://patents.google.com/patent/US3633A/en> (accessed 2023-02-14).
- (2) Parkes, A. On the Properties of Parkesine and Its Application to the Arts and Manufactures. *J. Frankl. Inst.* **1866**, 8 (6), 384–388.
- (3) Ritchie, H.; Roser, M. Plastic Pollution. *Our World Data* **2018**.
- (4) *Plastics - the Facts 2021 • Plastics Europe*. Plastics Europe. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/> (accessed 2022-09-08).
- (5) *Global Plastic Additives Market Size & Share | Industry Report, 2022*. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/plastic-additives-market> (accessed 2023-02-13).
- (6) Schächtele, K.; Fuhr, L.; Franklin, M. Atlas Du Plastique 2020.
- (7) Geyer, R.; Jambeck, J. R.; Law, K. L. Production, Use, and Fate of All Plastics Ever Made. *Sci. Adv.* **2017**, 6.
- (8) US EPA, O. *Plastics: Material-Specific Data*. <https://www.epa.gov/facts-and-figures-about-materials-waste-and-recycling/plastics-material-specific-data> (accessed 2023-02-02).
- (9) Wowkonowicz, P.; Kijeńska, M. Phthalate Release in Leachate from Municipal Landfills of Central Poland. *PLOS ONE* **2017**, 12 (3), e0174986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174986>.
- (10) Royer, S.-J.; Ferrón, S.; Wilson, S. T.; Karl, D. M. Production of Methane and Ethylene from Plastic in the Environment. *PLOS ONE* **2018**, 13 (8), e0200574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200574>.
- (11) Lange, J.-P. Managing Plastic Waste—Sorting, Recycling, Disposal, and Product Redesign. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2021**, 9 (47), 15722–15738. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c05013>.
- (12) Verma, R.; Vinoda, K. S.; Papireddy, M.; Gowda, A. N. S. Toxic Pollutants from Plastic Waste- A Review. *Procedia Environ. Sci.* **2016**, 35, 701–708. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.07.069>.
- (13) *Recycling of Polypropylene (PP)*. AZoCleantech.com. <https://www.azocleantech.com/article.aspx?ArticleID=240> (accessed 2023-02-14).
- (14) *MSC Zoe report says vessel hit the bottom in storm*. Container News. <https://container-news.com/msc-zoe-report-says-vessel-hit-the-bottom-in-storm/> (accessed 2023-02-15).
- (15) Lebreton, L.; Slat, B.; Ferrari, F.; Sainte-Rose, B.; Aitken, J.; Marthouse, R.; Hajbane, S.; Cunsolo, S.; Schwarz, A.; Levivier, A.; Noble, K.; Debeljak, P.; Maral, H.; Schoeneich-Argent, R.; Brambini, R.; Reisser, J. Evidence That the Great Pacific Garbage Patch Is Rapidly Accumulating Plastic. *Sci. Rep.* **2018**, 8 (1), 4666. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22939-w>.
- (16) Schöpel, B.; Stamminger, R. A Comprehensive Literature Study on Microfibres from Washing Machines. *Tenside Surfactants Deterg.* **2019**, 56 (2), 94–104. <https://doi.org/10.3139/113.110610>.
- (17) Ainali, N. M.; Bikiaris, D. N.; Lambropoulou, D. A. Aging Effects on Low- and High-Density Polyethylene, Polypropylene and Polystyrene under UV Irradiation: An Insight into Decomposition

- Mechanism by Py-GC/MS for Microplastic Analysis. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2021**, *158*, 105207. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2021.105207>.
- (18) Koga, M.; Watanabe, R.; Hagihara, H.; Mizukado, J.; Tokita, M.; Shinzawa, H. Accelerated Aging-Induced Variation of Polypropylene (PP) Structure Studied by Two-Dimensional (2D) Small-Angle X-Ray Scattering (SAXS) Correlation Spectroscopy. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1207*, 127764. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.127764>.
- (19) Liu, J.; Zhang, T.; Tian, L.; Liu, X.; Qi, Z.; Ma, Y.; Ji, R.; Chen, W. Aging Significantly Affects Mobility and Contaminant-Mobilizing Ability of Nanoplastics in Saturated Loamy Sand. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53* (10), 5805–5815. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00787>.
- (20) Lambert, S.; Wagner, M. Formation of Microscopic Particles during the Degradation of Different Polymers. *Chemosphere* **2016**, *161*, 510–517. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.042>.
- (21) Sonke, J. E.; Koenig, A. M.; Yakovenko, N.; Hagelskjær, O.; Margenat, H.; Hansson, S. V.; De Vleeschouwer, F.; Magand, O.; Le Roux, G.; Thomas, J. L. A Mass Budget and Box Model of Global Plastics Cycling, Degradation and Dispersal in the Land-Ocean-Atmosphere System. *Microplastics Nanoplastics* **2022**, *2* (1), 28. <https://doi.org/10.1186/s43591-022-00048-w>.
- (22) Hernandez, L. M.; Yousefi, N.; Tufenkji, N. Are There Nanoplastics in Your Personal Care Products? *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2017**, *4* (7), 280–285. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.7b00187>.
- (23) Ivar do Sul, J. A.; Costa, M. F. The Present and Future of Microplastic Pollution in the Marine Environment. *Environ. Pollut.* **2014**, *185*, 352–364. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.036>.
- (24) Materić, D.; Kjær, H. A.; Vallelonga, P.; Tison, J.-L.; Röckmann, T.; Holzinger, R. Nanoplastics Measurements in Northern and Southern Polar Ice. *Environ. Res.* **2022**, *208*, 112741. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112741>.
- (25) Xu, Y.; Ou, Q.; Jiao, M.; Liu, G.; van der Hoek, J. P. Identification and Quantification of Nanoplastics in Surface Water and Groundwater by Pyrolysis Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, *56* (8), 4988–4997. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07377>.
- (26) Wang, C.; Zhao, J.; Xing, B. Environmental Source, Fate, and Toxicity of Microplastics. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *407*, 124357. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124357>.
- (27) Kelly, M. R.; Lant, N. J.; Kurr, M.; Burgess, J. G. Importance of Water-Volume on the Release of Microplastic Fibers from Laundry. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53* (20), 11735–11744. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03022>.
- (28) Yang, T.; Luo, J.; Nowack, B. Characterization of Nanoplastics, Fibrils, and Microplastics Released during Washing and Abrasion of Polyester Textiles. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, *55* (23), 15873–15881. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c04826>.
- (29) Mekar, H. Effect of Agitation Method on the Nanosized Degradation of Polystyrene Microplastics Dispersed in Water. *ACS Omega* **2020**, *5* (7), 3218–3227. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03278>.

- (30) Ivleva, N. P. Chemical Analysis of Microplastics and Nanoplastics: Challenges, Advanced Methods, and Perspectives. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (19), 11886–11936. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00178>.
- (31) Lai, Y.; Dong, L.; Li, Q.; Li, P.; Hao, Z.; Yu, S.; Liu, J. Counting Nanoplastics in Environmental Waters by Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy after Cloud-Point Extraction and *In Situ* Labeling of Gold Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, *55* (8), 4783–4791. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06839>.
- (32) Cole, M.; Lindeque, P.; Fileman, E.; Halsband, C.; Goodhead, R.; Moger, J.; Galloway, T. S. Microplastic Ingestion by Zooplankton. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47* (12), 6646–6655. <https://doi.org/10.1021/es400663f>.
- (33) Liu, Q.; Chen, Z.; Chen, Y.; Yang, F.; Yao, W.; Xie, Y. Microplastics and Nanoplastics: Emerging Contaminants in Food. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (36), 10450–10468. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c04199>.
- (34) Toussaint, B.; Raffael, B.; Angers-Loustau, A.; Gilliland, D.; Kestens, V.; Petrillo, M.; Rio-Echevarria, I. M.; Van den Eede, G. Review of Micro- and Nanoplastic Contamination in the Food Chain. *Food Addit. Contam. Part A* **2019**, *36* (5), 639–673. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1583381>.
- (35) Li, J.; Wang, G.; Gou, X.; Xiang, J.; Huang, Q.; Liu, G. Revealing Trace Nanoplastics in Food Packages—An Electrochemical Approach Facilitated by Synergistic Attraction of Electrostatics and Hydrophobicity. *Anal. Chem.* **2022**, *acs.analchem.2c01703*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01703>.
- (36) Zangmeister, C. D.; Radney, J. G.; Benkstein, K. D.; Kalanyan, B. Common Single-Use Consumer Plastic Products Release Trillions of Sub-100 Nm Nanoparticles per Liter into Water during Normal Use. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, *56* (9), 5448–5455. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c06768>.
- (37) Zhang, Q.; Xu, E. G.; Li, J.; Chen, Q.; Ma, L.; Zeng, E. Y.; Shi, H. A Review of Microplastics in Table Salt, Drinking Water, and Air: Direct Human Exposure. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, *54* (7), 3740–3751. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b04535>.
- (38) Mohamed Nor, N. H.; Kooi, M.; Diepens, N. J.; Koelmans, A. A. Lifetime Accumulation of Microplastic in Children and Adults. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, *55* (8), 5084–5096. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07384>.
- (39) Wright, S. L.; Kelly, F. J. Plastic and Human Health: A Micro Issue? *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51* (12), 6634–6647. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00423>.
- (40) Schrurs, F.; Lison, D. Focusing the Research Efforts. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7* (9), 546–548. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.148>.
- (41) Davranche, M.; Veclin, C.; Pierson-Wickmann, A.-C.; Hadri, H. E.; Grassl, B.; Rowenczyk, L.; Dia, A.; Halle, A. ter; Blancho, F.; Reynaud, S.; Gigault, J. Are Nanoplastics Able to Bind Significant Amount of Metals? The Lead Example. *Environ. Pollut.* **2019**, *249*, 940–948. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.087>.
- (42) Wang, J.; Guo, X.; Xue, J. Biofilm-Developed Microplastics As Vectors of Pollutants in Aquatic Environments. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, *acs.est.1c04466*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c04466>.

- (43) Chen, W.; Gong, Y.; McKie, M.; Almuhtaram, H.; Sun, J.; Barrett, H.; Yang, D.; Wu, M.; Andrews, R. C.; Peng, H. Defining the Chemical Additives Driving *In Vitro* Toxicities of Plastics. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, acs.est.2c03608. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c03608>.
- (44) *Bisphénol A (FT 279). Généralités - Fiche toxicologique - INRS.* https://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_279 (accessed 2023-02-16).
- (45) Saint-Laurent, L.; Rhainds, M. Les phtalates : état des connaissances sur la toxicité et l'exposition de la population générale. 7 Janvier 2004.
- (46) Han, S.; Bang, J.; Choi, D.; Hwang, J.; Kim, T.; Oh, Y.; Hwang, Y.; Choi, J.; Hong, J. Surface Pattern Analysis of Microplastics and Their Impact on Human-Derived Cells. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2020**, 2 (11), 4541–4550. <https://doi.org/10.1021/acsapm.0c00645>.
- (47) Danopoulos, E.; Twiddy, M.; West, R.; Rotchell, J. M. A Rapid Review and Meta-Regression Analyses of the Toxicological Impacts of Microplastic Exposure in Human Cells. *J. Hazard. Mater.* **2022**, 427, 127861. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127861>.
- (48) Tan, H.; Yue, T.; Xu, Y.; Zhao, J.; Xing, B. Microplastics Reduce Lipid Digestion in Simulated Human Gastrointestinal System. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, 54 (19), 12285–12294. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02608>.
- (49) Mattsson, K.; Ekvall, M. T.; Hansson, L.-A.; Linse, S.; Malmendal, A.; Cedervall, T. Altered Behavior, Physiology, and Metabolism in Fish Exposed to Polystyrene Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, 49 (1), 553–561. <https://doi.org/10.1021/es5053655>.
- (50) Nobre, C. R.; Santana, M. F. M.; Maluf, A.; Cortez, F. S.; Cesar, A.; Pereira, C. D. S.; Turra, A. Assessment of Microplastic Toxicity to Embryonic Development of the Sea Urchin *Lytechinus Variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Mar. Pollut. Bull.* **2015**, 92 (1–2), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.050>.
- (51) Kwon, W.; Kim, D.; Kim, H.-Y.; Jeong, S. W.; Lee, S.-G.; Kim, H.-C.; Lee, Y.-J.; Kwon, M. K.; Hwang, J.-S.; Han, J. E.; Park, J.-K.; Lee, S.-J.; Choi, S.-K. Microglial Phagocytosis of Polystyrene Microplastics Results in Immune Alteration and Apoptosis *In Vitro* and *In Vivo*. *Sci. Total Environ.* **2022**, 807, 150817. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150817>.
- (52) Wang, W.; Lin, Y.; Yang, H.; Ling, W.; Liu, L.; Zhang, W.; Lu, D.; Liu, Q.; Jiang, G. Internal Exposure and Distribution of Airborne Fine Particles in the Human Body: Methodology, Current Understandings, and Research Needs. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, acs.est.1c07051. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07051>.
- (53) Rotchell, J. M.; Jenner, L. C.; Chapman, E.; Bennett, R. T.; Bolanle, I. O.; Loubani, M.; Sadofsky, L.; Palmer, T. M. Detection of Microplastics in Human Saphenous Vein Tissue Using MFTIR: A Pilot Study. *PLOS ONE* **2023**, 18 (2), e0280594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280594>.
- (54) Hwang, J.; Choi, D.; Han, S.; Choi, J.; Hong, J. An Assessment of the Toxicity of Polypropylene Microplastics in Human Derived Cells. *Sci. Total Environ.* **2019**, 684, 657–669. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.071>.
- (55) Yong, C.; Valiyaveetil, S.; Tang, B. Toxicity of Microplastics and Nanoplastics in Mammalian Systems. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, 17 (5), 1509. <https://doi.org/10.3390/ijerph17051509>.

- (56) Zhang, Z.; Orski, S.; Woys, A. M.; Yuan, G.; Zarraga, I. E.; Wagner, N. J.; Liu, Y. Adsorption of Polysorbate 20 and Proteins on Hydrophobic Polystyrene Surfaces Studied by Neutron Reflectometry. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *168*, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.04.036>.
- (57) Loos, C.; Syrovets, T.; Musyanovych, A.; Mailänder, V.; Landfester, K.; Nienhaus, G. U.; Simmet, T. Functionalized Polystyrene Nanoparticles as a Platform for Studying Bio–Nano Interactions. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2014**, *5*, 2403–2412. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.250>.
- (58) Nelson, J. M.; Griffin, E. G. Adsorption of Invertase. *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, *38* (5), 1109–1115. <https://doi.org/10.1021/ja02262a018>.
- (59) Zhang, C.; Li, X.; Wang, Z.; Huang, X.; Ge, Z.; Hu, B. Influence of Structured Water Layers on Protein Adsorption Process: A Case Study of Cytochrome *c* and Carbon Nanotube Interactions and Its Implications. *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124* (4), 684–694. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b10192>.
- (60) Raffaini, G.; Ganazzoli, F. Simulation Study of the Interaction of Some Albumin Subdomains with a Flat Graphite Surface. *Langmuir* **2003**, *19* (8), 3403–3412. <https://doi.org/10.1021/la026853h>.
- (61) Langmuir, I. THE ADSORPTION OF GASES ON PLANE SURFACES OF GLASS, MICA AND PLATINUM. *J. Am. Chem. Soc.* **1918**, *40* (9), 1361–1403. <https://doi.org/10.1021/ja02242a004>.
- (62) Hitchcock, D. I. PROTEIN FILMS ON COLLODION MEMBRANES. *J. Gen. Physiol.* **1925**, *8* (2), 61–74. <https://doi.org/10.1085/jgp.8.2.61>.
- (63) Raffaini, G.; Ganazzoli, F. Surface Ordering of Proteins Adsorbed on Graphite. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (36), 13850–13854. <https://doi.org/10.1021/jp0477452>.
- (64) Norde, W. My Voyage of Discovery to Proteins in Flatland ...and Beyond. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2008**, *61* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.09.029>.
- (65) Haynes, C. A.; Sliwinsky, E.; Norde, W. Structural and Electrostatic Properties of Globular Proteins at a Polystyrene-Water Interface. *J. Colloid Interface Sci.* **1994**, *164* (2), 394–409. <https://doi.org/10.1006/jcis.1994.1182>.
- (66) Czeslik, C. Factors Ruling Protein Adsorption. *Z. Für Phys. Chem.* **2004**, *218* (7), 771–801. <https://doi.org/10.1524/zpch.218.7.771.35722>.
- (67) Goobes, G.; Goobes, R.; Shaw, W. J.; Gibson, J. M.; Long, J. R.; Raghunathan, V.; Schueler-Furman, O.; Popham, J. M.; Baker, D.; Campbell, C. T.; Stayton, P. S.; Drobny, G. P. The Structure, Dynamics, and Energetics of Protein Adsorption—Lessons Learned from Adsorption of Statherin to Hydroxyapatite. *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45* (S1), S32–S47. <https://doi.org/10.1002/mrc.2123>.
- (68) Horinek, D.; Serr, A.; Geisler, M.; Pirzer, T.; Slotta, U.; Lud, S. Q.; Garrido, J. A.; Scheibel, T.; Hugel, T.; Netz, R. R. Peptide Adsorption on a Hydrophobic Surface Results from an Interplay of Solvation, Surface, and Intra-peptide Forces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (8), 2842–2847. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707879105>.
- (69) Costa, D.; Savio, L.; Pradier, C.-M. Adsorption of Amino Acids and Peptides on Metal and Oxide Surfaces in Water Environment: A Synthetic and Prospective Review. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120* (29), 7039–7052. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b05954>.
- (70) Patwardhan, S. V.; Emami, F. S.; Berry, R. J.; Jones, S. E.; Naik, Rajesh. R.; Deschaume, O.; Heinz, H.; Perry, C. C. Chemistry of Aqueous Silica Nanoparticle Surfaces and the Mechanism of Selective Peptide Adsorption. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (14), 6244–6256. <https://doi.org/10.1021/ja211307u>.

- (71) Liu, P.; Dai, J.; Bie, C.; Li, H.; Zhang, Z.; Guo, X.; Zhu, L. Bioaccessibility of Microplastic-Associated Antibiotics in Freshwater Organisms: Highlighting the Impacts of Biofilm Colonization *via* an *In Vitro* Protocol. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, *acs.est.2c02782*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c02782>.
- (72) Wheeler, K. E.; Chetwynd, A. J.; Fahy, K. M.; Hong, B. S.; Tochihiuti, J. A.; Foster, L. A.; Lynch, I. Environmental Dimensions of the Protein Corona. *Nat. Nanotechnol.* **2021**, *16* (6), 617–629. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00924-1>.
- (73) Natarajan, L.; Jenifer, M. A.; Mukherjee, A. Eco-Corona Formation on the Nanomaterials in the Aquatic Systems Lessens Their Toxic Impact: A Comprehensive Review. *Environ. Res.* **2021**, *194*, 110669. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110669>.
- (74) Woo, H.; Kang, S. H.; Kwon, Y.; Choi, Y.; Kim, J.; Ha, D.-H.; Tanaka, M.; Okochi, M.; Kim, J. S.; Kim, H. K.; Choi, J. Sensitive and Specific Capture of Polystyrene and Polypropylene Microplastics Using Engineered Peptide Biosensors. *RSC Adv.* **2022**, *12* (13), 7680–7688. <https://doi.org/10.1039/D1RA08701K>.
- (75) 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (7), 2050–2055. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608582104>.
- (76) Huang, Z.; Fu, F.; Wu, L.; Wang, W.; Wang, W.; Shi, C.; Huang, Y.; Pan, X.; Wu, C. Bibliometric Landscape of the Researches on Protein Corona of Nanoparticles. *Front. Mater. Sci.* **2021**. <https://doi.org/10.1007/s11706-021-0571-7>.
- (77) Kihara, S.; Köper, I.; Mata, J. P.; McGillivray, D. J. Reviewing Nanoplastic Toxicology: It’s an Interface Problem. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2021**, *288*, 102337. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102337>.
- (78) Strojjan, K.; Leonardi, A.; Bregar, V. B.; Križaj, I.; Svete, J.; Pavlin, M. Dispersion of Nanoparticles in Different Media Importantly Determines the Composition of Their Protein Corona. *PLOS ONE* **2017**, *12* (1), e0169552. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169552>.
- (79) Galdino, F. E.; Picco, A. S.; Capeletti, L. B.; Bettini, J.; Cardoso, M. B. Inside the Protein Corona: From Binding Parameters to Unstained Hard and Soft Coronas Visualization. *Nano Lett.* **2021**, *21* (19), 8250–8257. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.1c02416>.
- (80) Zhdanov, V. P. Nanoparticles without and with Protein Corona: Van Der Waals and Hydration Interaction. *J. Biol. Phys.* **2019**, *45* (3), 307–316. <https://doi.org/10.1007/s10867-019-09530-8>.
- (81) Debayle, M.; Balloul, E.; Dembele, F.; Xu, X.; Hanafi, M.; Ribot, F.; Monzel, C.; Coppey, M.; Fragola, A.; Dahan, M.; Pons, T.; Lequeux, N. Zwitterionic Polymer Ligands: An Ideal Surface Coating to Totally Suppress Protein-Nanoparticle Corona Formation? *Biomaterials* **2019**, *219*, 119357. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119357>.
- (82) García-Álvarez, R.; Vallet-Regí, M. Hard and Soft Protein Corona of Nanomaterials: Analysis and Relevance. *Nanomaterials* **2021**, *11* (4), 888. <https://doi.org/10.3390/nano11040888>.
- (83) Latour, R. A. The Langmuir Isotherm: A Commonly Applied but Misleading Approach for the Analysis of Protein Adsorption Behavior: Protein Adsorption and the Langmuir Isotherm. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2015**, *103* (3), 949–958. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35235>.

- (84) Li, X.; He, E.; Xia, B.; Liu, Y.; Zhang, P.; Cao, X.; Zhao, L.; Xu, X.; Qiu, H. Protein Corona-Induced Aggregation of Differently Sized Nanoplastics: Impacts of Protein Type and Concentration. *Environ. Sci. Nano* **2021**, *8* (6), 1560–1570. <https://doi.org/10.1039/D1EN00115A>.
- (85) Dong, Z.; Hou, Y.; Han, W.; Liu, M.; Wang, J.; Qiu, Y. Protein Corona-Mediated Transport of Nanoplastics in Seawater-Saturated Porous Media. *Water Res.* **2020**, *182*, 115978. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115978>.
- (86) Zhou, X.-X.; He, S.; Gao, Y.; Li, Z.-C.; Chi, H.-Y.; Li, C.-J.; Wang, D.-J.; Yan, B. Protein Corona-Mediated Extraction for Quantitative Analysis of Nanoplastics in Environmental Waters by Pyrolysis Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (17), 6698–6705. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00156>.
- (87) Latreille, P.-L.; Le Goas, M.; Salimi, S.; Robert, J.; De Crescenzo, G.; Boffito, D. C.; Martinez, V. A.; Hildgen, P.; Banquy, X. Scratching the Surface of the Protein Corona: Challenging Measurements and Controversies. *ACS Nano* **2022**, *16* (2), 1689–1707. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c05901>.
- (88) Kihara, S.; van der Heijden, N. J.; Seal, C. K.; Mata, J. P.; Whitten, A. E.; Köper, I.; McGillivray, D. J. Soft and Hard Interactions between Polystyrene Nanoplastics and Human Serum Albumin Protein Corona. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30* (4), 1067–1076. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00015>.
- (89) Kihara, S.; Ghosh, S.; McDougall, D. R.; Whitten, A. E.; Mata, J. P.; Köper, I.; McGillivray, D. J. Structure of Soft and Hard Protein Corona around Polystyrene Nanoplastics—Particle Size and Protein Types. *Biointerphases* **2020**, *15* (5), 051002. <https://doi.org/10.1116/6.0000404>.
- (90) Lundqvist, M.; Stigler, J.; Cedervall, T.; Berggård, T.; Flanagan, M. B.; Lynch, I.; Elia, G.; Dawson, K. The Evolution of the Protein Corona around Nanoparticles: A Test Study. *ACS Nano* **2011**, *5* (9), 7503–7509. <https://doi.org/10.1021/nn202458g>.
- (91) Zeng, L.; Gao, J.; Liu, Y.; Gao, J.; Yao, L.; Yang, X.; Liu, X.; He, B.; Hu, L.; Shi, J.; Song, M.; Qu, G.; Jiang, G. Role of Protein Corona in the Biological Effect of Nanomaterials: Investigating Methods. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2019**, *118*, 303–314. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.039>.
- (92) Zhang, H.; Wu, T.; Yu, W.; Ruan, S.; He, Q.; Gao, H. Ligand Size and Conformation Affect the Behavior of Nanoparticles Coated with in Vitro and in Vivo Protein Corona. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (10), 9094–9103. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b16096>.
- (93) Monopoli, M. P.; Walczyk, D.; Campbell, A.; Elia, G.; Lynch, I.; Baldelli Bombelli, F.; Dawson, K. A. Physical–Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to *in Vitro* and *in Vivo* Biological Impacts of Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (8), 2525–2534. <https://doi.org/10.1021/ja107583h>.
- (94) 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>.
- (95) Shemetov, A. A.; Nabiev, I.; Sukhanova, A. Molecular Interaction of Proteins and Peptides with Nanoparticles. *ACS Nano* **2012**, *6* (6), 4585–4602. <https://doi.org/10.1021/nn300415x>.
- (96) 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>.

- (97) Zhang, Y.; Wu, J. L. Y.; Lazarovits, J.; Chan, W. C. W. An Analysis of the Binding Function and Structural Organization of the Protein Corona. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (19), 8827–8836. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c01853>.
- (98) Müller, L. K.; Simon, J.; Rosenauer, C.; Mailänder, V.; Morsbach, S.; Landfester, K. The Transferability from Animal Models to Humans: Challenges Regarding Aggregation and Protein Corona Formation of Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (2), 374–385. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01472>.
- (99) Gopinath, P. M.; Saranya, V.; Vijayakumar, S.; Mythili Meera, M.; Ruprekha, S.; Kunal, R.; Pranay, A.; Thomas, J.; Mukherjee, A.; Chandrasekaran, N. Assessment on Interactive Prospectives of Nanoplastics with Plasma Proteins and the Toxicological Impacts of Virgin, Coronated and Environmentally Released-Nanoplastics. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 8860. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45139-6>.
- (100) Ferreira, L. F.; Picco, A. S.; Galdino, F. E.; Albuquerque, L. J. C.; Berret, J.-F.; Cardoso, M. B. Nanoparticle-Protein Interaction: Demystifying the Correlation Between Protein Corona and Aggregation Phenomena. **2022**, 21.
- (101) Vroom, R. J. E. Aging of Microplastics Promotes Their Ingestion by Marine Zooplankton. *Environ. Pollut.* **2017**, 10.
- (102) Anandakrishnan, R.; Drozdetski, A.; Walker, R. C.; Onufriev, A. V. Speed of Conformational Change: Comparing Explicit and Implicit Solvent Molecular Dynamics Simulations. *Biophys. J.* **2015**, *108* (5), 1153–1164. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.12.047>.
- (103) van Maaren, P. J.; van der Spoel, D. Molecular Dynamics Simulations of Water with Novel Shell-Model Potentials. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (13), 2618–2626. <https://doi.org/10.1021/jp003843l>.
- (104) Kusalik, P. G.; Svishchev, I. M. The Spatial Structure in Liquid Water. *Science* **1994**, *265* (5176), 1219–1221. <https://doi.org/10.1126/science.265.5176.1219>.
- (105) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- (106) McCammon, J. A.; Gelin, B. R.; Karplus, M. Dynamics of Folded Proteins. *Nature* **1977**, *267* (5612), 585–590. <https://doi.org/10.1038/267585a0>.
- (107) Warshel, A.; Levitt, M. Theoretical Studies of Enzymic Reactions: Dielectric, Electrostatic and Steric Stabilization of the Carbonium Ion in the Reaction of Lysozyme. *J. Mol. Biol.* **1976**, *103* (2), 227–249. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90311-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90311-9).
- (108) Sagermann, M.; Matthews, B. W. Crystal Structures of a T4-Lysozyme Duplication-Extension Mutant Demonstrate That the Highly Conserved β -Sheet Region Has Low Intrinsic Folding Propensity. *J. Mol. Biol.* **2002**, *316* (4), 931–940. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5376>.
- (109) Best, R. B.; Buchete, N.-V.; Hummer, G. Are Current Molecular Dynamics Force Fields Too Helical? *Biophys. J.* **2008**, *95* (1), L07–L09. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.132696>.
- (110) Kang, W.; Jiang, F.; Wu, Y. How to Strike a Conformational Balance in Protein Force Fields for Molecular Dynamics Simulations? *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2022**, *12* (3). <https://doi.org/10.1002/wcms.1578>.

- (111) Lindorff-Larsen, K.; Maragakis, P.; Piana, S.; Eastwood, M. P.; Dror, R. O.; Shaw, D. E. Systematic Validation of Protein Force Fields against Experimental Data. *PLoS ONE* **2012**, *7* (2), e32131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032131>.
- (112) Bjelkmar, P.; Larsson, P.; Cuendet, M. A.; Hess, B.; Lindahl, E. Implementation of the CHARMM Force Field in GROMACS: Analysis of Protein Stability Effects from Correction Maps, Virtual Interaction Sites, and Water Models. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6* (2), 459–466. <https://doi.org/10.1021/ct900549r>.
- (113) Piana, S.; Klepeis, J. L.; Shaw, D. E. Assessing the Accuracy of Physical Models Used in Protein-Folding Simulations: Quantitative Evidence from Long Molecular Dynamics Simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2014**, *24*, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.12.006>.
- (114) Baker, C. M. Polarizable Force Fields for Molecular Dynamics Simulations of Biomolecules. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2015**, *5* (2), 241–254. <https://doi.org/10.1002/wcms.1215>.
- (115) Raffaini, G.; Ganazzoli, F. Protein Adsorption on a Hydrophobic Surface: A Molecular Dynamics Study of Lysozyme on Graphite. *Langmuir* **2010**, *26* (8), 5679–5689. <https://doi.org/10.1021/la903769c>.
- (116) Wei, T.; Carignano, M. A.; Szleifer, I. Lysozyme Adsorption on Polyethylene Surfaces: Why Are Long Simulations Needed? *Langmuir* **2011**, *27* (19), 12074–12081. <https://doi.org/10.1021/la202622s>.
- (117) Oliveira, Y. M.; Vernin, N. S.; Maia Bila, D.; Marques, M.; Tavares, F. W. Pollution Caused by Nanoplastics: Adverse Effects and Mechanisms of Interaction *via* Molecular Simulation. *PeerJ* **2022**, *10*, e13618. <https://doi.org/10.7717/peerj.13618>.
- (118) Scott, W. R. P.; Hünenberger, P. H.; Tironi, I. G.; Mark, A. E.; Billeter, S. R.; Fennen, J.; Torda, A. E.; Huber, T.; Krüger, P.; van Gunsteren, W. F. The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103* (19), 3596–3607. <https://doi.org/10.1021/jp984217f>.
- (119) Sun, H. COMPASS: An Ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds. *J Phys Chem B* **1998**, *102* (38), 7338–7364.
- (120) Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (45), 11225–11236. <https://doi.org/10.1021/ja9621760>.
- (121) Hollóczki, O.; Gehrke, S. Nanoplastics Can Change the Secondary Structure of Proteins. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 16013. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52495-w>.
- (122) Zhu, X.; Huang, W.; Fang, M.; Liao, Z.; Wang, Y.; Xu, L.; Mu, Q.; Shi, C.; Lu, C.; Deng, H.; Dahlgren, R.; Shang, X. Airborne Microplastic Concentrations in Five Megacities of Northern and Southeast China. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, *acs.est.1c03618*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c03618>.
- (123) Slocik, J. M.; Dennis, P. B.; Govorov, A. O.; Bedford, N. M.; Ren, Y.; Naik, R. R. Chiral Restructuring of Peptide Enantiomers on Gold Nanomaterials. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6* (5), 2612–2620. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00933>.
- (124) Vallee, A.; Humblot, V.; Pradier, C.-M. Peptide Interactions with Metal and Oxide Surfaces. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43* (10), 1297–1306. <https://doi.org/10.1021/ar100017n>.

- (125) Silva, S.; Almeida, A.; Vale, N. Combination of Cell-Penetrating Peptides with Nanoparticles for Therapeutic Application: A Review. *Biomolecules* **2019**, *9* (1), 22. <https://doi.org/10.3390/biom9010022>.
- (126) Topală, T.; Bodoki, A.; Oprean, L.; Oprean, R. Bovine Serum Albumin Interactions with Metal Complexes. *Med. Pharm. Rep.* **2014**, *87* (4), 215–219. <https://doi.org/10.15386/cjmed-357>.
- (127) Lu, T.-H.; Panneerselvam, K.; Liaw, Y.-C.; Kan, P.; Lee, C.-J. Structure Determination of Porcine Haemoglobin. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2000**, *56* (3), 304–312. <https://doi.org/10.1107/S0907444900000093>.
- (128) Asakura, T.; Mayberry, J. Relationship between Morphologic Characteristics of Sickle Cells and Method of Deoxygenation. *J. Lab. Clin. Med.* **1984**, *104* (6), 987–994. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:0022214384900556>.
- (129) Mansouri, A. Oxidation of Human Hemoglobin by Sodium Nitrite-Effect of β -93 Thiol Groups. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, *89* (2), 441–447. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(79\)90649-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(79)90649-1).
- (130) Fink, A. L. The Aggregation and Fibrillation of α -Synuclein. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39* (9), 628–634. <https://doi.org/10.1021/ar050073t>.
- (131) Stefanis, L. α -Synuclein in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2* (2), a009399–a009399. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>.
- (132) Sam, S. T.; Nuradibah, M. A.; Ismail, H.; Noriman, N. Z.; Ragunathan, S. Recent Advances in Polyolefins/Natural Polymer Blends Used for Packaging Application. *Polym.-Plast. Technol. Eng.* **2014**, *53* (6), 631–644. <https://doi.org/10.1080/03602559.2013.866247>.
- (133) Gardette, M.; Perthue, A.; Gardette, J.-L.; Janecska, T.; Földes, E.; Pukánszky, B.; Therias, S. Photo- and Thermal-Oxidation of Polyethylene: Comparison of Mechanisms and Influence of Unsaturation Content. *Polym. Degrad. Stab.* **2013**, *98* (11), 2383–2390. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2013.07.017>.
- (134) Rajakumar, K.; Sarasvathy, V.; Thamarai Chelvan, A.; Chitra, R.; Vijayakumar, C. T. Natural Weathering Studies of Polypropylene. *J. Polym. Environ.* **2009**, *17* (3), 191–202. <https://doi.org/10.1007/s10924-009-0138-7>.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

Puisque cette thèse combine des approches expérimentales et des simulations, un grand nombre de méthodes différentes ont été utilisées. Nous présentons dans ce chapitre les protocoles suivis lors de notre travail.

1. Produits chimiques et petits matériels utilisés

| Produits | Marques | Référence |
|--|----------------------|-----------------|
| Produits secs | | |
| 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 |
| Plastiques | | |
| Microparticules de polyéthylène | Clariant | Ceridust 3610 |
| Microparticules de polypropylène | Clariant | Ceridust 6050 M |
| Filtres de polypropylène | Whatman | 6788-2504 |
| Capillaires et cuves optiques | | |
| Cuves CaF ₂ de 1 à 100 µm d'épaisseur | Hellma | |
| Cuves quartz Suprasil 1 cm | Hellma | 104-B-10-40 |
| Cuves de fluorescence en quartz suprasil 10×2 mm | Hellma | Z802549-1EA |
| Cuves des tonomètres | Eurolabo | |
| Capillaires en verre | Hilgenberd | 14-093-64 |
| Divers | | |
| Roue d'agitation | Stuart | SB3 |
| 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 |
| Tubes à centrifuger coniques en polypropylène | Fisherbrand | 11849650 |

Les masses de microplastiques introduits dans les solutions sont pesées sous hotte avec une balance Mettler Toledo précise à 10^{-5} g couplée à un kit antistatique Haug-PRX U alimenté par une haute tension 8 kV.

Nos solutions sont préparées dans de l'eau ultrapure MilliQ (MilliPore, $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, COT = 5 ppb). Cette eau est également utilisée pour préparer le tampon phosphate. Pour cela, des sels de phosphate monosodique NaH_2PO_4 (Sigma B9754) et disodique Na_2HPO_4 sont dissous dans de l'eau MilliQ en quantités calculées pour obtenir le pH désiré. Pour la plupart de nos expériences, nous avons préparé du tampon à pH 6,8 et une concentration de 2 M en phosphate, que nous avons dilué 20 fois lors des préparations de solutions de protéines pour tamponner à pH 7,0 avec une concentration de 100 mM phosphate. Pour les expériences de tonométrie nous préparons une solution tampon de pH 7,2 à 2 M, qui est diluée pour préparer des solutions tamponnées à pH 7,4 avec une concentration en phosphate de 100 mM. Ce pH permet d'être plus proche des conditions physiologiques et de comparer nos résultats à d'autres expériences de tonométrie qui ont été réalisées au laboratoire à ce pH.

Les solutions de protéine ont été préparées dans des tubes en polypropylène (PP) de 15 mL (tubes à centrifuger conique en PP Easy Reader™, Fisherbrand, référence 11849650, surface interne 50 cm^2). Nous avons également testé des tubes en verre de 9 mL (Pyrex, référence 10044604, surface interne 23 cm^2), des tubes en Téflon™ de 43 mL (Thermo Scientific, référence 3114-0050, surface interne 85 cm^2) et des tubes protéine Lobind™ de 6,4 mL (Eppendorf, référence 0030108302, surface interne 34 cm^2).

2. Méthodes d'analyse des protéines et des microparticules de plastique

2.1. Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

Ces mesures nous apportent des informations sur la structure des échantillons étudiés, et permet en particulier de calculer les surfaces spécifiques. Les surfaces spécifiques des microparticules de plastique et des filtres en polypropylène ont été déterminées par SAXS. L'appareil utilisé est un diffractomètre Xeuss 2.0, présenté Figure 2.1, configuré avec une source de rayons X de cuivre (Xenocs™), avec un temps de comptage de 3600 secondes à 2,5 m du détecteur. Les données présentées correspondent à des moyennes sur 2 mesures dans le vide.

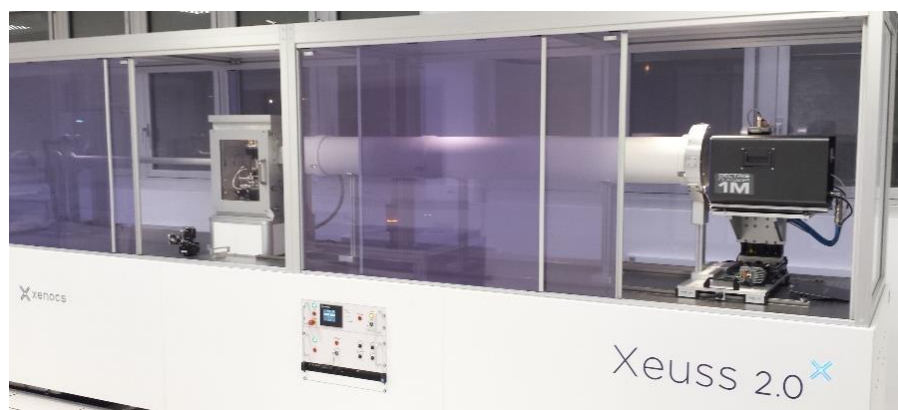


Figure 2.1 : Photographie du diffractomètre Xeuss 2.0 utilisé pour les mesures de SAXS.

Les échantillons étudiés sont introduits dans des capillaires de 2 mm en verre (Hilgenberg, référence 14-093-64) maintenus dans un porte-échantillon en sortie du collimateur comme représenté Figure 2.2.

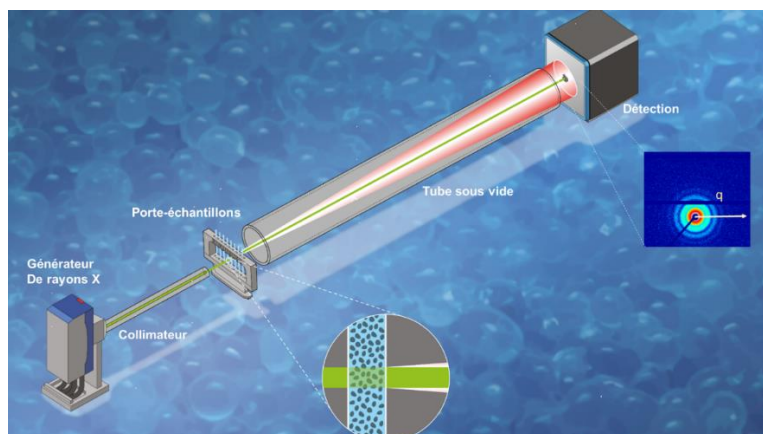


Figure 2.2 : Schéma de principe des mesures SAXS.

Les résultats obtenus ont été traités informatiquement pour soustraire le signal des supports et du bruit de fond et intégrer les spectres 2D à partir de la position du faisceau incident.

2.2. Spectroscopie ATR-FTIR

Les spectres ATR-FTIR nous apportent des informations sur la structure chimique des échantillons étudiés¹. La spectroscopie infrarouge a été réalisée avec un Bruker Tensor 27 IR équipé de l'accessoire ATR Specac Golden Gate, comme présenté Figure 2.3. Les acquisitions de spectres se font avec 128 scans, de 500 cm^{-1} à 5000 cm^{-1} , avec une résolution de 1 cm^{-1} et une vitesse de balayage de 10 kHz. La correction de ligne de base se fait en utilisant la correction élastique concave du logiciel OPUS, en utilisant comme paramètres 20 itérations et 20 points.



Figure 2.3 : Photographie du spectromètre infrarouge Bruker Tensor 27 IR équipé de l'accessoire ATR Specac Golden Gate, utilisé pour les mesures infrarouge.

Lors des mesures sur un échantillon solide, une petite quantité d'échantillon est déposée sur l'accessoire ATR puis est pressée par un cône en diamant. Les mesures sur un échantillon liquide se font de la même façon mais sans presser complètement avec le cône en diamant, qui est uniquement approché de la surface.

2.3. Spectrométrie photoélectronique à rayons X (XPS)

La spectrométrie photoélectronique à rayons X permet d'analyser la composition chimique de la surface d'un échantillon². Les mesures XPS ont été réalisées avec un spectromètre Kratos Axis Ultra DLD (Royaume-Uni), présenté Figure 2.4, avec une excitation monochromatique Al K α (1486,7 eV) et un système de compensation de charge. Les spectres globaux sont acquis avec une énergie de passage de l'analyseur de 160 eV et les spectres haute résolution avec une énergie de passage de 40 eV. L'échelle des énergies de liaison a été calibrée au pic 1s du carbone à 284,8 eV. Les données ont été traitées avec le logiciel CasaXPS pour calculer les pourcentages de concentrations atomiques. L'ajustement des pics a été réalisé en soustrayant un fond de Shirley³. Les surfaces des pics ont été corrigées en considérant les facteurs de sensibilité de Scofield⁴.



Figure 2.4 : Photographie du spectromètre Kratos Axis Ultra DLD utilisé pour les mesures XPS.

Ces mesures ont été réalisées directement sur des morceaux de filtres en PP ou des échantillons de microparticules de plastique n'ayant pas été en contact avec des protéines. Les échantillons de microparticules sont répartis sur du ruban adhésif double face afin que la poudre ne pollue pas l'appareil.

2.4. Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman nous apporte des informations sur la structure des espèces observées, le signal Raman dépendant des liaisons chimique et de la symétrie des molécules⁵⁻⁷. Il est également possible de réaliser des mesures d'imagerie Raman pour cartographier des échantillons à partir de spectres de référence. Les mesures de spectroscopie Raman ont été réalisées sur un microscope Raman confocal WITec alpha300 RA (Oxford Instruments, Allemagne), visible sur la photographie Figure 2.5.

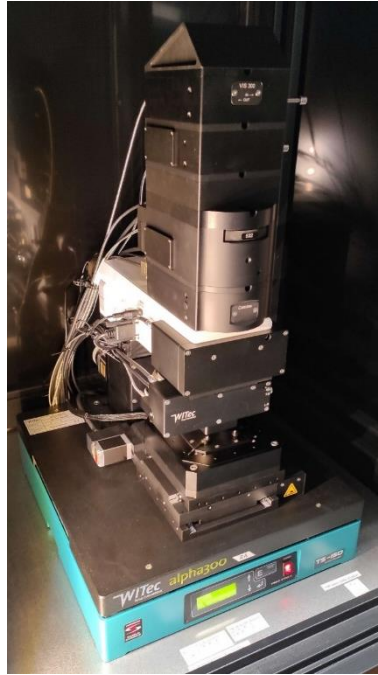


Figure 2.5 : Photographie du microscope confocal WiTec alpha300 RA utilisé pour les mesures de spectroscopie Raman.

Les poudres ont été déposées sur une lame de CaF_2 pour les mesures. Les Images Raman des microparticules de plastique sèches ont été réalisées sur des zones de $30\ \mu\text{m}$ par $30\ \mu\text{m}$ avec un pas de $0,3\ \mu\text{m}$, une durée d'exposition de $0,2\ \text{s}$, un objectif $\times 100$ (O.N. $0,9$), un réseau $600\ \text{tr/mm}$ et une puissance laser de $10\ \text{mW}$ à $532\ \text{nm}$. Les spectres de référence sur les microparticules sèches ont été obtenus avec une durée d'exposition de $5\ \text{secondes}$, 10 accumulations, un objectif $\times 100$ (O.N. $0,9$), un réseau $600\ \text{tr/mm}$ et une puissance laser de $5\ \text{mW}$ à $532\ \text{nm}$. Des spectres de référence ont été mesurés sur 10 particules avec ces paramètres puis moyennés.

Pour les solutions, $10\ \mu\text{L}$ de solution ont été déposés entre deux lamelles de silice (Esco Optics, USA) en utilisant du parafilm comme espaceur dans une chambre Attofluor (ThermoFischer, France) fermée. Les images Raman des microplastiques en solution ont été réalisées avec les mêmes paramètres en utilisant un objectif à immersion d'huile $\times 100$ (O.N. $1,3$), en utilisant le même réseau et le même laser que pour les mesures à sec. Pour chaque échantillon étudié, au moins deux images ont été mesurées. Pour obtenir des spectres de référence, nous avons moyenné 10 spectres mesurés en utilisant les mêmes paramètres que pour les références des particules sèches. Les 10 spectres ont été mesurés sur une ligne, à $10\ \mu\text{m}$ les uns des autres.

Pour les images Raman sur poudre comme pour les mesures en solutions, la résolution spatiale maximale est de $209\ \text{nm}$ d'après le critère de Rayleigh, et la résolution spectrale est de l'ordre de 3 à $5\ \text{cm}^{-1}$. Nous avons vérifié que le laser ne causait pas de dommages sur les différents échantillons en réalisant 10 mesures successives de $5\ \text{secondes}$ chacune en un même point.

Les données ont été traitées avec le logiciel WITec Project Five. Les rayons cosmiques ont été retirés automatiquement puis manuellement, puis la ligne de base a été corrigée en utilisant la fonction Shape. Les spectres Raman de chaque composante ont été extraits et comparés aux spectres de référence.

Lors des mesures sur les espèces de référence (microparticules de plastique seules, tampon phosphate, hémoglobine oxygénée en solution et hémoglobine vieillie thermiquement en solution, présentées chapitre 3 paragraphe 5), les composantes ont été obtenues en utilisant la fonction True

Component Analysis puis en ajoutant des composantes jusqu'à ce que l'image résiduelle soit de faible intensité et que le spectre soit correctement ajusté en tout point de l'image.

Lors des mesures sur les plastiques après mise en contact avec l'hémoglobine, nous avons importé les composantes correspondant au plastique approprié, au tampon phosphate, à l'hémoglobine oxygénée et à l'hémoglobine vieillie (voir chapitre 3 paragraphe 5).

Les images en champ clair de l'échantillon et les images Raman de chaque composante ont été exportées vers le logiciel Fiji, qui a été utilisé pour obtenir les images composites. Ces analyses permettent de cartographier les espèces présentes dans l'échantillon.

2.5. Spectrophotométrie UV-visible

La spectroscopie UV-visible a été utilisée pour vérifier la pureté des protéines, pour calculer leur concentration, et pour suivre l'oxygénation de l'hémoglobine. Pour les mesures sur des solutions, celles-ci ont été analysées en transmission dans des cuves en Quartz Suprasil (Hellma) de trajet optique 1 cm contenant 1 mL de solution avec un spectrophotomètre double faisceau Shimadzu UV-2450 présenté Figure 2.6.

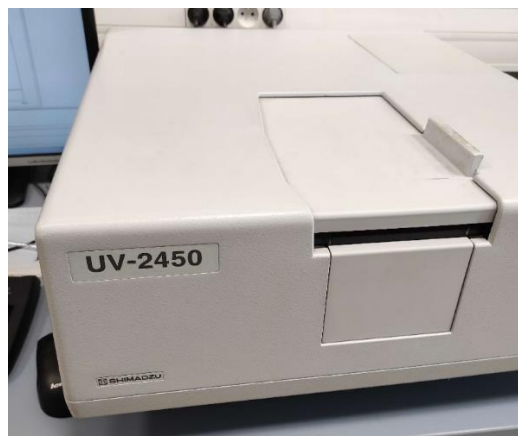


Figure 2.6 : Photographie du spectrophotomètre Shimadzu UV-2450 utilisé pour les mesures d'absorbance.

Pour les mesures sur de spectres de protéines adsorbées sur des filtres, nous avons utilisé une sphère d'intégration⁸ Shimadzu ISR-2600PLUS montée sur un spectrophotomètre double faisceau UV-2600. Une sphère d'intégration permet de réorienter tous les rayonnements réfléchis ou transmis par un échantillon vers un photomultiplicateur, et ainsi de mesurer les rayonnements diffusés. Nos mesures ont été réalisées en réflexion diffuse, ce qui signifie que nous avons analysé les photons diffusés par l'échantillon. Le principe de la sphère d'intégration, en particulier pour les mesures en réflexion diffuse, est illustré Figure 2.7.

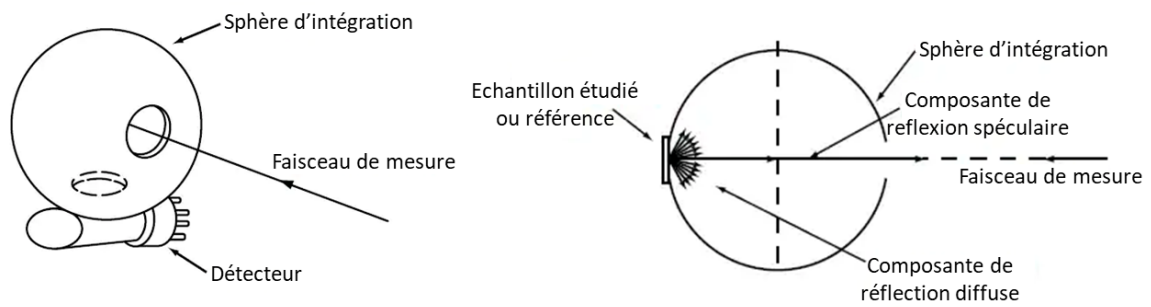


Figure 2.7 : A gauche, représentation schématique d'une sphère d'intégration, et à droite, schématisation de son principe de fonctionnement en réflexion diffuse. Adapté du site de Shimadzu⁹.

Lors de nos mesures l'échantillon est placé en sortie de la sphère, comme nous pouvons le voir Figure 2.8.



Figure 2.8 : Photographie de la sphère d'intégration Shimadzu ISR-2600PLUS avec un tonomètre positionné pour des mesures en réflexion diffuse.

Pour mesurer le spectre de microparticules de plastique, la ligne de base est mesurée avec un échantillon de sulfate de baryum en sortie de la sphère d'intégration. Pour mesurer le spectre d'une protéine adsorbée sur un filtre en PP, la ligne de base est mesurée avec un filtre en PP n'ayant pas été en contact avec des protéines en sortie de la sphère d'intégration.

2.6. Turbiscan

Les dispersions de microparticules de plastique en solution sont des systèmes métastables, si elles ne sont plus agitées les microparticules vont crémier à la surface de la solution. Les expériences turbiscan permettent de tirer des informations sur la stabilité de ces particules en solution¹⁰. Un analyseur de stabilité Turbiscan LAB (Formulation, France) a été utilisé pour mesurer la déstabilisation des microparticules en solution. Cet appareil, illustré Figure 2.9, permet de mesurer le signal transmis et

rétrodiffusé (backscattering) par l'échantillon à intervalles réguliers. Pour nos expériences, nous avons réalisé une mesure toutes les 30 minutes pendant 24 heures.

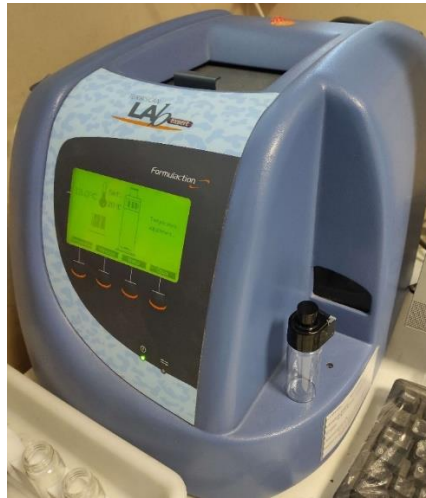


Figure 2.9 : Photographie du Turbiscan LAB et de la cuve utilisée pour les mesures de turbiscan.

Deux types de mesure sont possibles avec cet appareil, le premier consistant à effectuer les mesures à une hauteur donnée et le second à effectuer les mesures sur toute la hauteur de l'échantillon. Afin de suivre le crémage de particules en solution, nous utilisons le second mode de mesure. Nous avons passé au turbiscan des échantillons de 10 mL, correspondant à une hauteur de 25 mm dans les tubes de mesure. Afin de suivre le comportement 'global' de la suspension, nous avons moyenné la transmission et rétrodiffusion sur une hauteur de 5 mm à 18 mm et suivie l'évolution de ces valeurs au cours du temps.

Pour l'hémoglobine, les mesures de turbiscan ont été réalisées avec de la méthémoglobine (voir paragraphe 4.3 de ce chapitre), puisque nous n'avions pas la possibilité –au moment de ces expériences- de nous procurer du sang frais pour préparer de l'hémoglobine oxygénée lors de ces mesures. Nous avons ensuite vérifié la validité de ces mesures en répétant les mesures sur l'hémoglobine à 50 mg/L avec de l'hémoglobine oxygénée, afin de confirmer que le comportement observé était identique pour l'hémoglobine oxygénée et la méthémoglobine (voir chapitre 3 paragraphe 4).

2.7. Spectrofluorimétrie

Les mesures de spectrofluorimétrie nous ont permis de calculer les concentrations en BSA et en α -synucléine lorsque ces protéines sont en trop faibles quantités pour être mesurées précisément par spectroscopie UV-visible. Pour les mêmes raisons, cette méthode a également été utilisée pour calculer les concentrations des peptides. Les mesures de spectrofluorimétrie sur des échantillons ont été réalisées dans une cuve en Quartz Suprasil (Hellma) contenant 200 μ L de solution avec un fluorimètre Horiba Jobin-Yvon Fluoromax 4, visible Figure 2.10.



Figure 2.10 : Photographie du fluorimètre Horiba Jobin-Yvon Fluoromax 4 utilisé pour les mesures de fluorescence.

Une fois le signal d'émission mesuré, l'aire sous le pic du signal est mesurée. Pour déterminer le facteur entre cette aire et la concentration de la solution, une courbe de calibration a été mesurée pour chaque protéines et peptides étudiés. Les largeurs de fentes et longueurs d'onde d'excitation utilisées pour chaque protéine et peptide sont listées lors de la présentation de ces protéines et peptides.

2.8. Microfluorimétrie

La microfluorimétrie permet d'observer directement des coronas de protéine et de vérifier si des agrégats sont présents. Des expériences d'imagerie par fluorescence de BSA sur des microparticules de plastique ont également été réalisées sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL. Cette ligne est équipée d'un microscope inversé Olympus IX71, avec remplacement des lentilles intermédiaires non transparentes en UV. Les microparticules de plastique, qui sont faiblement fluorescente, ont été observées par imagerie visible. L'imagerie de la BSA a été réalisée en utilisant le signal de fluorescence des résidus tryptophane et tyrosine (excitation à 265 nm, émission de 329 nm à 351 nm). Les images ont été obtenues avec un objectif $\times 100$ Zeiss Ultrafluar (O.N. 1,25), ayant une résolution spatiale maximale de 108 nm d'après le critère de Rayleigh⁴¹. Le faisceau utilisé pour les mesures étant hétérogène, le signal est corrigé en utilisant l'équation 2 :

$$Image\ corrigée = \frac{Image\ brute - Fond}{Illumination - Fond\ de\ l'illumination} \quad (eq. 2)$$

Dans cette équation, l'illumination correspond à l'image obtenue en effectuant une mesure sans échantillon ni filtre et le fond correspond à la mesure sans faisceau.

Les solutions de BSA étudiées correspondent à une situation de saturation, avec 10 g/L de microplastiques dans 10 mL de solution de protéine à 0,1 g/L, et ont été étudiées in situ sans lavage. Afin de contrôler la quantité de microparticules en solution (trop de particules nous empêcherait de les observer individuellement, et trop peu ne nous permettrait pas de réaliser des mesures sur un nombre statistiquement significatif de particules), les échantillons sont partiellement décantés et une fraction précise est extraite. Pour cela, la base des tubes en PP est trouée avant la mise en contact en utilisant une punaise, puis refermée en utilisant un bouchon de tube Eppendorf 1,5 mL en PP. La mise en contact est alors réalisée dans ce tube en suivant le protocole décrit paragraphe 5.2 de ce chapitre. Après la mise en contact, les tubes sont maintenus immobiles pour décanter pendant 24h pour les particules de PE et 3h pour celles de PP (les temps de crémage sont différents puisque les suspensions

n'ont pas la même stabilité, voir chapitre 3 paragraphe 4). Une fois les solutions décantées, le bouchon d'Eppendorf est retiré puis le bouchon du tube est légèrement dévissé pour que la solution coule lentement. La solution est ainsi répartie en 10 échantillons de 1 mL chacun et de concentrations croissantes en microparticules de plastique. Il a été convenu que les résultats présentés dans cette thèse seraient mesurés sur le septième mL, qui est homogénéisé manuellement avant les mesures.

2.9. Dynamic Light Scattering (DLS)

La DLS permet de déterminer la taille de micro-objets en solution, en particulier pour suivre l'agrégation des protéines¹². Ces expériences ont été réalisées avec un Zetasizer (Malvern), présenté Figure 2.11.



Figure 2.11 : Photographie du Zetasizer utilisé pour les mesures de DLS.

Avant mesures les échantillons sont filtrés avec un seuil de coupure de 1,2 μm , puis 400 μL de solution est prélevé et introduit dans une cuve en PMMA (Brand, chemin optique 1 cm, référence 7591-15). Les mesures sont réalisées après 200 secondes d'équilibration en température à 25°C, et les corrélogrammes obtenus sur 3 mesures consécutives sont moyennés pour obtenir les courbes présentées dans cette thèse.

2.10. Dichroïsme circulaire

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été réalisées pour observer les éventuelles modification de structure secondaire des protéines^{13,14}. Les expériences de dichroïsme circulaire sous rayonnement synchrotron (SRCD, Synchrotron Radiation Circular Dichroism) ont été réalisées sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL. Pour les mesures, les échantillons ont été introduits dans des fenêtre en CaF_2 dont l'épaisseur (de 1 μm à 100 μm) était choisie pour éviter la saturation de l'appareil.

Les solutions ont été préparées préalablement, puis les mises en contact ont été réalisées sur place en suivant le protocole décrit paragraphe 5.2 de ce chapitre. Pour les solutions correspondant au sous-nageant sans microparticule, celles-ci sont extraites par centrifugation puis extraction avec une pipette Pasteur reliée à une pompe à eau en suivant le protocole également décrit paragraphe 5.2.

L'épaisseur des échantillons était vérifiée en mesurant le spectre UV-visible puis en utilisant la loi de Beer-Lambert en connaissant la concentration en protéine, son coefficient d'extinction molaire et l'absorbance de l'échantillon (mesurée avant la mesure de dichroïsme circulaire, sur un volume de 1

mL dans une cuve en Quartz Suprasil (Hellma) de trajet optique 1 cm). La cohérence des valeurs calculées est vérifiée en calculant l'épaisseur des cellules à vide en mesurant les franges d'interférences par spectroscopie UV-visible.

Chaque spectre de dichroïsme circulaire a été mesuré 3 fois puis traité en suivant le protocole suivant :

1 – Moyenner les 3 spectres.

2 – Soustraire le signal du tampon approprié pour l'échantillon.

3 – Soustraire la ligne de base.

4 – Lisser les spectres obtenus.

5 – Normaliser par rapport à l'épaisseur, la concentration en monomère et la concentration en nombre d'acides aminés.

Un suivi de l'évolution en température du spectre de la BSA en présence de microparticules de PE a également été réalisé. Pour cela, une solution de BSA à 0,7 g/L a été mise en contact avec 10 g/L de PE sur roue pendant 72 heures en suivant le protocole présenté paragraphe 5.2 de ce chapitre. Après la mise en contact, la solution est laissée à décanter pendant 24 heures puis séparée en 10 échantillons de 1 mL comme présenté à la fin du paragraphe 2.8 de ce chapitre. Le dernier mL (celui correspondant à la solution en surface) est récupéré, puis 4 μ L de cet échantillon est déposé dans une fenêtre en CaF_2 d'épaisseur 54 μ m. Une série de mesure en contrôle de température est alors réalisée de 21°C à 96°C par pas de 3°C, en maintenant le système 11 minutes à chaque palier de température pour assurer l'équilibre thermique. Pour chaque température, 3 spectres sont mesurés de 170 nm à 260 nm. Lors du traitement ; ces spectres ne peuvent pas être normalisés puisque la présence des microparticules empêche de connaître le trajet optique exact.

3. Plastiques microstructurés utilisés

3.1. Microparticules de plastique

Les microparticules utilisées ont été offertes par Clariant (Allemagne), sous la référence Ceridust 3610 pour le polyéthylène (PE) et 6050M pour le polypropylène (PP). Les microparticules de PE ont une densité de 0,97 g/cm³, il s'agit donc de PE haute densité¹⁵.

Les distributions de taille ont été déterminées en utilisant le diamètre de Feret mesuré en utilisant un microscope inversé et analysé en utilisant Fiji¹⁶. Les surfaces spécifiques ont été mesurées par SAXS. Les données correspondent à une moyenne de 3 mesures sur des poudres sèches sous vide.

Des mesures de cristallographie aux rayons X ont également été réalisées sur les microparticules de plastique en utilisant un Empyrean DY1534 (Panalytical). Celles-ci permettent d'obtenir des informations sur la structure cristalline et/ou amorphes des microparticules. Les mesures ont été réalisées à 40 kV et 30mV en mode linéaire PIXcel intégrant en mouvement continu par Guillaume Brotons à l'IMMM (Le Mans) sur la plateforme "Diffraction et Diffusion des Rayons X". Les protocoles de mesures classiques à la géométrie sur poudre "Bragg-Brentano" ont été suivies (faisceau émergent en collimation divergente et convergences au détecteur par diffraction des cristallites, double jeu de fentes de Soller et filtre $K\beta$ sur la source). Le diffractogramme du substrat a été systématiquement mesuré¹⁷.

Les microparticules de plastique ont également été imagées par microscopie confocale Raman. Les plastiques ont été déposés sur des lamelles de CaF_2 et les acquisitions d'images Raman ont été

réalisées sur des zones de $30 \times 30 \mu\text{m}$ en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 532 nm, un objectif $\times 100$ (O.N. 0,9), un réseau 600 g/mm, une puissance de laser de 10 mW, une durée d'exposition de 0,1 s et un pas de $0,3 \mu\text{m}$. L'image en champ clair correspondante a été acquise en réflexion avec le même objectif. L'absence de dégâts causés par le laser a été contrôlée en accumulant des spectres en un même point pendant 50 secondes à la même puissance. Les données ont été traitées en utilisant le logiciel WITec Project Five. La fonction de retrait automatique des rayons cosmiques a été utilisée puis tout rayons cosmiques restants ont été éliminés manuellement. La ligne de base a été corrigée en utilisant la fonction shape. Lors des mesures sur les espèces de référence, les composantes ont été obtenues en utilisant la fonction True Component Analysis puis en ajoutant des composantes jusqu'à ce que l'image résiduelle soit de faible intensité et que le spectre soit correctement ajusté en tout point de l'image. Ces analyses permettent de cartographier les espèces présentes sur les images.

Les spectres FTIR ont été obtenues en pressant les poudres avec un cône en diamant. 128 scans ont été acquis de 500 à 5000 cm^{-1} avec une résolution de 1 cm^{-1} et une fréquence de scan de 10 kHz.

3.2. Filtres en polypropylène

Afin d'avoir accès à une autre forme de plastique microstructuré, plus adaptée pour certaines de nos expériences, nous avons utilisé des filtres en PP Whatman Puradisc de diamètre 25 mm et pores $0,45 \mu\text{m}$. Ces filtres étant vendus dans des boîtiers en polypropylène, les bordures de ces derniers sont coupées afin d'en extraire les filtres, comme représenté Figure 2.12.

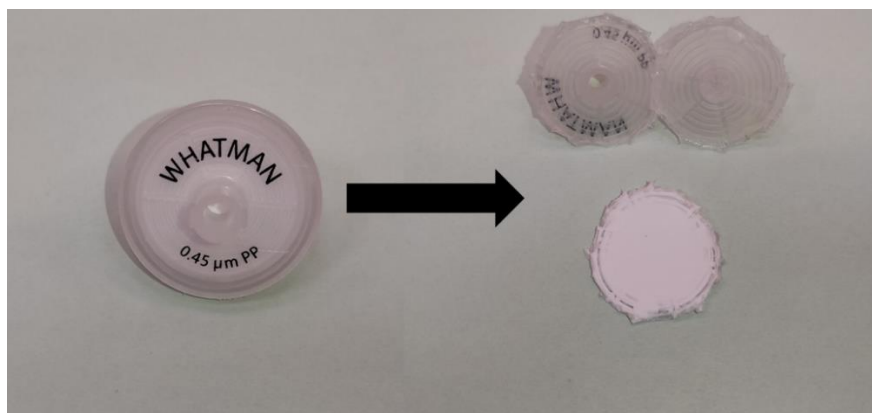


Figure 2.12 : Photographie d'un filtre en polypropylène contenu dans son porte-filtre (à gauche) et extrait de son porte-filtre (à droite).

Afin d'assurer que les filtres utilisés lors de chaque mise en contact sont de même taille, une pièce en plastique rectangulaire de 10 mm par 15 mm a été imprimée par impression 3D et utilisée pour découper des morceaux de même taille sur chaque filtre ($22,5 \text{ mg}$, soit $0,01575 \text{ m}^2$). La surface spécifique de ces filtres a été déterminé par SAXS en utilisant le même protocole que pour les microparticules de plastique. Les filtres ont également été analysés par spectroscopie ATR-FTIR et XPS en suivant les mêmes protocoles que dans le cas des microparticules de plastique.

3.3. Vieillessement des microplastiques

Trois méthodes de vieillissement différentes ont été testées, en suivant à chaque fois le même protocole pour les microparticules de PP et de PE.

La première méthode a consisté à laisser les microplastiques dans une solution d'eau de mer artificielle en mouvement. Cette eau de mer artificielle a été préparée en dissolvant, dans une fiole (1 L) d'eau milliQ, les produits listés Tableau 2.1, puis en ajoutant de la soude jusqu'à atteindre un pH de 8,3. Une fois la solution préparée, 10 mL sont introduits dans 25 tubes en polypropylène de 15 mL (Fisherbrand™).

| Produit | Quantité |
|--------------------------------------|----------|
| NaCl | 26,4 g |
| KCl | 745 mg |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 1,32 g |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 6,08 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 3,94 g |
| Eau milliQ | Qsp 1 L |

Tableau 2.1 : Produits utilisés pour préparer 1 L d'eau de mer artificielle.

Ces tubes sont alors placés à 4°C sur une roue de 50 cm de diamètre tournant à 3 tours/minute, dont ils sont retirés une fois toutes les 2 semaines pour les secouer manuellement puis les ouvrir pour permettre un remplacement de l'air contenu. Ce vieillissement a été prolongé pendant plus de 2 ans. Certains tubes tournent encore sur cette roue.

La seconde méthode a consisté à remplir à moitié un bécher de 100 mL avec des microparticules de plastique en poudre, puis de le laisser dans une étuve à 85°C. Ces plastiques sont récupérés après 2 mois de vieillissement thermique.

La troisième méthode est un vieillissement par irradiation. Ces irradiations sont obtenues en utilisant l'accélérateur linéaire d'électrons du laboratoire (ALIENOR), qui génère des électrons pulsés de 10 MeV. Lors de nos expériences, nous avons utilisé des pulses de 12 ns à une fréquence de 10 Hz. Pour déterminer les doses de radiations émises, la tension est mesurée en sortie du faisceau par un oscilloscope TDS784D (Tektronix) avec une bande passante de 1 GHz. L'aire du signal des pulses est mesurée par cet oscilloscope et communiquée en temps réel à l'ordinateur. Cette aire est proportionnelle à la dose d'irradiation contenue dans le pulse, et le facteur de proportionnalité a été calculé par dosimétrie de Fricke¹⁸. Nous avons ainsi mesuré que chaque pulse correspond à environ 20 Gy, mais cette valeur peut varier en fonction de la température ou de la durée de fonctionnement de l'appareil, il est donc important de suivre l'évolution de cette valeur pendant les expériences pour ajuster le nombre de pulses nécessaires pour irradier l'échantillon.

Une lame en verre sodocalcique est introduite en sortie de l'accélérateur et irradiée par 600 pulses afin de faire apparaître une tâche sombre, permettant de visualiser la hauteur du faisceau afin de positionner le porte-échantillon. Une fois la lame retirée, environ 300 mg de microparticules de plastique est introduit dans une cuve en Quartz SUPRASIL de 10×10 mm, atteignant ainsi une hauteur d'environ 1,5 cm (la tâche présente sur la lame est utilisée pour vérifier que l'échantillon ne dépasse pas la hauteur du faisceau). L'échantillon, positionné comme indiqué sur la photographie Figure 2.13 est alors soumis à 4 sessions d'irradiation successives de 500 kGy chacune (durant environ 40 minutes), et mélangé entre chaque session afin de permettre une irradiation homogène du plastique.



Figure 2.13 : Cuve contenant 300 mg de microparticules de plastique en sortie de l'accélérateur linéaire d'électrons.

L'efficacité de ces méthodes a été déterminé en mesurant le spectre ATR-FTIR des plastiques après vieillissement en suivant le protocole décrit dans le paragraphe 2.2.

4. Protéines et peptides utilisés

4.1. Peptides

La faible taille des peptides, et le fait qu'ils permettent d'observer les propriétés d'acides aminés spécifiques en font des objets de choix pour les simulations. Nous avons donc étudié une série de 20 peptides suivant la séquence SGGXGGXGGXGGS, X étant un acide aminé différent pour chacun des peptides. Cette séquence a été choisie pour limiter au maximum la gêne stérique autour de l'acide aminé X, et l'obtention de ces peptides dans le cadre des simulations est présenté dans le paragraphe 7 de ce chapitre.

Pour la partie expérimentale nous avons sélectionné 2 de ces peptides : SGGWGGWGGWGGS et SGGYGGYGGYGGS, que nous appellerons respectivement peptide W et peptide Y (voir chapitre 5 paragraphe 2).

Les peptides ont été fournis par SB-peptide sous la forme de 10 aliquots contenant chacun 1 mg de peptide et conservés à -20°C. Lors de la préparation des solutions de peptide, 1 aliquot est introduit dans une fiole jaugée de 20 mL que nous remplissons au trait de jauge avec de l'eau milliQ. Le peptide Y est dissous directement, mais le peptide W requiert ensuite 2 heures d'agitation à température ambiante avec un agitateur magnétique. Les solutions sont ensuite dialysées dans de l'eau MilliQ à 4°C avec une membrane Spectra/Por de seuil de rétention 3,5 kDa. Après quatre dialyses d'au moins deux heures chacune, les solutions sont centrifugées à 20 000 g pendant 10 minutes. Leurs spectres d'absorbance UV ont été mesurés et sont présentés Figure 2.14.

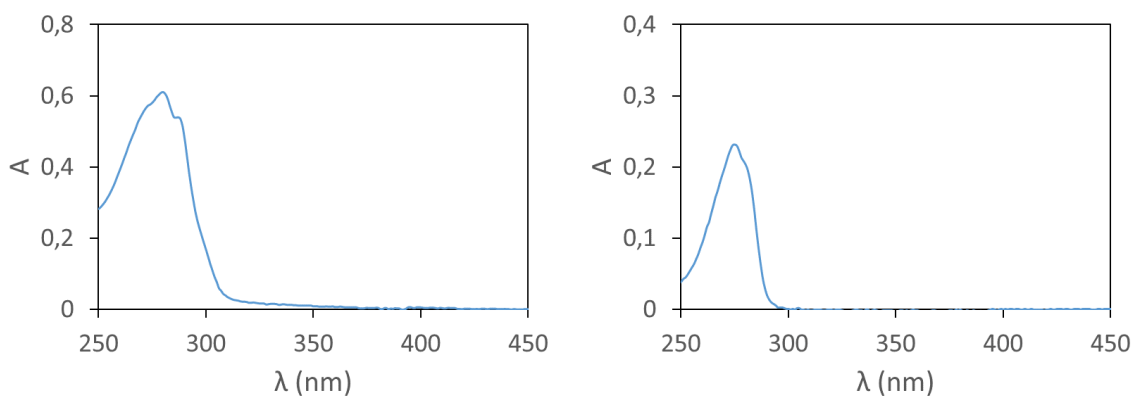


Figure 2.14 : Spectres d'absorbance UV-visible du peptide W (à gauche) et du peptide Y (à droite) dans 100 mM phosphate pH 7,0*.

*Tous les spectres d'absorption et de fluorescence présentés dans cette partie ont été mesurés dans ce tampon, qui ne sera pas reprécisé dans les légendes pour en simplifier la lecture.

Les coefficients d'extinction molaire de ces peptides ont été calculés en utilisant ProtParam, et nous avons obtenu :

Pour le peptide W, $\epsilon_{280} = 16500 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Pour le peptide Y, $\epsilon_{280} = 4470 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Les spectres d'émission de fluorescence ont également été mesurés, et sont représentés Figure 2.15.

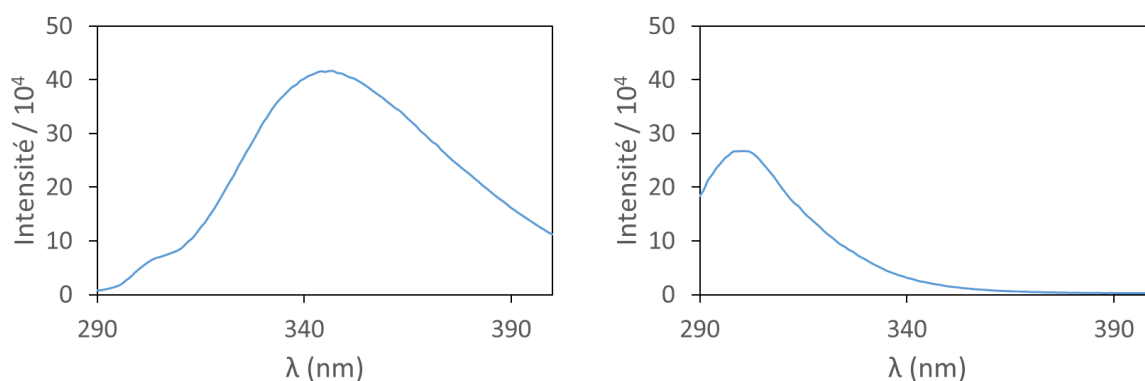


Figure 2.15 : Spectres d'émission de fluorescence du peptide W (à gauche) et du peptide Y (à droite) pour une longueur d'onde d'excitation de 275 nm et une largeur de fentes de 4 nm.

Pour pouvoir déterminer la concentration des solutions de peptides à partir de leur spectre d'émission, nous avons réalisé des courbes d'étalonnage. Pour cela nous avons mesuré les spectres d'émission des peptides pour une longueur d'onde d'excitation de 275 nm et une largeur de fentes de 4 nm à différentes concentrations (mesurées en spectroscopie UV-visible). Puis, pour chaque concentration, nous avons mesuré l'aire du signal de 335 à 360 nm pour le peptide W et de 300 à 310 nm pour le peptide Y. Les courbes ainsi obtenues sont représentées Figure 2.16.

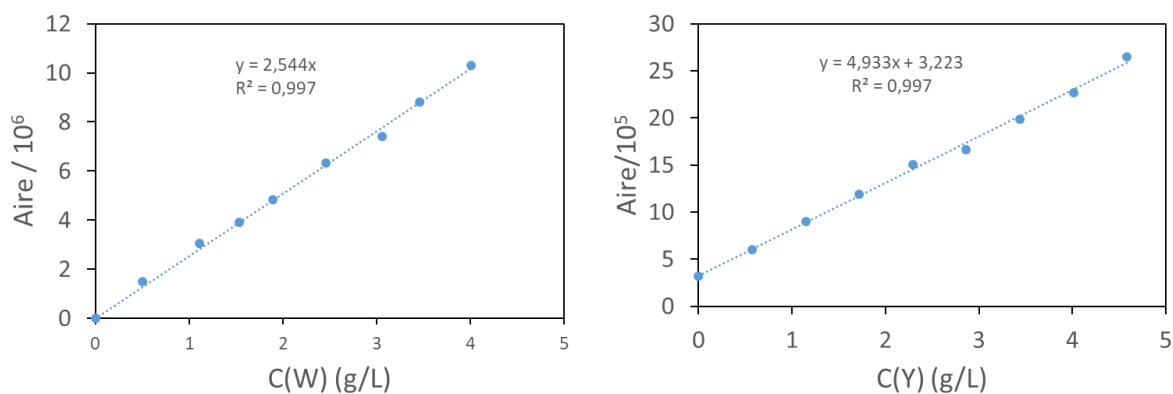


Figure 2.16 : A gauche, courbe d'étalonnage de l'aire (en coups pas seconde) du signal d'émission de fluorescence (de 335 à 360 nm) du peptide W en fonction de sa concentration massique. A droite, courbe d'étalonnage de l'aire du signal d'émission de fluorescence (de 300 à 310 nm) du peptide Y.

Nous pouvons remarquer la présence d'une composante constante dans le cas du peptide Y. Ceci est cohérent puisque la longueur d'onde d'émission du peptide Y est proche de celle de l'eau, qui présente un pic d'émission autour de 305 nm. Pour les deux peptides, nous avons bien obtenu des courbes d'étalonnage linéaires.

4.2. Albumine de sérum bovin (BSA)

Les caractéristiques principales de la BSA sont présentées Tableau 2.2.

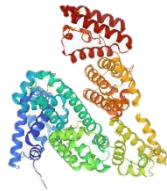
| | |
|---------------------------|---|
| Représentation |  |
| Masse molaire (Da) | 66 463 |
| Nombre d'acides aminés | 583 ¹⁹ |
| Nombre d'aromatiques | 49 |
| Ponts disulfure | 17 ²⁰ |
| Point isoélectrique | 4,7 – 4,9 ²¹ |
| Caractère oligomérique | Monomère ²² |
| Rayon de Stokes | 3,5 nm ²³ |
| Structure secondaire | 67% hélices, 10% coudes, 23% autre ²⁴ |
| Acides aminés hydrophobes | 394 |

Tableau 2.2 : Caractéristiques principales de la BSA.

Nous utilisons de la BSA commerciale achetée sous forme lyophilisée (Sigma A7030). Celle-ci est mise, par pointe de spatule, en solution et dialysée dans de l'eau MilliQ à 4°C avec une membrane Spectra/Por de seuil de rétention 3,5 kDa. Après quatre dialyses d'au moins deux heures chacune, la solution est centrifugée à 20 000 g pendant 10 minutes.

Les solutions sont conservées à 6°C, et centrifugées à chaque utilisation (16000 g, 5 min, 4°C) avant de mesurer leur spectre UV-visible pour calculer leur concentration et vérifier la pureté de la solution. Le

spectre UV-visible de la BSA est présenté Figure 2.17. Pour déterminer la concentration en BSA à partir du spectre UV-visible, nous avons utilisé la valeur du coefficient d'extinction molaire à 278 nm $\epsilon_{278} = 44000 \text{ M}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$.²⁵

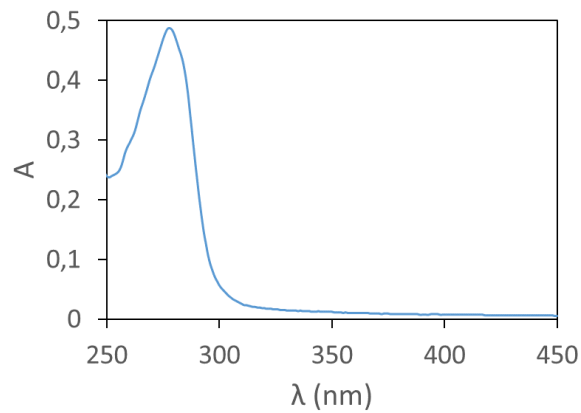


Figure 2.17 : Spectre d'absorbance UV-visible de la BSA.

Le spectre d'émission de fluorescence de la BSA a également été mesuré, et est présenté Figure 2.18.

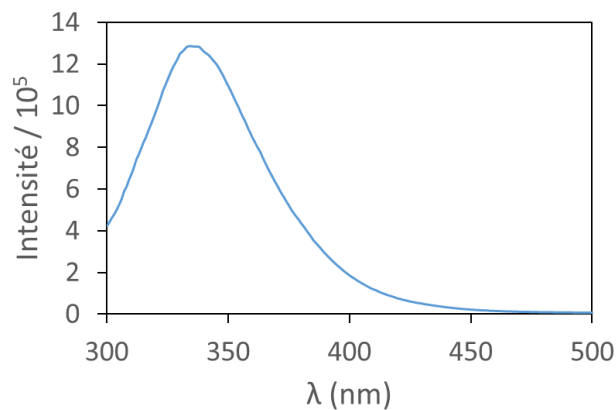


Figure 2.18 : Spectre d'émission de fluorescence de la BSA pour une longueur d'onde d'excitation de 279 nm et une largeur de fentes de 4 nm.

La BSA contenant en particulier 3 résidus tryptophane et 21 résidus tyrosine, il est cohérent que son spectre d'émission soit relativement large, avec un maximum se trouvant entre ceux des peptides contenant ces acides aminés.

Pour pouvoir déterminer la concentration des solutions de BSA à partir de leur spectre d'émission, nous avons réalisé une courbe d'étalonnage. Pour cela nous avons mesuré les spectres d'émission des peptides pour une longueur d'onde d'excitation de 279 nm et une largeur de fentes de 4 nm à différentes concentrations (mesurées en spectroscopie UV-visible). Pour, pour chaque concentration, nous avons mesuré l'aire du signal de 330 à 340 nm. Les courbes ainsi obtenues sont représentées Figure 2.19.

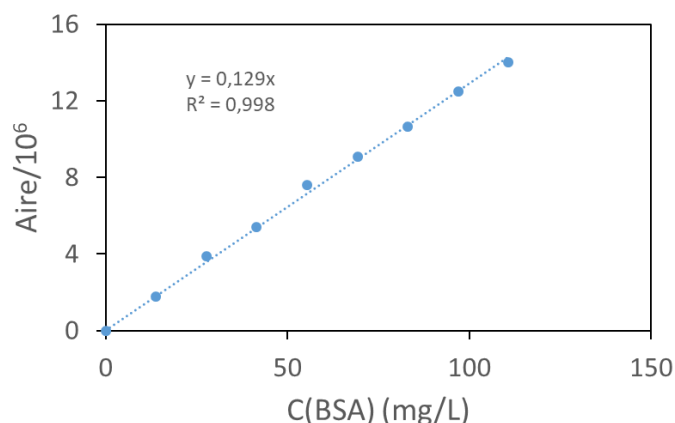


Figure 2.19 : Courbe d'étalonnage de l'aire (en coups pas seconde) du signal d'émission de fluorescence (de 330 à 340 nm) de la BSA en fonction de sa concentration massique.

Nous avons bien obtenu une courbe d'étalonnage linéaire.

4.3. Hémoglobine

Les caractéristiques principales de l'hémoglobine sont présentées Tableau 2.3.

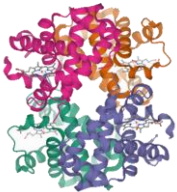
| | |
|---------------------------|---|
| Représentation |  |
| Masse molaire (Da) | 64 458 |
| Nombre d'acides aminés | 574 ²⁶ |
| Nombre d'aromatiques | 44 |
| Ponts disulfure | 0 |
| Point isoélectrique | 7,0 ²⁷ |
| Caractère oligomérique | Tétramère (2 chaînes α et 2 chaînes β) |
| Rayon de Stokes | 3,2 nm ²⁸ |
| Structure secondaire | 75% hélices, 25% autre ²⁹ |
| Acides aminés hydrophobes | 422 |

Tableau 2.3 : Caractéristiques principales de l'hémoglobine.

Nous avons travaillé sur 3 des formes de l'hémoglobine, que nous allons présenter séparément : l'hémoglobine oxygénée, l'hémoglobine désoxygénée et l'hémoglobine oxydée (methémoglobine). Il existe d'autres formes d'hémoglobine, comme la carboxyhémoglobine qui est obtenue lorsque le fer de l'hème est lié au monoxyde de carbone, mais seules ces 3 formes seront utilisées dans le cadre de cette thèse.

Préparation de l'hémoglobine oxygénée

L'hémoglobine de porc oxygénée est obtenue à partir de sang fourni par l'abattoir Harang de Houdan, le laboratoire ayant l'autorisation de la Division Départementale de Protection des Populations pour le transporter et l'utiliser. Le sang est mélangé lors de son acquisition à un quart de son volume de solution anticoagulante préparée en dissolvant dans de l'eau milli-Q de l'acide citrique à 4,8 g/L, du citrate de sodium à 13,2 g/L et du dextrose à 14,7 g/L. Le sang est gardé à 4°C dans une glacière pour son transport et purifié dès son arrivée au laboratoire.

Pour la purification le sang est centrifugé (5000 g, 10 min, 4°C) pour retirer, par aspiration sous vide, le surnageant contenant les lipides. Une solution de NaCl à 9 g/L est mélangée au culot, en homogénéisant avec une baguette en verre, pour compenser le volume éliminé tout en restant à force ionique constante. La solution est centrifugée à nouveau (5000 g, 5 min, 4°C) avant d'éliminer le surnageant.

Cette étape de lavage NaCl/centrifugation est répétée un total de 3 fois. Les hématies sont ensuite hémolysées par choc osmotique en ajoutant environ 1 volume d'eau milli-Q à 4°C pour 3 volumes de culot globulaire lavé (le changement de couleur de la solution étant utilisé pour repérer la fin de l'hémolyse). Du tampon phosphate 2,8 M à pH=7,0 et 4°C est ensuite ajouté pour faire précipiter les membranes des hématies, le changement de couleur de la solution étant à nouveau utilisé pour repérer la fin de la précipitation. La solution est centrifugée (25000 g, 20 min, 4°C) et le surnageant contenant l'hémoglobine est récupéré.

Le surnageant est dialysé pendant au moins 2 heures dans 40 volumes d'eau milli-Q à 4°C à travers une membrane de dialyse de 3.5 kDa. La dialyse est répétée 4 fois. La solution dialysée est centrifugée (25000 g, 10 min, 4°C) pour éliminer les dernières membranes et l'hémoglobine précipitée. La solution est ensuite passée sur une colonne contenant de la résine AG 501-X8 pour éliminer le 2,3-diphosphoglycérate, un inhibiteur de l'hémoglobine³⁰, puis centrifugée (25000 g, 15 min, 4°C).

La solution ainsi purifiée est répartie dans des flacons remplis au maximum et étanches pour éviter la présence d'oxygène et ainsi, l'oxydation de l'hémoglobine. Les solutions sont conservées à 6°C, et centrifugées à chaque utilisation (16000 g, 5 min, 4°C) avant de mesurer leur spectre UV-visible pour calculer leur concentration et vérifier l'absence de méthémoglobine.

Le spectre d'adsorption UV-visible de l'hémoglobine oxygénée présente deux domaines d'intérêt, un pic de forte intensité autour de 415 nm (appelé pic de Soret) et un duo de pics de plus faible intensité autour de 550 nm. Ces composantes du spectre sont présentées Figure 2.20.

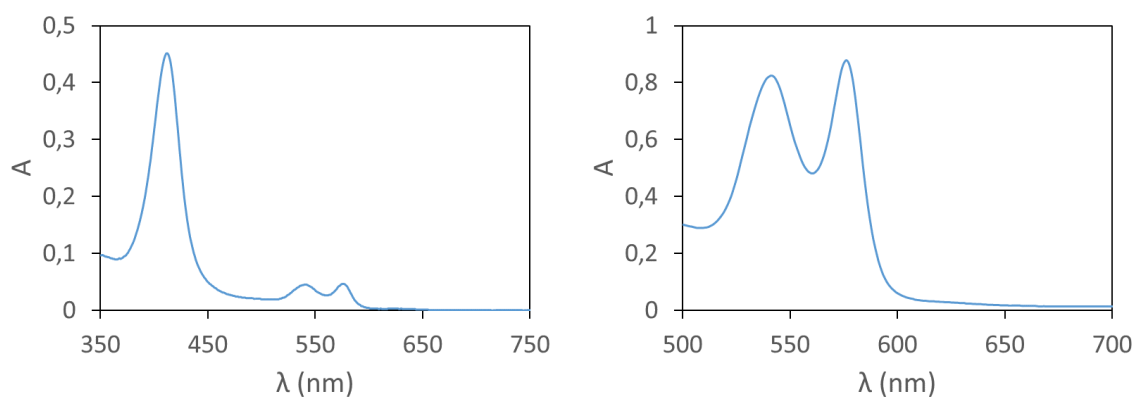


Figure 2.20 : Spectres d'absorbance UV-visible de l'hémoglobine oxygénée à 50 mg/L (à gauche) et à 1 g/L (à droite).

Le pic utilisé pour calculer la concentration de la solution va donc dépendre de l'ordre de grandeur de sa concentration.

Pour une concentration de moins de 0,1 g/L nous allons utiliser le coefficient d'extinction molaire à 415 nm, $\epsilon_{415} = 141200 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.³¹

Pour une concentration entre 0,1 g/L et 1 g/L nous allons utiliser le coefficient d'extinction molaire à 576 nm, $\epsilon_{576} = 15150 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.³²

Le spectre de l'hémoglobine est modifié lors de sa désoxygénation (présentée dans le paragraphe 7.1 de ce paragraphe), comme nous pouvons le voir Figure 2.21 sur le spectre visible.

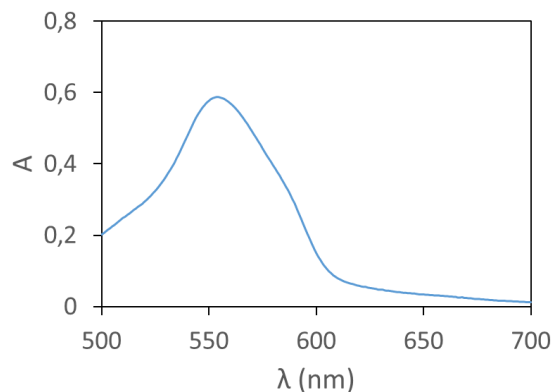


Figure 2.21 : Spectre d'absorbance visible de l'hémoglobine désoxygénée à 1 g/L.

Le coefficient d'extinction molaire de l'hémoglobine désoxygénée à 555 nm est

$$\epsilon_{555} = 13300 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}.$$
³²

Le spectre Soret de l'hémoglobine désoxygénée n'est pas présenté car il est peu déformé, et seule la longueur d'onde du maximum d'adsorption est déplacée de 413 nm à 429 nm.

Préparation de la méthémoglobine

A cause de la situation sanitaire, il nous a été impossible pendant plusieurs mois d'accéder à des abattoirs pour nous procurer du sang et préparer de l'hémoglobine fraîche. Afin de pouvoir continuer nos expériences pendant cette période, nous avons utilisé de l'hémoglobine bovine lyophilisée (Sigma-Aldrich), qui est sous la forme de méthémoglobine une fois en solution. Les expériences réalisées avec la méthémoglobine ont été répétées avec de l'hémoglobine oxygénée une fois celle-ci à nouveau disponible pour vérifier la validité des résultats (voir chapitre 3 paragraphe 4).

Comme la BSA, la protéine lyophilisée est mise en solution et dialysée dans de l'eau MilliQ à 4°C avec une membrane Spectra/Por de seuil de rétention 3,5 kDa. Après quatre dialyses d'au moins deux heures chacune, la solution est centrifugée à 20 000 g pendant 10 minutes. Les solutions sont conservées à 4°C et leur spectre d'adsorption UV-visible est mesuré avant chaque utilisation pour vérifier leur pureté.

Comme dans le cas de l'hémoglobine oxygénée, le spectre de la méthémoglobine est constituée d'un pic de Soret intense autour de 415 nm et d'un signal visible moins intense autour de 600 nm, comme présenté Figure 2.22.

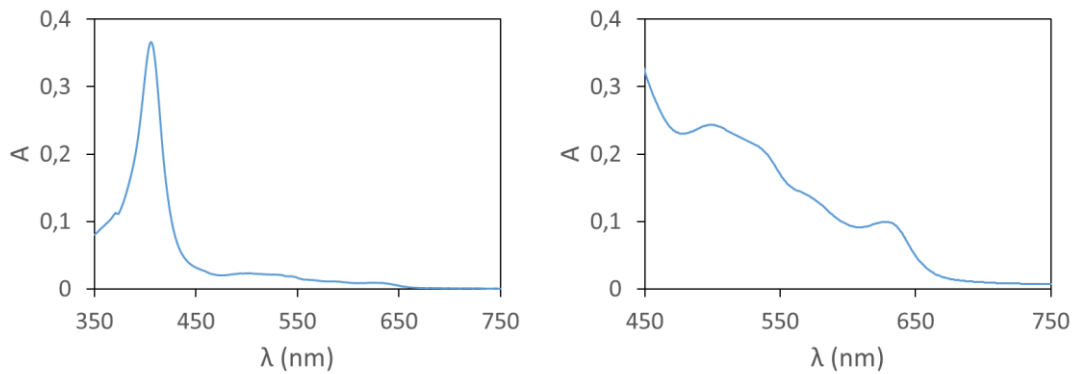


Figure 2.22 : Spectres d'absorbance UV-visible de la méthémoglobine à 50 mg/L (à gauche) et à 250 mg/L (à droite) mesurés dans un tampon phosphate 100 mM pH 7,0.

Pour la méthémoglobine, nous avons utilisé le coefficient d'extinction molaire à 623 nm qui est la longueur d'onde d'un point isobestique des spectres des deux formes de méthémoglobine présentes en solution et fonction du pH : forme $Hb^+(H_2O)$ et forme $Hb^+(HO^-)$. Le coefficient d'extinction molaire est

$$\epsilon_{623} = 3500 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}.^{33}$$

Contrairement aux autres protéines étudiées dans cette thèse, l'hémoglobine n'est pas observable en fluorescence malgré la présence d'acides aminés aromatiques. Ceci est causé par le pic de Soret qui éteint par absorption le signal d'émission de fluorescence de la protéine et empêche donc de le mesurer avec des instruments classiques³⁴.

4.4. Alpha-synucléine

Les caractéristiques principales de l' α -synucléine sont présentées Tableau 2.4.


| | |
|---------------------------|---|
| Représentation |  |
| Masse molaire (Da) | 14 460 |
| Nombre d'acides aminés | 140 ³⁵ |
| Nombre d'aromatiques | 6 |
| Ponts disulfure | 0 |
| Point isoélectrique | 4,7 ³⁶ |
| Caractère oligomérique | Monomère ³⁷ |
| Rayon de Stokes (nm) | 3,27 nm ³⁸ |
| Structure secondaire | 47% hélices, 10% feuillets- β , 43% autre ³⁷ |
| Acides aminés hydrophobes | 121 |

Tableau 2.4 : Caractéristiques principales de l' α -synucléine.

L' α -synucléine recombinante a été exprimée dans la souche BL21(CE3) d'*E coli*. Des cellules BL21(DE3) compétentes (50 μ L) ont été transformées avec le vecteur d'expression pRK172 codant pour l' α -

synucléine humaine, puis déposées et étalées dans une boîte de Pétri d'agar LB contenant 200 mg/L d'ampicilline et incubées une nuit à 37°C. Les colonies transformées ont été récupérées dans 6 flasques Erlenmeyer de 1L avec un milieu de culture LB contenant de l'ampicilline à 200 mg/L et cultivées à 37°C sous agitation (180 tours/minute). Lorsque les cellules ont atteint une densité optique de 0,6 à 600 nm, l'expression de l' α -synucléine a été induite par l'ajout d'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) à 0,5 mM puis une incubation supplémentaire à 37°C et 180 tours/minute pendant 3 heures.

Ensuite, les cellules ont été récupérées en centrifugeant 10 minutes à 5000 g à 4°C, remises en suspension dans 200 mL de Tris-HCl à 50 mM, pH 7,5, contenant 1mM de PMSF et 2 comprimés d'inhibiteurs de protéase cOmplete sans EDTA (Roche) et congelées à -80°C.

Pour purifier l' α -synucléine, les cellules ont été décongelées dans un bain-marie à 37°C. Après ajout de PMSF à 1 mM et de 2 comprimés cOmplete, les cellules ont été lysées par sonication sur de la glace en utilisant un Sonics Vibra cell 75041 Ultrasonic Processor (amplitude 40%, cycles de 20 secondes de sonication avec 20 secondes de pause pour une durée totale de sonication de 300 secondes). Les extraits ont été centrifugés 25 minutes à 4000 g et le surnageant a été récupéré. De la poudre de sulfate d'ammonium (50% de saturation, soit 0,291 g/mL) a été ajoutée à 4°C sous agitation pour précipiter l' α -synucléine. Les protéines précipitées ont été centrifugées 25 minutes à 5000 g à 4°C puis remises en suspension dans 400 mL de TrisHCl à 50 mM, pH 7,5, contenant de comprimés cOmplete jusqu'à la solubilisation complète du culot. De la polyéthylèneimine (Sigma) à 0,05% a été ajoutée à l'échantillon pendant 30 minutes sur de la glace pour précipiter les acides nucléiques. L'échantillon a ensuite été centrifugé 25 minutes à 5000 g à 4°C. Le surnageant a été chargé sur une colonne échangeuse d'ions XK 16/40 DEAE-Sepharose (GE Healthcare) (volume de résine 50 mL) équilibrée avec du TrisHCl 50 mM, pH 7,5, KCl 20 mM, β -Mercaptoethanol 1mM. Après lavage avec 200 mL de ce tampon, l'élution a été effectuée avec un gradient linéaire de KCl (de 20 mM à 1 M, 300 mL à un débit de 4 mL/min) et des fractions de 4 mL ont été récupérées et stockées à -80°C.

Les fractions d'intérêt contenant de l' α -synucléine, identifiées par SDS-PAGE, ont été regroupées et chauffées à 95°C pendant 20 minutes pour précipiter les contaminants protéiques tout en gardant l' α -synucléine soluble.

L'échantillon a été centrifugé à 4000 g pendant 20 minutes à 4°C et le surnageant a été récupéré. La concentration de l' α -synucléine purifiée a été déterminée par spectrophotométrie en utilisant un coefficient d'extinction molaire de $5960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 280 nm. L' α -synucléine pure a été filtrée sur des filtres de nitrocellulose stériles de 0,22 μm , aliquotée, congelée dans de l'azote liquide puis stockée à -80°C jusqu'à utilisation.

L'expression et la purification de l' α -synucléine utilisée pour cette thèse a été menée en binôme avec Laura Pieri, qui est garante de la qualité de la protéine purifiée. Avant la mise en contact avec les microparticules de plastique, l' α -synucléine a été dialysée dans de l'eau milliQ (4 dialyses successives d'au moins 2 heures chacun dans 3,75 L d'eau) puis centrifugée 15 minutes à 25000 g. Avant chaque expérience, l' α -synucléine est centrifugée (16000 g, 5 min, 4°C) et son spectre d'adsorption UV-visible est mesuré pour vérifier sa pureté (Figure 2.23).

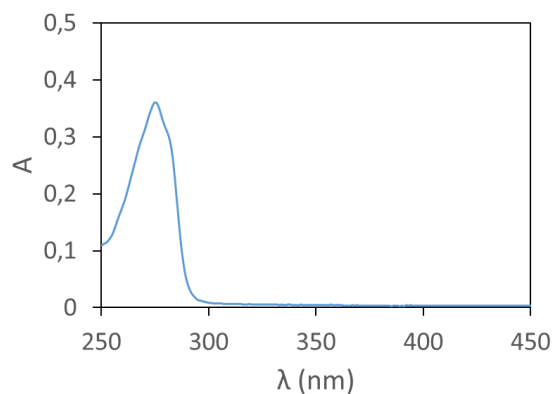


Figure 2.23 : Spectre d'absorbance UV-visible de l' α -synucléine.

Le coefficient d'extinction molaire de l' α -synucléine, $\epsilon_{280} = 5960 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, a été calculé avec ProtParam.

Le spectre d'émission de fluorescence de l' α -synucléine a également été calculé, et est présenté Figure 2.24.

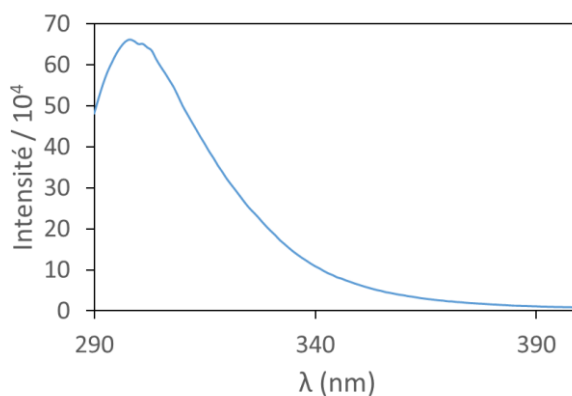


Figure 2.24 : Spectre d'émission par fluorescence de l' α -synucléine pour une longueur d'onde d'excitation de 275 nm et une largeur de fentes de 6 nm.

Ce spectre est encore plus proche du spectre du peptide Y que celui de la BSA, ce qui est cohérent puisque l' α -synucléine contient 4 tyrosine et aucun tryptophane.

Pour pouvoir déterminer la concentration des solutions de l' α -synucléine à partir de leur spectre d'émission, nous avons réalisé une courbe d'étalonnage. Pour cela nous avons mesuré les spectres d'émission des peptides pour une longueur d'onde d'excitation de 275 nm et une largeur des fentes de 6 nm à différentes concentrations (mesurées en spectroscopie UV-visible). Pour, pour chaque concentration, nous avons mesuré l'aire du signal de 295 à 305 nm. Les courbes ainsi obtenues sont représentées Figure 2.25.

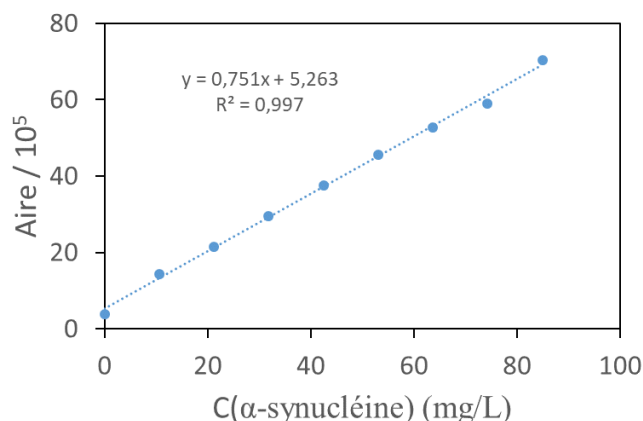


Figure 2.25 : Courbe d'étalonnage de l'aire (en coups pas seconde) du signal d'émission de fluorescence (de 295 à 305 nm) de l'α-synucléine en fonction de sa concentration massique.

Une fois de plus, la courbe d'étalonnage inclut une composante constante puisque la mesure est effectuée au niveau du pic d'émission de l'eau autour de 305 nm. La courbe d'étalonnage obtenue est bien linéaire.

5. Mise en contact des protéines et peptides avec les plastiques microstructurés

5.1. Préparation des échantillons

Pour préparer une solution de protéine d'une concentration donnée dans du tampon phosphate 100mM en partant d'une solution mère de protéine de concentration connue et de solution mère de tampon phosphate 2M, le même protocole est toujours suivi :

- 1 – Dans un tube en PP de 15 mL (Fisherbrand™), de l'eau est ajoutée pour diluer les concentrations.
- 2 – Du tampon phosphate concentré est ajouté pour tamponner le milieu.
- 3 – De la solution de protéine concentrée est ajoutée.
- 4 – Des plastiques sont ajoutés. Les microparticules sont déposées à la surface de l'échantillon. Dans le cas des filtres, ils sont fixés à l'intérieur des bouchons avec un minimum de ruban adhésif en polypropylène comme illustré Figure 2.26.

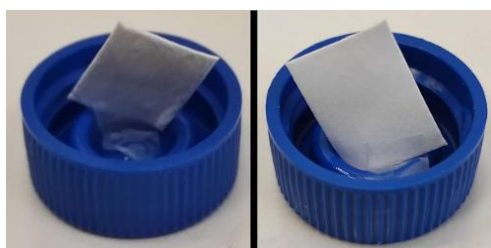


Figure 2.26 : Photographies des deux faces d'un morceau de filtre attaché à la surface intérieure d'un bouchon par du ruban adhésif.

5.2. Contact avec les microparticules de plastique

La première méthode de mise en contact consiste à avoir des protéines et microplastiques présents dans une même solution en mouvement, comme présenté sur la photo Figure 2.27.

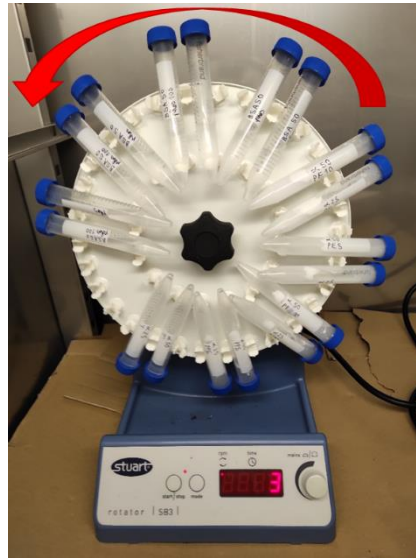


Figure 2.27 : Photographie de tubes sur la roue utilisée pour les mises en contact des protéines et des microplastiques tournant à 3 tours/minute. La flèche indique la rotation des tubes sur la roue.

Pour obtenir le mouvement nécessaire à la mise en contact nous avons laissé ces tubes sur une roue de 25 cm de diamètre tournant à 3 tours par minutes. Ces paramètres permettent de mélanger les solutions de façon constante sans endommager les protéines. La durée de ces mises en contact est de 72 heures, ce qui a été décidé à partir des suivis de cinétique de perte d'hémoglobine en présence de microparticules de plastique par Korydwen Fruit dans le cadre de son master (Université Paris Saclay, 2019, Suivi des microplastiques en interaction avec des protéines).

Après certaines mises en contact, il était nécessaire de séparer les microparticules de plastique et la solution de protéine, en particulier pour réaliser des mesures spectroscopiques sur celle-ci. Pour cela les tubes contenant les solutions sont directement centrifugés 10 minutes à 3000g et 6°C pour faire passer les microparticules en surface. Le surnageant est alors extrait avec une pipette Pasteur reliée à une pompe à eau. Cette étape de centrifugation puis lavage est répétée un total de 3 fois pour extraire autant de microparticules que possible. Les centrifugations sont réalisées avec une centrifugeuse Beckman Avanti J-25 dont l'accélération est réglée à 10 et la décélération à 1.

5.3. Contact avec les filtres en PP

Une seconde méthode de mise en contact consiste à avoir un filtre microstructuré en PP en mouvement dans une solution de protéines, ce que nous avons mis en place en réalisant des expériences de dip coating. Pour réaliser ce type de mise en contact nous avons dans un premier temps utilisé un Dip Coater (KSV Instruments) pour tremper de façon répété un morceau de filtre dans un creuset contenant 10 mL de solution d'hémoglobine, comme présenté Figure 2.28.

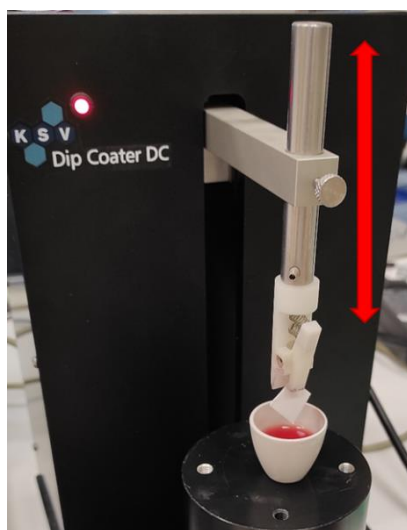


Figure 2.28 : Photographie de la mise en contact d'une protéine et d'un filtre en PP par dip coating. La flèche indique le déplacement du bras maintenant le morceau de filtre.

Ce montage s'est avéré peu adapté à nos mesures, qui étaient réalisées sur une échelle de plusieurs heures à 3 jours. Premièrement, parce que le fait de ne pouvoir réaliser qu'une mesure à la fois complique le fait de réaliser des triplicatas de mesures utilisant la même solution initiale, celle-ci pouvant se dégrader entre les mesures. Secondement, parce que maintenir le creuset à l'air libre pour la durée de nos mesures cause l'évaporation d'une partie importante de la solution.

Nous avons résolu le premier problème en remplaçant le 'bras' de l'appareil par une pièce permettant d'attacher plusieurs morceaux de filtres. Pour cela, nous avons utilisé le logiciel FreeCAD pour modéliser la pièce représentée Figure 2.29.

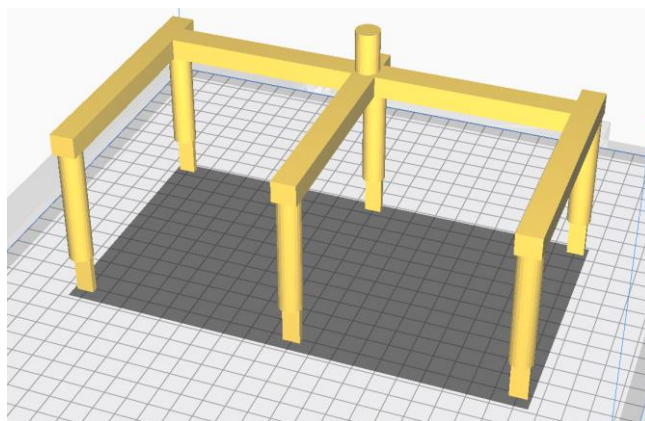


Figure 2.29 : Modèle préparé pour l'impression 3D des bras utilisés pour le dip coating.

Pour empêcher l'évaporation des solutions de protéine, nous avons déposé les creusets dans des boîtes en plastique dont nous avons découpé un trou au milieu du couvercle. Afin de limiter au maximum les pertes au niveau de l'ouverture, nous avons également modélisé puis imprimé des pièces plates présentant un trou du même diamètre que les bras du dip coater. Ces pièces ont ensuite été collées sur les couvercles des boîtes.

En ajoutant ces éléments à notre montage, avec un morceau de filtre (10 mm × 15 mm) fixé au bout de chaque « bras » par un morceau de ruban adhésif, il nous est possible de réaliser des mesures en

triplicatas sur deux échantillons à la fois et en minimisant les pertes de solution, comme illustré Figure 2.30.

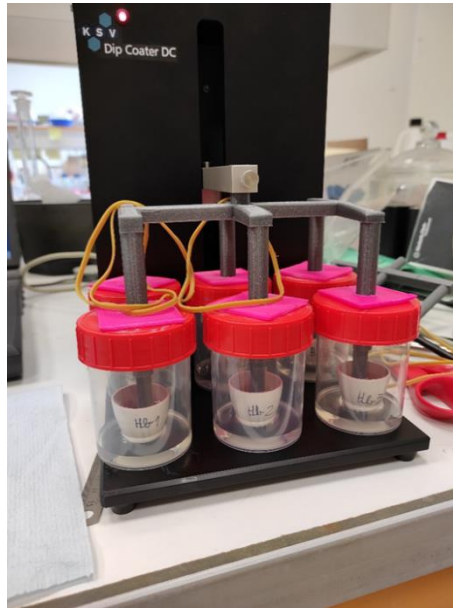


Figure 2.30 : Photographie du montage pour les expériences de dip coating.

Ce montage a permis de réaliser des expériences de dip coating sur des durées de 72 heures pour 6 échantillons de façon simultanée et de rendre les pertes de solution par évaporation négligeables. Dans le but d'approcher les conditions expérimentales de celles des mises en contact sur roue, le dip coater a été programmé pour effectuer des cycles de 20 secondes, égale à la période de rotation de la roue utilisée. Ce cycle consiste, en partant avec l'extrémité inférieure du filtre au niveau de la surface de la solution, de descendre de 10 mm à une vitesse constante de 170 mm/min, de rester fixe pendant 6,5 secondes, de remonter de 10 mm à une vitesse constante de 170 mm/min, puis de rester fixe à nouveau pendant 6,5 secondes. Le nombre de répétitions de ce cycle est calculé au début de l'expérience en fonction de la durée de mise en contact souhaitée.

5.4. Contact avec des tubes en PE

Pour compléter nos mesures, nous avons cherché à établir un troisième protocole pour mettre en contact une des protéines en mouvement avec un plastique immobile. Pour cela, nous avons fait circuler des solutions de protéine dans des tubes en plastique (Tygon chemical, diamètre interne 1/8 in, diamètre externe 1/4 in, référence 2660F-175) comme représenté Figure 2.31.



Figure 2.31 : Schéma de la mise en contact d'une protéine et d'un tube en plastique par circulation.

Afin de pouvoir suivre une solution de protéine en contact avec des tubes en plastique au cours du temps, nous avons réalisé un montage en circulation dans lequel la solution passe par une cuve en

quartz (Hellma Flox-through cells, référence Z804983). Cette cuve ne pouvant pas être utilisée dans un porte-cuve classique nous avons dû faire le nôtre par impression 3D. En expérimentant avec la cuve en dehors de spectromètre nous avons remarqué que, si la cuve est maintenue horizontalement pendant qu'un fluide circule dans le circuit, des bulles se forment dans cette dernière (Figure 2.32).

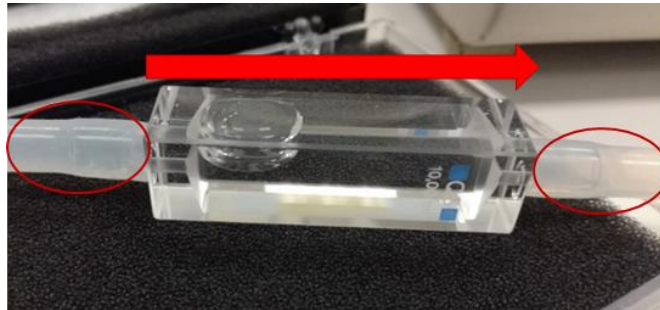


Figure 2.32 : Photographie d'une cuve maintenue horizontalement dans un circuit fermé. Les tubes en PE sont entourés en rouge, et la flèche indique le sens de circulation de la solution. Une bulle d'air est observée en haut à gauche de la cuve.

Afin d'éviter la formation de ces bulles lors de nos mesures nous avons utilisé le logiciel FreeCAD pour modéliser un porte-cuve adapté pour maintenir la cuve en diagonale, comme représenté Figure 2.33.

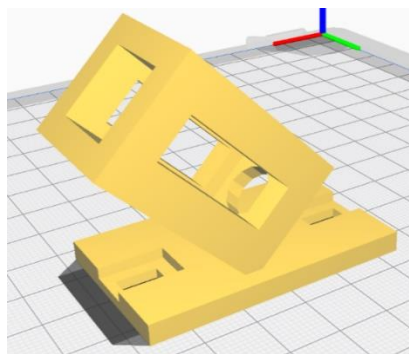


Figure 2.33 : Modèle de porte-cuve préparé pour l'impression 3D.

Une fois le support imprimé, celui-ci a été intégré à un circuit permettant de suivre l'évolution d'une solution de protéine en circulation par spectroscopie UV-visible. Ce circuit est composé de la cuve en quartz, d'une pompe péristaltique, d'un bécher contenant la solution à étudier et éventuellement un filtre en plastique, visibles Figure 2.34.

Nous avons fait le choix de garder un bécher de solution en contact avec l'air (bien que protégé par du parafilm pour limiter les pertes par évaporation) pour éviter la formation de bulles dans le circuit au cours de l'expérience. En effet, lorsque nous avons réalisé des mesures en remplissant entièrement le circuit de solution avant de le refermer, des fuites ont eu lieu au niveau des joints utilisés pour refermer le circuit et des points d'entrée et de sortie de la cuve. Bien que ces fuites soient faibles, elles causent sur une durée de plusieurs heures la formation de bulles de taille suffisante pour empêcher la bonne circulation de la solution.

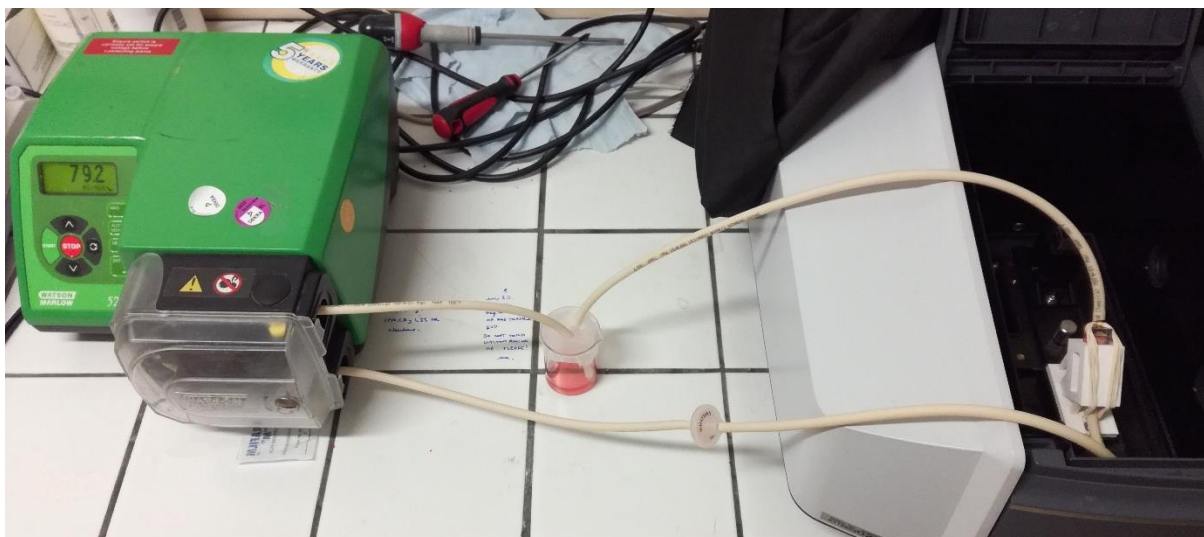


Figure 2.34 : Photographie du montage utilisé pour les expériences de circulation d'une solution de protéine dans des tubes en plastique.

5.5. Pertes sur différents tubes

Pour chaque protéine étudiée nous avons déterminé la quantité de protéine perdue en 72 heures de mise en contact sur roue. Pour cela nous avons utilisé 4 modèles de tubes différents, l'un en polypropylène (tube à centrifuger de 15 mL, Fischerbrand), le second en Teflon™ (Thermo Scientific), le troisième en verre (Pyrex) puis des tubes protein LoBind™ (Eppendorf). Les surfaces internes de ces tubes sont respectivement 50 cm², 85 nm², 34 cm² et 23 cm². Nous avons rempli chaque tube environ aux 2/3, représentatif du reste de nos expériences pour lesquelles nous avons utilisé 10 mL ou 5 mL de solution de protéine dans des tubes de 15 mL. Ces études ont été réalisées à une concentration en protéine de 0,1 g/L dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7,0, qui est représentatif des concentrations que nous allons utiliser pour le reste des expériences, et en remplissant les tubes.

Pour chaque tube, nous avons préparé 6 échantillons de chaque protéine étudiée. 3 de ces échantillons ont été laissés 72 heures à 6°C sur une roue de 25 cm de diamètre tournant à 3 tours/minute. Les 3 autres échantillons ont été maintenus statiques pendant 72 heures à 6°C. Après ces 72 heures, la concentration de chaque échantillon est mesurée et comparée à sa concentration initiale pour déterminer la quantité de protéine perdue.

6. Mesures d'impact des microparticules de plastique sur les protéines

6.1. Isothermes d'adsorption

La mesure d'isothermes d'adsorption permet d'estimer l'affinité des protéines pour les microparticules de plastique, ainsi que la quantité de protéine adsorbée par unité de surface. Les isothermes d'adsorption des protéines ont été mesurées sur les différents microparticules de plastique, vieilles et non vieilles. Les isothermes ont été tracées par déplétion, la quantité de

protéines adsorbée par les microparticules de plastique étant déterminée en calculant la différence entre la quantité de protéines non adsorbées à la quantité totale de protéines dans le système.

Pour cela plusieurs échantillons de protéines à différentes concentrations, de 5 mg/L à 100 mg/L, sont préparés dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7,0. La gamme de concentration que nous avons utilisée lors de la mise en contact de protéines avec des microparticules de plastique non vieilles est 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L, 60 mg/L, 80 mg/L, 100 mg/L. Cette gamme nous permet d'avoir un nombre de points suffisant à basse concentration pour observer la croissance initiale de l'isotherme, et à haute concentration pour observer le pallier atteint. Lors des mises en contact avec les microparticules de plastique vieilles, dont les isothermes n'atteignaient pas de pallier avec cette gamme, les concentrations des protéines sont multipliées par 10. Lors des mises en contact avec les peptides, le plateau de l'isotherme est atteint à une plus faible concentration en peptide, nous utilisons donc une gamme de concentrations différentes. Les concentrations de peptides utilisées lors des mises en contact avec les microparticules de plastique non vieilles est 0,1 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L, 7,5 mg/L, 10 mg/L, 12,5 mg/L, 15 mg/L.

Pour chaque concentration, 3 échantillons sont préparés, un témoin sans plastique, un contenant des microparticules de PP à 10 g/L, et un contenant des microparticules de PE à 10 g/L. Ces échantillons sont ensuite laissés sur une roue tournant à 3 tours/minute pendant 72 heures à 4°C (suivant le protocole présenté paragraphe 5.2 de ce chapitre).

Une fois la mise en contact réalisée en suivant le protocole décrit dans la partie 5.2, les échantillons sont centrifugés pour extraire les microparticules de plastique par crémage. 3 centrifugations successives sont réalisées (3000 g, 10 minutes, accélération 9, décélération 2, 6°C), les microparticules de plastique en surface étant extraites par aspiration avec une pipette Pasteur reliée à une pompe à eau après chaque centrifugation. Les tubes témoins sont également centrifugés. Ce protocole est représenté Figure 2.35.

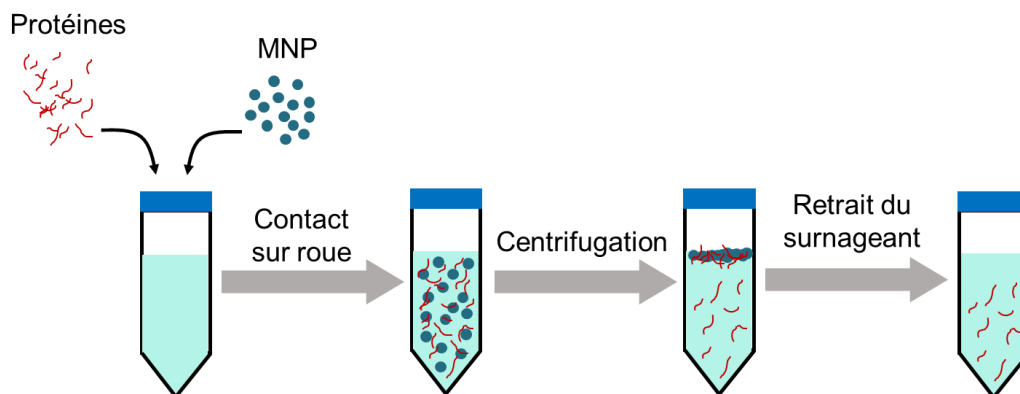


Figure 2.35 : Représentation schématique du protocole de mise en contact pour la mesure des isothermes d'adsorption. Les deux dernières étapes sont répétées 3 fois.

Pour l'hémoglobine, la concentration est mesurée par spectroscopie UV-visible. Pour la BSA et l' α -synucléine, la concentration est déterminée par spectroscopie de fluorescence. Des courbes de calibration ont été utilisées pour déterminer la concentration de la BSA et de l' α -synucléine à partir des intensités d'émission (voir paragraphe 4 de ce chapitre). Les isothermes d'adsorption obtenues ont été ajustées par minimisation des carrés des écarts en utilisant le modèle de Langmuir (voir chapitre 3 paragraphe 3).

6.2. Tonométrie

6.2.1. Tonométrie sur une solution d'hémoglobine

Les expériences de tonométrie ont été réalisées uniquement sur de l'hémoglobine oxygénée fraîche (préparée dans les 15 jours précédant la mesure). Elles permettent de déterminer l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène^{39,40}. Ces expériences consistent à désoxygéner l'hémoglobine, comme présenté Figure 2.36, puis à effectuer des ajouts contrôlée d'oxygène pour suivre sa réoxygénation.

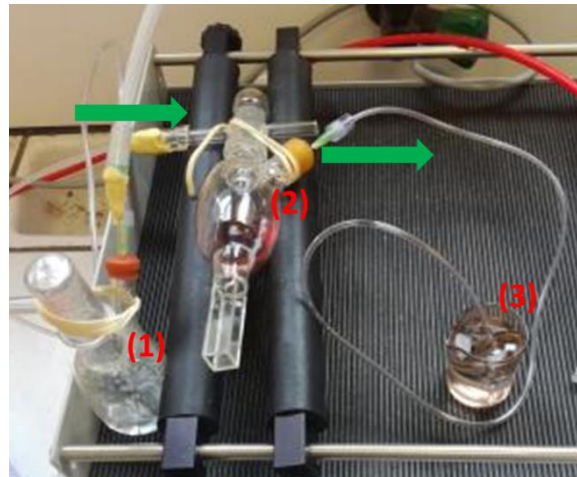


Figure 2.36 : Photographie d'une solution d'hémoglobine en cours de désoxygénation dans un tonomètre. Les flèches vertes indiquent le sens de circulation de l'argon, les nombres rouges indiquent les différentes parties du montage dans l'ordre de circulation de l'argon.

Comme indiqué Figure 2.36, le montage de désoxygénation peut se décomposer en trois parties, l'ensemble du système étant hermétiquement fermé :

- (1) Le flux d'argon passe initialement par un flacon d'eau, ce qui permet de visualiser par bullage le flux d'argon en entrée du système et de l'humidifier pour éviter de sécher l'échantillon.
- (2) Ensuite, le flux d'argon passe par le tonomètre contenant la solution d'hémoglobine, désoxygénant ainsi la solution.
- (3) Le sortie du système est également placée dans un béccher d'eau pour visualiser le flux d'argon en sortie du système, nous permettant ainsi de repérer plus facilement d'éventuelles fuites.

Pour les suivis d'oxygénation nous avons introduit 3mL de solution d'hémoglobine oxygénée à 1 g/L dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7,4 dans un tonomètre de 80 mL (volume mesuré par pesée en le remplissant d'eau) avant d'en mesurer le spectre d'absorption visible afin de vérifier qu'elle soit bien oxygénée. Après avoir fermé le tonomètre nous faisons passer un flux d'argon humide pendant 2 heures pour désoxygéner l'hémoglobine avec le montage photographié Figure 2.36. Le spectre visible de la solution complètement désoxygénée est mesuré, puis une quantité mesurée d'oxygène est introduite avec une seringue Hamilton, la solution est laissée 5 minutes afin d'atteindre l'équilibre, puis un nouveau spectre est mesuré. Cette opération est répétée jusqu'à ce que la solution soit presque complètement réoxygénée, puis le tonomètre est laissé ouvert pendant 10 minutes pour terminer la réoxygénation avant de mesurer le spectre de la solution complètement réoxygénée. Nous obtenons ainsi une série de spectres représentés Figure 2.37.

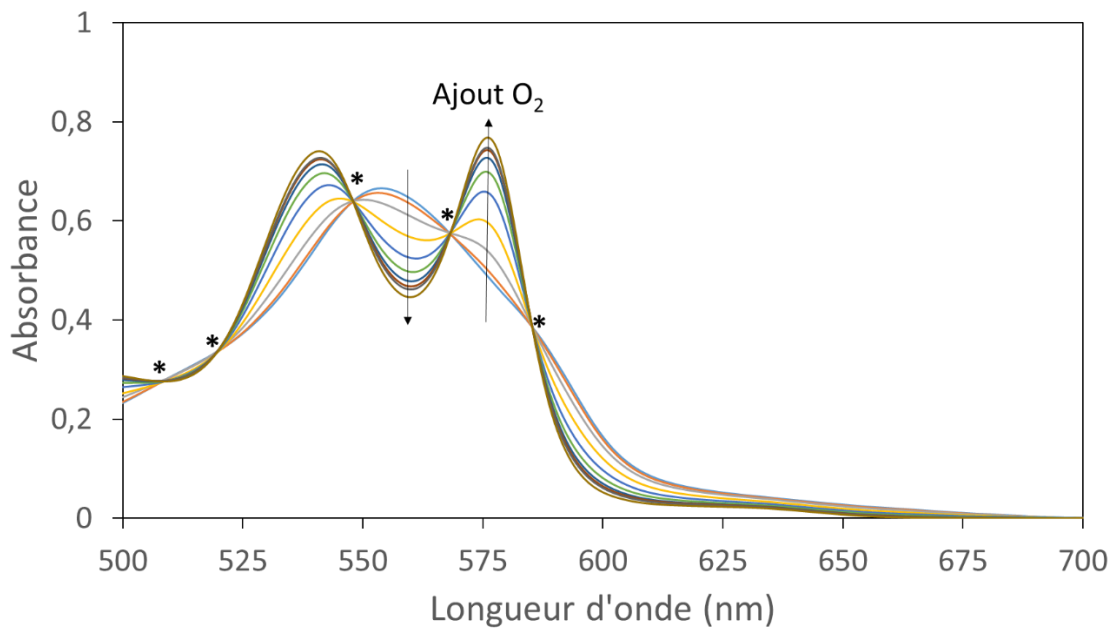


Figure 2.37 : Spectres d'absorption de l'hémoglobine après chaque ajout d'oxygène.
Les astérisques indiquent les points isobestiques.

L'existence de points isobestiques prouve l'équilibre entre deux formes, et les spectres des solutions partiellement oxygénées correspondent donc à des combinaisons linéaires des spectres de l'hémoglobine complètement oxygénée et de l'hémoglobine complètement désoxygénée. Plus précisément, l'absorbance à une longueur d'onde donnée peut s'exprimer par l'équation 4 :

$$A(\lambda) = \theta \times A_{ox}(\lambda) + (1 - \theta) \times A_{desox}(\lambda) \quad (eq.4)$$

Dans cette équation, $A(\lambda)$ est l'absorbance de l'échantillon partiellement oxygéné à la longueur d'onde considérée, $A_{ox}(\lambda)$ et $A_{desox}(\lambda)$ sont respectivement l'absorbance de la solution complètement oxygénée et complètement désoxygénée à cette longueur d'onde, et θ est la proportion d'hémoglobine oxygénée dans l'échantillon. Nous en déduisons ainsi l'équation 5 :

$$\theta = \frac{A(\lambda) - A_{ox}(\lambda)}{A_{desox}(\lambda) - A_{ox}(\lambda)} \quad (eq.5)$$

Cette formule n'est toutefois pas applicable aux points isobestiques, qui correspondent aux longueurs d'onde pour lesquelles les absorbances de l'hémoglobine oxygénée et de l'hémoglobine désoxygénée sont égales (voir Figure 2.37), puisque le dénominateur serait nul. Afin d'améliorer la précision des valeurs de θ déterminées, celles-ci ne sont pas calculées pour une seule longueur d'onde mais sur l'ensemble du signal. Après avoir éliminé les valeurs obtenues autour des points isobestiques (Figure 2.38), les valeurs restantes pour chaque échantillon sont moyennées pour déterminer la proportion d'hémoglobine oxygénée correspondante.

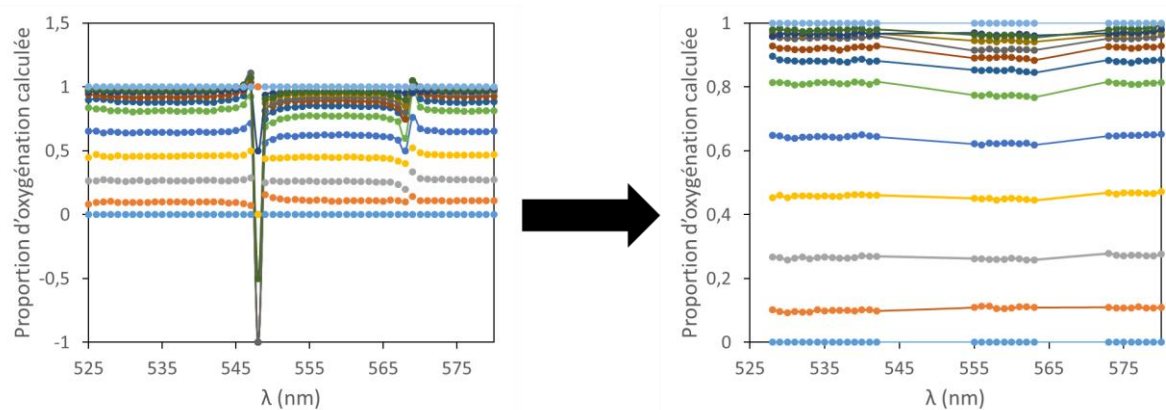


Figure 2.38 : Calcul des proportions d'oxygénation basé sur les absorptions à différentes longueur d'onde, en utilisant toutes les données (à gauche) puis en retirant les données autour des points isobestiques (à droite).

Puisque nous connaissons pour chaque échantillon le volume du tonomètre, le volume occupé par la solution d'hémoglobine et le volume d'air ajouté, nous pouvons déterminer la pression partielle en dioxygène dans le tonomètre. En connaissant la proportion d'hémoglobine oxygénée correspondante, nous pouvons donc tracer la courbe d'oxygénation de l'hémoglobine. Cette courbe représentative de la proportion d'hémoglobine oxygénée en fonction de la pression partielle en dioxygène peut être modélisées en suivant l'équation de Hill⁴¹ (équation 6).

$$\theta = \frac{P_{O_2}^n}{P_{50}^n + P_{O_2}^n} \quad (eq.6)$$

Où θ est la proportion d'hémoglobine oxygénées, P_{O_2} est la pression partielle en dioxygène, P_{50} est la pression partielle en dioxygène pour laquelle 50% de l'hémoglobine est oxygénée et n est le coefficient de Hill. Ceci correspond à l'allure de courbe représenté Figure 2.39.

La valeur de P_{50} donne donc une information sur l'affinité de l'hémoglobine. Une plus faible valeur correspond à une plus forte affinité, puisqu'elle indique qu'une faible quantité de dioxygène est suffisante pour oxygéner la moitié de l'hémoglobine. Le coefficient de Hill correspond à la coopérativité de l'hémoglobine pour l'oxygène, autrement dit au renforcement mutuel des fixations des différents ligands sur une même protéine. Pour un tétramère, ce coefficient pourrait théoriquement atteindre 4, mais en pratique le coefficient mesuré pour l'hémoglobine ne dépasse pas 3.

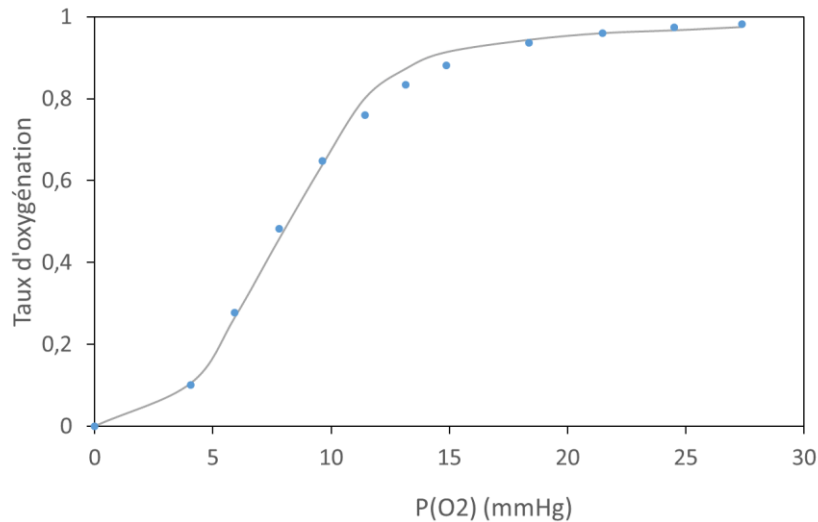


Figure 2.39 : Courbe d'oxygénation de l'hémoglobine et ajustement utilisant la formule de Hill.

Pour déterminer les valeurs de n et de P_{50} , nous utilisons la forme linéarisée de l'équation de Hill (équation 7).

$$\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n \times \log(P_{O_2}) - n \times \log(P_{50}) \quad (\text{eq. 7})$$

Tracer la courbe représentative de $\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right)$ en fonction de $\log(P_{O_2})$ permet donc de déterminer les valeurs de P_{50} et de n . Ainsi, la tonométrie nous permet de suivre l'évolution de l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène.

6.2.2. Tonométrie sur un filtre en PP

Les expériences de tonométrie réalisées sur des filtres en PP après mise en contact avec une solution d'hémoglobine peut permettre de mesurer l'activité d'hémoglobine adsorbée sur du plastique microstructuré. Ceci ne serait pas possible en suivant notre protocole décrit précédemment pour une solution d'hémoglobine contenant des microparticules de plastique en solution puisque celles-ci crèmeraient sur la durée de l'expérience. Pour réaliser les mesures sur des filtres, nous utilisons un tonomètre dont les dimensions de la cuve sont 1 mm × 10 mm (contre 10 mm × 10 mm pour les solutions) afin de maintenir le filtre relativement vertical. Un morceau de 1 cm × 1,5 cm est découpé dans un filtre en PP, déposé dans un tube contenant 10 mL d'hémoglobine oxygénée à 10 g/L dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7,4, puis laissé 72 heures sur une roue tournant à 3 tours/minute à 4°C. Une fois la mise en contact terminée le filtre est récupéré, déposé de chaque côté sur une lingette sèche afin de retirer la solution d'hémoglobine non-adsorbée, puis introduit dans le tonomètre avec 100 µL d'eau milliQ (Figure 2.40) pour éviter le séchage de la protéine.



Figure 2.40 : Photographie d'un filtre ayant adsorbé de l'hémoglobine trempant dans un tonomètre avec 100 µL de tampon phosphate 100 mM à pH 7,4.

Afin de mesurer le spectre UV-visible de l'hémoglobine sur le filtre, une sphère d'intégration est utilisée. Le spectre de réflexion diffuse est mesuré, puis la transformation de Kubelka-Munk est appliquée pour obtenir des spectres proportionnels à des spectres d'adsorption UV-visible. Les spectres de l'hémoglobine oxygénée puis désoxygénée sont mesurés, suivis par les spectres de l'hémoglobine après ajouts successifs d'oxygène en suivant le même protocole que dans le cas d'une solution d'hémoglobine.

A partir de ces spectres, les valeurs de n et de P_{50} sont déterminées de la même façon que dans le cas de l'hémoglobine en solution. Cette méthode n'est toutefois pas appliquée sur le signal de l'hème, dont la faible intensité rend l'évolution difficile à exploiter, mais sur le pic de Soret qui est beaucoup plus intense, comme nous pouvons le voir Figure 2.41.

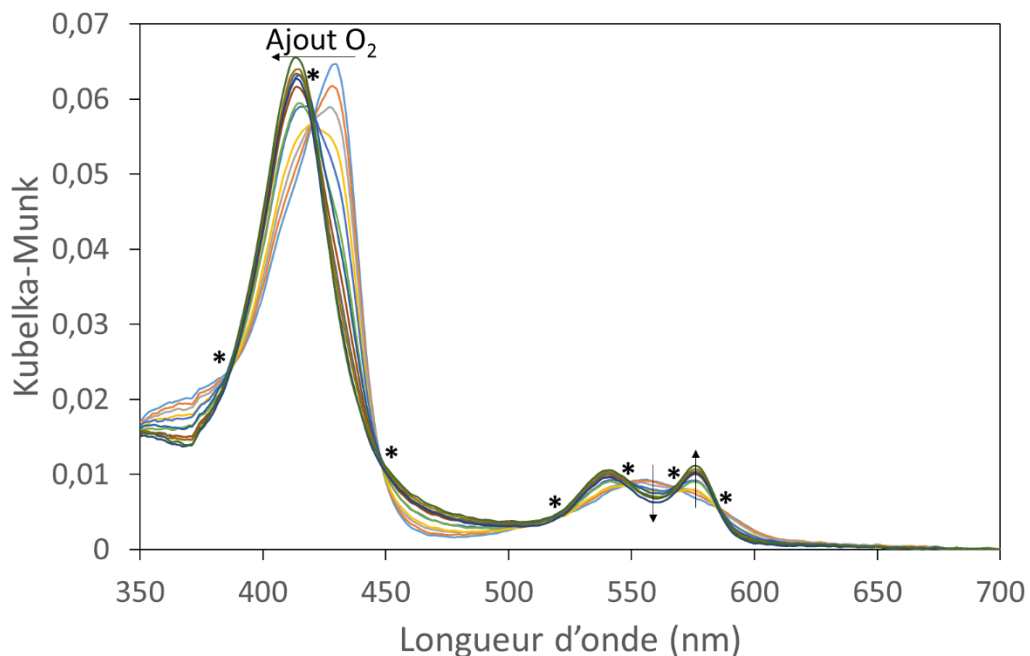


Figure 2.41 : Transformation de Kubelka-Munk des spectres de réflexion diffuse de l'hémoglobine adsorbée sur le filtre en PP après ajouts successifs d'oxygène. Les astérisques indiquent les points isobestiques.

7. Simulations

La réalisation de simulations nous permet de suivre à l'échelle atomique le comportement de peptides lors de leur adsorption sur des nanoparticules de plastique. Dans le cadre de cette thèse toutes les études ont été réalisées sur des nanoparticules de PE, puisque le temps de calcul à notre disposition aurait été insuffisant pour répéter toutes les simulations avec des nanoparticules de PP.

Les simulations ont été réalisées en deux étapes, de premières simulations exploratoires ont été réalisées sur une station locale puis ont abouti sur des simulations réalisées sur supercalculateurs. Toutes les simulations ont été réalisées sur des systèmes comprenant un peptide et une nanoparticule de PE en utilisant le champ de force OPLS-AA. Les nanoparticules de PE sont elles-mêmes composées de résidus polyéthylène (PE) et, dans le cas des nanoparticules vieilles, de résidus polycétone (PK) (Figure 2.42).

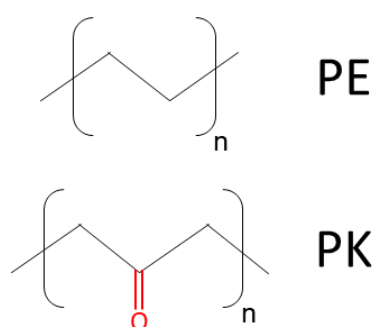


Figure 2.42 : Formules topologiques du résidu polyéthylène (PE, au dessus) et du résidu polycétone (PK, en dessous).

Premièrement, des simulations ont été réalisées pour nous familiariser avec le type de système étudié, qui n'avait jusque-là pas été simulé au laboratoire. Ces simulations ont été réalisées avec 20 peptides différents, chacun d'entre eux permettant d'étudier les propriétés d'un acide aminé différent.

Par la suite, des simulations suivant un protocole plus rigide ont été réalisées. Un stagiaire a été encadré pour réaliser ces simulations, qui ont porté sur un nombre plus limité de peptide pour permettre des études sur plusieurs nanoparticules de plastiques et la réalisation de triplicatas.

7.1. Génération des peptides et de la première nanoparticule de PE

Dans cette partie et la suivante, GROMACS 2018.8 a été utilisé.

Les calculs dans cette partie ont été réalisés sur un ordinateur local utilisant un processeur Intel® Xeon(R) Gold 6252 CPU @ 2,10GHz, une carte graphique Quadro RTX 6000/PCIe/SSE2 et 92GB de mémoire vive.

Les peptides ont été générés avec PEP-FOLD. 20 peptides ont été générés en suivant la séquence SGGXGGXGGXGGS, où X est un acide aminé différent pour chaque peptide. G est le plus petit acide aminé, et S est le plus petit acide aminé polaire, cette séquence permet donc de limiter au maximum la gêne stérique autour de l'acide aminé X et ainsi de mieux étudier ses propriétés. Dans un premier temps une seule nanoparticule de PE a été générée, nos premiers objectifs étant d'étudier les interactions de cette nanoparticule avec les différents peptides et d'étudier l'influence du modèle d'eau utilisé. Deux modèles d'eau classiques ont été utilisés, le modèle TIP3P et le modèle SPC/E.

Pour la nanoparticule, nous avons généré 9 chaînes suivant la séquence PE₅₇₆ en utilisant CHARMM-GUI et réalisé un melt de ces chaînes avec le même outil. Le melt est réalisé à 285K pendant 1000 ns et permet d'obtenir une nanoparticule à partir des chaînes de polymère. Les étapes suivies pour la réalisation de ce melt sont représentées Figure 2.43.

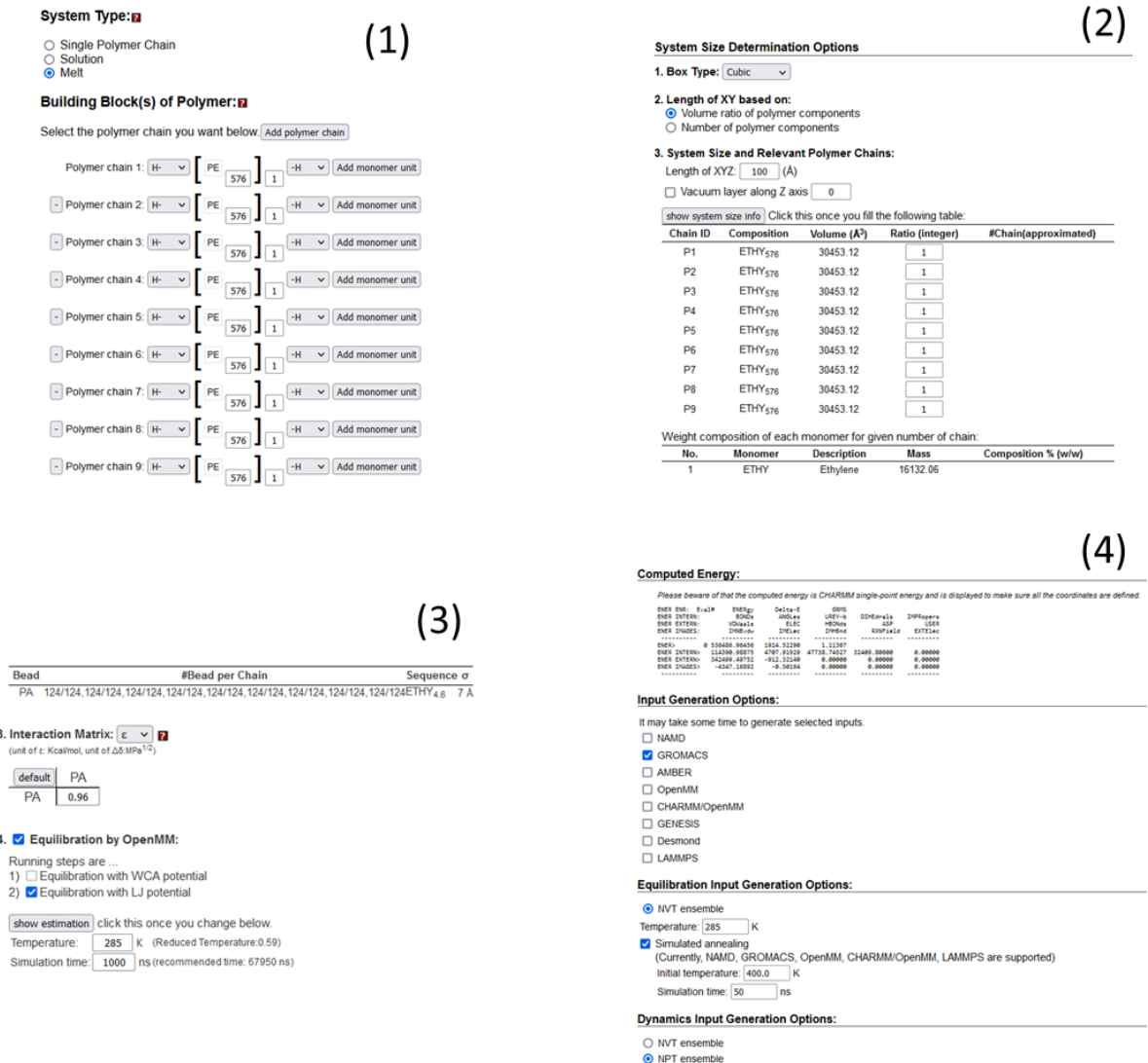


Figure 2.43 : Captures d'écran de CHARMM-GUI aux différentes étapes de la génération d'un melt et paramètres utilisés pour cette étude.

Comme nous pouvons le voir Figure 2.43, la réalisation du melt via CHARMM-GUI se fait en plusieurs étapes :

- (1) Les séquences des chaînes de polymère sont définies.
- (2) La taille du système est déterminée.
- (3) Le système est équilibré à volume constant.
- (4) Le recuit simulé est effectué et les fichiers décrivant la nanoparticule sont générés.

La nanoparticule est ensuite exportée et un recuit simulé est réalisé sur le ordinateur local pour obtenir une conformation stable de la particule. Avec GROMACS, des conditions périodiques sont appliquées sur une boîte cubique centrée sur la nanoparticule et dont les parois sont à au moins 3 nm de la particule. La commande *solvate* de GROMACS est ensuite utilisée pour remplir la boîte d'eau en

utilisant le modèle d'eau TIP3P ou SPC/E, en fonction des simulations pour lesquelles la particule sera utilisée. Le système est ensuite équilibré à volume constant (NVT) puis à pression constante (NPT) de 1 bar.

L'équilibration NVT, réalisé en 50000 pas de 2 fs, est effectué avec un thermostat de Berendsen modifié⁴² (V-rescale) à 300 K avec une constante de temps de 0,1 ps.

L'équilibration NPT, réalisé en 50000 pas de 2 fs, est effectué avec un thermostat de Berendsen modifié⁴² à 300 K avec une constante de temps de 0,1 ps et un barostat de Parrinello-Rahman⁴³ à 1 bar avec une constante de temps de 2 ps.

Chacune de ces étapes d'équilibration est réalisée à 300 K, sur 100 ps avec des pas de 2 fs.

Le recuit simulé est ensuite effectué à 1 bar en faisant évoluer la température linéairement de 300 K à 500 K sur 2 ns, puis de 500 K à 0 K sur 2 ns, puis de 0 K à 300 K sur 1 ns. Lors de cette étape, nous utilisons un thermostat de Berendsen modifié⁴² (V-rescale) avec une constante de temps de 0,1 ps et un barostat de Parrinello-Rahman⁴³ à 1 bar avec une constante de temps de 2 ps. Une fois le recuit simulé terminé, la nanoparticule seule est sauvegardée.

7.2. Paramètres des simulations et analyse des trajectoires avec la première nanoparticule de PE

Les calculs dans cette partie ont été réalisés sur un ordinateur local utilisant un processeur Intel® Xeon(R) Gold 6252 CPU @ 2,10GHz, une carte graphique Quadro RTX 6000/PCIe/SSE2 et 92GB de mémoire vive.

Les systèmes initiaux sont préparés en utilisant VMD. La nanoparticule équilibrée dans le modèle d'eau qui sera utilisé pour la simulation est chargée au centre du système, puis le peptide est chargé et positionné à 2 nm de la surface de la nanoparticule. Comme pour les recuits simulés, des conditions périodiques sont appliquées sur une boîte cubique dont la distance minimale entre les parois et la nanoparticule ou le peptide est de 3 nm. La commande *solvate* de GROMACS est utilisée pour remplir la boîte d'eau en utilisant le modèle TIP3P ou SPC/E, en fonction du modèle étudié pour la simulation préparée. Le système est ensuite équilibré à volume constant puis à pression constante de 1 bar. Les étapes d'équilibration sont réalisées en utilisant le même protocole que pour la nanoparticule de PE seule.

Une fois le système équilibré, celui-ci est simulé pendant 50 ns avec un pas de 2 fs à 300 K et 1 bar. Lors de cette étape, nous utilisons un thermostat de Berendsen modifié⁴² (V-rescale) avec une constante de temps de 0,1 ps et un barostat de Parrinello-Rahman⁴³ à 1 bar avec une constante de temps de 2 ps. Sur le ordinateur, nous pouvons lancer des simulations sur 4 systèmes en parallèle et terminer les simulations en 10 jours.

Une fois la simulation terminée la trajectoire est visualisée avec VMD puis, si le peptide n'est pas entré en contact avec la nanoparticule pendant la durée de la simulation ou s'il a été adsorbé moins de 10 ns avant la fin de la simulation, une simulation de 50 ns supplémentaire est lancée à partir de l'état final de la simulation précédente.

Avant d'analyser les résultats, la trajectoire est corrigée en centrant la nanoparticule de PE avec la commande *trjconv* de GROMACS. Les traitements *nojump* puis *mol* sont appliqués à la nanoparticule pour éviter les artéfacts pouvant être causés par les conditions périodiques et la centrer. La commande

trjconv est appliquée sur les chaînes carbonées de la nanoparticule avec l'option *-fit rot+trans* pour la maintenir immobile au centre de la boîte de simulation. Afin d'établir précisément le moment du contact, l'outil *timeline* de VMD est utilisé pour suivre les contacts entre le peptide et la nanoparticule au cours de la simulation, en considérant que les contacts correspondent à des distances de moins de 4 Å.

La commande *msd* de GROMACS est utilisée pour suivre le MSD du peptide libre en solution. Une régression linéaire est ensuite effectuée sur la courbe obtenue aux longues durées pour calculer le coefficient de diffusion du peptide en solution.

La commande *rms* de GROMACS est utilisée pour suivre le RMSD du peptide à partir de son adsorption sur la nanoparticule afin d'estimer son déplacement à la surface de la particule. La commande *gyrate* de GROMACS est utilisée pour suivre le rayon de giration du peptide sur toute la durée de la simulation, et ainsi comparer ses valeurs avant et après l'adsorption du peptide.

Pour certains peptides, la carte de Ramachandran a été obtenue en utilisant la commande *rama* de GROMACS. Ceci a permis de vérifier les espaces conformationnels explorés par ces peptides avant et après leur adsorption.

Pour déterminer la proportion des contacts entre le peptide et la nanoparticule se faisant au niveau des résidus X, la commande *mindist* est utilisée en définissant une distance minimale de contact de 0,4 nm. Cette commande est utilisée un total de 4 fois, les trois premières étant pour calculer le nombre de contact de chacun des 3 résidus X avec la nanoparticule et la quatrième pour calculer le nombre total de contacts entre le peptide et la nanoparticule.

7.3. Génération des nanoparticules de PE pour les études sur HPC

Dans cette partie et la suivante, GROMACS 2021.3 a été utilisé.

Pour les simulations suivantes, nous avons encadré Mona Rysak dans le cadre d'un stage de master 2 (Ecole Centrale Nantes, 2022, Plastiques, peptides et protéines : Approche de leurs interactions par dynamique moléculaire). Nous avons utilisé les mêmes peptides que lors des simulations sur la première nanoparticule. Dans cette partie, les simulations ont été réalisées sur des supercalculateurs. Le premier supercalculateur utilisé est Topaze, installé dans le Très Grand Centre de Calcul du CEA (TGCC) et qui possède une puissance de calcul crête de l'ordre de 8,8 petaflops par seconde. Le second est le supercalculateur Jean Zay, installé au centre de calcul du CNRS, l'IDRIS, avec une puissance crête de 15,9 petaflops par seconde. Le but de ces simulations était principalement d'étudier l'importance du vieillissement des microparticules de PE, nous avons donc généré plusieurs nanoparticules de PE et avons limité nos études à 5 peptides. De plus, seul le modèle d'eau TIP3P a été utilisé.

Les peptides utilisés sont ceux que nous avons générés dans la partie précédente. Pour les nanoparticules de PE nous utilisons à nouveau CHARMM-GUI, mais cette fois nous générons uniquement les chaînes de polymère sans réaliser de melt. En effet nous générons des chaînes de plus petite taille qui nous permettront de les rassembler dans un système de taille raisonnable pour réaliser les recuits simulés à partir des chaînes de polymère linéaires. 3 types de systèmes initiaux sont préparés :

- Des nanoparticules de PE non vieilles, préparées avec 9 chaînes de séquence PE₆₀.

-Des nanoparticules de PE vieilles avec des groupements carbonyle régulièrement espacés, préparées avec 9 chaînes dont les séquences sont de la forme $H-[PE_xPK_1PE_{11-x}]_5-H$ (x pouvant varier entre les chaînes).

-Des nanoparticules de PE vieilles avec des groupements carbonyle espacés aléatoirement, préparées avec 9 chaînes composées de 55 résidus PE et 5 résidus PK positionnés aléatoirement.

Malgré le recuit simulé utilisé pour la nanoparticule précédente nous avons remarqué des modifications de sa structure en début de simulation. Afin d'éviter cela nous avons renforcé l'étape de stabilisation des nanoparticules en réalisant deux recuits simulés successifs suivi d'une simulation du système à température constante. Le protocole suivi pour préparer chaque nanoparticule de PE à partir des 9 chaînes correspondantes est donc le suivant :

Les 9 chaînes de PE sont positionnées à proximité les unes des autres sous VMD (environ 0,5 nm entre les chaînes), puis le système est enregistré. Avec GROMACS, des conditions de périodes sont appliquées sur une boîte cubique dont les parois sont à au moins 3 nm des chaînes. La commande *solvate* de GROMACS est ensuite utilisée pour remplir la boîte d'eau en utilisant le modèle d'eau TIP3P. Le système est ensuite équilibré à volume constant puis à pression constante de 1 bar. Les étapes d'équilibration sont réalisées en utilisant le même protocole que pour la nanoparticule de PE présentée paragraphe 7.1 de ce chapitre.

Le recuit simulé est ensuite effectué à 1 bar en faisant évoluer la température linéairement de 300 K à 500 K sur 2 ns, puis de 500 K à 0 K sur 2 ns, puis de 0 K à 300 K sur 1 ns. Lors de cette étape, nous utilisons un thermostat de Berendsen modifié⁴² (V-rescale) avec une constante de temps de 0,1 ps et un barostat de Parrinello-Rahman⁴³ à 1 bar avec une constante de temps de 2 ps. Ce profil de température est alors appliqué une seconde fois sur 5 ns supplémentaires. Suite à ce recuit, afin de garantir la stabilité des nanoparticules à la température utilisée pour les calculs, la nanoparticule seule est simulée dans l'eau TIP3P à 300 K et 1 bar pendant 20 ns avec un pas de 2 fs.

7.4. Paramètres des simulations et analyse des données avec les nanoparticules de PE sur HPC

Les calculs de cette partie ont été réalisés sur des supercalculateurs. Les mêmes supercalculateurs ont été utilisés que dans le paragraphe 7.3 de ce chapitre.

Les protocoles suivis pour simuler les peptides en présence des nanoparticules sont les mêmes que ceux présentés dans le paragraphe 7.2 de ce chapitre. Une étape d'analyse supplémentaire est toutefois ajoutée pour suivre les déplacements des peptides à la surface des nanoparticules :

La commande *traj* de GROMACS est appliquée aux peptides afin de suivre les coordonnées du peptide à partir de son adsorption sur la nanoparticule de plastique. Puisque la trajectoire a été corrigée pour centrer et immobiliser la nanoparticule, l'évolution de ces coordonnées permet de suivre directement le déplacement des peptides sur la surface des nanoparticules.

Lors de ces analyses, nous avons également simulé certains peptide en solution dans l'eau TIP3P pendant 50 ns puis utilisé la commande *sasa* de GROMACS pour déterminer leur surface moyenne.

Bibliographie

- (1) Grdadolnik, J. ATR-FTIR Spectroscopy: Its Advantages and Limitations. *Acta Chim Slov* **2002**, *49* (3), 631–642.
- (2) Krishna, D. N. G.; Philip, J. Review on Surface-Characterization Applications of X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS): Recent Developments and Challenges. *Appl. Surf. Sci. Adv.* **2022**, *12*, 100332. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2022.100332>.
- (3) Végh, J. The Shirley Background Revised. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **2006**, *151* (3), 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.elspec.2005.12.002>.
- (4) Scofield, J. H. Hartree-Slater Subshell Photoionization Cross-Sections at 1254 and 1487 EV. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1976**, *8* (2), 129–137. [https://doi.org/10.1016/0368-2048\(76\)80015-1](https://doi.org/10.1016/0368-2048(76)80015-1).
- (5) Spiro, T. G. Resonance Raman Spectroscopy. New Structure Probe for Biological Chromophores. *Acc. Chem. Res.* **1974**, *7* (10), 339–344. <https://doi.org/10.1021/ar50082a004>.
- (6) Strommen, D. P.; Nakamoto, K. Resonance Raman Spectroscopy. *J Chem Educ* **1977**, *54* (8), 474. <https://doi.org/10.1021/ed054p474>.
- (7) Lin-Vien, D.; Colthup, N. B.; Fateley, W. G.; Grasselli, J. G. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*; Elsevier, 1991.
- (8) Jacquez, J. A.; Kuppenheim, H. F. Theory of the Integrating Sphere. *J. Opt. Soc. Am.* **1955**, *45* (6), 460. <https://doi.org/10.1364/JOSA.45.000460>.
- (9) *Integrating Spheres.* <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamentals-uv/integratingspheres.html> (accessed 2023-01-30).
- (10) Sun, Y.; Deac, A.; Zhang, G. G. Z. Assessing Physical Stability of Colloidal Dispersions Using a Turbiscan Optical Analyzer. *Mol. Pharm.* **2019**, *16* (2), 877–885. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01194>.
- (11) Lord Rayleigh, F. R. S. Investigations in Optics, with Special Reference to the Spectroscope. *Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **1879**, *8* (49), 261–274. <https://doi.org/10.1080/14786447908639684>.
- (12) Arzenšek, D. Dynamic Light Scattering and Application to Proteins in Solutions. 19.
- (13) Husband, F. A.; Garrood, M. J.; Mackie, A. R.; Burnett, G. R.; Wilde, P. J. Adsorbed Protein Secondary and Tertiary Structures by Circular Dichroism and Infrared Spectroscopy with Refractive Index Matched Emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (2), 859–866. <https://doi.org/10.1021/jf000688z>.
- (14) Greenfield, N. J. Using Circular Dichroism Spectra to Estimate Protein Secondary Structure. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (6), 2876–2890. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>.
- (15) Sam, S. T.; Nuradibah, M. A.; Ismail, H.; Noriman, N. Z.; Ragnathan, S. Recent Advances in Polyolefins/Natural Polymer Blends Used for Packaging Application. *Polym.-Plast. Technol. Eng.* **2014**, *53* (6), 631–644. <https://doi.org/10.1080/03602559.2013.866247>.

- (16) Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J.-Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9* (7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- (17) Bhat, N. V.; Deshmukh, R. R. X-Ray Crystallographic Studies of Polymeric Materials. *NISCAIR-CSIR* **2002**, 361–366.
- (18) Klassen, N. V.; Shortt, K. R.; Seuntjens, J.; Ross, C. K. Fricke Dosimetry: The Difference between G(Fe³⁺) for ⁶⁰Co. *Phys Med Biol* **1999**, *44* (7), 1609–1624. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/44/7/303>.
- (19) Bank, R. P. D. RCSB PDB - 4F5S: Crystal Structure of Bovine Serum Albumin. <https://www.rcsb.org/structure/4F5S> (accessed 2022-12-06).
- (20) Wang, C.-H.; Chen, W. Raman Characterizing Disulfide Bonds and Secondary Structure of Bovine Serum Albumin. *AIP Conf. Proc.* **2010**, *1267* (1), 346. <https://doi.org/10.1063/1.3482550>.
- (21) Malamud, D.; Drysdale, J. W. Isoelectric Points of Proteins: A Table. *Anal. Biochem.* **1978**, *86* (2), 620–647. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90790-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90790-X).
- (22) Brahma, A.; Mandal, C.; Bhattacharyya, D. Characterization of a Dimeric Unfolding Intermediate of Bovine Serum Albumin under Mildly Acidic Condition. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2005**, *1751* (2), 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.007>.
- (23) Axelsson, I. Characterization of Proteins and Other Macromolecules by Agarose Gel Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1978**, *152* (1), 21–32. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)85330-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85330-3).
- (24) Murayama, K.; Tomida, M. Heat-Induced Secondary Structure and Conformation Change of Bovine Serum Albumin Investigated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biochemistry* **2004**, *43* (36), 11526–11532. <https://doi.org/10.1021/bi0489154>.
- (25) Sober, H. A. *Handbook of Biochemistry : Selected Data for Molecular Biology*; Chemical Rubber Co.: Cleveland, OH, 1968.
- (26) Bank, R. P. D. RCSB PDB - 1QPW: Crystal Structure Determination of Porcine Hemoglobin at 1.8Å Resolution. <https://www.rcsb.org/structure/1QPW> (accessed 2022-12-06).
- (27) Hempe, J. M.; Craver, R. D. Separation of Hemoglobin Variants with Similar Charge by Capillary Isoelectric Focusing: Value of Isoelectric Point for Identification of Common and Uncommon Hemoglobin Variants. *Electrophoresis* **2000**, *21* (4), 743–748. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000301\)21:4<743::AID-ELPS743>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000301)21:4<743::AID-ELPS743>3.0.CO;2-1).
- (28) Voisin, T.; Couvineau, A.; Rouyer-Fessard, C.; Laburthe, M. Solubilization and Hydrodynamic Properties of Active Peptide YY Receptor from Rat Jejunal Crypts. Characterization as a Mr 44,000 Glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (17), 10762–10767. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99083-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99083-6).
- (29) Bhattacharyya, J.; Bhattacharyya, M.; Chakraborti, A. S.; Chaudhuri, U.; Poddar, R. K. Structural Organisations of Hemoglobin and Myoglobin Influence Their Binding Behaviour with Phenothiazines. *Int. J. Biol. Macromol.* **1998**, *23* (1), 11–18. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(98\)00006-3](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00006-3).

- (30) Marta, M.; Patamia, M.; Colella, A.; Sacchi, S.; Pomponi, M.; Kovacs, K. M.; Lydersen, C.; Giardina, B. Anionic Binding Site and 2,3-DPG Effect in Bovine Hemoglobin. 6.
- (31) Antonini, E. Hemoglobin and Myoglobin and Their Reactions with Ligands. *N.-Holl.* **1971**.
- (32) Banerjee, R.; Alpert, Y.; Leterrier, F.; Williams, R. J. P. 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. <https://doi.org/10.1021/bi00835a025>.
- (33) Walters, C. L.; Taylor, A. mcM. Pig-Heart Myoglobin and Its Derivatives with Nitric Oxide. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1964**, *82* (2), 420–422.
- (34) Zheng, W.; Li, D.; Zeng, Y.; Luo, Y.; Qu, J. Y. Two-Photon Excited Hemoglobin Fluorescence. *Biomed. Opt. Express* **2011**, *2* (1), 71. <https://doi.org/10.1364/BOE.2.000071>.
- (35) SNCA - Alpha-synuclein - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P37840/entry> (accessed 2022-09-05).
- (36) Furukawa, K.; Aguirre, C.; So, M.; Sasahara, K.; Miyanoiri, Y.; Sakurai, K.; Yamaguchi, K.; Ikenaka, K.; Mochizuki, H.; Kardos, J.; Kawata, Y.; Goto, Y. Isoelectric Point-Amyloid Formation of α -Synuclein Extends the Generality of the Solubility and Supersaturation-Limited Mechanism. *Curr. Res. Struct. Biol.* **2020**, *2*, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2020.03.001>.
- (37) Apetri, M. M.; Maiti, N. C.; Zagorski, M. G.; Carey, P. R.; Anderson, V. E. Secondary Structure of α -Synuclein Oligomers: Characterization by Raman and Atomic Force Microscopy. *J. Mol. Biol.* **2006**, *355* (1), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.10.071>.
- (38) Li, X.; Dong, C.; Hoffmann, M.; Garen, C. R.; Cortez, L. M.; Petersen, N. O.; Woodside, M. T. Early Stages of Aggregation of Engineered α -Synuclein Monomers and Oligomers in Solution. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 1734. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37584-6>.
- (39) Devineau, S. Adsorption des protéines sur les nanomatériaux. Biochimie et physico-chimie d'un nouveau stress. 302.
- (40) Burnett, R. W.; Covington, A. K.; Maas, A. H. J.; Müller-Plathe, O.; Weisberg, H. F.; Wimberley, P. D.; Zijlstra, W. G.; Siggaard-Anderson, O. IFCC Method (1988) for Tonometry of Blood: Reference Materials for PCO₂ and PO₂. *Clin. Chim. Acta* **1989**, *185* (1), S17–S24. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(89\)90141-1](https://doi.org/10.1016/0009-8981(89)90141-1).
- (41) Hill, A. V. The Combinations of Haemoglobin with Oxygen and with Carbon Monoxide. I. *Biochem J* **1913**, *7* (5), 471–480. <https://doi.org/10.1042/bj0070471>.
- (42) Lemak, A. S.; Balabaev, N. K. On The Berendsen Thermostat. *Mol. Simul.* **1994**, *13* (3), 177–187. <https://doi.org/10.1080/08927029408021981>.
- (43) Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method. *J. Appl. Phys.* **1981**, *52* (12), 7182–7190. <https://doi.org/10.1063/1.328693>.

Chapitre 3

Interactions de protéines modèles avec les microplastiques

Les études ont porté sur les interactions de protéines modèles, ici l'albumine du sérum bovin (BSA), l'hémoglobine et l' α -synucléine, avec des plastiques microstructurés non-vieillis. Nous qualifions de plastique microstructuré tout plastique présentant une structure à l'échelle microscopique, comprenant en particulier des microparticules de plastique ainsi que des filtres composés de microfibrilles de plastique.

La BSA est une protéine globulaire soluble dans l'eau très utilisée en laboratoire de par sa stabilité et sa facilité de production. Elle est donc simple à obtenir, bon marché, et ses propriétés sont bien connues et documentées, ce qui en fait une protéine modèle de choix pour de nombreuses études, dont celles effectuées dans le cadre de cette thèse. L'hémoglobine est également une protéine globulaire très étudiée, et en particulier souvent utilisée dans notre laboratoire. De plus, puisque sa fonction consiste à lier et transporter un ligand gazeux, il nous est possible d'estimer l'activité de cette protéine par des expériences de tonométrie.

L' α -synucléine est une protéine partiellement déstructurée et de petite taille par rapport à la BSA ou l'hémoglobine, ce qui en fait un système d'étude complémentaire. L'intérêt pour cette protéine vient principalement de son rôle dans la maladie de Parkinson, qui pourrait être causée par son agrégation¹.

Les plastiques utilisés incluent du polypropylène (PP) et du polyéthylène (PE) sous forme de microparticules de plastique, qui ont été utilisés pour la plupart de nos expériences, ainsi que des filtres en polypropylène constitués de fibres de dimensions microscopiques, les filtres ayant un seuil de coupure de 0,45 μm . Le polypropylène et le polyéthylène sont parmi les plastiques les plus utilisés, et par conséquent ceux qui sont retrouvés dans la nature en grandes quantités². Ils ont de plus des structures simples, ce qui permet de simplifier leurs générations et études lors des simulations. Dans le cadre de cette thèse toutes les microparticules de PP utilisées viennent d'un même lot, toutes les microparticules de PE utilisées viennent d'un même lot et tous les filtres en PP utilisés viennent d'un même lot, ceci afin de garantir des conditions similaires pour toutes nos expériences.

Nous avons caractérisé les plastiques par microscopie et diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) pour déterminer leur morphologie, par spectroscopie ATR-FTIR pour établir leur structure chimique, par imagerie Raman pour observer leur homogénéité à l'échelle de particules individuelles et par XPS pour définir leur composition de surface. Une fois les plastiques caractérisés, nous avons établi un protocole de mise en contact avec les protéines. Ceci a été l'un des premiers défis de cette thèse, les microparticules de plastiques étant hydrophobes et les protéines hydrophiles, trouver une méthode pour provoquer le contact des plastiques avec les protéines pour une longue durée n'a pas été aisé. Pour la majorité de nos expériences la mise en contact a été réalisée sur roue tournant à faible vitesse afin de garder les solutions en mouvement de façon constante tout en limitant le stress mécanique appliqué aux protéines. Nous avons également testé différents paramètres expérimentaux à utiliser pour les mises en contact, en particulier les concentrations auxquelles nous devons travailler et la durée des mises en contact.

Une fois la mise en contact réalisée, nous avons étudié l'influence de la présence des microplastiques sur les protéines, mais aussi l'impact de notre protocole (par exemple, le fait de laisser des solutions de protéines en rotation à faible vitesse). Après avoir laissé des solutions sur roue, avec ou sans plastiques, nous avons donc effectué des mesures de DLS pour observer leur éventuelle agrégation, mesuré les isothermes d'adsorption des protéines sur les microparticules de plastique et estimé la stabilité des suspensions de microparticules. Pour l'hémoglobine et la BSA, nous avons également suivi l'évolution de la structure des protéines par dichroïsme circulaire. Enfin, nous avons mesuré l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène par tonométrie.

Différentes méthodes de mise en contact ont été testées. L'une de ces méthodes a consisté à réaliser un recouvrement par trempage (dip coating en anglais, terme que j'utiliserai par la suite) d'un filtre en PP dans une solution de protéines, mettant en jeu des interfaces différentes de celles impliquées lors des mises en contact sur roue. Ceci n'a eu que peu d'effet sur la solution, probablement à cause de la faible surface de contact avec le filtre, mais nous avons tout de même remarqué une réduction de l'hydrophobie des filtres après dip coating dans des solutions concentrées.

1. Caractérisation des microplastiques

Pour comprendre les interactions des protéines avec les plastiques microstructurés, il est important de connaître les caractéristiques des échantillons de plastique utilisés. Nous avons étudié les microparticules de polypropylène et de polyéthylène, ainsi que les filtres en polypropylène que nous avons utilisés au long de cette thèse, tous nos échantillons provenant des mêmes lots. Nous avons déterminé la taille des plastiques microstructurés, vérifié leur composition et homogénéité, puis nous avons étudié plus particulièrement leur composition de surface. Les mesures ont aussi été réalisées sur les filtres en polypropylène lorsque cela était possible.

1.1. Morphologie

Afin de caractériser la morphologie des plastiques que nous avons utilisé, nous les avons observés par microscopie et caractérisés par SAXS par Marion Schwartz. La première méthode nous a permis d'observer directement les plastiques pour obtenir des informations sur leur structure et leurs dimensions. Une fois ces informations connues, des expériences SAXS ont été réalisées pour déterminer en particulier la surface spécifique de ces plastiques. Cette donnée est cruciale pour analyser de façon quantitative les interactions entre protéines et microplastiques, puisqu'il s'agit d'interactions de surface.

Les expériences de microscopie ont été réalisées sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL, et nous ont permis d'obtenir les images présentées Figure 3.1.

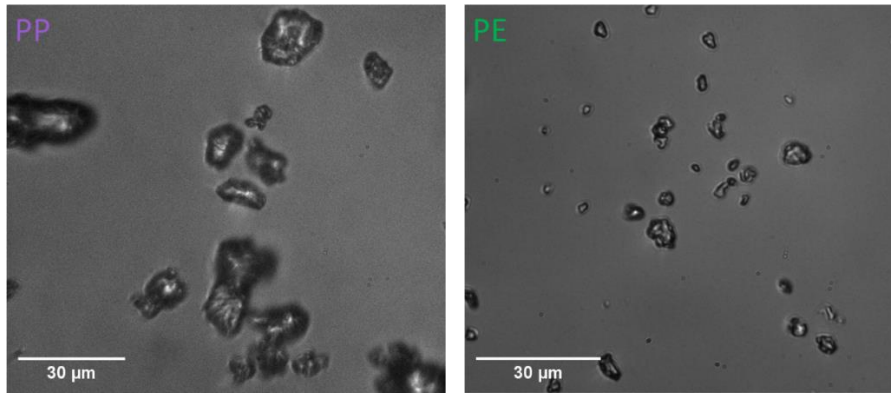


Figure 3.1 : Images en microscopie de microparticules de PP (à gauche) et de PE (à droite) prises sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL.

Sur ces images, nous pouvons remarquer que les particules de PP sont de plus grande taille que celles de PE, avec des dimensions de l'ordre de 10 μm pour le PP et 4 μm pour le PE, et que les deux échantillons sont polydisperses en termes de taille des particules. Ces observations ont été confirmées en étudiant différentes zones de nos échantillons.

L'observation des filtres en PP en microscopie a été plus difficile. En particulier il ne nous a pas été possible d'obtenir des images avec une intensité uniforme, les bordures étant plus sombres et le centre plus lumineux. Une image du filtre est présentée Figure 3.2.

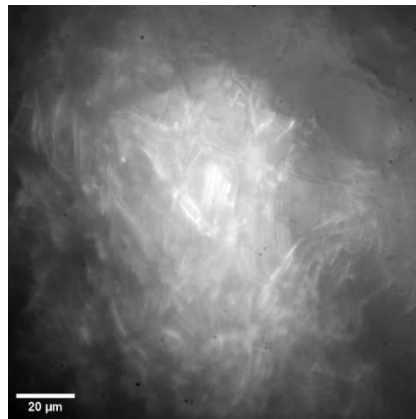


Figure 3.2 : Image en microscopie d'un filtre en PP prise sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL.

Nous pouvons ici observer des fibres avec des diamètres de l'ordre du micromètre. Ces fibres semblent correspondre à la limite de résolution de l'appareil, il est donc possible que ce filtre ait des composantes plus petites mais qui ne peuvent être observées avec l'équipement utilisé.

Il est important de connaître les surfaces spécifiques des plastiques utilisées, en particulier pour obtenir les isothermes d'adsorption des protéines. Nous avons déterminé ces surfaces spécifiques par mesures SAXS, lors desquelles nous avons obtenu les spectres représentés Figure 3.3.

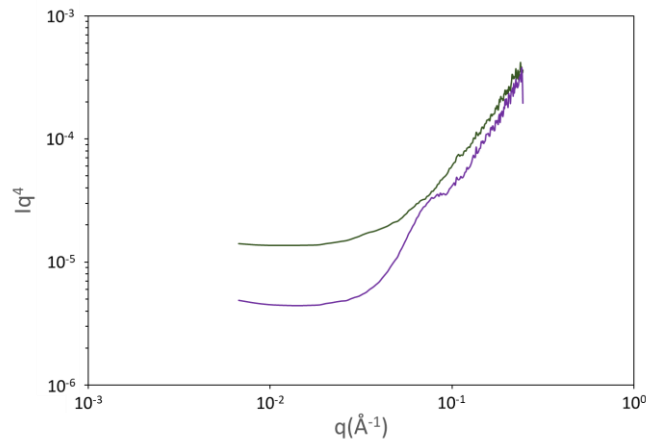


Figure 3.3 : Spectres SAXS des microparticules de PE (en vert) et de PP (en violet), mesurés dans le vide à 2,5m du détecteur avec 3600 secondes d'accumulation.

A partir de ces figures nous pouvons appliquer la loi de Porod³ d'après laquelle, dans le cas où l'inverse du vecteur d'onde q est assez grand par rapport aux grandeurs caractéristiques du système étudié, l'équation (eq. 1) est vérifiée.

$$I_d(q) = \frac{2\pi}{q^4} \times C^2 \times S \quad (\text{eq. 1})$$

Dans laquelle, C est le contraste du milieu dispersé par rapport au solvant et S est l'aire totale des interfaces séparant l'espèce étudiée et le milieu alentour dans la zone étudiée (ici, séparant les plastiques et l'air). En ayant représenté Figure 3.3 la valeur de $I \times q^4$ en fonction de q , I étant l'intensité de diffusion (en cm^{-1}) et q étant le vecteur d'onde de diffusion (en cm^{-1}), nous observons un plateau pour les valeurs de q inférieures à $0,05 \text{ \AA}^{-1}$. En notant le niveau de ce plateau $\lim(I \times q^4)$, nous pouvons déduire de l'équation 1 :

$$\sigma_m = \frac{\lim(I \times q^4)}{2\pi \times \rho_m \times C^2} \quad (\text{eq. 2})$$

Dans laquelle σ_m est la surface spécifique massique et ρ_m est la densité massique ($0,97 \text{ g/cm}^3$ pour le PE et $0,90 \text{ g/cm}^3$ pour le PP). En appliquant l'équation 2 avec $C = 9,4 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ pour le PE et $C = 8,72 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ (valeurs déterminées par le logiciel pySAXS, utilisant Xraylib pour déterminer les valeurs des contrastes à partir des formules chimiques et densités des matériaux) pour le PP, nous obtenons :

- $2,5 \text{ m}^2/\text{g}$ pour PE
- $1,1 \text{ m}^2/\text{g}$ pour PP

Dans le cas du PP, nous observons également un pic de corrélation pour $q = 0,08 \text{ \AA}^{-1}$. D'après le modèle de Hosemann, ceci indiquerait que les particules comportent un système d'empilement de couches lamellaires séparées par des domaines amorphes⁴. Ce type d'organisation est connu et a déjà été observé dans certains matériaux plastiques^{5,6}.

De la même façon, nous avons obtenu le spectre d'un morceau de filtre en polypropylène, représenté Figure 3.4.

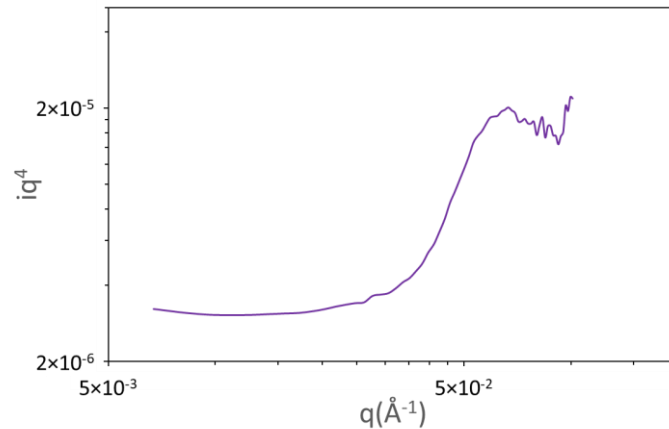


Figure 3.4 : Spectre SAXS des filtres en PP microstructurés, mesuré dans le vide à 2,5m du détecteur avec 3600 secondes d'accumulation.

Pour le filtre nous observons un signal similaire à celui des microparticules de PP, avec en particulier une bosse pour des valeurs de q d'environ $0,06 \text{ \AA}^{-1}$, suggérant à nouveau la présence d'objets d'une dimension de l'ordre de quelques nanomètres. La présence de tels objets ne peut pas être confirmée en utilisant l'image prise en microscopie, puisque la résolution de celle-ci serait insuffisante pour résoudre des objets de cette taille. Nous n'avons pas assez de points sur ce plateau pour calculer précisément les dimensions correspondantes, mais le plateau aux faibles valeurs de q permet de calculer la surface spécifique des filtres.

La valeur calculée pour la surface spécifique des filtres en PP est de $0,7 \text{ m}^2/\text{g}$.

Cette valeur est inférieure à celles obtenues pour les microparticules de PP et de PE. Ceci était attendu, les microparticules ayant des surfaces spécifiques particulièrement importantes, comme expliqué dans le chapitre d'introduction.

Afin de tirer des informations supplémentaires sur la morphologie des microparticules de PP et de PE, en particulier sur leur structure cristalline, des mesures par cristallographie aux rayons X (DRX) ont été réalisées en collaboration avec Guillaume Brotons. Les diffractogrammes obtenus sont présentés Figure 3.5 pour les microparticules de PE et Figure 3.6 pour les microparticules de PP.

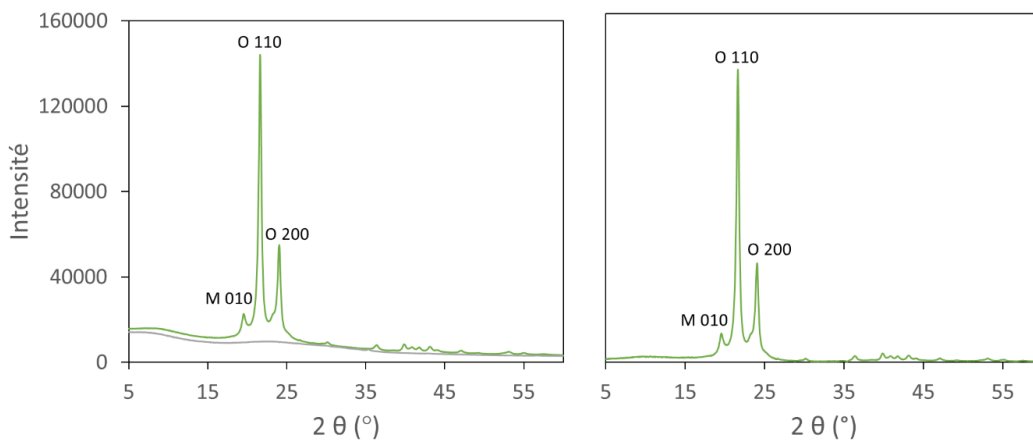


Figure 3.5 : A gauche, diffractogramme des microparticules de PE (en vert) et du substrat utilisé (en gris), à droite, diffractogramme des microparticules de PE après soustraction du signal du substrat. Les pics principaux sont attribués au plan et à la phase cristalline correspondante (M = monoclinique, O = orthorhombique).

Pour les microparticules de PE, nous observons un mélange de structure orthorhombique et de structure monoclinique⁷. Après avoir soustrait le signal du substrat nous n’observons pas de déformation indiquant la présence de phases amorphes, les microparticules de PE sont donc complètement structurées.

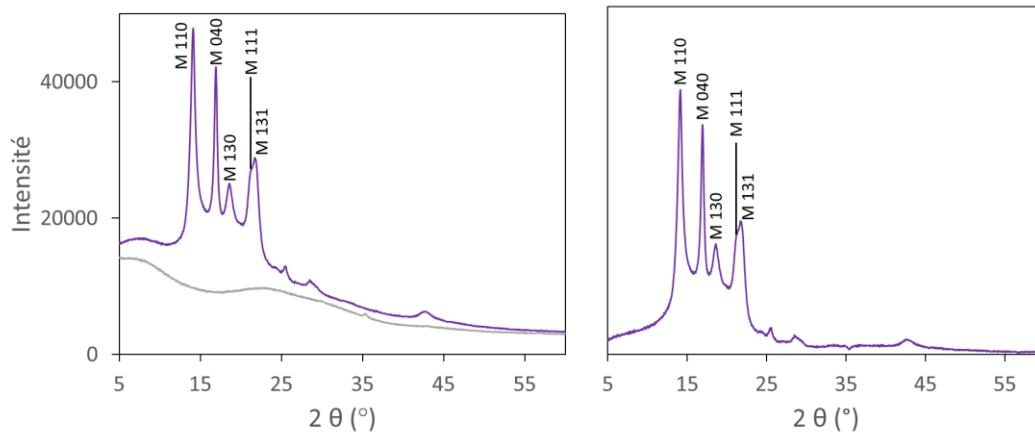


Figure 3.6 : A gauche, diffractogramme des microparticules de PP (en violet) et du substrat utilisé (en gris), à droite, diffractogramme des microparticules de PP après soustraction du signal du substrat. Les pics principaux sont attribués au plan et à la phase cristalline correspondante (M = monoclinique).

Dans le cas des microparticules de PP, la phase cristalline observée correspond purement à une structure monoclinique⁸. Nous notons de plus que cette structure correspond généralement à du PP isotactique⁹ (Cette information est importante pour générer des systèmes cohérents lors de simulations, et sera présentée plus en détails dans l’introduction du chapitre 5). Comme pour les microparticules de PE, le diffractogramme des microparticules de PP après soustraction du signal du substrat ne met pas en évidence la présence de PP amorphe. Les microparticules de PP sont donc entièrement structurées.

1.2. Structure chimique

Comme présentées dans le chapitre d’introduction, les structures chimiques du PP et du PE sont relativement simples, le PE étant uniquement constitué d’une chaîne carbonée saturée en hydrogène, et le PP étant constitué d’une chaîne carbonée dont la moitié des atomes de carbone comportent un groupement méthyle. La présence de ces groupements cause des changements importants sur certains spectres, rendant ces plastiques facilement distinguables par spectroscopie. Leurs spectres sont de plus très étudiés puisque le PE et le PP sont à la fois parmi les polymères les plus simples et les plus utilisés en industrie, le PE correspondant à 36% de la production de plastique et le PP à 21% de cette production¹⁰.

Afin de vérifier la pureté des plastiques microstructurés, nous avons mesuré leurs spectres ATR-FTIR. Le spectre obtenu pour PE est conforme à ceux de la littérature^{11,12}, comme nous pouvons le voir Figure 3.7.

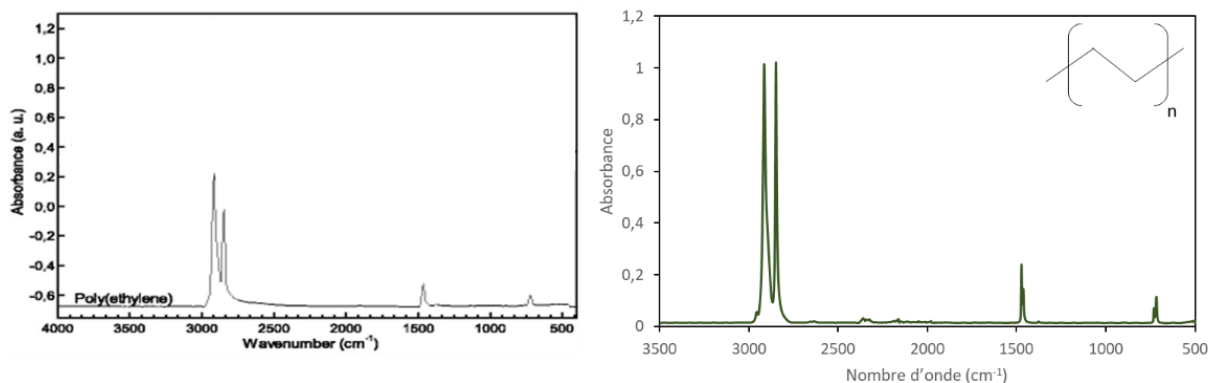


Figure 3.7 : Spectre ATR-FTIR du polyéthylène
à gauche, adapté de *Analytical characterization of polymers used in conservation and restoration by ATR-FTIR spectroscopy*¹² et à droite, celui que nous avons obtenu expérimentalement.
Le bruit entre 2000 cm^{-1} et 2500 cm^{-1} correspond au signal du CO_2 .

Le spectre du PE comporte peu de pics, ce qui était attendu puisque sa structure est simple, et chaque pic du spectre a été attribué. Les attributions des pics sont listées dans le Tableau 3.1.

| Nombre d'onde (cm^{-1}) | Attribution |
|------------------------------------|-------------------------|
| 717-137 | ρ déformation |
| 1463-1472 | δ déformation |
| 2848 | ν_s $-\text{CH}_2-$ |
| 2914 | ν_s $-\text{CH}_2-$ |

Tableau 3.1 : Attribution du spectre ATR-FTIR du polyéthylène.

Puisque tous les pics correspondent au spectre du PE, aucun additif n'est présent en concentration mesurable par IR. Cette première observation indique que les microparticules de PE sont pures ou que les éventuels additifs ne sont pas détectables par ATR-FTIR.

Dans le cas des microparticules de PP, nous obtenons également un spectre en accord avec ce que nous pouvons trouver dans la littérature¹³ (Figure 3.8).

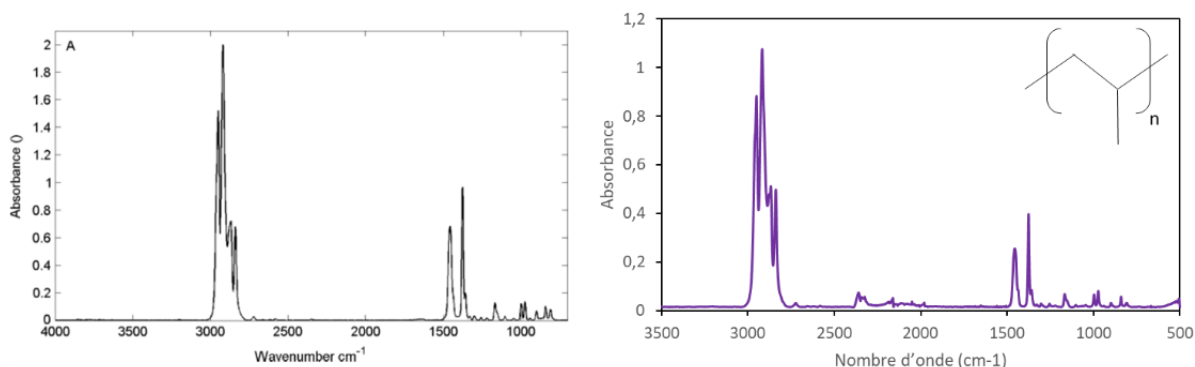


Figure 3.8 : Spectre ATR-FTIR du polypropylène
à gauche, celui représenté dans *Comparison between XPS- and FTIR-analysis of Plasma-treated Polypropylene*¹³
et à droite, celui que nous avons obtenu expérimentalement.
Le bruit entre 2000 cm^{-1} et 2500 cm^{-1} correspond au signal du CO_2 .

Bien que la structure du polypropylène semble peu différente de celle du polyéthylène son spectre ATR-FTIR comporte un nombre de pics beaucoup plus important, la présence de groupements méthyle suffisant à augmenter considérablement sa complexité. Malgré cela, les formes cis et trans du polypropylène ne semblent pas présenter de différences spectroscopiques et contribuent aux mêmes pics, listés Tableau 3.2.

| Nombre d'onde | Attribution |
|---------------|-------------------------------|
| 841 | ν C-CH ₃ |
| 973 | ρ -CH ₃ |
| 997 | ρ -CH ₃ |
| 1167 | ρ -CH ₃ |
| 1376 | δ_s -CH ₃ |
| 1456 | δ_s -CH ₂ - |
| 2838 | ν_s -CH ₂ - |
| 2917 | ν_a -CH ₂ - |
| 2950 | ν_a -CH ₃ |

Tableau 3.2 : Attribution des pics du spectre ATR-FTIR du polyéthylène.

Comparé aux spectres de la littérature, nous observons une montée du signal aux faibles nombre d'onde, mais ceci peut être causé par des raisons matérielles (mesures limitées par les spécificités du spectromètre IR, soustraction de la ligne de base). De plus nous avons un signal autour de 1650 cm⁻¹ que nous n'observons pas dans le spectre de référence et n'est donc pas attribué. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette observation : i) Un état de cristallisation différent ; ii) La présence d'un additif ; iii) Une modification chimique, du type oxydation. En mesurant les aires des différents pics, nous voyons que l'intensité du signal à 1650 cm⁻¹ correspond à 0,9% de celle du pic à 1456 cm⁻¹, il est donc possible qu'il s'agisse de bruit mais les autres hypothèses sont à considérer. Nous reviendrons sur ces hypothèses dans la discussion de l'imagerie Raman et des mesures XPS.

En effectuant des mesures sur les filtres en polypropylène utilisés, nous avons obtenu un spectre identique à celui des microparticules (voir en Annexe, Figure A.1).

1.3. Homogénéité

L'imagerie Raman est une technique consistant à mesurer le spectre Raman en chaque point d'une image à l'aide d'un microscope confocal, puis de chercher les composantes communes aux différents spectres. Une fois ces composantes déterminées nous obtenons une image par composante (une cartographie chimique), dont l'intensité en chaque point dépend du coefficient attribué à la composante associée pour ajuster le spectre. Cette technique permet donc d'analyser les spectres Raman de différentes espèces présentes dans un échantillon mais aussi d'observer son homogénéité. Des mesures d'imagerie Raman ont été réalisées sur les plastiques utilisés en collaboration avec Stéphanie Devineau.

Lorsque nous avons réalisé des mesures d'imagerie Raman sur des morceaux de filtres en polypropylène après mise en contact avec les solutions de protéines, les parties sèches du filtre ont

été brûlées par le laser. Nous n'avons donc pu mesurer le spectre que du filtre humide, pour lequel nous n'avons pas pu séparer la composante du filtre et celle de l'eau. Les composantes du filtre ne seront donc pas présentées dans cette partie.

La spectroscopie Raman permet de vérifier la composition des microparticules de plastique. L'imagerie Raman complète ces mesures en nous permettant de déterminer si les microparticules de plastique sont constituées d'une seule phase ou de plusieurs phases ayant des composantes différentes à l'échelle d'une particule individuelle, avec une résolution spatiale de l'ordre de 1 μm . Dans le cas des microparticules de PP et de PE ces composantes peuvent permettre de différencier des domaines cristallins, certains pics de leurs spectres étant spécifiques aux phases cristallines ou aux phases amorphes.

Le spectre Raman des microparticules de polyéthylène (Figure 3.9) est relativement simple, comprenant 8 pics entre 1000 cm^{-1} et 1500 cm^{-1} et 3 pics entre 2600 cm^{-1} et 3000 cm^{-1} , ce qui correspond à ce que nous pouvons trouver dans la littérature^{14,15}. L'imagerie Raman nous permet d'observer la présence de 3 composantes différentes, comme représentées Figure 3.9.

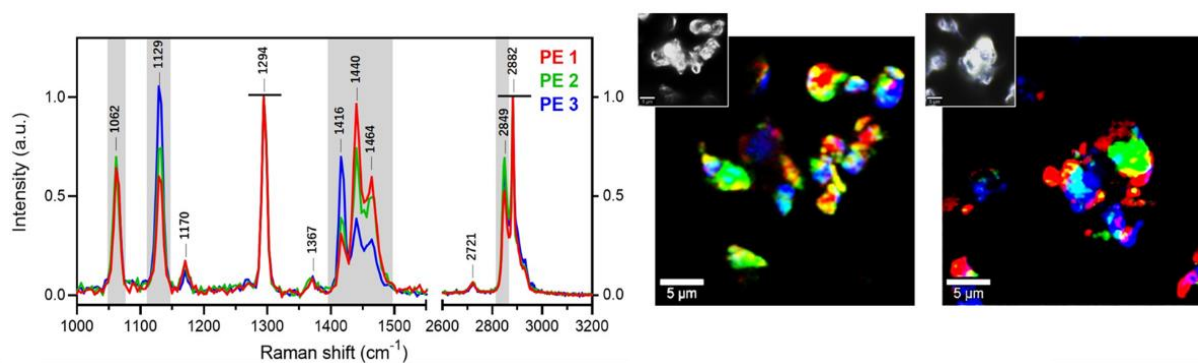


Figure 3.9 : A gauche, spectres Raman des trois composantes observées lors des expériences d'imagerie sur les microparticules de PE. A droite, résultat des expériences d'imagerie Raman sur les microparticules de PE, chaque composante est représentée de la même couleur dans l'image et dans le spectre.

Nous observons que les différences entre ces composantes se limitent aux intensités relatives des pics (les spectres présentés ici étant normalisés à 1294 cm^{-1} et à 2882 cm^{-1}). Ceci semble indiquer qu'elles représentent la même espèce, ici le polyéthylène, avec des taux de cristallinité différents. Ceci se confirme en vérifiant l'attribution des pics, représentée Tableau 3.3.

Les pics à 1440 cm^{-1} et 1464 cm^{-1} sont souvent attribués au PE amorphe¹⁴, ce qui serait en contradiction avec nos résultats de mesures de DRX, mais les spectres Raman des différentes phases cristallines sont proches et difficile à différencier. En particulier ces pics peuvent correspondre à du PE monoclinique¹⁵, en accord avec nos résultats de DRX, il s'agit donc de la structure observée pour nos échantillons. Nous en déduisons que la phase PE1 correspond à la phase dont la structure est la plus proche du système monoclinique et la phase PE3 à celle dont la structure est la plus proche du système orthorhombique. Le PE reste la seule espèce détectée, mais la présence de différentes composantes nous indique que les microparticules ont des structures hétérogènes. Nous n'avons pas remarqué de tendances particulières concernant la position des différents systèmes cristallins.

| Nombre d'onde (cm ⁻¹) | Attribution |
|-----------------------------------|--|
| 1062 | v _a C-C |
| 1129 | v _s C-C |
| 1170 | v C-C |
| 1294 | τ CH ₂ |
| 1367 | δ CHD |
| 1416 | δ CH ₂ + ω CH ₂ (orthorhombique) |
| 1440 | δ CH ₂ (amorphe ou monoclinique) |
| 1464 | δ CH ₂ (amorphe ou monoclinique) |
| 2721 | v CHD |
| 2849 | v _s CH ₂ |
| 2882 | v _a CH ₂ |

Tableau 3.3 : Attribution des pics du spectre Raman des microparticules de PE.

Lors des expériences d'imagerie Raman sur les microparticules de PP, nous avons observé une seule composante (Figure 3.10), identique pour tous les échantillons étudiés et cohérente avec les spectres tirés de la littérature¹⁶⁻¹⁸.

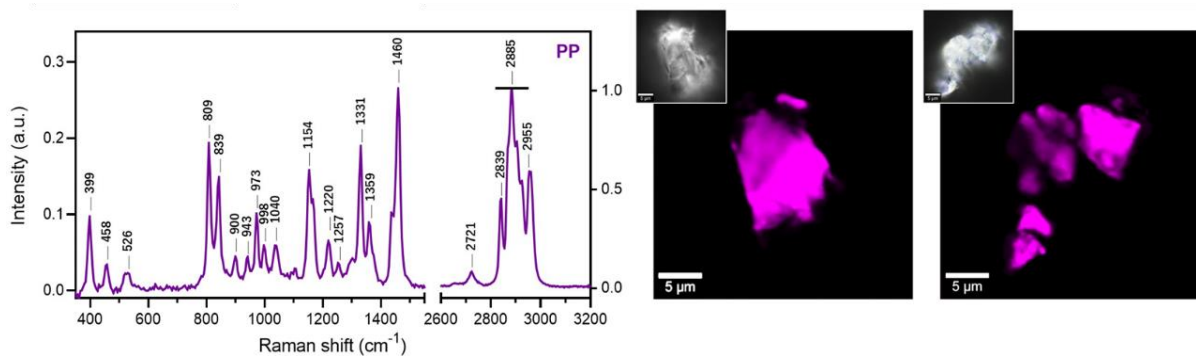


Figure 3.10 : A gauche, spectre Raman observé lors des expériences d'imagerie sur les microparticules de PP. A droite, résultat des expériences d'imagerie Raman sur les microparticules de PP.

Comme en spectroscopie ATR-FTIR, le spectre Raman du PP est significativement plus complexe que celui du PE malgré la similarité de leurs structures. Nous avons attribué un maximum des pics du spectre du polypropylène, bien que certains n'aient pas été trouvés dans la littérature et ne sont donc pas inclus ici, et avons regroupé ces résultats Tableau 3.4.

Les pics à 809 cm⁻¹ et 839 cm⁻¹ correspondent respectivement à une phase cristalline et à une phase amorphe¹⁶. Le fait que nous n'ayons qu'une composante en imagerie Raman indique donc que les microparticules de PP sont homogènes, c'est-à-dire sans domaine complètement amorphe ou cristallin à l'échelle des zones dont les spectres sont mesurés. Ceci correspond à la dimension du faisceau, de l'ordre de 100 nm pour nos mesures. Cette homogénéité du PP lève la première hypothèse mentionnée lors de l'analyse de spectre ATR-FTIR des microparticules de plastique paragraphe 1.2, nous n'avons pas d'états de cristallisation différents.

| Nombre d'onde (cm ⁻¹) | Attribution |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| 399 | Expansion chaîne carbonée |
| 809 | v C-C (phase cristalline) |
| 839 | v C-C (phase amorphe) |
| 973 | ρ CH ₃ |
| 1154 | ρ CH ₃ |
| 1220 | v C-C chaîne carbonée |
| 1331 | δ CH / τ CH ₂ |
| 1460 | δ _a CH ₃ |
| 2839 | v _s CH ₂ |
| 2885 | v _s CH ₂ |
| 2955 | v _s CH ₃ |

Tableau 3.4 : Attribution des pics du spectre Raman des microparticules de PP.

De plus, puisque nous n'avons pas observé de signal correspondant au PP amorphe lors des mesures de DRX, nous pouvons en déduire qu'elle ne constitue qu'une faible proportion du plastique.

1.4. Surface

Puisque les interactions des protéines avec les microplastiques se font à la surface de ces derniers, nous avons réalisé des mesures par XPS pour les microparticules de PP et de PE, qui permet d'analyser les premiers nanomètres de la surface.

Sur le spectre du PE (Figure 3.11) nous observons deux pics, un très intense à 285 eV, qui correspond au carbone, et un pic peu visible à 533 eV, qui correspond à l'oxygène.

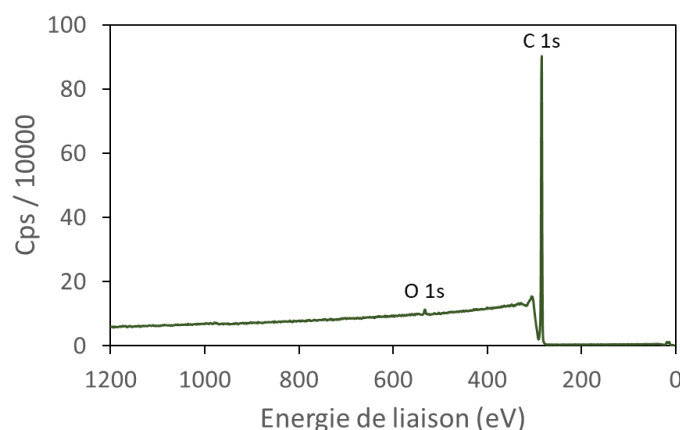


Figure 3.11 : Spectre XPS des microparticules de PE et orbitales correspondantes.

Pour mieux analyser ces pics nous avons réalisé un spectre haute résolution centré sur chacun d'entre eux, représentés Figure 3.12 pour le pic du carbone et Figure 3.13 pour le pic de l'oxygène.

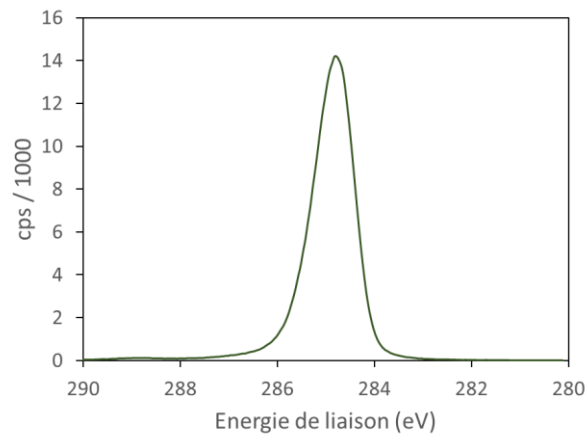


Figure 3.12 : Spectre haute résolution du pic du carbone sur les microparticules de PE avec ligne de base corrigée.

Le spectre du pic du carbone est composé d'un unique pic centré à 285,0 eV, ce qui correspond à ce qui est attendu pour les carbone de la chaîne carbonée¹⁹. Nous n'observons donc pas d'additifs carbonés en surface du PE en quantité détectable par XPS.

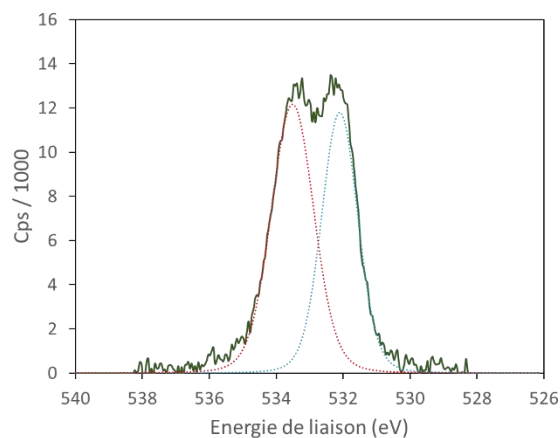


Figure 3.13 : Spectre haute résolution du pic de l'oxygène sur les microparticules de PE (en vert) avec ligne de base corrigée et composantes utilisées pour l'ajustement (en bleu et en rouge).

Cette image mieux résolue permet de remarquer que le signal de l'oxygène est ici constitué de 2 composantes, la première à 534 eV pouvant correspondre à des groupements ester/carboxylate et la seconde à 532 eV pouvant correspondre à des groupements carbonyle¹⁹. L'observation de l'oxygène par XPS montre qu'il se trouve à la surface du PE, ce qui résulte probablement d'un début d'oxydation du microplastique. La quantité d'oxygène est relativement faible, représentant 0,9% du signal, ce qui indique que les groupements correspondants sont peu nombreux.

Le spectre des microparticules de PP, représenté Figure 3.14, présente un unique pic intense à 285 eV, qui correspond à nouveau au carbone. Aucun signal n'est observé autour de 530 eV, ce qui indique qu'il n'y a pas d'oxygène en surface du polypropylène, et donc que ce microplastique n'est pas oxydé.

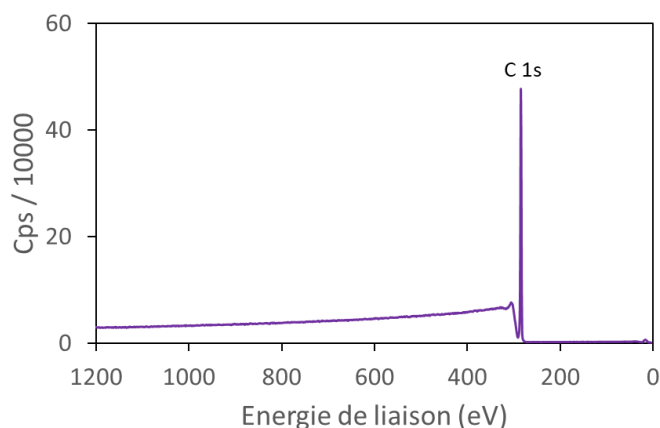


Figure 3.14 : Spectre XPS des microparticules de PP et orbitale correspondante.

Afin d'analyser le pic du carbone nous avons réalisé un spectre haute résolution centré sur sa position, qui est représenté Figure 3.15.

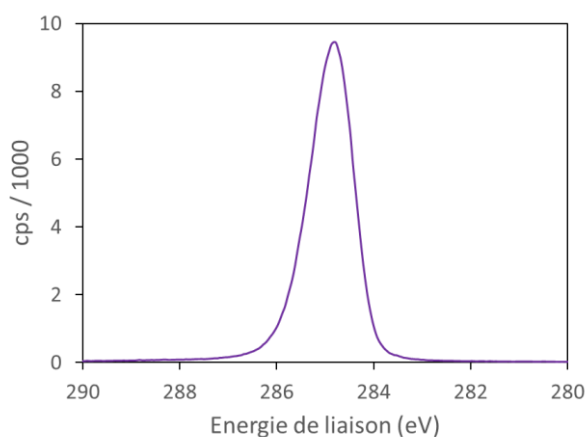


Figure 3.15 : Spectre haute résolution du pic du carbone des microparticules de PP avec ligne de base corrigée.

Comme dans le cas du PE nous n'observons qu'une seule composante pour le carbone, centrée à 284,8 eV, correspondant au signal attendu pour la chaîne carbonée et les groupements méthyle¹⁹. Ces mesures ne mettent donc pas en évidence la présence d'additif en surface du PP. Cette absence d'additifs ainsi que d'oxygène sur le PP lève la seconde et la troisième hypothèse mentionnée lors de l'analyse de spectre ATR-FTIR des microparticules de plastique paragraphe 1.2, nous n'avons ni présence d'additif ni modification chimique du plastique. Le pic observé à 1650 cm^{-1} correspond donc probablement à du bruit.

De la même façon nous avons mesuré le spectre d'un filtre en PP, ainsi qu'un spectre haute résolution centré sur le pic du carbone, qui sont représentés Figure 3.16. Ce spectre a la même allure que celui mesuré pour les microparticules de PP. En particulier, le pic du carbone est centré à 285,0 eV et nous n'observons pas de pic correspondant à l'oxygène ou d'autres éléments. Comme pour les microparticules de PP, ce spectre ne met pas en évidence la présence d'additif en surface du filtre en PP.

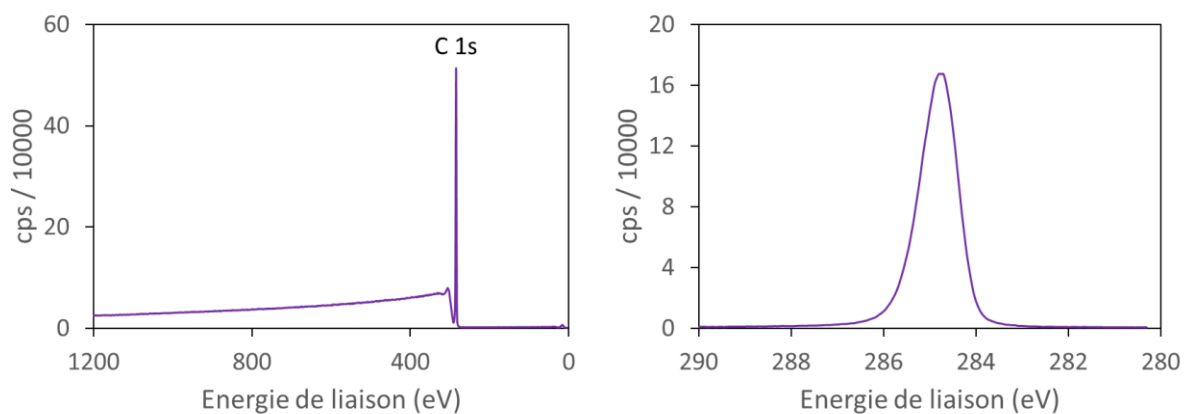


Figure 3.16 : Spectre XPS d'un filtre en PP et orbitale correspondante (à gauche), et spectre haute résolution du pic du carbone d'un filtre en PP avec ligne de base corrigée (à droite).

En conclusion, nous n'observons pas d'additif en surface pour le PP, qu'il s'agisse des microparticules ou des filtres. Pour le PE nous observons de l'oxygène en faible quantité, qui résulte probablement d'un début d'oxydation.

2. Mise en contact

Une fois les plastiques microstructurés caractérisés, la première étape de l'analyse de leurs interactions avec les protéines a été la mise en place d'un protocole pour leur mise en contact.

Les microplastiques étant hydrophobes, leur mise en contact avec les protéines est plus difficile que celle de microparticules plus couramment étudiées comme celles de silice. Lorsque nous avons commencé nos études, aucun protocole n'avait à notre connaissance été publié pour décrire une méthodologie à suivre. Il s'agissait donc d'un véritable verrou pour notre travail, et nous avons mis en place notre propre protocole pour permettre le passage des microplastiques en solution sans abimer les protéines.

2.1. Méthode de mise en contact

Les microplastiques hydrophobes ne peuvent habituellement pas passer dans une solution aqueuse, et resteront en surface ou précipiteront en fonction de leur densité. Il est toutefois possible d'obtenir une suspension de microplastiques en solution aqueuse en présence de protéines, puisque la corona que ces dernières forment à la surface du microplastique est hydrophile (voir le chapitre d'introduction). Ces suspensions permettent aux microplastiques d'interagir avec les protéines mais sont instables, il est donc nécessaire de maintenir la solution en mouvement de façon continue au long de la mise en contact. Pour cela nous avons décidé de mettre nos échantillons sur des roues tournant lentement, ce qui permet un passage en solution efficace des microplastiques tout en gardant les mouvements suffisamment lents pour ne pas dénaturer les protéines par stress mécanique. Le montage utilisé a été pris en photo Figure 3.17.



Figure 3.17 : Tubes contenant des solutions de protéines en contact avec des microplastiques, sur roue.

Avant le début de cette thèse, des expériences avaient été réalisées par Korydwen Fruit dans le cadre de son master (Université Paris Saclay, 2019, Suivi des microplastiques en interaction avec des protéines) afin de déterminer les paramètres importants pour le contact, comme la durée et la vitesse de rotation. Ses expériences étaient les premières dans ce domaine.

Un protocole établi pendant ce stage a consisté à séparer les microparticules de plastiques de la solution après mise en contact afin de permettre des mesures spectroscopiques sans diffusion causée par la présence des microparticules. Ce protocole a ensuite été adapté en réalisant une succession de centrifugations afin d'extraire un maximum de microparticules par aspiration sous vide. Le procédé est représenté Figure 3.18.

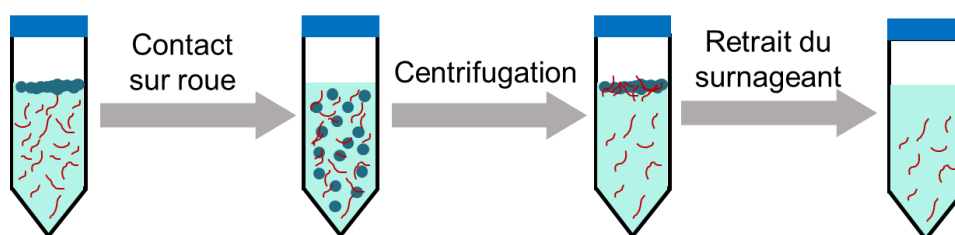


Figure 3.18 : Représentation schématique des étapes de la mise en contact des protéines (en rouge) avec les microparticules de plastique (en bleu) suivie de la récupération du sous-nageant.

Comme expliqué dans le chapitre d'introduction, la corona est composée de deux parties, une hard corona constituée des couches de protéines les plus proches de la microparticule et fortement liée à cette dernière, et une soft corona moins fortement liée (voir le chapitre Introduction). Il est important de noter que la soft corona est séparée des microplastiques pendant la centrifugation²⁰, ces expériences portent donc sur la hard corona (voir introduction).

Nous avons également remarqué que la séparation des microplastiques peut avoir lieu en laissant crémier la suspension pour obtenir un sous-nageant et un surnageant, comme représentées Figure 3.19. La cinétique de ce crémage dépend du système, mais pour certaines des protéines que nous avons utilisées la suspension restait homogène pendant plusieurs heures, nous avons donc préféré

continuer à utiliser la centrifugation pour pouvoir procéder à nos mesures rapidement après les mises en contact.

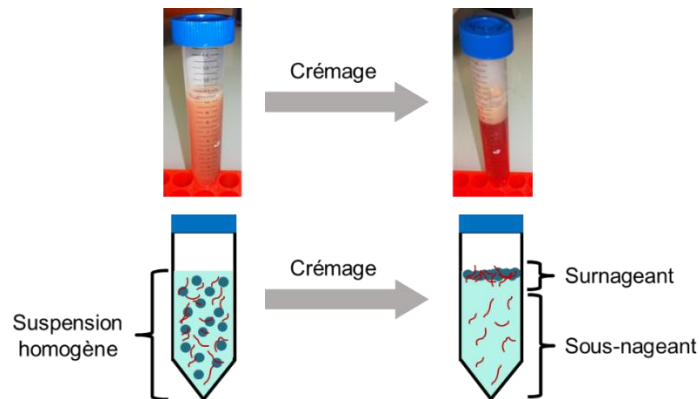


Figure 3.19 : Au-dessus, photographies d'une suspension de microparticules de PE dans de l'hémoglobine avant et après 30 minutes de crémage (température ambiante). En dessous, représentation schématique des différentes phases avant et après crémage.

Comme nous pouvons le voir, la suspension homogène, le sous-nageant et le surnageant correspondent à trois systèmes différents. La suspension homogène correspond à la solution pouvant contenir des protéines libres et des microparticules ainsi que les protéines adsorbées sur ces dernières. Le sous-nageant contient uniquement les protéines n'ayant pas été adsorbées ou ayant été adsorbées de façon réversible avant de retourner en solution. Le surnageant contient les microplastiques ainsi que les protéines adsorbées sur ces derniers. Il est aussi important de noter que les protéines du sous-nageant peuvent avoir interagi avec la corona, ou même en avoir fait partie, avant de retourner en solution, potentiellement modifiées ou déstructurées²¹.

Une expérience typique du stage de Korydwen Fruit a consisté à préparer des échantillons de 2 mL d'une solution d'hémoglobine à 160 mg/L en présence de PE dans des tubes Eppendorf Low Binding de 5mL et de les laisser sur une roue tournant à 3 tours/minute dans une chambre froide à 4°C. A différents intervalles des tubes sont retirés de la roue, les plastiques sont séparés de la solution par centrifugation puis extraits par aspiration, puis la concentration en protéine de la solution est déterminée par spectroscopie UV-visible. Des mesures ont également été réalisées sur des solutions témoins sans PE, et les résultats ont été rassemblés Figure 3.20.

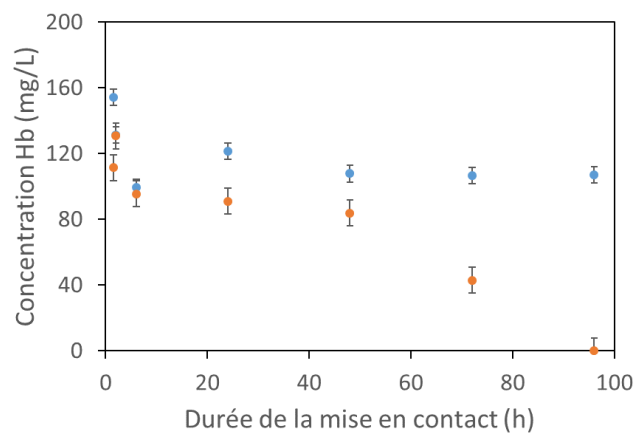


Figure 3.20 : Cinétique de perte d'hémoglobine au contact des microparticules de PE, pour une concentration initiale en Hb de 160 mg/L et une concentration initiale en plastique de 20 g/L (en orange) et pour une concentration initiale en Hb de 160 mg/L sans plastique (en bleu).

Nous voyons ici une diminution de la concentration en hémoglobine, une part étant adsorbée sur les parois du tube et une autre part étant adsorbée par les microplastiques. Sur les premières heures, la concentration du témoin est proche de celle de la solution en contact avec les microplastiques, indiquant que l'adsorption sur les microparticules n'a pas lieu immédiatement. La concentration dans le tube témoin atteint alors un plateau tandis que la concentration dans le tube contenant du PE continue de diminuer pour devenir nulle après environ 96 heures de mise en contact. Ces mesures nous indiquent qu'une partie des protéines est perdue rapidement, y compris si nous n'avons pas de plastique en solution, indiquant que ceux-ci sont probablement adsorbés sur la surface du tube.

La concentration de protéine en solution reste alors constante pendant plusieurs heures avant de diminuer uniquement en présence de microparticules de plastiques. Nous en déduisons que la perte de protéine due aux microparticules ne commence qu'après environ 48 heures de mise en contact, certainement parce que le passage des microplastiques en solution requiert une durée importante pour avoir lieu.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé des tubes en polypropylène Fischerbrand de 15 mL dans lesquels nous avons réalisé des mises en contact sur des échantillons de 5 mL de solution. La plus grande taille de ces tubes devrait favoriser le mouvement de la solution, permettant ainsi à la mise en contact de commencer plus rapidement et d'être plus uniforme. Nous avons donc à nouveau dû tester différentes concentrations en protéines et microplastiques, et différentes durées de mise en contact, afin d'ajuster nos paramètres à ces nouveaux tubes.

Un verrou expérimental a consisté à déterminer des concentrations en protéines et en microparticules de plastique adaptées afin d'observer des pertes mesurables en protéines sans arriver à des concentrations nulles, l'idée étant de comparer des pertes entre des solutions de protéines de concentrations initiales proches. Ainsi, nous chercherons à tracer les isothermes d'adsorption des protéines sur les microplastiques (voir paragraphe 3 de ce chapitre).

En utilisant une concentration initiale en BSA de 1,5 g/L et en mesurant la concentration en protéine du sous-nageant après 72 heures de mise en contact avec des microparticules de PE à différentes concentrations, nous obtenons les points représentés Figure 3.21.

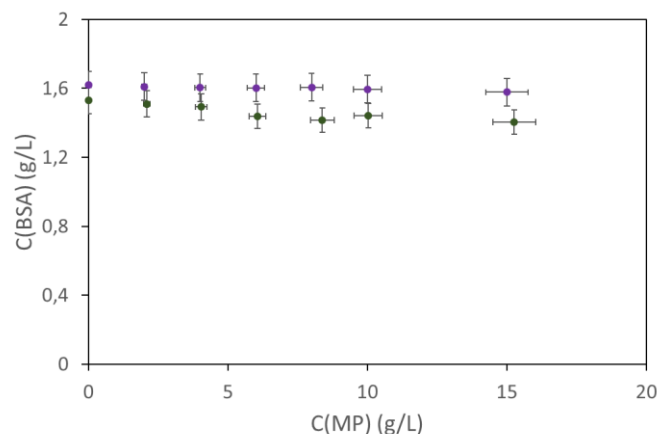


Figure 3.21 : Concentration finale en BSA après 72 h de mise en contact avec des microparticules de PP (en violet) et de PE (en vert) pour une concentration initiale en protéine de 1,5 g/L et différentes concentrations en microparticules.

Les pertes de protéines sont négligeables, même pour une concentration en microplastique de 15 g/L, ce qui indique que la concentration en protéine est trop élevée. Nous avons donc répété l'expérience avec les mêmes concentrations en microparticules de PE pour une concentration initiale en protéine de 150 mg/L et obtenu les résultats représentés Figure 3.22.

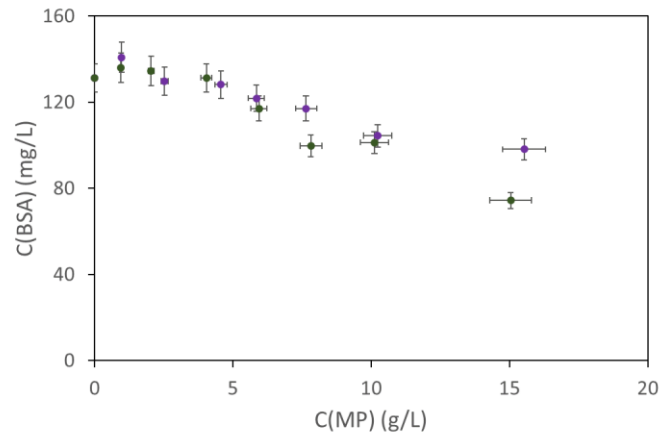


Figure 3.22 : Concentration finale en BSA après 72 h de mise en contact avec des microparticules de PP (en violet) et de PE (en vert) pour une concentration initiale en protéine de 150 mg/L et différentes concentrations en PE.

Nous observons des diminutions notables de la concentration en BSA pour des concentrations en microparticules de PE allant de 6 g/L à 15 g/L, ce qui signifie que les ordres de grandeur des concentrations utilisées ici sont adaptés. Les concentrations mesurées après ces mises en contact restant supérieures à la moitié de la concentration initiale, travailler à plus faibles concentrations devrait permettre à une plus grande proportion des protéines présentes d'interagir avec les plastiques. Pour la plupart de nos expériences, nous utiliserons des concentrations en microparticules de plastique 10 g/L et des concentrations en protéine allant de 5 mg/L à 100 mg/L.

Nous avons ensuite vérifié qu'une mise en contact de 72 heures permet d'arriver à un équilibre. Pour cela nous avons utilisé de la BSA à 25 mg/L dans laquelle nous avons introduit 0 g/L, 5 g/L ou 10 g/L de microplastiques. Nous avons mesuré les concentrations des solutions après 24 heures, 48 heures et 72 heures de mise en contact et avons représenté les résultats Figure 3.23.

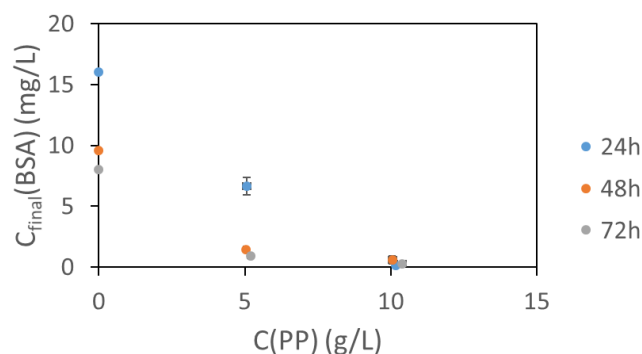


Figure 3.23 : Concentrations finales en BSA après 24 h, 48 h et 72 h de mise en contact avec des microparticules de PP pour une concentration initiale en protéine de 25 mg/L et différentes concentrations initiales en plastique.

Nous observons qu'à cette concentration en protéine, le système semble avoir atteint un équilibre après 48 heures de mise en contact pour 5 g/L de microplastiques, et après 24 heures de contact pour

10 g/L de microplastiques. Afin de vérifier que les ordres de grandeur restent comparables pour les autres protéines nous avons réalisé la même expérience avec de l'hémoglobine à une concentration initiale de 50 mg/L et représenté les résultats Figure 3.24.

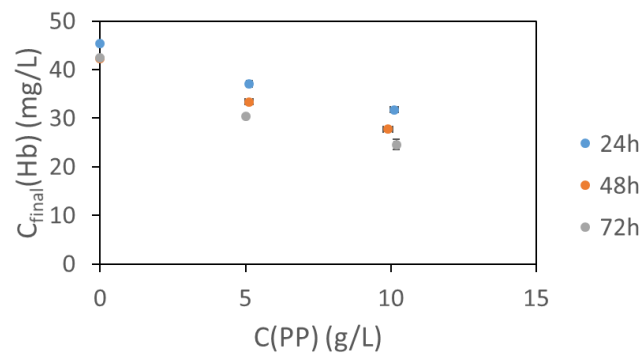


Figure 3.24 : Concentrations finales en Hb après 24 h, 48 h et 72 h de mise en contact avec des microparticules de PP pour une concentration initiale en protéine de 50 mg/L et différentes concentrations initiales en plastique.

Nous voyons ici une différence de concentration mesurable entre 24 heures, 48 heures et 72 heures de mise en contact quelle que soit la concentration en microplastiques. Cette évolution de la concentration semble toutefois se faire à une vitesse constante et identique que nous ayons 5 g/L ou 10 g/L de microplastiques, et peut donc s'expliquer par une dénaturation ou agrégation de l'hémoglobine causée par le mouvement des tubes sur la roue. D'après ces résultats, des mises en contact de 72 heures permettront d'atteindre l'équilibre d'adsorption des protéines sur les microplastiques.

Pour résumer, en nous basant sur ces essais ainsi que sur les premiers résultats obtenus en utilisant ces paramètres, nous avons déterminé qu'il est approprié dans le cas de la BSA de travailler à une concentration constante en microparticules de plastique de 10 g/L, et à des concentrations en protéine allant de quelques milligrammes par litres à quelques centaines, pour des mises en contact de 72 heures. Ces mêmes paramètres ont été testés pour l'hémoglobine et l' α -synucléine, en particulier lors de la mesure des isothermes d'adsorption présentées paragraphe 3 de ce chapitre, confirmant que ces conditions sont appropriées pour les trois protéines que nous étudions.

2.2. Fragilisation des protéines sur roue

La fragilisation des protéines correspond à la déstabilisation de leur structure qui peut être causée par plusieurs facteurs. La présence des microparticules de plastique est au centre de nos expériences mais le stress mécanique causé par le mouvement de la roue, la présence de l'interface air/eau, les interactions possibles avec la surface du tube et la durée de la mise en contact sont autant de facteurs supplémentaires qui peuvent contribuer à cette fragilisation. La combinaison de tous ces facteurs peut aboutir à l'agrégation ou la dénaturation des protéines, comme représenté Figure 3.25, ce qui a déjà été observé au laboratoire.

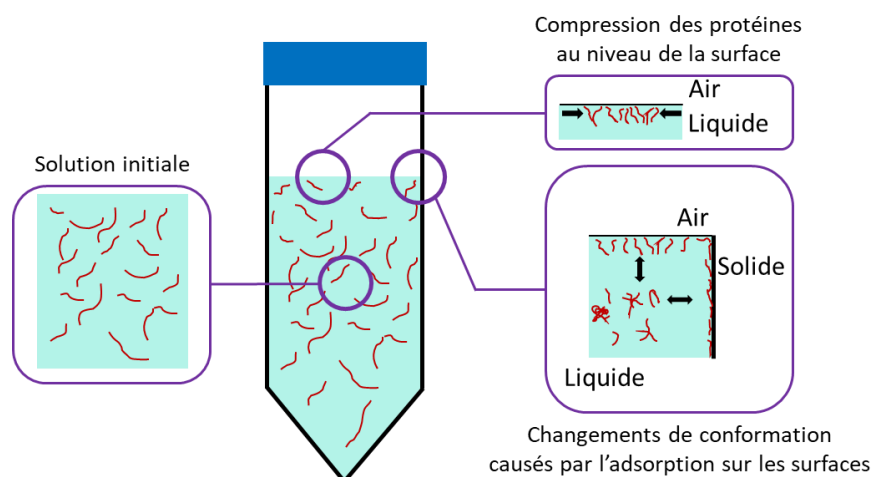


Figure 3.25 : Représentation schématique des facteurs de fragilisation des protéines dans un tube. Les flèches simples (→) indiquent les forces de pression sur les protéines et les doubles flèches (↔) indiquent les échanges de protéines entre les interfaces et la solution.

Les pertes de protéines en solution lors des mises en contact ne sont pas uniquement causées par les microplastiques, puisqu'une partie des protéines peut être adsorbée par la surface du tube dans lequel se trouve la solution. Afin d'estimer cette perte nous avons, pour chaque protéine étudiée, laissé 10 mL de solution à 50 mg/L dans un tube Fischerbrand en polypropylène pendant 24 heures à 4°C, soit en laissant le tube statique soit en le mettant sur une roue à 3 tours/minute, puis nous avons mesuré les concentrations après mise en contact pour déterminer le pourcentage de protéines perdues. Afin d'estimer l'effet de la nature du tube, nous avons également réalisé ces mesures pour des tubes en Teflon de 44 mL contenant 26,2 mL de solution, pour des tubes en verre de 8 mL contenant 5,5 mL de solution et pour des tubes Eppendorf 'Protein Low Binding' de 5 mL contenant 3,8 mL de solution, les volumes de solution ayant été choisis pour que, dans chaque cas, la solution remplisse environ 2/3 du tube. Les résultats ainsi obtenus sont rassemblés Tableau 3.5.

| Tube | BSA | | Hémoglobine | | α -synucléine | |
|---------------|-------------|----------------|-------------|----------------|----------------------|----------------|
| | Statique | 3 tours/minute | Statique | 3 tours/minute | Statique | 3 tours/minute |
| Polypropylène | 2,5 ± 0,2 % | 3,3 ± 1,3 % | 0 ± 2,5% | 6,6 ± 0,8 % | 0 ± 0,7 % | 12,5 ± 1,5 % |
| Teflon | 0,8 ± 0,7 % | 0,9 ± 1,4 % | 0 ± 1,1 % | 0,7 ± 0,3 % | 1,2 ± 1,0 ± | 11,3 ± 1,4 % |
| Verre | 6,3 ± 1,1 % | 16,9 ± 7,1 % | 0 ± 2,2 % | 4,1 ± 0,8 % | 0,5 ± 0,7 % | 21,0 ± 2,1 % |
| Low binding | 2,3 ± 1,0 % | 1,1 ± 1,2 % | 0 ± 1,1 % | 0 ± 0,3 % | 0 ± 0,6 % | 12,1 ± 0,8 % |

Tableau 3.5 : Pourcentages des pertes de protéines après 24 h à 4°C dans différents tubes en position statique ou en mouvement sur roue à 3 tours/minute pour des concentrations initiales en protéine de 50 mg/L.

Lorsque le tube reste statique la quantité de protéine perdue est généralement négligeable, à l'exception de la BSA pour laquelle nous observons plus de 5% de pertes dans les tubes en verre. Ceci est cohérent avec les propriétés connues de la BSA, qui est régulièrement utilisée pour recouvrir la paroi (coating) de tubes²². Lorsque le tube est laissé sur roue nous observons des pertes significatives, qu'il sera donc important de prendre en compte lors des mises en contact avec les microplastiques. Pour cela, nous préparerons pour chaque expérience des témoins aux mêmes concentrations en protéines que les échantillons étudiés mais ne contenant pas de microplastiques. Le calcul des quantités de protéines sur les plastiques se feront alors par rapport aux concentrations des témoins

après passage sur roue, et non pas par rapport aux concentrations des échantillons avant passage sur roue.

Afin de déterminer si le passage des solutions sur roue suffit également à causer une agrégation des protéines sans présence de microparticules de plastiques nous avons eu recours à la DLS, une méthode permettant d'estimer la taille d'objets en solution, afin d'observer l'agrégation éventuelle des protéines. Chaque corrélogramme présenté a été obtenu en moyennant 3 mesures et les solutions ont été filtrées avec un seuil de coupure de 1,2 μm avant les mesures.

Pour la BSA nous avons pris deux échantillons à 50 mg/L, l'un ayant été laissé pendant 72 heures statique à 4°C, et l'autre ayant été laissé sur roue tournant à 3 tours/minute pendant 72 heures, donnant les corrélogrammes présentés Figure 3.26.

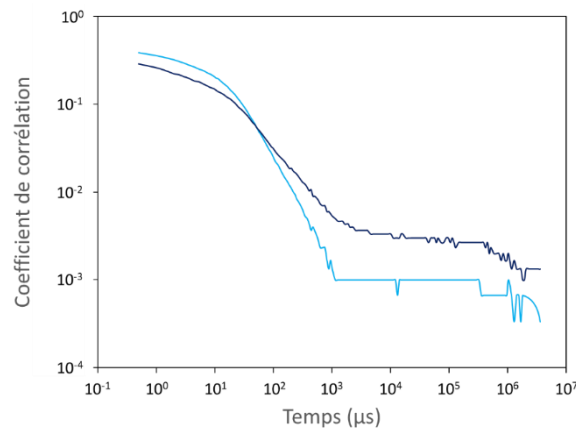


Figure 3.26 : Corrélogrammes des solutions filtrées de BSA initialement à 50 mg/L, après 72 h, en position statique (bleu clair) et en mouvement sur roue à 3 tours/minute (bleu foncé).

Les corrélogrammes obtenus sont relativement peu bruités, et nous observons que le passage sur roue cause une différence notable du signal. En particulier le palier aux temps longs du signal de la BSA après passage sur roue a un coefficient de corrélation plus élevé que celui de la BSA restée statique, ce qui indique la présence d'objet de plus grande taille en solution, et donc une probable agrégation de la protéine. Le mouvement de la roue suffit donc à causer l'agrégation de la BSA.

Les mêmes expériences ont été réalisées avec de l' α -synucléine à 50 mg/L, nous donnant les corrélogrammes représentés Figure 3.27.

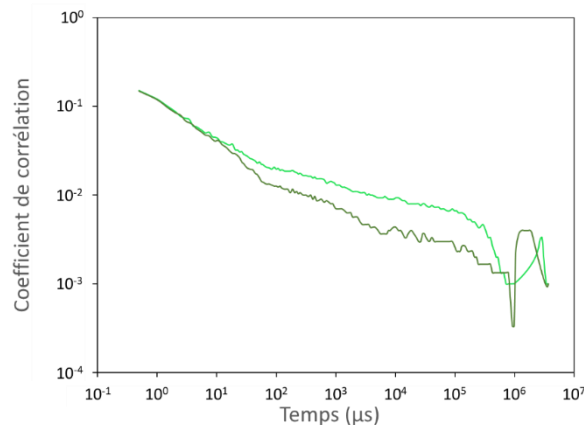


Figure 3.27 : Corrélogrammes des solutions filtrées d' α -synucléine initialement à 50 mg/L, après 72 h, en position statique (en vert clair) et en mouvement sur roue à 3 tours/minute (en vert foncé).

Pour l' α -synucléine nous avons obtenu des corrélogrammes bruités, ayant de faibles coefficients de corrélation et ne présentant aucun plateau. Ceci peut indiquer que notre échantillon est très polydisperse ou, plus probablement, que l' α -synucléine est trop petite pour être observable en DLS à cette concentration²³.

Pour l'hémoglobine, à cause des problèmes de confinement et d'approvisionnement (hémoglobine fraîche, filtres), les mesures ont été effectuées sur des solutions de méthémoglobine commerciale, en utilisant des filtres avec un seuil de coupure à 0,8 μm et non 1,2 μm comme pour les autres protéines. Nous n'avons pas eu l'occasion de reprendre ces mesures avec de l'hémoglobine oxygénée et un seuil de coupure de 1,2 μm avant la rédaction de ce manuscrit.

Les corrélogrammes obtenus sur les solutions à 50 mg/L n'étaient pas exploitables à cause d'une trop faible intensité du signal. Nous avons donc augmenté la concentration de la protéine, et répété les mesures sur des solutions d'hémoglobine à 250 mg/L. Pour chacune de ces concentrations nous avons observé que, après 72 heures sur roue puis centrifugation, des agrégats d'hémoglobine forment un culot macroscopique. La formation de ce culot est observée qu'il s'agisse de solutions de méthémoglobine seule ou contenant des microparticules de plastique (résultats étudiés partie 6.1. de ce chapitre), mais n'est pas observée pour une solution d'hémoglobine étant restée statique pendant 72 heures, comme nous pouvons le voir Figure 3.28. Une forte quantité d'hémoglobine est agrégée, nous avons calculé par mesures de spectres visibles une diminution de la concentration de méthémoglobine en solution de 50% entre l'échantillon sans passage sur roue et celui laissé sur roue pendant 72 heures à 3 tours/minute.

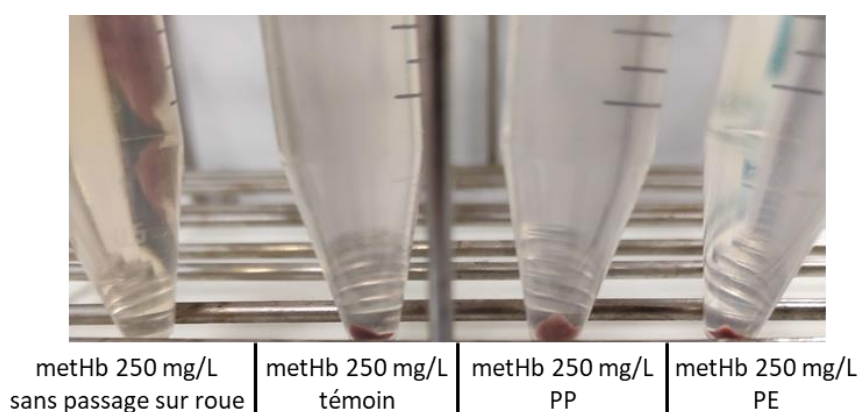


Figure 3.28 : Photographie des tubes de méthémoglobine après centrifugation 10 minutes à 3000 g. Avant centrifugation le tube de gauche a été maintenu statique pendant 72 h, le tube témoin a été laissé 72 h sur roue à 3 tours/min sans plastiques et les tubes de droite ont été laissés 72 h sur roue à 3 tours/min avec 10 g/L de microparticules de PP et de PE.

Ce comportement a également été observé pour les échantillons à 50 mg/L en méthémoglobine mais n'a été observé pour aucun échantillon d'hémoglobine oxygénée utilisée pour d'autres expériences, avec des concentrations allant de 5 mg/L à 1 g/L. Ceci signifie que, en termes d'agrégation, les solutions de méthémoglobine n'ont pas le même comportement que les solutions d'hémoglobine oxygénée. Nous avons tout de même mesuré les corrélogrammes de ces solutions en DLS, et les avons représentés Figure 3.29.

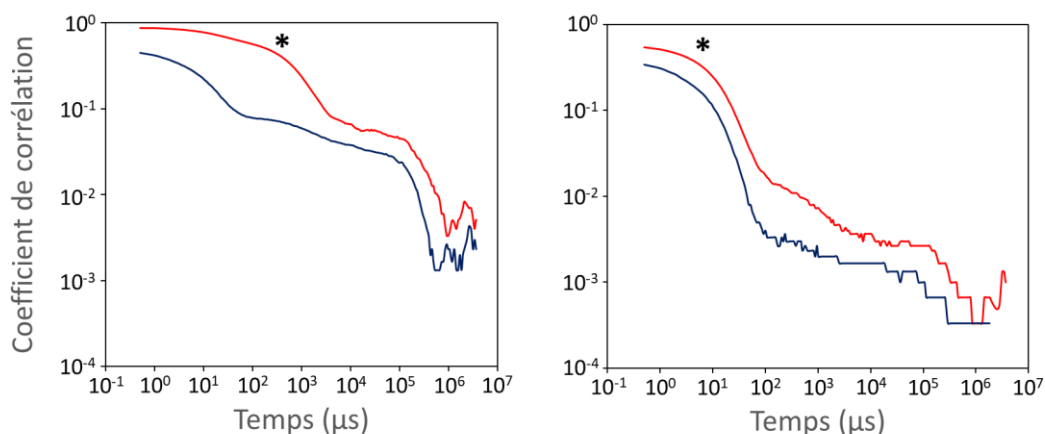


Figure 3.29 : Corrélogrammes des solutions d'hémoglobine après 72 h, en position statique (en rouge) et après sur roue à 3 tours/minute (en bleu) pour des solutions à 250 mg/L non-filtrées (à gauche) et filtrées (à droite). L'astérisque indique le début de la diminution du coefficient pour la solution d'hémoglobine maintenue statique.

Sur l'ensemble des corrélogrammes nous observons un signal moins intense pour la solution passée sur roue que pour celle maintenue statique, ce qui s'explique par la plus faible concentration de la seconde solution causée par l'agrégation d'hémoglobine à l'échelle macroscopique. Nous observons aussi que, pour les solutions non filtrées, le coefficient de corrélation commence à diminuer à un temps plus long pour la solution gardée statique que pour celle passée sur roue. Cette différence n'est plus observée après filtration, ce qui indique qu'elle est causée par la présence d'agrégats dans la solution maintenue statique mais pas dans celle passée sur roue, et que ces agrégats ont un diamètre supérieur à 0,8 μm .

La présence d'agrégats dans la solution de méthémoglobine avant agitation peut expliquer sa différence de comportement avec les solutions d'hémoglobine oxygénée, puisque ces agrégats peuvent servir de noyau pour amorcer le phénomène d'agrégation à l'échelle macroscopique. Ces mesures mériteraient d'être refaites en utilisant de l'hémoglobine oxygénée et un seuil de coupure de 1,2 μm .

3. Isothermes d'adsorption des protéines modèles sur des microparticules de plastique

Nous avons mesuré les isothermes d'adsorption des protéines sur les microplastiques. Ceci consiste à mesurer la quantité de protéines adsorbées par les microparticules de plastique pour différentes concentrations de protéines à concentration de plastiques constante. En d'autres termes, nous mesurons la concentration en protéines adsorbées par les plastiques en fonction de la concentration en protéines restant en solution après la mise en contact (protéines libres). Nous avons vérifié que les isothermes d'adsorption de nos systèmes suivent le modèle de Langmuir²⁴ qui correspond à l'adsorption d'une monocouche sur une surface homogène. L'allure de ce type d'isotherme est présentée Figure 3.30.

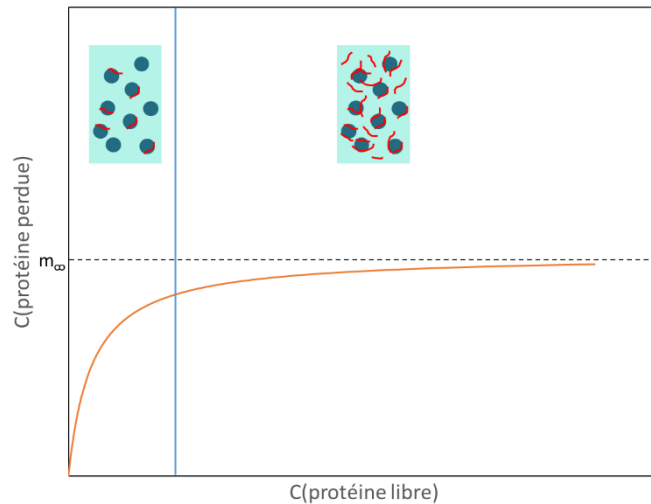


Figure 3.30 : Isotherme d'adsorption suivant le modèle de Langmuir et représentation schématique des états du système correspondants à faible et forte concentration en protéines.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, pour tracer une telle isotherme d'adsorption, il est important de trouver une gamme de concentrations en protéine adaptée afin d'obtenir suffisamment de points pour tracer les deux parties de la courbe. A faible concentration nous avons une partie croissante, correspondant à la phase pendant laquelle la plupart des protéines ajoutées en solution sont immédiatement adsorbées par les plastiques, et à forte concentration nous observons un plateau, lorsque les plastiques sont saturés et que toutes protéines ajoutées restent donc en solution. Chacune de ces phases apporte des informations différentes, nous devons donc nous assurer d'avoir plusieurs points dans la première partie de la courbe, dont le rythme de croissance nous informera de l'affinité de la protéine pour le plastique, et plusieurs points sur le plateau, qui nous permet de déterminer la quantité de protéines permettant de saturer les microparticules. Il est également important de choisir une bonne durée de mise en contact, celle-ci devant être suffisamment longue pour que le système atteigne l'équilibre tout en évitant de laisser nos échantillons en mouvement plus longtemps que nécessaire, ce qui pourrait causer une dénaturation des protéines causée par la durée du passage sur roue et non par la présence des plastiques.

L'étude des isothermes d'adsorption des protéines sur les microplastiques nous donne des informations sur l'affinité des protéines pour les plastiques, et sur la quantité de protéines pouvant s'adsorber sur ces dernières. Les isothermes ont uniquement été mesurées pour les microplastiques, la surface spécifique des filtres en PP étant trop faible pour obtenir une surface de plastique disponible suffisante pour obtenir une perte de concentration en protéine significative. Nous avons travaillé avec une concentration en plastique de 10 g/L pour PP et PE, et avec une gamme de concentration en protéine allant de 5 mg/L à 100 mg/L pour la BSA, l'hémoglobine et l' α -synucléine.

Avant de tracer les isothermes, l'observation des tubes contenant les protéines à différentes concentrations offre déjà des informations sur les interactions entre protéines et microparticules de plastique, comme nous pouvons le voir sur les photos Figure 3.31.

En effet, les microplastiques s'entassent au-dessus de la surface, sans jamais passer en solution, pour les solutions ayant moins de 30 mg/L de BSA (4 premiers tubes), 30 mg/L d'hémoglobine (4 premiers tubes) ou 15 mg/L d' α -synucléine (2 premiers tubes), ces observations étant vérifiées aux mêmes concentrations pour le PP et le PE.

Après avoir retiré les microplastiques par centrifugations puis aspirations successives, nous avons mesuré les concentrations des solutions pour déterminer les masses de protéines perdues sur les microplastiques afin de tracer les isothermes. Pour chaque échantillon, la quantité de protéines perdues a été déterminée en comparant la concentration de protéines dans la solution après la mise en contact puis l'extraction du plastique à la concentration d'une solution témoin ayant la même concentration initiale en protéine après 72 heures de mouvement sur roue sans microparticules de plastique. Ceci permet de déterminer la perte causée par les microparticules, séparément des pertes causées par le mouvement du tube sur la roue. Ces expériences ont été réalisées 3 fois. Une isotherme d'adsorption correspond à la représentation de la quantité de protéines adsorbées en fonction de la concentration en protéine libre en solution. Ici, nous avons normalisé la masse de protéine adsorbée par la surface de plastique disponible afin de permettre une meilleure comparaison des résultats entre le PP et le PE. Des ajustements ont été réalisés pour chaque isotherme, nous donnant les courbes représentées Figure 3.32 pour une mise en contact à 4°C dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7,0.

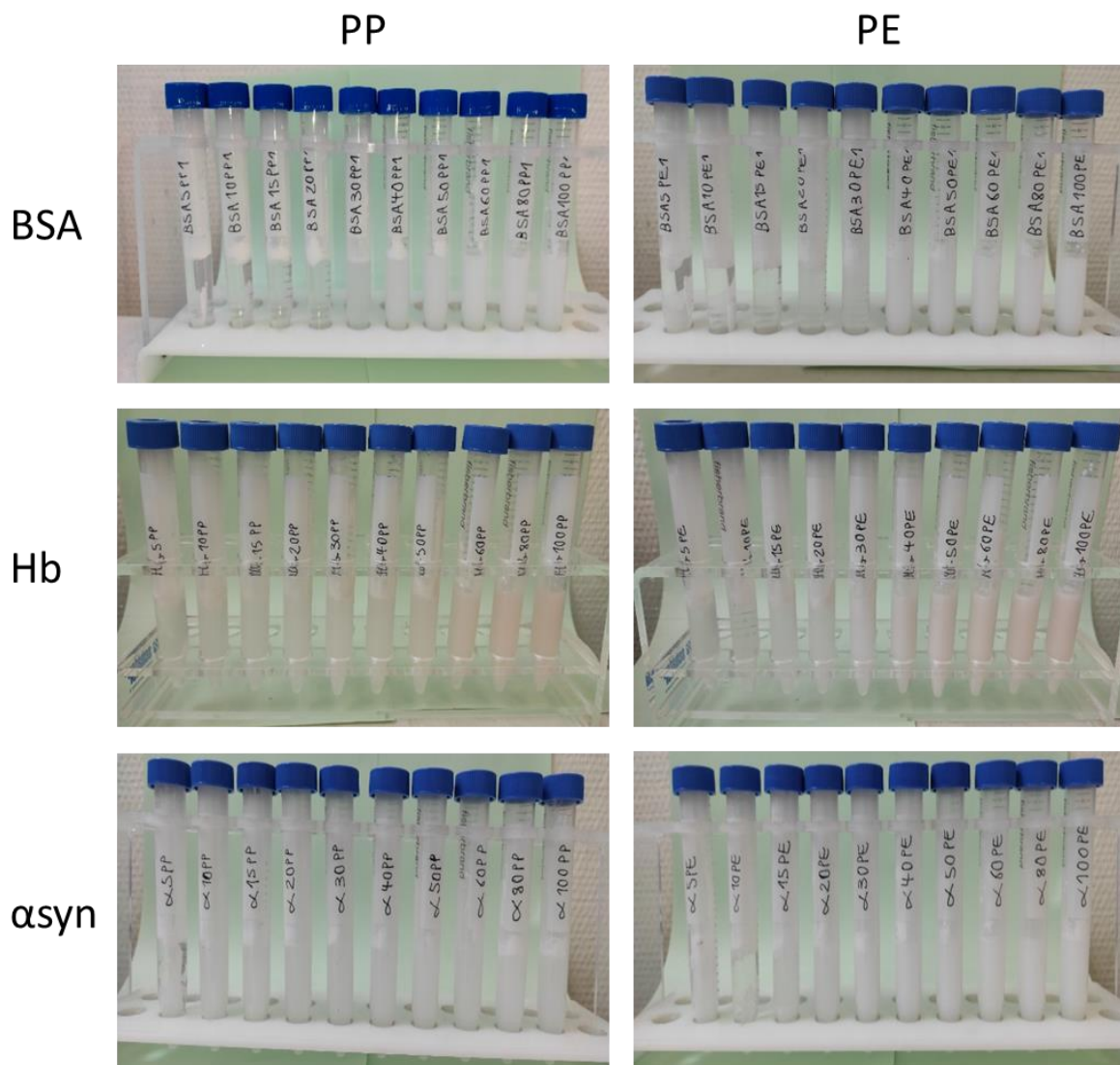


Figure 3.31 : Photographies des solutions d'une protéine à des concentrations de 5 mg/L (à gauche) à 100 mg/L (à droite) en contact avec un microplastique à 10 g/L, après 72 h sur roue à 3 tours/minute. Chaque tube indique (dans l'ordre) la protéine contenue, la concentration en protéine (en mg/L) et le plastique contenu.

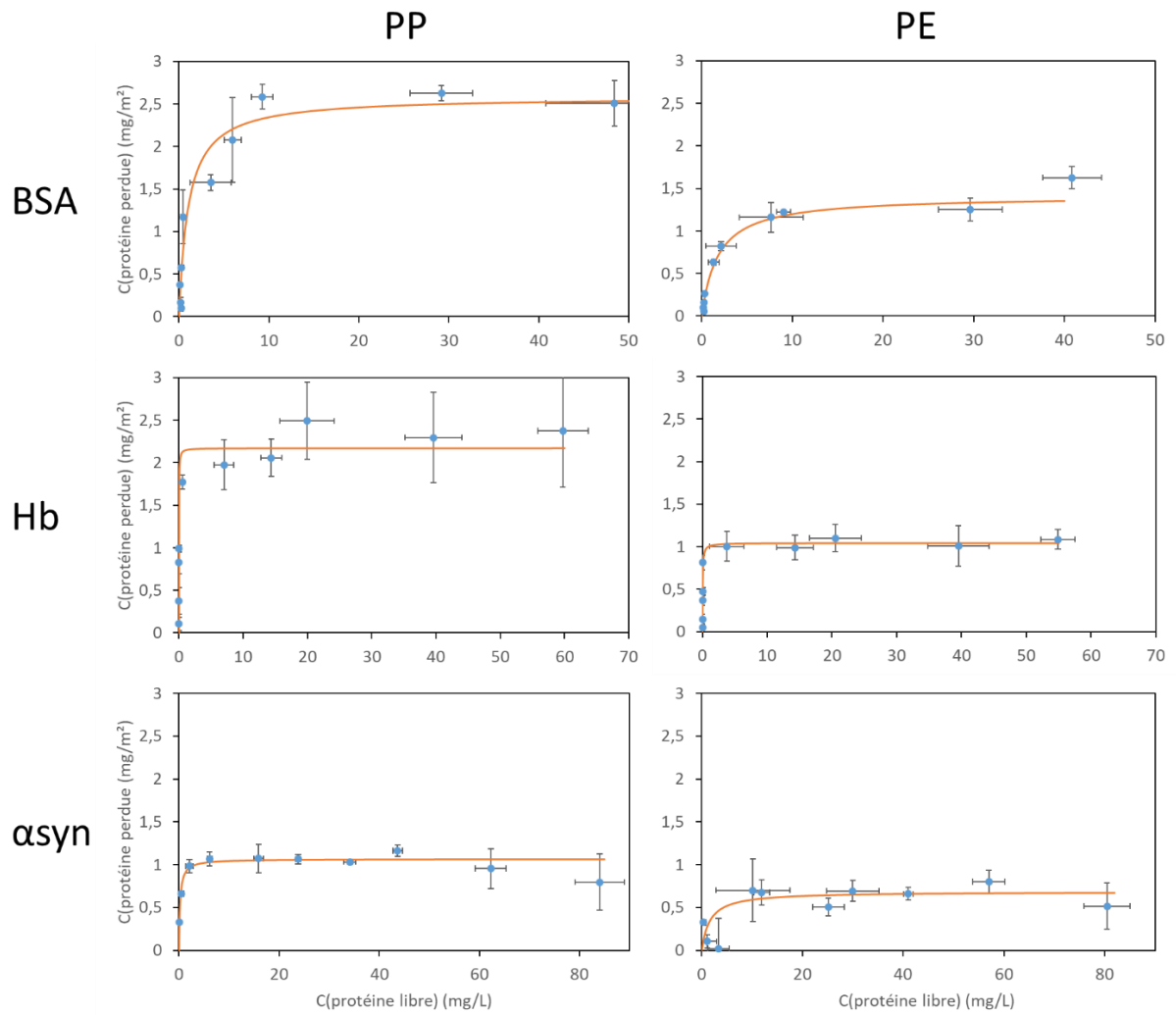


Figure 3.32 : Isothermes d'adsorption de chaque protéine sur chaque microplastique, obtenues à partir des solutions présentées Figure 3.31, et ajustées suivant le modèle de Langmuir.

Le modèle de Langmuir a été testé car des études précédentes réalisées par le laboratoire^{25,26} ont montré que ce modèle est adapté pour décrire l'adsorption de protéines par des microparticules. Les systèmes étudiés étaient différents, puisqu'il s'agissait de microparticules hydrophiles, mais les ajustements réalisés ici confirment que les isothermes obtenues suivent la formule de Langmuir (eq. 2). De plus, nous avons de plus tenté des ajustements en utilisant d'autres modèles tels que ceux de Freundlich²⁷, de Jovanovic²⁸ et de Temkin-Pyzhev²⁹, mais aucun n'a permis un meilleur ajustement de nos points expérimentaux.

$$C_{ads} = m_{\infty} \times \frac{C \times K_{ads}}{1 + C \times K_{ads}} \quad (eq. 2)$$

Dans cette formule, m_{∞} correspond à la quantité maximale de protéine pouvant être adsorbée par les microplastiques, et K_{ads} donne une estimation de l'affinité de la protéine pour le microplastique. La détermination de ces paramètres lors des ajustements nous apporte donc des informations sur les interactions entre les protéines et les microparticules de plastique. Les paramètres des ajustements obtenus sont rassemblés Tableau 3.6.

| | PP | | PE | |
|-------------|-----------------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|
| | m_{∞} (mg/m ²) | K_{ads} (L/mg) | m_{∞} (mg/m ²) | K_{ads} (L/mg) |
| BSA | 2,6 ± 0,2 | 1,0 ± 0,2 | 1,4 ± 0,1 | 0,7 ± 0,2 |
| Hb | 2,2 ± 0,2 | 92 ± 8 | 1,0 ± 0,1 | 26 ± 3 |
| αsyn | 1,1 ± 0,1 | 4,6 ± 0,5 | 0,7 ± 0,1 | 0,6 ± 0,1 |

Tableau 3.6 : Paramètres obtenus après ajustement suivant le modèle de Langmuir des isothermes d'adsorption des protéines étudiées sur les microparticules de PP et de PE dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7,0.

A notre connaissance, les isothermes d'adsorption les plus proches de celles que nous avons mesuré dans la littérature concernent l'adsorption de BSA sur des filtres de PE microstructurés³⁰. D'après cette étude la concentration de saturation des filtres est de 3,46 mg/m² en BSA à pH 6,39, et descend jusqu'à 2,24 mg/m² à pH 9,18. Comparé à cette étude, nous observons une concentration de saturation de la BSA sur les microparticules de PE plus faible mais restant dans un ordre de grandeur cohérent.

A l'échelle macroscopique, les isothermes d'adsorption de la BSA sur des tubes en PP et en PE ont été mesurées dans la littérature. D'après ces études, les valeurs de m_{∞} correspondantes sont de 3,5 mg/m² pour l'adsorption de la BSA sur le PP³¹ et de 20 mg/m² pour l'adsorption de la BSA sur le PE³². La première valeur est du même ordre de grandeur que ce que nous avons mesuré, mais la seconde est plus de 10 fois supérieure à ce que nous avons mesuré. Ceci peut indiquer que, sur une surface de PE macroscopique, plusieurs couches de BSA se forment.

Cet ajustement ne permet qu'une approximation de la valeur de K_{ads} , dont la valeur ne modifie que légèrement la courbure entre la phase croissante et le plateau, nous ne pouvons donc comparer que les ordres de grandeurs déterminés ici. Les valeurs de m_{∞} sont quant à elles déterminées précisément.

Nous observons que, quelle que soit la protéine considérée, la valeur de m_{∞} est plus élevée pour le PP que pour le PE, ce qui indique qu'une quantité plus importante de protéine est nécessaire pour saturer le PP. Les valeurs de K_{ads} obtenues pour la BSA sur le PE et le PP semblent proches mais, dans le cas de l'hémoglobine et de l'α-synucléine, nous observons que la valeur de K_{ads} est notablement plus élevée pour le PP que pour le PE, indiquant une plus forte affinité des protéines pour le PP. Ces observations

sont cohérentes entre elles puisque, si les protéines ont une plus faible affinité pour le PE, la cinétique de leur adsorption par le plastique est plus lente que dans le cas du PP, laissant le temps aux protéines adsorbées de se déformer pour couvrir une plus grande surface avant l'adsorption de protéines supplémentaires. Il en résulte que chaque protéine occupe une surface plus importante, et donc que la quantité de protéines adsorbées par unités de surface est plus faible (voir chapitre 1 paragraphe 2).

En comparant les résultats obtenus entre les différentes protéines, pour chaque plastique nous observons que l'affinité de l'hémoglobine pour les microparticules de plastique est beaucoup plus importante que celles de la BSA ou de l' α -synucléine (de 20 fois à 92 fois plus importante). Ces différences importantes de comportement entre l'hémoglobine et les autres protéines peuvent s'expliquer par la théorie DLVO³³. Cette théorie décrit les interactions entre particules colloïdales comme la somme des forces de van der Waals et des interactions entre les doubles couches électriques. La force de Van des Waals dépend de la taille des particules tandis que la force liées aux interactions entre les doubles couches électriques dépend de la charge des particules considérées, donc du point isoélectrique dans le cas de protéines.

L'hémoglobine et la BSA ont des tailles similaires, étant chacune composée d'environ 580 résidus, tandis que l' α -synucléine est composée de seulement 140 résidus. Puisque la BSA et l' α -synucléine ont un comportement similaire entre elles et différent de celui de l'hémoglobine, les forces de van der Waals ne semblent pas être le facteur déterminant pour la stabilisation des microparticules de plastique par les protéines.

La BSA et l' α -synucléine ont un point isoélectrique de l'ordre de 4,7, contre un point isoélectrique de 7,0 pour l'hémoglobine. Dans un tampon de pH 7,0, comme le tampon phosphate utilisé pour ces expériences, la BSA et l' α -synucléine sont donc plus fortement chargées que l'hémoglobine, causant des forces répulsives plus importantes entre leurs doubles couches électriques. Ceci favorise donc les interactions entre l'hémoglobine et les microparticules de plastique, en cohérence avec nos observations. D'après nos résultats, le facteur déterminant pour l'adsorption des protéines sur les microparticules de plastique serait donc leur charge. Ceci pourrait être confirmé en répétant ces mesures à d'autres pH, en particulier pour un pH de 4,7. Ce type d'expérience a été réalisé au laboratoire pour de l'hémoglobine sur des nanoparticules de silice, dont l'adsorption a été observée à pH 7,0 mais pas à 9,0³⁴.

De plus, que ce soit pour le PE ou pour le PP, la valeur de m_∞ de l'hémoglobine est légèrement plus faible que celle de la BSA, tandis que celle de l' α -synucléine est significativement plus faible que celle de l'hémoglobine. L' α -synucléine étant une protéine en partie déstructurée, il lui est possible de maximiser sa surface de contact avec les plastiques, ce qui peut expliquer la plus faible valeur de m_∞ puisque chaque protéine occupe une surface plus importante. L'hémoglobine étant un oligomère, il lui est possible de se déformer plus facilement, ce qui peut expliquer les valeurs de m_∞ légèrement plus faibles que celles de la BSA.

Nous voulons comparer les quantités de protéines adsorbées aux quantités correspondant à des monocouches. Pour cela nous estimons la quantité de protéines pouvant être adsorbée sur une microparticule de plastique pour former une monocouche. En considérant que nos microparticules sont sphériques et que les protéines sont des sphères de rayon égal à leur rayon de giration, si le rayon des microparticules est au moins 10 fois supérieur à celui des protéines, nous pouvons considérer que l'équation 3 est vérifiée.

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

Dans cette équation N_T est le nombre de protéines pouvant être adsorbées dans une monocouche, R est le rayon de la microparticule de plastique et r est le rayon de giration de la protéine. En analysant les images des microparticules de plastique par microscopie en utilisant Fiji, nous avons déterminé que le rayon médian (sur 250 particules) des microparticules de PE utilisées est $2,1 \mu\text{m}$ et celui des microparticules de PP est $5,0 \mu\text{m}$. Nous pouvons donc appliquer l'équation 3 à nos protéines, dont le rayon de giration est de l'ordre de quelques nm. Connaissant leur masse molaire nous en déduisons les valeurs de m_∞ correspondant à des monocouches, rassemblés Tableau 3.7. Bien que la valeur de N_T dépende du rayon des particules la valeur de m_∞ est indépendante de ce rayon puisqu'elle est rapportée à la surface. Les valeurs de m_∞ calculées sont donc les mêmes pour les microparticules de PP et de PE.

| Protéine | m_∞ |
|--------------------|------------------------|
| BSA | 2,43 mg/m ² |
| Hb | 2,74 mg/m ² |
| αsyn | 2,40 mg/m ² |

Tableau 3.7 : Masse de protéines correspondant à une monocouche sur les microparticules de plastique.

Pour chacune des protéines et sur chacun des plastiques, la valeur de m_∞ attendue si une monocouche de protéine se forme à la surface des microparticules de plastique est de l'ordre de $2,5 \text{ mg/m}^2$. Comparé aux valeurs obtenues expérimentalement, nous pouvons donc en déduire que l'hémoglobine et la BSA forment une monocouche complète sur les microparticules de PP. Dans les autres cas la quantité de protéines adsorbées est proche de la moitié de celle nécessaire pour la formation d'une monocouche, nous avons donc des monocouches partielles de protéines. Cette observation est cohérente avec le fait que, d'après nos isothermes d'adsorption, l'hémoglobine et la BSA ont une plus forte affinité pour les microparticules de plastique que l' α -synucléine, et les microparticules de PP ont une plus forte affinité pour les protéines que celles de PE.

Les différences observées entre les isothermes confirment l'intérêt de comparer plusieurs protéines modèles et l'utilisation de plusieurs plastiques.

4. Dispersion des plastiques en solution par les protéines

Bien que les microplastiques puissent passer en solution en présence de protéines, la suspension obtenue n'est pas stable : si elle est laissée immobile pendant une durée suffisante, les plastiques vont remonter en surface, comme nous l'avons vu sur la photo Figure 3.19.

Le turbiscan mesure la transmittance et la rétrodiffusion d'un échantillon à différentes hauteurs à intervalle régulier, nous permettant de suivre la cinétique de crémage des microplastiques. Pour une solution contenant les microparticules de plastique sans protéine, nous observons que la transmission est maximale dès le début de la mesure et ne change pas au cours du temps, tandis que la rétrodiffusion reste nulle tout au long de la mesure, indiquant que la solution reste transparente et donc que les microplastiques ne sont pas passés en solution. Pour l'analyse de nos résultats, nous avons moyenné les valeurs de transmission et de rétrodiffusion dans le tube d'une hauteur de 5 mm à 18 mm, la hauteur atteinte par la solution étant 20 mm.

Pour les solutions contenant des protéines, la transmission est initialement minimale, puisque les protéines ont permis aux microplastiques de former une suspension. La transmission augmente ensuite au cours du temps à mesure que les plastiques remontent en surface. Nous avons réalisé pour chaque protéine deux mesures, une à 100 mg/L (à saturation de la couche adsorbée) et une à 700 mg/L (en sursaturation de protéines), pour chaque microplastique. L'évolution de la transmission des solutions est représentée Figure 3.33.

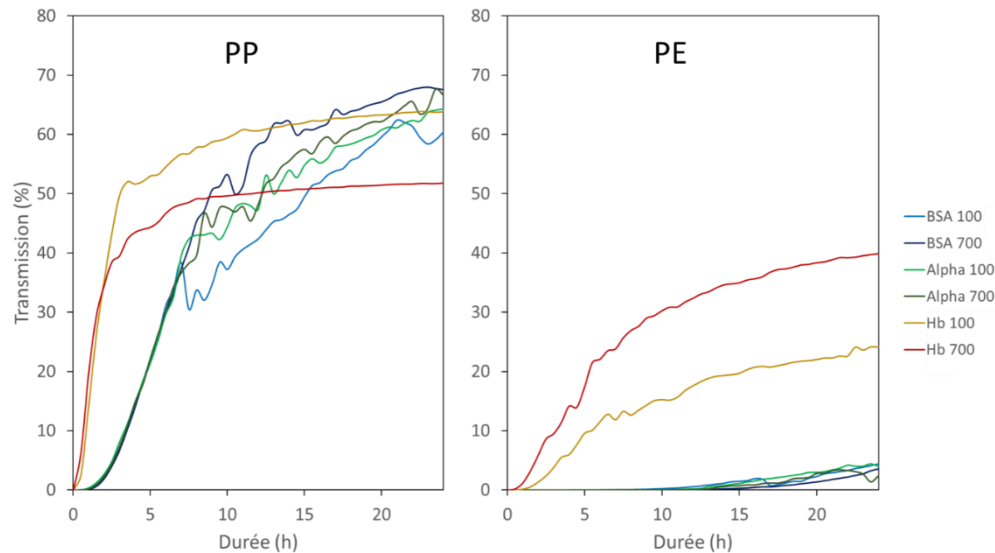


Figure 3.33 : Suivi de la transmission des solutions de protéine après 72 h de mise en contact avec les microplastiques dans des solutions de concentration 100 mg/L et 700 mg/L en BSA, en α -synucléine et en hémoglobine pour le PP (à gauche) et pour le PE (à droite).

Nous observons pour les trois protéines que la transmission augmente beaucoup plus rapidement pour les dispersions de microparticules de PP que pour celles de microparticules de PE. De plus pour les deux plastiques nous observons que la transmission évolue à des rythmes similaires pour les solutions de BSA et celles d' α -synucléine, tandis que la transmission augmente plus rapidement pour les solutions d'hémoglobine. Une augmentation plus rapide de la transmission indique une plus grande vitesse de sédimentation des microparticules de plastique correspondantes.

Dans le cas de particules dispersées en solution, la vitesse de sédimentation peut être déterminée par la loi de Stokes³⁵, et suit donc l'équation 4 :

$$V_g = \frac{d^2 \times (\Delta\rho) \times g}{18 \times \eta} \quad (eq.4)$$

Dans cette équation, V_g est la vitesse de sédimentation, d est le diamètre de la particule, $\Delta\rho$ est la différence de densité entre la particule et le liquide, g est l'intensité de la pesanteur et η est la viscosité du milieu dispersant. La formation de la corona sur les microparticules peut modifier leur diamètre ainsi que leur densité, ce sont donc les paramètres pouvant varier entre nos systèmes.

La densité des microparticules de PE utilisées est de 0,97, tandis que celle des microparticules de PP est de 0,9. Ces densités étant inférieures à 1 les valeurs de $\Delta\rho$ pour les particules dans l'eau sont négatives. Les vitesses de sédimentation calculées sont donc négatives, ce qui est bien attendu pour des phénomènes de crémage. De plus les microparticules de PE ont un diamètre moyen de 5,4 μm , tandis que les microparticules de PP ont un diamètre moyen de 10,3 μm . Ceci explique que, pour

chaque protéine étudiée, la vitesse de crémage est plus importante pour les microparticules de PP que pour les microparticules de PE.

Puisque les microparticules de plastique crèment plus rapidement dans les solutions d'hémoglobine, nous pouvons en déduire que le diamètre des particules couvertes d'une corona d'hémoglobine est supérieur à celui des particules couvertes d'une corona de BSA ou d' α -synucléine. Ceci est en accord avec les résultats des isothermes d'adsorption. Puisque les microparticules de plastique ont une plus forte affinité pour l'hémoglobine que pour les autres protéines, l'adsorption de l'hémoglobine est plus rapide, ce qui résulte en une corona de plus grande taille (comme expliqué chapitre 1).

Pour les microparticules de PP comme pour celles de PE, la vitesse de crémage dans les solutions de BSA et d' α -synucléine est similaire que la concentration en protéine soit de 100 mg/L ou 700 mg/L. Dans le cas de l'hémoglobine, nous observons que pour une concentration en protéine de 700 mg/L la vitesse de sédimentation des microparticules de PP est inférieure à celle des microparticules dans une solution à 100 mg/L, tandis que la tendance inverse est observée pour les microparticules de PE. L'évolution observée pour les microparticules de PE peut indiquer que le diamètre de la corona continue d'augmenter avec la concentration en hémoglobine même une fois la surface des microparticules saturée, possiblement parce que la soft corona (qui a été séparée lors des mesures d'isothermes) continue de croître une fois la hard corona complète. Cette interprétation n'explique toutefois pas l'évolution observée pour les microparticules de PP.

Pour ces mêmes solutions l'évolution de la rétrodiffusion a également été mesurée, et les courbes obtenues sont représentées Figure 3.34.

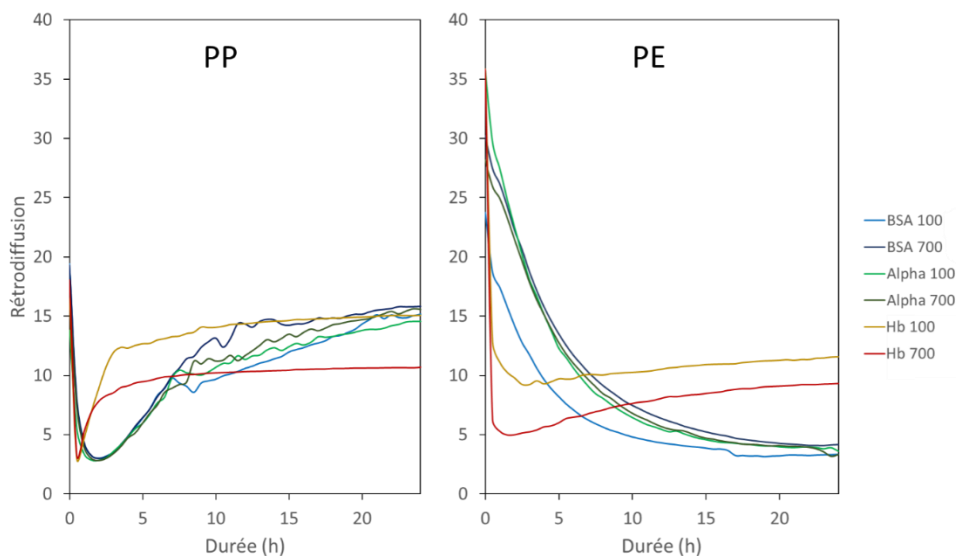


Figure 3.34 : Suivi de la rétrodiffusion des solutions de protéine après 72 h de mise en contact avec les microplastiques dans des solutions de concentration 100 mg/L et 700 mg/L en BSA, en α -synucléine et en hémoglobine pour le PP (à gauche) et pour le PE (à droite).

Pour toutes les courbes nous observons initialement une dégression rapide de l'intensité, qui peut être attribuée à une remontée en surface des microparticules et est donc attendue. Après cette décroissance, nous observons une croissance de la rétrodiffusion conduisant à un palier pour toutes les suspensions de microparticules de PP ainsi que pour les suspensions de PE dans l'hémoglobine. Cette croissance de la rétrodiffusion pourrait s'expliquer par l'agrégation de protéines après le début du crémage. Actuellement nous n'avons pas d'autres explications pour cette possible agrégation, et

n'avons à notre connaissance trouvé aucune mesure similaire dans la littérature pour comparer ces résultats.

Comme dans le cas des isothermes d'adsorption, l'importante différence de comportement observée entre l'hémoglobine et les autres protéines pourrait s'expliquer par les différences de points isoélectriques d'après la théorie DLVO³³.

5. Etat des protéines dans la corona

Nous avons utilisé deux méthodes d'imagerie pour observer directement la corona de protéine autour des microplastiques, l'imagerie Raman et l'imagerie de fluorescence. De plus, nous avons réalisé des expériences de tonométrie afin d'observer la fonctionnalité de l'hémoglobine adsorbée sur un plastique microstructuré.

5.1. Imagerie Raman de l'hémoglobine sur des microparticules de plastique

L'appareil utilisé est équipé d'un laser à 532 nm, ce qui permet de faire de la spectroscopie Raman de résonance pour les hémoprotéines, en particulier l'hémoglobine, et donc d'obtenir un signal d'une forte intensité de l'hème^{36,37}. Même dans ces conditions le signal de l'hémoglobine reste relativement faible aux concentrations auxquelles nous avons travaillé pour les expériences précédentes. Nous avons donc utilisé des solutions à 1 g/L en hémoglobine, comparé au 0,1 g/L utilisé pour les expériences précédentes.

Pour la BSA et l' α -synucléine, qui n'absorbent pas à la longueur d'onde du laser utilisé, le signal Raman obtenu est trop faible pour permettre une détection sur les plastiques puisqu'il n'y a pas de résonance. Par conséquent, l'hémoglobine est la seule protéine que nous avons étudié par spectroscopie Raman.

5.1.1. Mise en place de la méthode d'analyse des images Raman

Les acquisitions en imagerie Raman étant réalisées sur des durées de plusieurs heures par image, chaque acquisition d'imagerie Raman n'a pu être réalisée que deux fois sur chaque échantillon étudié. Les mesures sur les microparticules de plastique après contact avec l'hémoglobine sont réalisées dans la solution de protéine. Les filtres en PP ayant brûlé sous le laser lors de nos tentatives de mesures Raman, même en déposant de la solution d'hémoglobine sur ces derniers lors des mesures, les spectres obtenus n'étaient pas exploitables, seules les expériences réalisées sur les microparticules de plastiques sont donc présentées ici.

Lors d'une acquisition d'imagerie Raman, le spectre de chaque point de l'image est mesuré. Après traitement, nous utilisons les spectres de références mesurés pour réaliser un ajustement de chaque spectre de l'image et produire ainsi une image pour chaque référence, pour laquelle l'intensité en chaque point est proportionnelle au coefficient appliqué à cette composante lors de l'ajustement. Nous savons que nos systèmes contiennent du tampon phosphate, des microplastiques et de l'hémoglobine, nous avons donc mesuré séparément les spectres de ces composantes afin de les utiliser comme spectres de référence lors des expériences d'imagerie Raman.

Le premier signal de référence, représenté Figure 3.35, est celui du tampon phosphate.

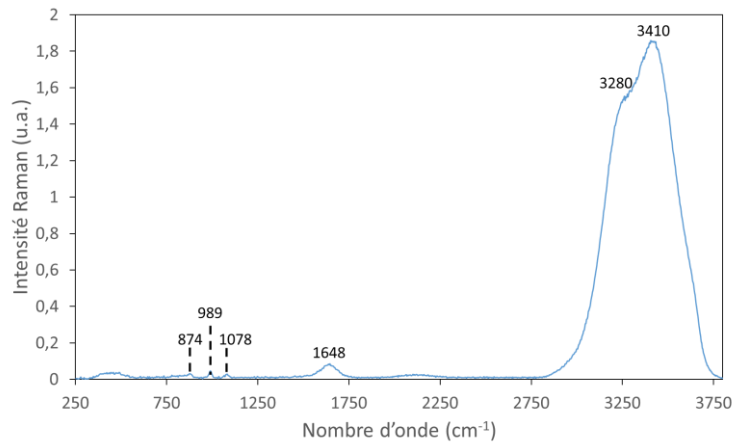


Figure 3.35 : Spectre Raman du tampon phosphate 100 mM pH 7,0 utilisé comme référence.

Nous remarquons que ce spectre est principalement composé du signal de l'eau à 1648 cm^{-1} et autour de 3300 cm^{-1} , avec le signal du groupement phosphate³⁸ visible autour de 1000 cm^{-1} . Nous avons attribué les pics de ce spectre Tableau 3.8.

| Nombre d'onde (cm^{-1}) | Signal |
|------------------------------------|--------------------------|
| 874 | ν P-(OH) |
| 989 | ν_s PO_3 |
| 1078 | ν_{as} PO_3 |
| 1648 | δ H-O-H |
| 3280 | ν_s O-H |
| 3410 | ν_a O-H |

Tableau 3.8 : Attribution des pics du spectre Raman du tampon phosphate.

Les spectres de référence utilisés pour le PE et le PP sont ceux qui ont été présentés Figure 3.9 et Figure 3.10 respectivement. Un seul spectre est utilisé pour le PE afin de simplifier l'analyse des résultats, et parce que l'ajout de composantes de PE supplémentaires ne modifie pas les résultats d'analyse par imagerie Raman.

Afin de pouvoir repérer l'hémoglobine lors de l'imagerie Raman nous avons également besoin de spectres de référence pour la protéine. Puisque le spectre de l'hémoglobine dépend de son état, nous avons utilisé deux spectres de référence, le premier correspondant à l'hémoglobine native oxygénée et le second correspondant à de l'hémoglobine dénaturée par chauffage à 85°C. Ceci nous permettra lors de nos mesures d'imagerie Raman de déterminer si de l'hémoglobine dénaturée se trouve sur les microparticules de plastique. Nous pouvons noter ici que la dénaturation conduit à l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine. Il s'agit donc du spectre de référence de la méthémoglobine dénaturée. Le spectre de la méthémoglobine a également été mesuré après oxydation par le nitrite de sodium. Les deux spectres présentant peu de différence, le logiciel ne permet pas de distinguer dans les images Raman la méthémoglobine et la méthémoglobine dénaturée. A cause de cela, les zones correspondant à de la méthémoglobine sont réparties de façon aléatoire à la méthémoglobine et à la méthémoglobine dénaturée par le logiciel. Nous avons donc utilisé le spectre de l'hémoglobine dénaturée thermiquement comme unique spectre de référence de la méthémoglobine.

1) Pour l'hémoglobine oxygénée nous avons mesuré le spectre d'une solution d'hémoglobine fraîche en 10 endroits différents. Une fois les spectres moyennés nous avons soustrait le spectre du tampon phosphate présenté précédemment afin d'obtenir le spectre de l'hémoglobine oxygénée seule, représenté Figure 3.36.

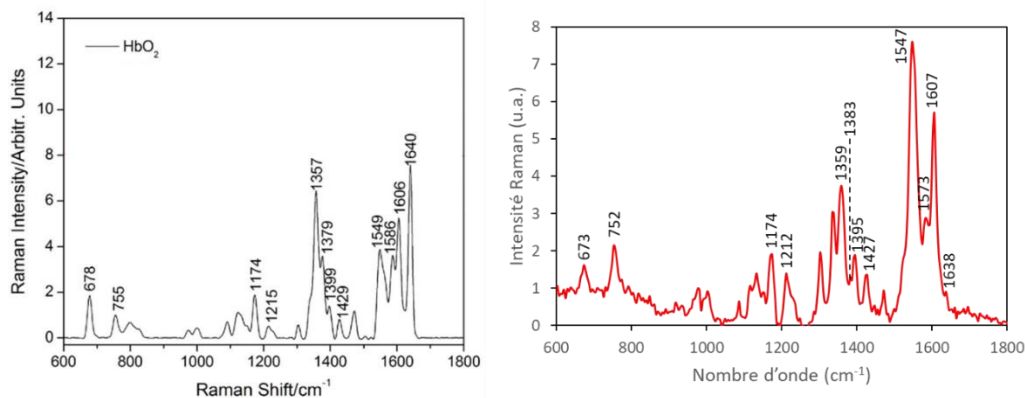


Figure 3.36 : Spectres Raman de l'hémoglobine oxygénée, à gauche, spectre tiré de *Detection of methemoglobin in whole blood based on confocal micro-raman spectroscopy and multivariate statistical techniques*³⁹ et à droite, celui que nous avons acquis et utilisé comme référence.

Les pics de ce spectre Raman ont été attribués dans l'article dont il est tiré³⁹, nous permettant d'attribuer les pics de notre spectre comme présenté Tableau 3.9.

| Nombre d'onde (cm ⁻¹) | Signal |
|-----------------------------------|--|
| 673 | $\delta(\text{pyr deform})_{\text{sym}}$ |
| 752 | $\nu(\text{pyr breathing})$ |
| 1174 | $\nu(\text{pyr half-ring})_{\text{asym}}$ |
| 1212 | $\delta_{\text{asym}}(\text{C}_m\text{H})$ |
| 1359 | $\nu(\text{pyr half-ring})_{\text{sym}}$ |
| 1383 | $\nu(\text{pyr half-ring})_{\text{sym}}$ |
| 1395 | $\nu(\text{pyr quater-ring})$ |
| 1427 | $\nu(\text{C}_\alpha\text{C}_m)_{\text{sym}}$ |
| 1547 | $\nu(\text{C}_\beta\text{C}_\beta)$ |
| 1583 | $\nu(\text{C}_\alpha\text{C}_m)_{\text{asym}}$ |
| 1607 | $\nu(\text{C}_\alpha\text{C}_m)_{\text{asym}}$ |
| 1638 | $\nu(\text{C}_\alpha\text{C}_m)_{\text{asym}}$ |

Tableau 3.9 : Attribution des pics du spectre Raman de l'hémoglobine oxygénée.

La soustraction du spectre du tampon phosphate est nécessaire pour qu'il nous soit possible lors de l'analyse automatique des images de repérer d'éventuelles traces d'hémoglobine oxygénée dans des zones ne comportant pas ou peu de signal de l'eau. Par rapport au spectre trouvé dans la littérature nous observons des différences de rapport d'intensités relatives des pics. La plupart de ces écarts sont

faibles, et peuvent s'expliquer par la différence de longueur d'onde d'excitation utilisée, 514 nm pour l'article de la littérature et 533 nm pour nos mesures, ou par la différence de protéine, notre hémoglobine étant porcine tandis que celle de l'article est de l'hémoglobine humaine. Une différence notable est le pic à 1640 cm^{-1} , qui est le pic le plus intense dans l'article mais est à peine visible dans nos mesures. Une explication possible pourrait être la présence de 2,3-diphosphoglycérate (DPG) dans la solution étudiée en littérature, DPG que nous avons retiré de nos solutions (voir le chapitre Matériel et Méthodes). Le DPG étant un effecteur allostérique de l'hémoglobine (une molécule se liant à la protéine, changeant sa configuration et diminuant son activité), il influence sa conformation et donc possiblement son spectre Raman, ce qui pourrait être à l'origine de la différence observée.

Afin de vérifier que le laser utilisé lors des mesures de spectroscopie Raman n'altère pas la protéine nous avons réalisé 10 spectres successifs en un même point de l'échantillon. Chaque spectre était identique et correspondait à celui de l'hémoglobine oxygénée, confirmant que l'hémoglobine n'était pas oxydée par la mesure.

2) Pour l'hémoglobine dénaturée, l'échantillon a été obtenu en chauffant de l'hémoglobine fraîche pendant 60 minutes à 85°C , température à laquelle l'hémoglobine est déstructurée et s'agglomère⁴⁰. Des agrégats d'hémoglobine vieillie thermiquement ont alors été observés en solution, ce qui nous a permis d'obtenir un spectre peu bruité en moyennant le spectre d'un grand nombre d'agrégats par imagerie Raman. Le spectre obtenu ne contenait pas de signal d'eau, indiquant que l'intérieur de l'agrégat est déshydraté, et n'a donc pas nécessité de traitement supplémentaire. Ce spectre est présenté Figure 3.37 à droite.

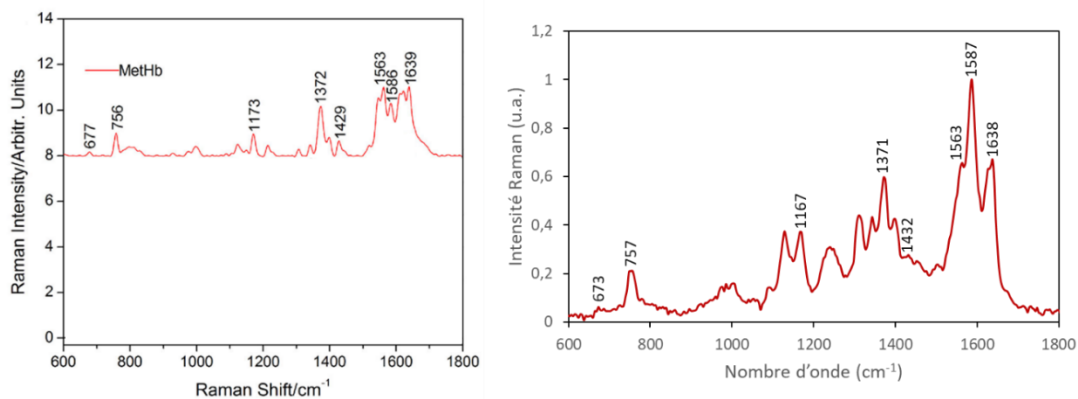


Figure 3.37 : Spectres Raman d'hémoglobine, à gauche, le spectre de méthémoglobine adapté de *Detection of methemoglobin in whole blood based on confocal micro-Raman spectroscopy and multivariate statistical techniques*³⁹ et à droite, le spectre d'hémoglobine dénaturée thermiquement que nous avons utilisé comme référence.

Le spectre le plus proche, trouvé dans la littérature, est celui de la méthémoglobine. Les observations de spectres présentés dans cette partie confirment que le spectre de la méthémoglobine dénaturée est le choix adapté pour les systèmes que nous allons observer. Les pics présents sur ce spectre ont les mêmes attributions que ceux du spectre de l'hémoglobine oxygénée.

Nous avons donc réalisé des acquisitions sur des particules de PP et de PE, puis utilisé les 4 spectres de références présentés précédemment (Tampon phosphate, HbO_2 , metHb obtenue par vieillissement thermique et PP ou PE en fonction du plastique observé) pour obtenir les composantes d'imagerie Raman représentées Figure 3.38.

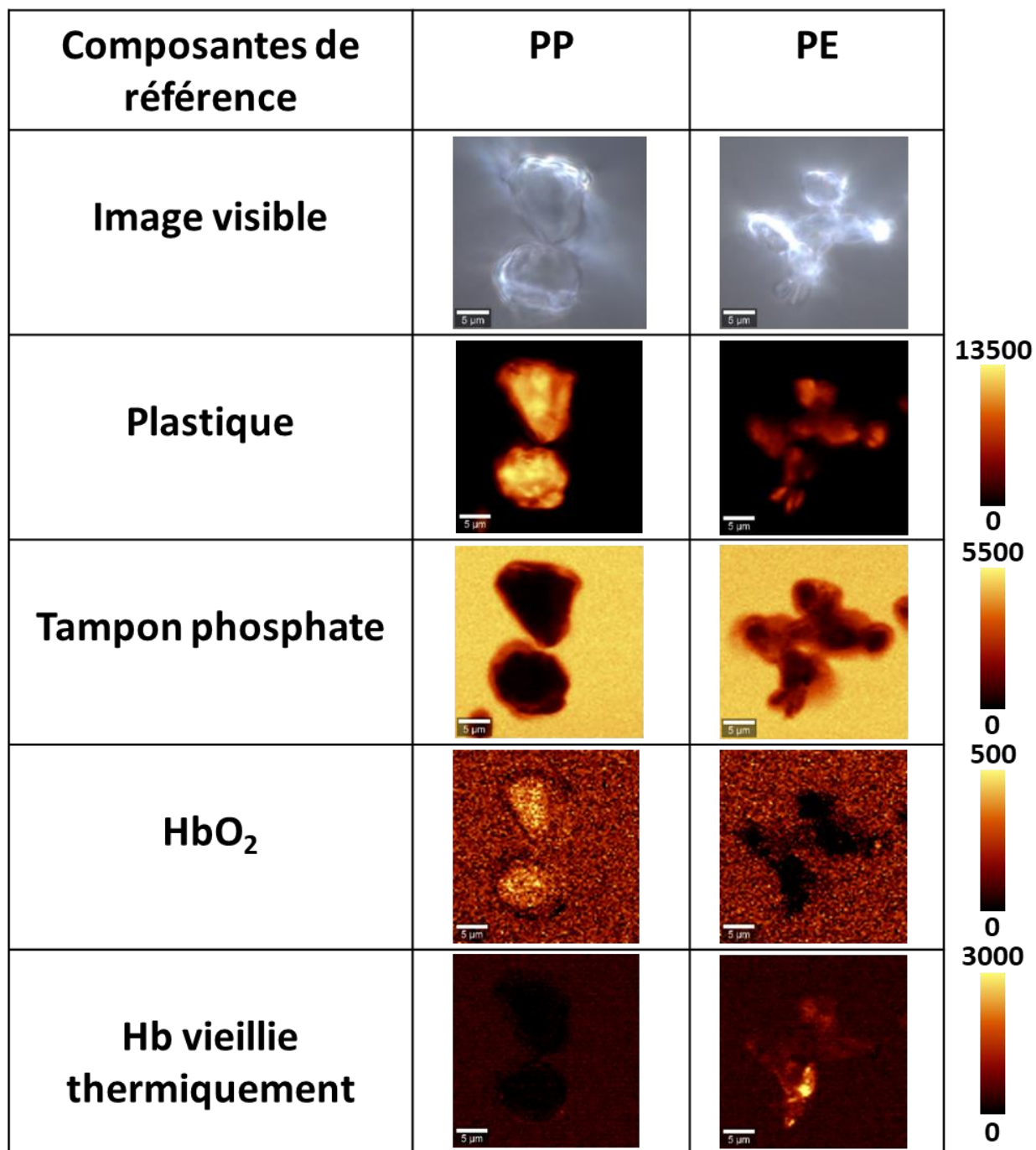


Figure 3.38 : Images Raman des composantes après 72 h de mise en contact des microplastiques avec Hb.
La barre d'échelle mesure 5 μm pour chaque image.

Pour chaque plastique, nous avons réalisé des mesures d'imagerie sur deux particules. Globalement, nous avons observé les mêmes comportements pour les deux particules de PE et pour les deux particules de PP. Pour simplifier la présentation des résultats, nous montrerons donc les images obtenues pour une particule de chaque système dans cette partie, les images des secondes particules se trouvant en Annexe Figure A.2A.

Pour confirmer les attributions des différentes composantes, nous avons comparé les spectres Raman mesurés en un point aux spectres de référence. Pour simplifier la comparaison visuelle des spectres, dans chaque cas le spectre de référence est normalisé au niveau du pic le plus proche sur le spectre mesuré. Ainsi, les premières observations donnent l'impression que le polypropylène est couvert d'hémoglobine oxygénée, et que le polyéthylène présente des agrégats d'hémoglobine dénaturée.

Nous avons donc cherché à vérifier si le polypropylène est couvert d'hémoglobine oxygénée en comparant manuellement le spectre mesuré en un point du plastique et le spectre de référence de l'hémoglobine oxygénée, Figure 3.39.

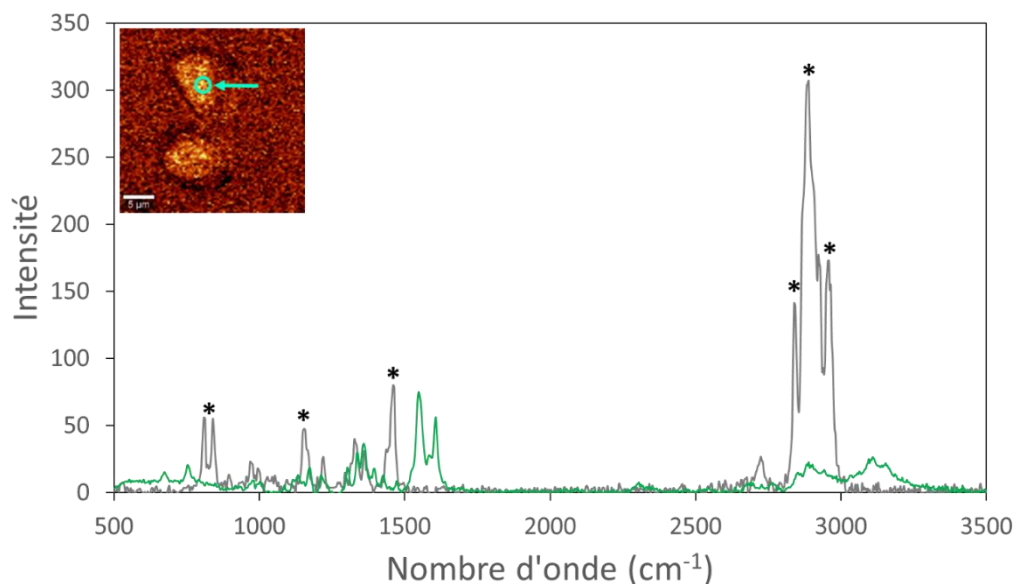


Figure 3.39 : Spectre Raman, en gris, mesuré en un point sur le PP (position indiquée en haut à gauche sur la composante 'HbO₂'), et comparaison au spectre de référence de l'hémoglobine oxygénée (en vert). Les étoiles indiquent les pics majoritaires de PP.

Le spectre mesuré ne correspond pas à celui de l'hémoglobine oxygénée, en particulier aucun signal n'est observé entre 1500 cm⁻¹ et 1600 cm⁻¹, là où se trouvent les pics les plus intenses du signal de l'hémoglobine. L'image correspondant au spectre de référence de l'hémoglobine oxygénée n'est donc pas causée par la présence d'hémoglobine sur le PP à un niveau significatif mais par des artéfacts lors de l'ajustement, probablement parce que les signaux du PP et de l'hémoglobine oxygénée comprennent des pics proches entre 1000 cm⁻¹ et 1500 cm⁻¹. Afin d'éviter toute confusion, l'image correspondant au spectre de référence de l'hémoglobine oxygénée sur le PP sera retirée des figures à venir.

De la même façon nous avons comparé manuellement le spectre mesuré sur ce qui semblait être un agrégat de Hb sur PE, et le spectre de référence de l'hémoglobine dénaturée thermiquement, que nous avons représenté Figure 3.40.

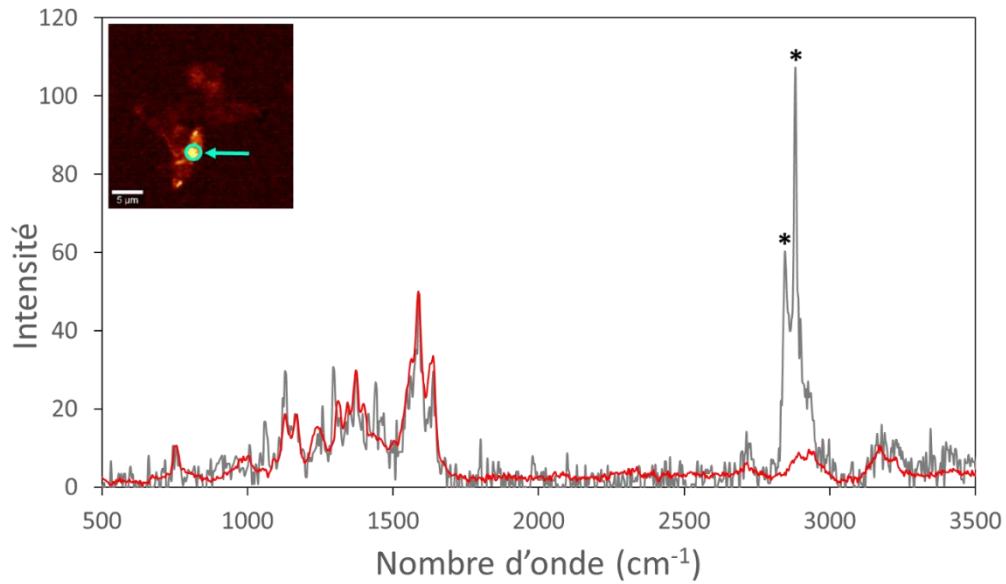


Figure 3.40 : Spectres Raman, en gris, mesuré en un point sur le PE (position indiquée en haut à gauche sur la composante 'Hb vieillie thermiquement'), et comparaison au spectre de référence de l'hémoglobine vieillie thermiquement (en rouge). Les étoiles distinguent les pics majoritaires du PE.

Cette fois, le spectre mesuré correspond au spectre de référence de l'hémoglobine vieillie thermiquement, nous avons donc bien des agrégats d'hémoglobine dénaturée sur les particules de PE.

Nous observons également la présence d'hémoglobine dont le signal correspond à celui de l'hémoglobine dénaturée sur le reste du plastique, confirmée par l'analyse des spectres, bien qu'avec une plus faible intensité en dehors des agrégats. Ceci suggère la présence d'une « fine » couche d'hémoglobine sur la microparticule, qui pourrait correspondre à la corona.

5.1.2. Analyse des images Raman

Afin d'analyser les résultats de l'imagerie Raman nous avons superposé les images des différentes composantes représentées Figure 3.38 pour le PE après 72 heures de mise en contact avec l'hémoglobine. L'image obtenue est représentée Figure 3.41.

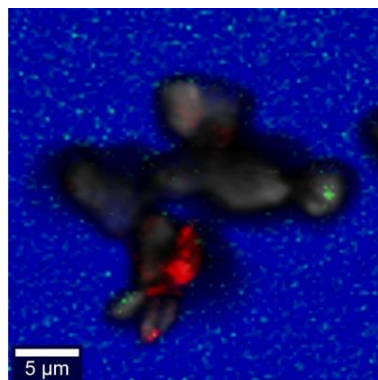


Figure 3.41 : Superposition des composantes d'imagerie Raman, PE en gris, tampon phosphate en bleu, HbO₂ en vert, Hb vieillie thermiquement en rouge.

Cette représentation confirme que l'agrégat de Hb se trouve bien sur le plastique, et permet aussi de remarquer ce qui semble être un agrégat d'hémoglobine oxygénée sur la droite du microplastique. Une fois de plus, afin de vérifier cette conclusion, nous avons comparé manuellement le spectre Raman mesuré en ce point au spectre de référence de l'hémoglobine oxygénée. Ces spectres sont représentés Figure 3.42.

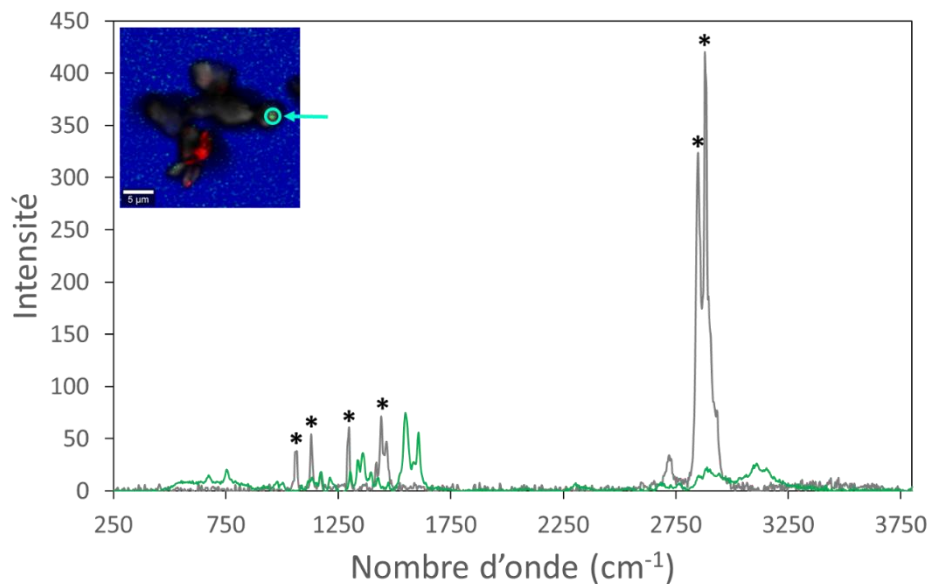


Figure 3.42 : Spectres Raman, en gris, mesuré en un point sur le PE (position indiquée en haut à gauche sur la superposition des composantes d'imagerie Raman), et comparaison au spectre de référence de l'hémoglobine oxygénée (en vert). Les étoiles distinguent les pics majoritaires du PE.

Comme dans le cas du polypropylène nous n'observons aucun signal entre 1500 cm^{-1} et 1750 cm^{-1} , où se trouve le pic le plus intense du signal de l'hémoglobine oxygénée. Nous pouvons donc en déduire qu'il n'y a pas d'agrégat d'hémoglobine oxygénée sur le plastique, et que le signal observé sur la composante correspondante est un artefact causé par l'ajustement effectué par le logiciel.

Nos mesures de DLS sur l'hémoglobine ayant été réalisées sur des solutions de méthémoglobine à 250 mg/L , tandis que les mesures de Raman ont été réalisées sur des solutions d'hémoglobine oxygénée à 1 g/L , nous ne pouvons pas directement comparer les résultats de ces expériences. Or, nous voulons déterminer si la formation des agrégats d'hémoglobine observés en imagerie Raman est causée par la présence de microparticules de plastique ou si le stress mécanique causé par le passage sur roue suffit à causer cette agrégation. Pour cela, nous avons donc réalisé des mesures de DLS supplémentaires sur des solutions d'hémoglobine oxygénée à 1 g/L laissées sur roue tournant à 3 tours/minute pendant 72 heures à 4°C . Nous avons réalisé des mesures de DLS des solutions avant filtration et après filtration avec un seuil de coupure de $1,2\text{ }\mu\text{m}$ et avons ainsi obtenu les corrélogrammes représentés Figure 3.43.

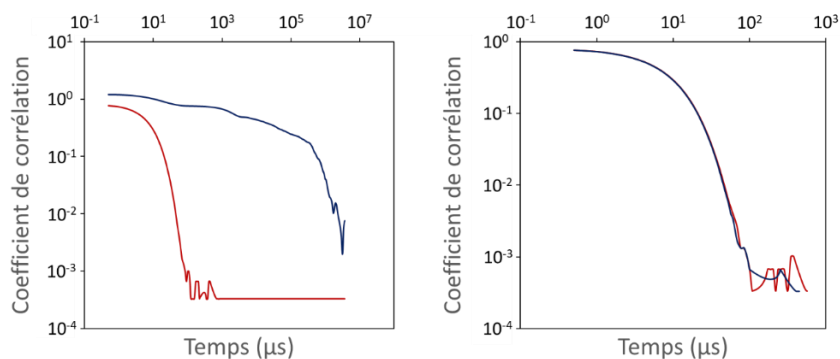


Figure 3.43 : Corrélogrammes de méthémoglobine après 72 h statique (en rouge) et après 72 h sur roue à 3 tours/minute (en bleu) pour des solutions à 1 g/L non-filtrées (à gauche) et filtrées (à droite).

Le passage sur roue modifie fortement le corrélogramme des solutions non filtrées, le palier du corrélogramme diminuant à un temps plus court pour la solution maintenue statique que pour celle passée sur roue, indiquant la formation d'objets de grande taille en solution lors de l'agitation. Lorsque les solutions d'hémoglobine sont filtrées nous obtenons le même signal que la solution soit passée sur la roue ou non, indiquant que les agrégats formés ont une taille supérieure à 1,2 μm . D'après ces mesures, le mouvement de la solution d'hémoglobine concentrée suffit à causer l'agrégation de l'hémoglobine sans présence de microparticules de plastique, comme présenté Figure 3.44.

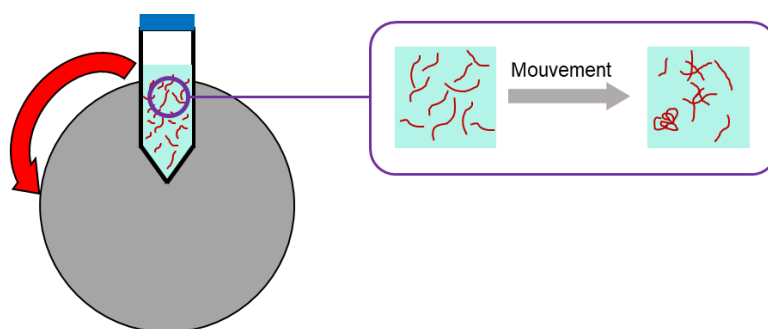


Figure 3.44 : Représentation schématique de l'effet du mouvement sur roue sur l'hémoglobine en solution.

Dans le but d'analyser directement ces agrégats nous avons observé par spectroscopie Raman des échantillons d'hémoglobine oxygénée à 1 g/L passés sur une roue tournant à 3 tours/minute pendant 72 heures à 4°C. Toutefois, nous n'avons pas détecté d'agrégat d'hémoglobine par cette méthode, ceux-ci n'étant pas visibles lors des observations directes et les spectres mesurés dans la solution correspondant uniquement au spectre de l'hémoglobine oxygénée, sans trace de méthémoglobine ou d'hémoglobine dénaturée.

D'après ces observations, les agrégats adsorbés sur les microparticules de plastique peuvent résulter du stress mécanique dû au mouvement des solutions sur la roue. La taille des agrégats observés par imagerie Raman est de l'ordre de 5 μm , nous ne pouvons donc pas comparer leur taille à celle des agrégats formés en solution sans présence de plastique, dont nous savons uniquement que leur diamètre est supérieur à 1,2 μm .

Pour compléter ces expériences nous avons réalisé une étude cinétique via des mesures d'imagerie Raman de microplastiques après 24 heures et 48 heures de contact avec l'hémoglobine pour PE (Figure 3.45) et pour PP (Figure 3.49). De nouveau, les images obtenues sur les secondes particules de ces systèmes sont présentées en annexe (Figure A.3 pour le PE et Figure A.4 pour le PP).

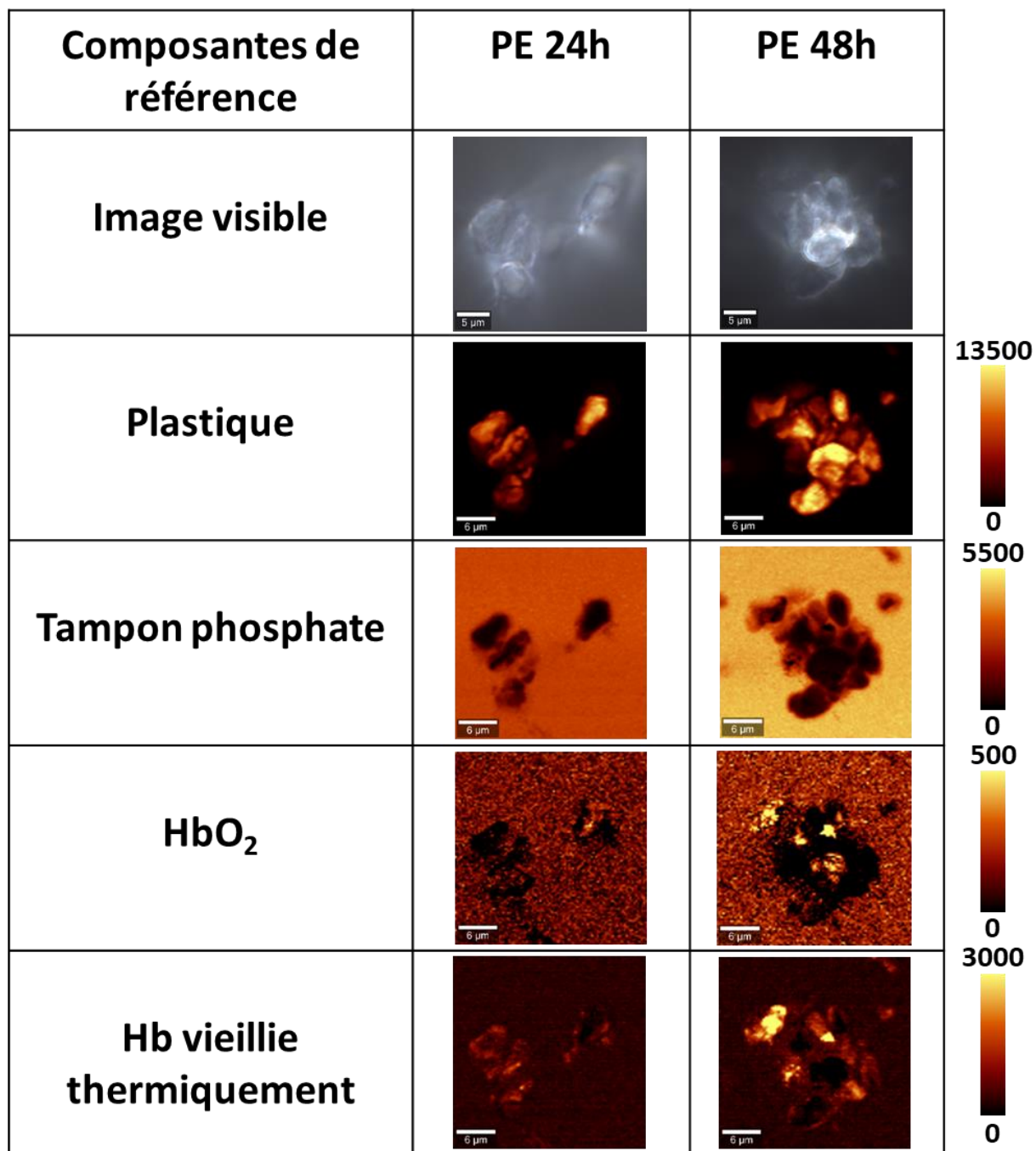


Figure 3.45 : Images Raman des composantes après 24 h et 48 h de mise en contact des microparticules de PE avec Hb. La barre d'échelle mesure 6 µm pour chaque image.

L'image de PE après 24 heures de mise en contact donne l'impression que le plastique est recouvert d'hémoglobine dénaturée, ce que nous avons vérifié en comparant le spectre mesuré dans la zone correspondante au spectre de référence de l'hémoglobine dénaturée Figure 3.46.

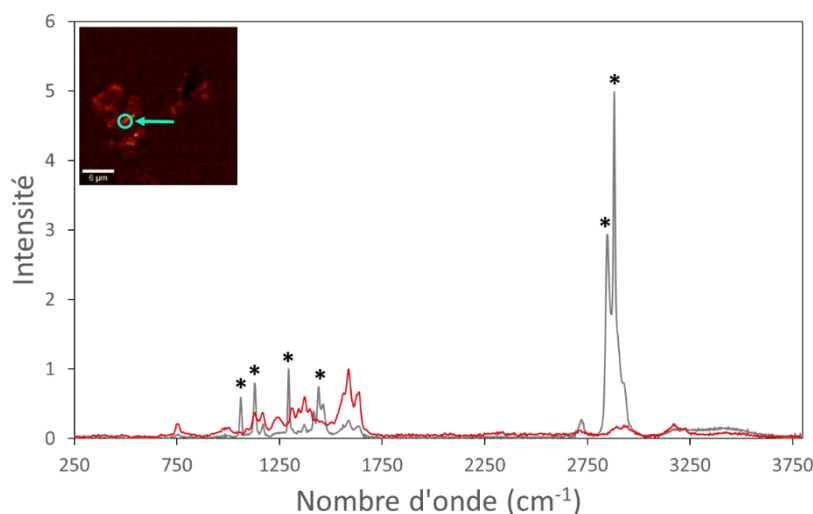


Figure 3.46 : Spectres Raman, en gris, mesuré en un point sur le PE (position indiquée en haut à gauche sur la composante 'Hb vieillie thermiquement'), et comparaison au spectre de référence de l'hémoglobine vieillie thermiquement (en rouge). Les étoiles distinguent les pics majoritaires du PE.

Le signal du plastique est prédominant mais nous observons tout de même des pics correspondants au spectre de l'hémoglobine, en particulier autour de 1700 cm^{-1} et 2700 cm^{-1} , ce qui confirme la présence d'hémoglobine dénaturée sur l'ensemble de la surface des microparticules de PE après 24 heures de mise en contact.

Afin de vérifier l'homogénéité du signal, le logiciel Fiji a été utilisé pour analyser la répartition de l'intensité du signal sur l'image. L'histogramme correspondant est représenté Figure 3.47.

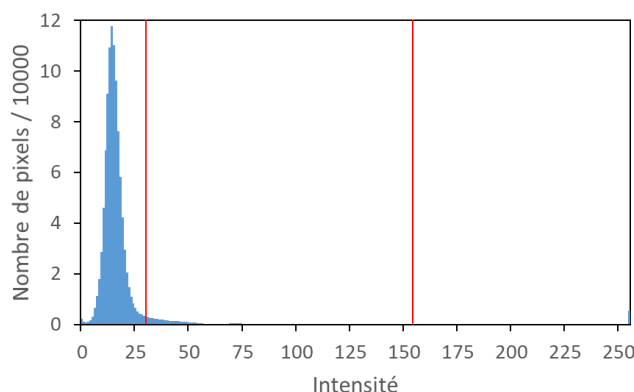


Figure 3.47 : Histogramme de l'intensité du signal de l'hémoglobine dénaturée sur l'image, les traits rouges délimitent les intensités mesurées sur le plastique, le pic correspond à l'intensité du signal dans la solution.

Cet histogramme montre que le signal mesuré au niveau des microparticules de PE est très hétérogène. Ceci peut indiquer que nous observons une corona fortement hétérogène ou que le signal observé est dû à un début d'agrégation d'hémoglobine en différents points de la microparticule.

L'observation d'agrégats d'hémoglobine sur les échantillons de PE après 48 heures et 72 heures de mise en contact, ainsi que l'absence d'hémoglobine dénaturée observable sur les microparticules de PP, confirme la possibilité de cette seconde hypothèse. Une méthode d'imagerie plus sensible à la présence d'hémoglobine oxygénée pourrait permettre de confirmer si la corona est composée d'hémoglobine oxygénée ou dénaturée, et donc si la couche d'hémoglobine dénaturée observée correspond uniquement à un début d'agrégation.

Après 48 heures de mise en contact les images semblent indiquer la présence d'agrégats d'hémoglobine oxygénée et d'hémoglobine dénaturée regroupés dans les mêmes zones. Nous avons donc comparé le spectre mesuré dans l'une de ces zones aux spectres de référence de l'hémoglobine oxygénée et de l'hémoglobine dénaturée (Figure 3.48).

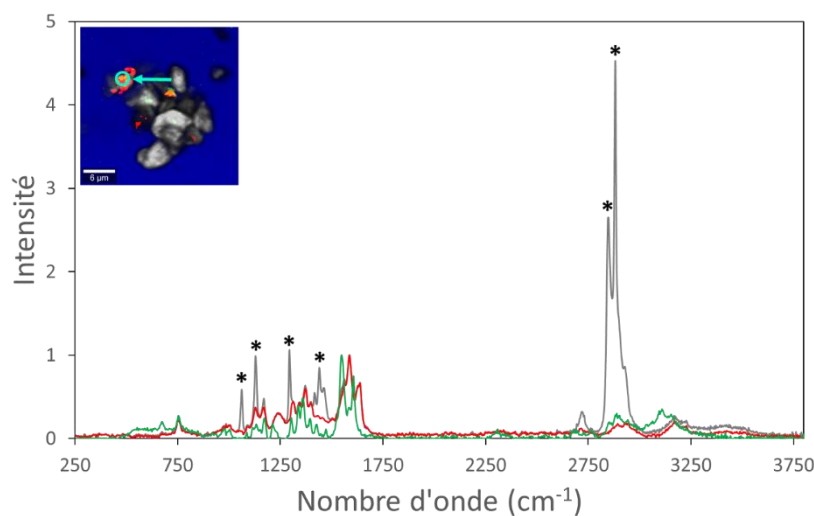


Figure 3.48 : Spectres Raman, en gris, mesuré en un point sur le PE (position indiquée en haut à gauche sur la superposition des composantes d'imagerie Raman)), et comparaison au spectre de référence de l'hémoglobine oxygénée (en vert) et de l'hémoglobine vieillie thermiquement (en rouge). Les étoiles distinguent les pics majoritaires du PE.

Nous observons que le spectre mesuré correspond à celui de l'hémoglobine dénaturée, et non à celui de l'hémoglobine oxygénée. Nos mesures d'imagerie Raman indiquent donc la présence d'agrégats d'hémoglobine dénaturée sur le plastique.

L'ensemble de nos mesures d'imagerie Raman sur les microparticules de PE après mise en contact avec l'hémoglobine semblent donc indiquer que le plastique se couvre dans les premières 24 heures d'une couche d'hémoglobine dénaturée, sans qu'il nous soit possible de déterminer si l'adsorption de l'hémoglobine par le plastique est ce qui cause sa dénaturation ou si le plastique adsorbe l'hémoglobine déjà dénaturée en solution. Entre 24 heures et 48 heures de mise en contact nous observons ensuite la présence d'agrégats d'hémoglobine dénaturée sur le plastique. Ceci peut indiquer que l'hémoglobine s'agrège après adsorption par les microparticules, que les agrégats d'hémoglobine se forment en solution avec une cinétique lente avant de s'adsorber sur les microparticules, ou que l'adsorption des agrégats d'hémoglobine présents en solution se fait avec une cinétique lente.

Lors de la présentation des résultats des expériences d'imagerie Raman sur les microparticules de PP après 24 heures et 48 heures de mise en contact avec l'hémoglobine (Figure 3.49) nous avons retiré les images obtenues pour le spectre de référence de l'hémoglobine oxygénée puisque nous avons à nouveau eu des artefacts lors de l'ajustement.

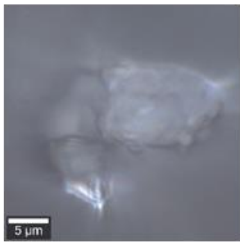
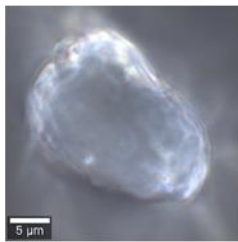
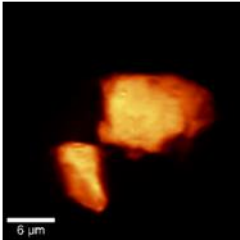
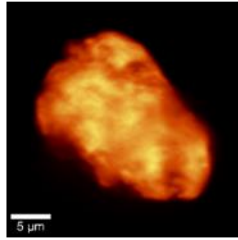

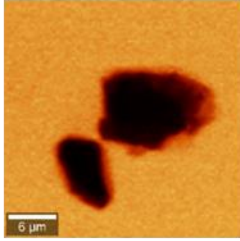
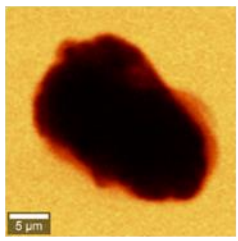


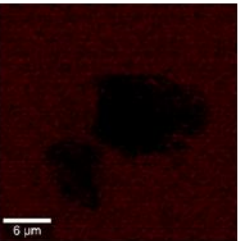
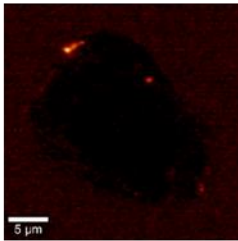

| Composantes de référence | PP 24h | PP 48h | |
|---------------------------|---|---|--|
| Image visible |  |  | |
| Plastique |  |  | 13500  0 |
| Tampon phosphate |  |  | 5500  0 |
| HbO ₂ | | | 500  0 |
| Hb vieillie thermiquement |  |  | 3000  0 |

Figure 3.49 : Images Raman des composantes après 24 h et 48 h de mise en contact des microparticules de PE avec Hb. La barre d'échelle mesure 6 μm pour les images à 24 h et 5 μm pour les images à 48 h.

Dans le cas des microparticules de PP, les observations et conclusions effectuées sur les échantillons après 72 heures de mise en contact restent vérifiées sur les échantillons après 24 heures de mise en contact et après 48 heures de mise en contact. Une fois de plus nous n'observons pas d'agrégat d'hémoglobine dénaturée sur le PP, malgré la présence de celle-ci sur l'une des particules après 48 heures de mise en contact. Nous avons vérifié que le signal observé correspond bien à de l'hémoglobine Figure 3.50, il s'agit donc bien d'un agrégat d'hémoglobine, mais aux limites de sensibilité et de résolution de l'appareil.

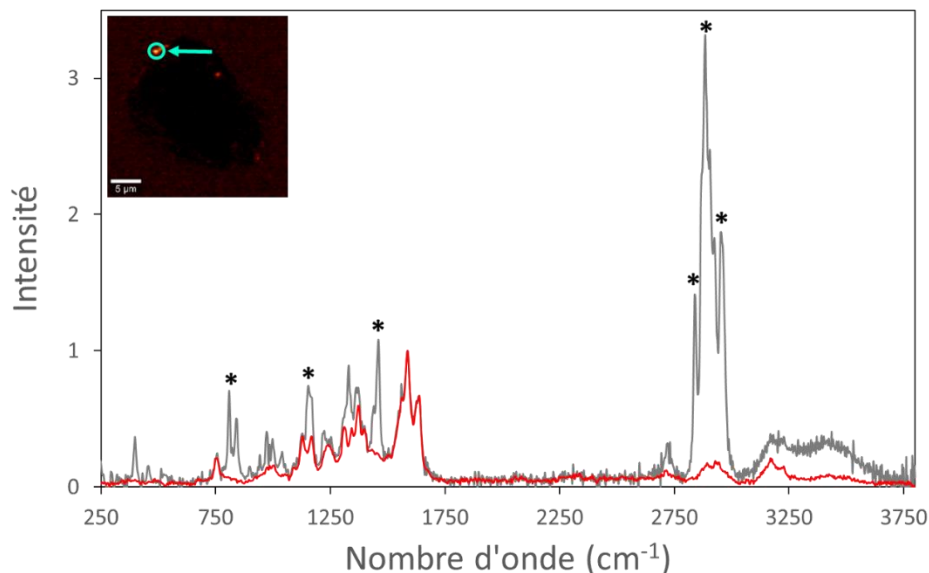


Figure 3.50 : Spectres Raman, en gris, mesuré en un point sur le PP (position indiquée en haut à gauche sur la composante 'Hb vieillie thermiquement'), et comparaison au spectre de référence de l'hémoglobine vieillie thermiquement (en rouge). Les étoiles distinguent les pics majoritaires du PP.

Nous savons grâce à nos isothermes que l'hémoglobine a une forte affinité pour les microparticules de PP et de PE. Nous n'observons pas d'hémoglobine oxygénée, et nous n'observons de l'hémoglobine dénaturée que sur les microparticules de PE et uniquement dans le cadre de formation d'agrégats sur le plastique, ce qui indique que la spectroscopie Raman n'est pas assez sensible pour observer la corona. Cependant, cette méthode a une performance unique car elle permet d'observer et de localiser, à notre connaissance pour la première fois, des agrégats à l'échelle du micron sur des surfaces de microparticules.

Puisque l'analyse de nos isothermes d'adsorption nous a indiqué la formation d'une monocouche de protéine à la surface des microparticules de plastique lors de la mise en contact, il est possible que les agrégats soient relargués en solution lors de la centrifugation des échantillons.

5.2. Oxygénation de l'hémoglobine adsorbée sur filtre en polypropylène

Des modifications des propriétés de l'hémoglobine ont déjà été observées au laboratoire lorsque celle-ci est adsorbée sur des nanoparticules de silice²⁵, qui restent de façon stable en solution. Comme montré par les mesures de turbiscan les suspensions obtenues lors de la mise en contact des microplastiques avec l'hémoglobine sont instables, et ne sont donc pas adaptées à la mesure de courbes d'oxygénation. Pour ces solutions nous avons tout de même mesuré les courbes

d'oxygénation du sous-nageant après séparation, qui seront présentées dans la partie 6.3 de ce chapitre. Afin d'observer l'activité de l'hémoglobine adsorbée sur du plastique microstructuré nous avons réalisé des mesures sur des filtres en polypropylène après mise en contact avec de l'hémoglobine. La mise en contact est réalisée de la même façon qu'avec les microparticules de plastique, en remplaçant ces microparticules par un morceau de filtre en polypropylène de 2,5 cm par 1 cm. Après la mise en contact de 72 heures sur roue, le morceau de filtre est passé sur du papier absorbant pour éliminer la solution d'hémoglobine restant en surface pour ne garder que l'hémoglobine adsorbée. Le filtre est ensuite introduit dans un tonomètre avec 100 μ L de tampon phosphate 100 mM à pH 7,4 pour maintenir son humidité sans faire passer l'hémoglobine en solution, puisque l'hémoglobine perd son activité si elle est séchée⁴¹. La quantité d'eau ajoutée immerge seulement la base du filtre, comme nous pouvons le voir sur la photo Figure 3.51, et ne va donc pas interférer avec les mesures de spectres sur le filtre (voir le chapitre Matériel et Méthodes).



Figure 3.51 : Photographie d'un filtre ayant adsorbé de l'hémoglobine dans un tonomètre avec 100 μ L de tampon phosphate 100 mM à pH 7,4.

Afin de maximiser la quantité d'hémoglobine pouvant être adsorbée nous avons réalisé cette expérience avec une solution d'hémoglobine à 10 g/L, mais même dans ces conditions nous ne remarquons pas de coloration du filtre à l'œil nu, ce qui suggère que la quantité d'hémoglobine sur le filtre est faible. Le fait que la quantité d'hémoglobine adsorbée par le filtre soit aussi faible confirme que des mesures d'isothermes d'adsorption sur les filtres nécessiterait soit de travailler à des concentrations en protéine très faible, et donc difficilement mesurables, soit avec une quantité importante de filtre, au point que la surface du tube serait couverte de filtres, confirmant notre décision de ne pas réaliser d'isothermes d'adsorption des protéines sur les filtres en PP. Lors de nos prochaines mesures de spectroscopie UV-visible, nous allons donc inclure la zone de 400 nm à 450 nm, où se trouve le pic de Soret. Ce pic étant une dizaine de fois plus intense que la bande de l'hème, nous allons privilégier son observation si nos échantillons contiennent de l'hémoglobine en faible quantité. Puisque nous ne pouvons pas mesurer directement le spectre d'adsorption UV-visible du filtre en PP, qui est opaque, nous avons utilisé une sphère d'intégration pour en mesurer le spectre de réflexion diffuse. Nous avons suivi le protocole décrit (voir chapitre 2) en réalisant un spectre en réflexion diffuse après chaque ajout d'oxygène et avons ainsi obtenu les courbes présentées Figure 3.52.

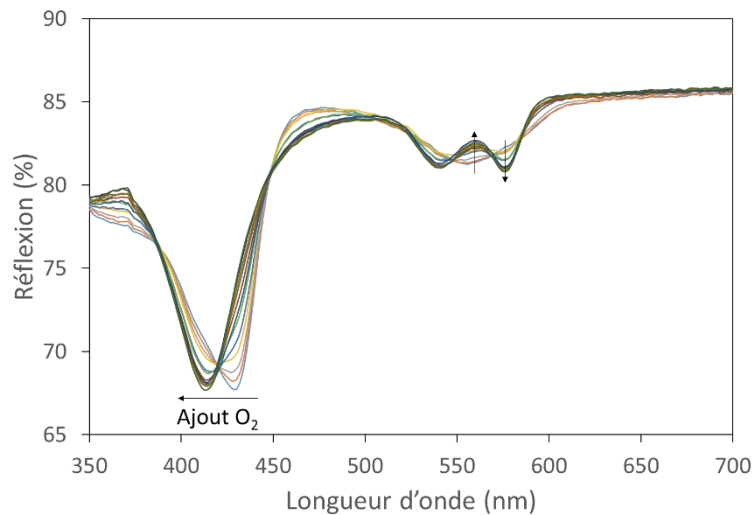


Figure 3.52 : Spectres de réflexion diffuse de l'hémoglobine adsorbée sur le filtre en PP après ajouts successifs d'oxygène.

Il est possible de convertir les résultats mesurés en réflexion pour obtenir une grandeur proportionnelle à l'absorbance de la protéine se trouvant à la surface du filtre en appliquant l'approximation de Kubelka-Munk^{42,43}. La formule correspondante est eq. 5.

$$KM = \frac{(1 - R) \times (1 - R)}{2 \times R} \quad (eq.5)$$

Dans cette équation, KM est une grandeur proportionnelle à l'absorbance au niveau de la surface de l'échantillon et R est la réflectance de l'échantillon.

En appliquant cette formule nous obtenons une série de spectres cohérents avec des spectres d'absorbance UV-visible de l'hémoglobine. En ne connaissant pas le facteur de proportionnalité entre la grandeur de Kubelka-Munk et l'absorbance de la solution cette grandeur ne peut être utilisée pour déterminer la quantité d'hémoglobine présente, mais il nous est possible de déterminer la proportion d'hémoglobine oxygénée dans un échantillon en appliquant le protocole décrit (voir chapitre 2) aux spectres représentés Figure 3.53.

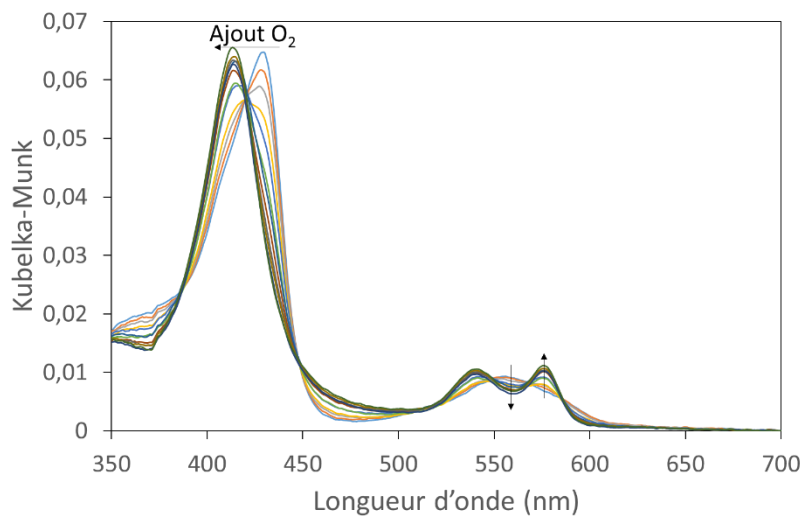


Figure 3.53 : Transformation de Kubelka-Munk des spectres de réflexion diffuse de l'hémoglobine adsorbée sur le filtre en PP après ajouts successifs d'oxygène.

Nous remarquons que le pic de Soret est moins intense par rapport au signal de l'hème que dans le cas d'hémoglobine en solution, le rapport d'intensité entre ces signaux étant ici égal à 6 et la valeur obtenue pour de l'hémoglobine en solution étant de 10. Cette réduction de l'intensité du pic de Soret indique que la conformation de l'hémoglobine a été modifiée, et donc que l'hémoglobine a bien été adsorbée.

En utilisant ces courbes, nous avons tracé la courbe d'oxygénation de l'hémoglobine sur le filtre. Cette courbe a été comparée à celle obtenue pour une solution d'hémoglobine témoin qui a été laissée sur roue à 3 tours/minute pendant 72 heures à 4°C sans présence de plastique, et pour laquelle les mesures de spectres ont été réalisées par spectroscopie d'adsorption UV-visible. Ces courbes sont présentées Figure 3.54.

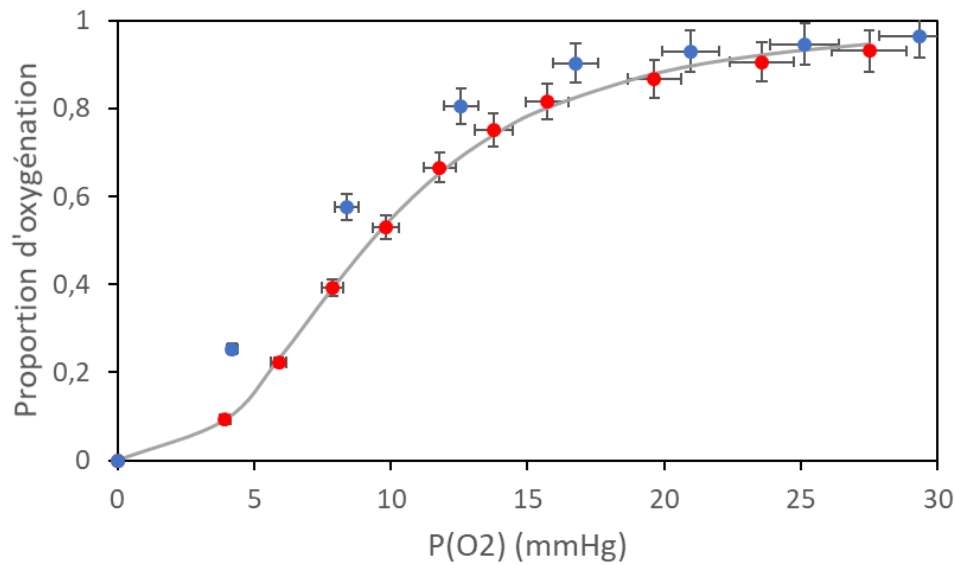


Figure 3.54 : Courbes d'oxygénation obtenues par traitement des données de réflexion diffuse de l'hémoglobine après 72 h sur filtre en PP (points de mesure en rouge, ajustement avec la formule de Hill en gris), et par traitement des données d'adsorption d'une solution d'hémoglobine après 72 h sur roue (points de mesure du témoin en bleu).

Nous observons une différence nette entre la courbe d'oxygénation de l'hémoglobine en solution et celle de l'hémoglobine adsorbée sur le filtre. Afin de comparer quantitativement ces courbes nous les avons ajustées en utilisant l'équation de Hill (eq. 6), applicable pour les réactions consistant en la fixation d'un ligand sur une protéine oligomérique comme l'hémoglobine⁴⁴.

$$\theta = \frac{P_{O_2}^n}{P_{50}^n + P_{O_2}^n} \quad (\text{eq. 6})$$

Dans cette équation, θ est la proportion d'hémoglobine oxygénée, P_{O_2} est la pression partielle en dioxygène dans le système, P_{50} est la pression partielle en dioxygène pour laquelle la moitié de l'hémoglobine est oxygénée et n est le coefficient de Hill, qui est un indicateur de la coopérativité lors de la fixation du ligand. Cette équation peut être linéarisée pour donner (eq. 7)

$$\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n \times \log(P_{O_2}) - n \times \log(P_{50}) \quad (\text{eq. 7})$$

En traçant la courbe représentative de $\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right)$ en fonction de $\log(P_{O_2})$ nous obtenons donc une droite de pente n et d'ordonnée à l'origine $-n \times \log(P_{50})$. Nous avons ainsi obtenu les valeurs de n et de P_{50} pour le témoin et pour l'hémoglobine sur le filtre Tableau 3.10.

| | Hb après 72 h sur filtre | Hb témoin |
|------------------------|--------------------------|-----------|
| n | 2,6 ± 0,1 | 2,3 ± 0,2 |
| P ₅₀ (mmHg) | 9,4 ± 0,5 | 6,9 ± 0,5 |

Tableau 3.10 : Valeur de n et de P_{50} pour Hb adsorbée sur un filtre en PP et pour le témoin correspondant.

Nous observons que la valeur de n n'est pas modifiée de façon significative après adsorption, mais la valeur de P_{50} est plus importante pour l'hémoglobine sur le filtre. Une valeur de P_{50} plus élevée signifie que, pour qu'une même quantité de dioxygène se fixe à l'hémoglobine, il est nécessaire d'avoir une plus forte pression partielle en dioxygène. En d'autres termes, l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène est diminuée lorsque celle-ci est adsorbée. Le fait que la valeur de n n'a pas été modifiée significativement indique que la coopérativité de l'hémoglobine lors de la fixation de l'oxygène reste la même que la protéine soit en solution ou sur le filtre.

L'évolution de l'activité de l'hémoglobine adsorbée sur des nanoparticules de silice a déjà été étudiée au laboratoire⁴⁵. L'effet de l'adsorption de l'hémoglobine sur des nanoparticules de silice est différent de ce que nous avons observé sur les microparticules de plastique, résultant en une diminution de la valeur de P_{50} (donc une augmentation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène) et de la valeur de n (donc une diminution de la coopérativité de l'hémoglobine lors de la fixation de l'oxygène). Ceci suggère que les mécanismes d'adsorption de l'hémoglobine diffèrent en fonction de si la protéine est adsorbée par des particules hydrophobes comme les plastiques, ou hydrophiles comme la silice, et que ces particules influencent donc les protéines de façons différentes.

5.3. Imagerie de fluorescence de la BSA adsorbée sur les plastiques

Avec l'aide de Marion Schwartz, nous avons réalisé des mesures d'imagerie fluorimétrique sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL. Ces mesures ont été réalisées avant que nous ayons accès à l' α -synucléine. De plus le signal d'émission de fluorescence de l'hémoglobine est éteint par le pic de Soret, sa mesure requiert donc d'utiliser des appareils qui ne sont pas adaptés à nos mesures⁴⁶. Pour cette raison, seule la BSA a donc été étudiée lors de ces expériences. Pour cela des images de microscopie ont été prises, puis une excitation à 265 nm a été effectuée et le signal de fluorescence émis a été intégré de 329 nm à 351 nm, l'hétérogénéité du faisceau étant corrigée lors du traitement des données. Des mesures préalables ont confirmé que, à ces longueurs d'onde, nous observons la protéine sans signal des plastiques. Nous avons ainsi obtenu les images Figure 3.55. Les solutions n'ont ici pas été centrifugées avant les mesures.

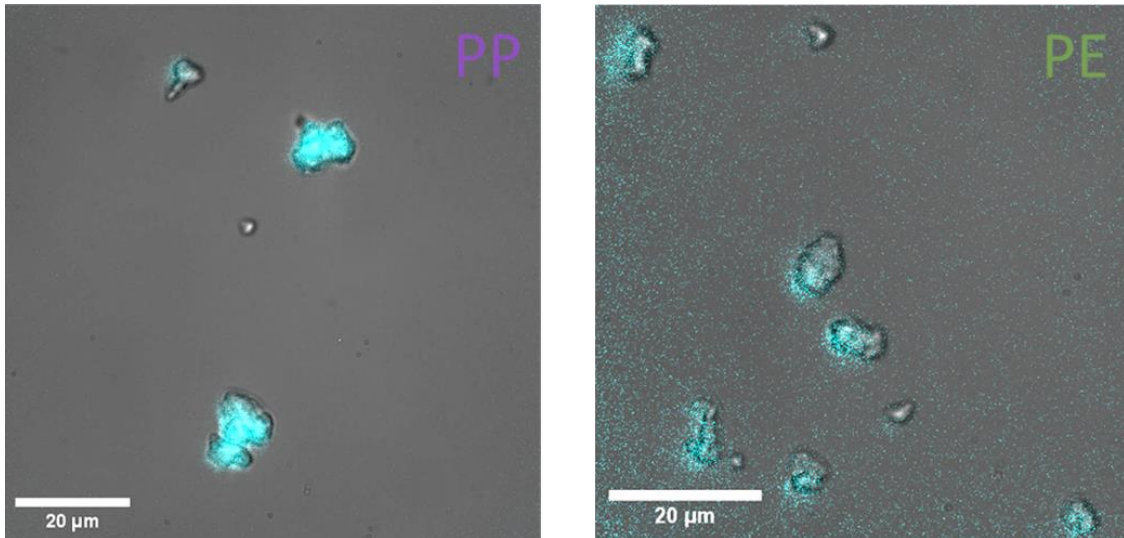


Figure 3.55 : Image des microparticules de plastique après 72 h de mise en contact sur roue avec la BSA. En bleu signal de fluorescence de 329 nm à 351 nm pour une excitation à 265 nm, correspondant à la protéine.

Ces images confirment que les protéines sont adsorbées par les microparticules de plastique. Afin de déterminer le taux de couverture des microparticules par les protéines, nous avons calculé pour chaque protéine le rapport de la surface correspondant au signal de la protéine sur la surface de plastique observée. Ce rapport a été calculé pour plusieurs particules et les résultats obtenus sont représentés Figure 3.56.

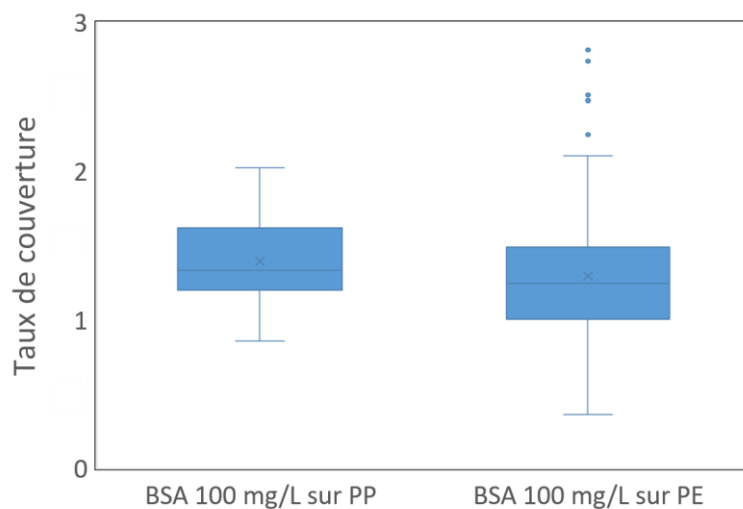


Figure 3.56 : Taux de couverture des microparticules de plastique par la BSA (rapport de la surface du signal de la BSA sur celle des microparticules). 38 particules de PP (à gauche) ont été analysées et 129 particules de PE (à droite).

Pour le PP comme pour le PE nous observons des taux de couverture du même ordre de grandeur, généralement supérieur à 1. Ceci suggère que nous pouvons observer le liseret de protéines autour des particules bien que la résolution optique de la technique (de 108 nm) ne permet pas de déterminer l'épaisseur de la corona. Afin de déterminer si les protéines adsorbées sont plus proches de former une monocouche ou des agrégats nous avons également évalué leur hétérogénéité en calculant l'écart type de l'intensité du signal de fluorescence de la protéine sur le plastique. Les résultats ainsi obtenus sont présentés Figure 3.57.

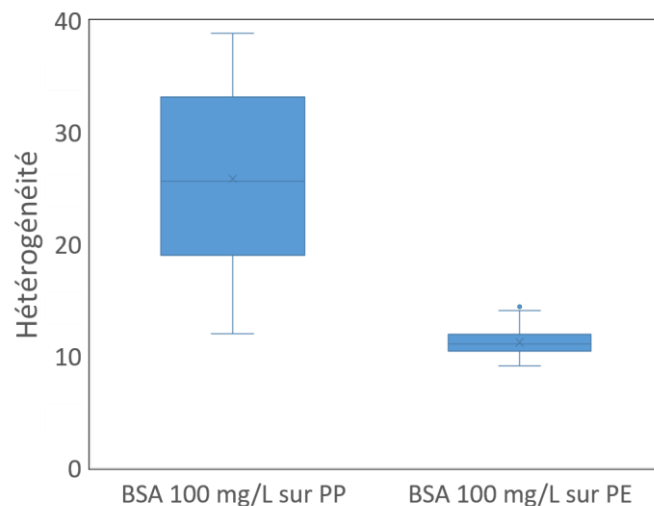


Figure 3.57 : Hétérogénéité de la couche de BSA sur les microparticules de plastique (écart type de l'intensité du signal de fluorescence de la BSA).
42 particules de PP (à gauche) ont été analysées et 133 particules de PE (à droite).

La répartition de la BSA est plus homogène sur les microparticules de PE que sur celles de PP. De plus, l'hétérogénéité de la BSA est moins variable d'une particule à l'autre dans le cas du PE. Ceci indique que la BSA forme des couches homogènes sur les microparticules de PE et hétérogènes sur les microparticules de PP. Ceci est cohérent avec les isothermes d'adsorption présentées Figure 3.32, puisqu'une plus grande quantité de BSA est adsorbée par les microparticules de PP, ceci indique une corona plus dense sur ces particules. Comme expliqué en introduction, une corona plus dense indique une cinétique d'adsorption plus rapide, ce qui résulte en une corona moins homogène, comme nous l'observons ici.

6. Etat des protéines en solution après mise en contact avec les plastiques

Même si elles ne font pas partie de la corona il est important de s'intéresser aux protéines se trouvant en solution après avoir été mises en contact avec les microplastiques. En effet ces protéines peuvent avoir été influencées par les MPs, par exemple si elles ont fait partie de la soft corona avant de retourner en solution, ou si elles ont interagi avec des protéines faisant partie de la corona.

Nous avons donc réalisé des mesures de dichroïsme circulaire sur la BSA et l'hémoglobine, afin de voir si la mise en contact a eu un effet sur la structure secondaire de ces protéines, et des mesures de tonométrie sur l'hémoglobine, afin de vérifier l'impact de la mise en contact sur sa fonction.

6.1. Suivi de l'agrégation des protéines après la mise en contact

Afin de déterminer le potentiel impact de la présence des microparticules de plastique en solution, nous avons réalisé des mesures de DLS sur les solutions de protéine après mise en contact avec les plastiques, et comparé les corrélogrammes à ceux obtenus pour les solutions de protéine après

72 heures sur roue à 3 tours/minute sans plastique. Les microparticules de plastique sont extraites des solutions avant les mesures en suivant le même protocole que lors des mesures des isothermes d'adsorption. Toutes les solutions sont filtrées avec un seuil de coupure à 1,2 μm afin de garantir l'absence de microparticules de plastique en solution, les signaux mesurés correspondent donc bien aux protéines. Pour la BSA, les corrélogrammes mesurés après la mise en contact avec les microparticules de plastique sont représentés Figure 3.58.

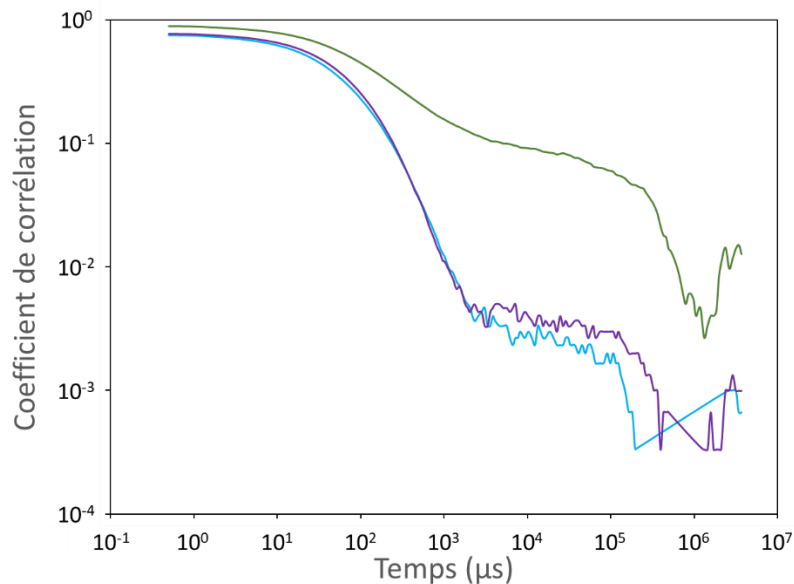


Figure 3.58 : Corréllogrammes des solutions filtrées de BSA initialement à 50 mg/L, après 72 h sur roue à 3 tours/minute, sans plastique (en bleu clair) et en contact avec des microparticules de PE (en vert) et de PP (en violet).

La présence de PP ne semble pas modifier l'impact du passage sur roue sur l'agrégation de la protéine, mais le PE a un effet notable à la même concentration. Dans le cas du PE nous observons un coefficient de corrélation aux longues durées beaucoup plus important, ce qui indique la présence d'objets de taille plus importantes. Ce résultat suggère que la présence de PE favorise l'agrégation de la BSA, tandis que la présence de PP n'a pas d'effet mesurable. La présence de microparticules peut favoriser l'agrégation de la protéine en servant de noyaux de nucléation à cette dernière, amorçant ainsi le phénomène d'agrégation. Puisque ces agrégats sont en solution après la centrifugation de l'échantillon, et que nous ne les avons pas observés lors des mesures d'imagerie de fluorescence, nous pouvons en déduire qu'ils se trouvent dans la soft corona. Pour le moment, nous n'avons pas trouvé d'explications pour la différence de comportement observée entre la BSA en présence de microparticules de PP et la BSA en présence de microparticules de PE.

Les corréllogrammes de l' α -synucléine ont également été mesurés après 72 heures de mise en contact sur roue avec PP et PE pour des concentrations en microplastiques de 10 g/L, nous donnant les courbes représentées Figure 3.59.

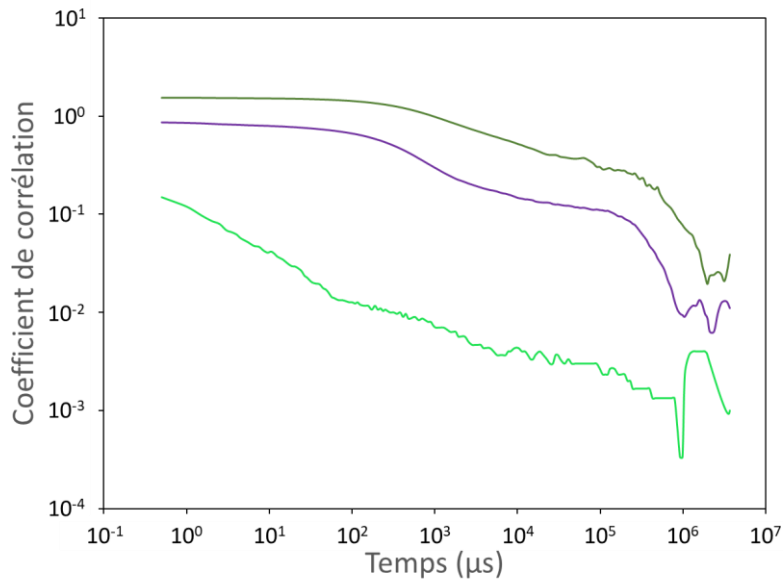


Figure 3.59 : Corrélogrammes des solution filtrées d' α -synucléine initialement à 50 mg/L, après 72 h sur roue à 3 tours/minute, sans plastique (en vert clair) et en contact avec des microparticules de PE (en vert foncé) et de PP (en violet).

Nous observons une modification importante du signal après la mise en contact avec les microplastiques sous la forme d'une augmentation du coefficient de corrélation mais aussi d'une réduction du bruit. Le fait que le signal soit moins bruité après la mise en contact peut s'expliquer par une augmentation de la taille des objets en solution ou par une homogénéisation de leur taille. Puisque les coefficients de corrélation des corrélogrammes sont plus élevés, et en particulier puisque leur valeur reste stable pour des durées plus longues, cette diminution du bruit correspond vraisemblablement à la formation d'objets de plus grande taille en solution. Autrement dit la présence de microparticules de plastique en solution favorise l'agrégation de l' α -synucléine, probablement en servant de noyaux de nucléation à la protéine. Ceci est cohérent puisque L' α -synucléine est une protéine susceptible de s'agréger en solution⁴⁷, et cette agrégation peut être modifiée par la présence de nanoparticules⁴⁸. Comme dans le cas de la BSA, le fait que ces agrégats soient observés dans la solution indique qu'ils se forment dans la soft corona.

Dans le cas de l'hémoglobine, pour les mêmes raisons que lors des mesures de DLS sur les solutions sans microparticules de plastique, nous avons utilisé des solutions de méthémoglobine à une concentration de 250 mg/L et filtré avec un seuil de coupure à 0,8 μ m. Les corrélogrammes ainsi obtenus sont représentés Figure 3.60.

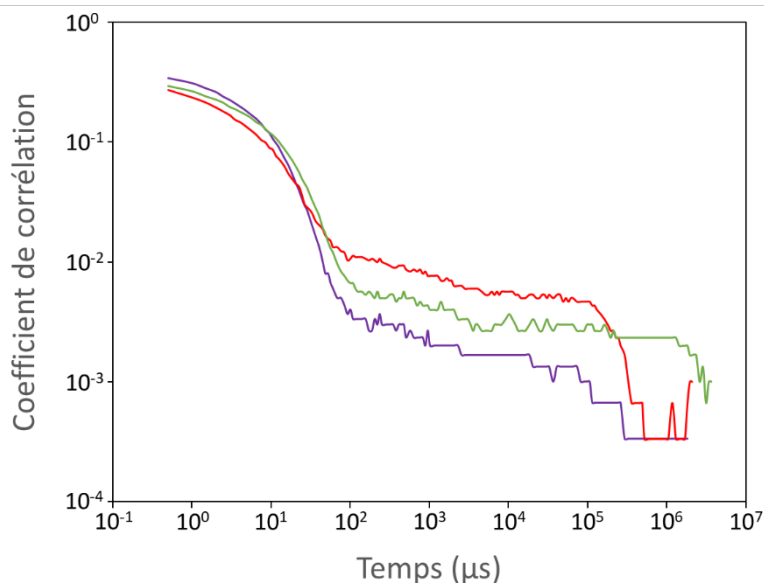


Figure 3.60 : Corrélogrammes des solutions filtrées de methHb initialement à 250 mg/L sans plastique (en rouge) et en contact avec des microparticules de PE (en vert) et de PP (en violet) après 72 h sur roue à 3 tours/minute.

La principale différence observée entre les corrélogrammes en présence et en l'absence de microparticules de plastique est une intensité plus faible du signal aux longues durées après la mise en contact. Ceci indique une plus faible concentration d'agrégats en solution. Il est possible que cette diminution de la quantité d'agrégats en solution soit causée par l'adsorption de ces derniers par les microparticules de plastique, comme observé en imagerie Raman. Le fait que ces agrégats ne soient pas passés en solution lors de la centrifugation des échantillons indiquerait donc qu'ils font partie de la hard corona. Comme pour les mesures de DLS sur les solutions de méthémoglobine sans microparticules de plastiques, ces expériences mériteraient d'être répétées avec des solutions d'hémoglobine oxygénée et des filtres avec un seuil de coupure à 1,2 μm .

6.2. Etude de la structure secondaire des protéines dans la dispersion

Des expériences de dichroïsme circulaire ont été réalisées sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL afin d'observer les éventuelles modifications structurales des protéines. Lors de notre session au synchrotron nous n'avons pas encore accès à l' α -synucléine, seules la BSA et l'hémoglobine sont donc traitées dans cette partie.

Nous avons commencé par vérifier les conditions dans lesquelles cette méthode est utilisable. Nous avons préparé deux solutions d'hémoglobine, une contenant uniquement de la protéine et une contenant de la protéine en contact avec du PE. Après avoir laissé ces solutions sur roue pendant 72 heures nous avons mesuré le spectre de l'hémoglobine seule, puis celui de l'hémoglobine en contact avec le PE pendant que la solution est encore homogène (l'échantillon mesuré a donc une faible concentration en MP). Après avoir laissé crémé la solution d'hémoglobine avec PE, un échantillon est prélevé dans la partie claire de la solution (sous-nageant, pas de MP) et un autre dans le surnageant (surnageant, forte concentration en MP), et leurs spectres sont mesurés. Ces 3 spectres sont rassemblés et comparés au spectre de l'hémoglobine avant la mise en contact avec le PE Figure 3.61.

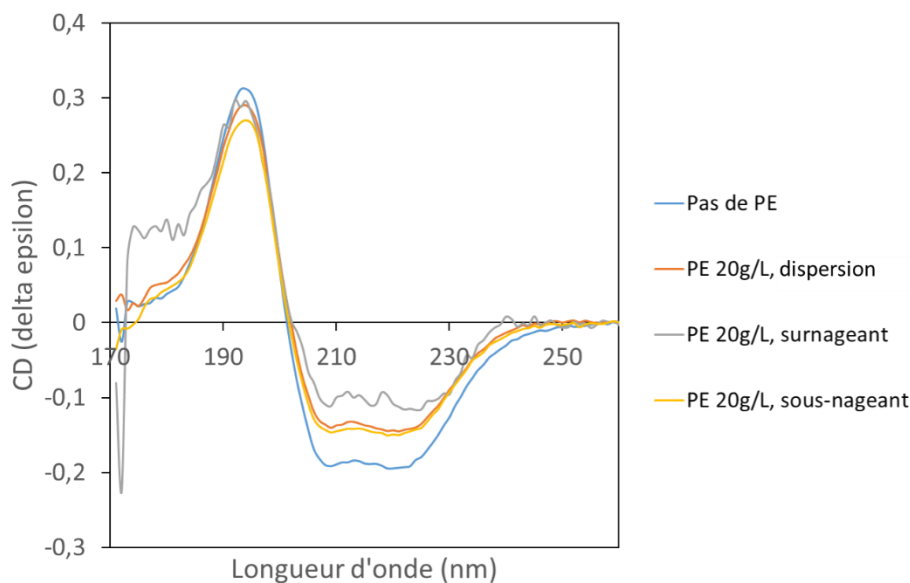


Figure 3.61 : Spectres de dichroïsme circulaire de l'hémoglobine dans les différentes phases après 72 h de contact avec les microparticules de PE à 20 g/L.

Ces tests nous indiquent qu'il est possible de mesurer les spectres de l'hémoglobine dans la dispersion des microplastiques et dans le sous-nageant, et que ceux-ci ne présentent pas de différences majeures par rapport au spectre de la protéine seule en dehors de leur intensité. Cette modification de l'intensité s'explique par la diminution de la concentration d'hémoglobine de la solution, une partie de la protéine étant adsorbée par les microparticules et par les parois du tube. Le spectre du surnageant est fortement bruité par rapport aux autres spectres mesurés, probablement à cause de la taille relativement importante des microplastiques.

Le signal obtenu pour le surnageant est trop bruité pour permettre une analyse des résultats, et la composition de la dispersion comprend un mélange de protéines adsorbées et de protéines libres, dont les proportions sont mal connues. Nous avons donc choisi d'analyser le sous-nageant obtenu après séparation, dont le signal est peu bruité et dont nous savons qu'il correspond spécifiquement aux protéines non-adsorbées après contact avec le plastique, afin de savoir précisément à quelle phase pourront s'appliquer nos conclusions.

Pour chacune des protéines nous avons suivi sur 72 heures des échantillons laissés sur roue tournant à 3 tours/minute à 4°C sans microplastique, avec PP et avec PE. Les spectres de dichroïsme circulaire de ces solutions ont été mesurés avant le passage sur roue, après 24 heures sur roue, après 48 heures sur roue et après 72 heures sur roue. Les spectres obtenus pour la BSA à 66 mg/L sans microplastique sont représentés Figure 3.62.

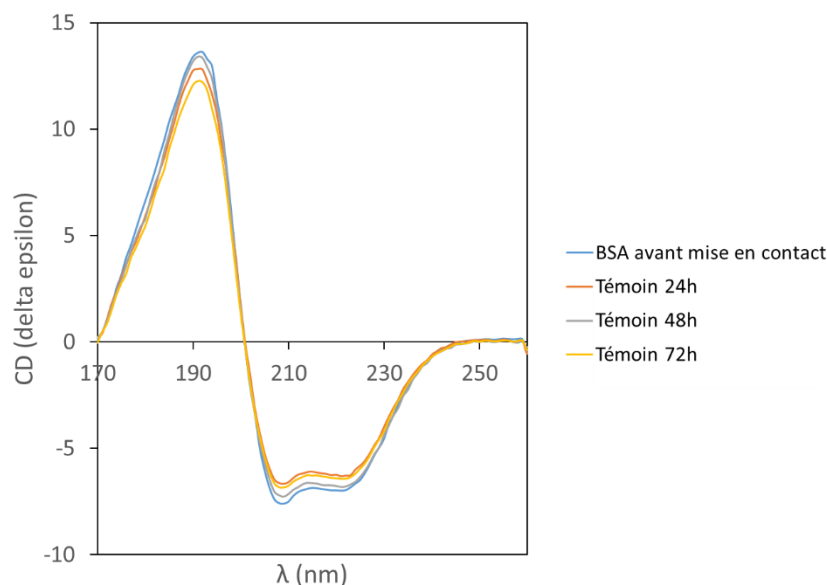


Figure 3.62 : Spectres de dichroïsme circulaire de la BSA après 24 h, 48 h et 72 h de mouvement sur roue à 3 tours/minutes.

L'analyse de spectre de la BSA par le logiciel CDToolX nous indique que la structure secondaire de la BSA est composée de 56% d'hélices, 14% de coudes et 30% de structures autres, sans changements après 72 heures de mouvement sur roue à 3 tours/minute. Cette quantité d'hélices est cohérente avec ce qui est trouvé dans la littérature^{49,50}. L'intensité est légèrement différente entre les spectres, mais ces variations sont faibles et probablement dues aux imprécisions lors de la calibration, pouvant par exemple être causées par l'incertitude sur l'épaisseur de la cellule dans laquelle se trouve l'échantillon lors de la mesure. Ceci indique que les agrégats observés en DLS sont en concentration trop faible pour les observer en dichroïsme circulaire, ou que les propriétés optiques de la BSA ne sont pas modifiées par son agrégation.

Nous avons ensuite mesuré ces spectres pour la BSA en contact avec les microplastiques, présentés Figure 3.63.

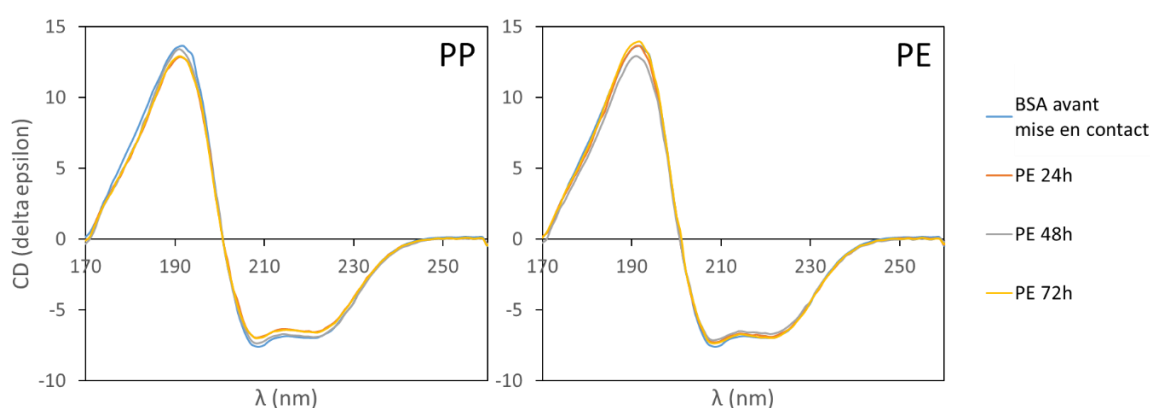


Figure 3.63 : Suivis en dichroïsme circulaire de la BSA en contact avec les microplastiques dans le sous-nageant, après 24 h, 48 h et 72 h sur roue, à gauche PP et à droite PE.

Les spectres ne sont pas modifiés au cours de la mise en contact, la structure secondaire de la BSA se trouvant dans le sous-nageant reste donc inchangée.

Nous avons eu des problèmes de calibration du trajet optique pour les spectres de l'hémoglobine à 16 mg/L, ces derniers sont donc représentés en unité arbitraire et normalisés à 194 nm. Les spectres obtenus pour l'hémoglobine sans microplastique sont représentés Figure 3.64.

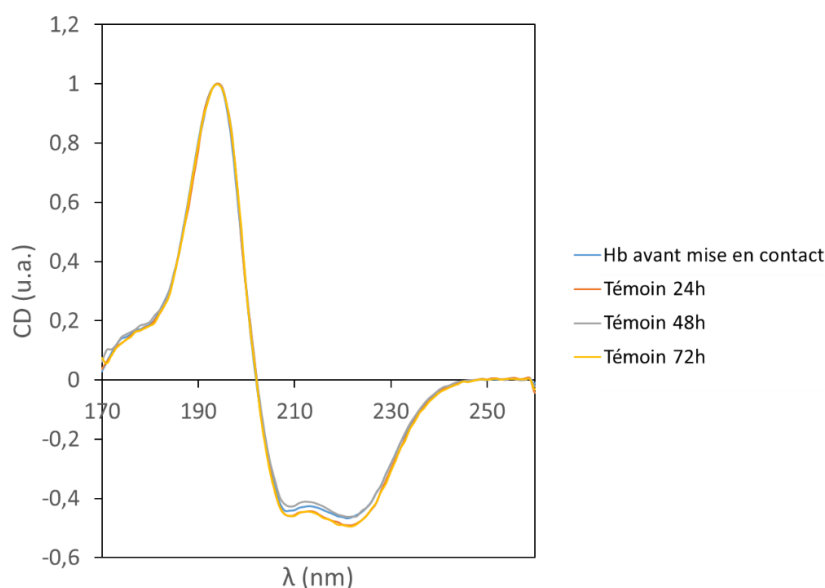


Figure 3.64 : Spectres de dichroïsme circulaire de Hb après 24 h, 48 h et 72 h de mouvement sur roue à 3 tours/minutes.

L'analyse de ces spectres par CDTToolX nous permet de déterminer que la structure secondaire de notre hémoglobine est composée de 70% d'hélices, 5% de coudes et 25% de structures autres. Ceci est cohérent avec la structure décrite dans la littérature⁵¹. Malgré l'observation d'agrégation en DLS, le passage sur roue sans microplastique ne semble pas modifier la structure secondaire de l'hémoglobine. Ceci peut être expliqué parce que les agrégats sont en trop faible concentration ou parce que les propriétés optiques de l'hémoglobine ne sont pas modifiées par son agrégation.

Les spectres obtenus pour l'hémoglobine sur roue avec microplastiques sont représentés Figure 3.65.

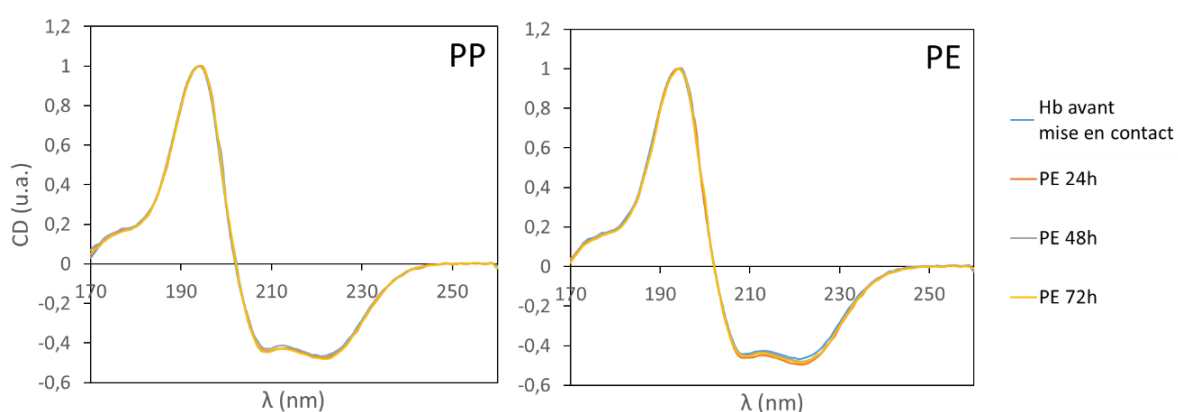


Figure 3.65 : Suivis en dichroïsme circulaire de l'hémoglobine en contact avec les microplastiques dans le sous-nageant, après 24 h, 48 h et 72 h sur roue, à gauche PP et à droite PE.

Comme pour l'hémoglobine sans microplastique, aucune modification significative du spectre n'est observée lors de la mise en contact.

Une étude supplémentaire effectuée en dichroïsme circulaire est le suivi de la structure de la BSA lors de son chauffage. Nous avons mis en contact sur roue de la BSA à 700 mg/L avec des microparticules de PE à 10 g/L, laissé crémé la suspension pendant 24 heures, puis prélevé un échantillon dans le surnageant pour observer la protéine adsorbée sur le plastique. L'échantillon est chauffé de 21°C à 96°C par paliers de 3°C, en mesurant le spectre de l'échantillon à chaque température. Le système est maintenu à chaque température pendant 11 minutes afin que les spectres mesurés correspondent au système à l'équilibre, et 3 spectres sont acquis puis moyennés. Les spectres ainsi obtenus sont regroupés Figure 3.66.

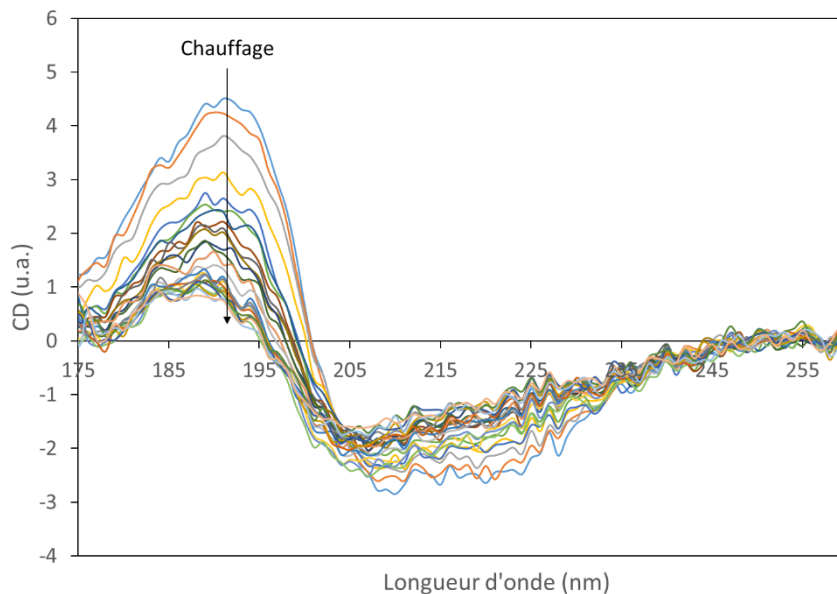


Figure 3.66 : Spectres de la BSA en contact avec les microparticules de PE dans le surnageant et chauffée.
Un spectre est acquis tous les 3°C de 21°C à 96°C.

Nous remarquons que les spectres sont très bruités même avant chauffage en raison de la faible concentration en BSA utilisée ici pour la mise en contact avec les microplastiques. Afin de visualiser directement la dégradation de la protéine nous avons suivi l'évolution de l'intensité du signal à 194 nm, qui dépend directement de la quantité d'hélices dans la protéine⁵², en fonction de la température. Frank Wien a réalisé des mesures de référence sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL sur de la BSA à 10 g/L dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7,0, en chauffant l'échantillon de 25°C à 95°C par paliers de 5°C. Une fois de plus, le système est maintenu 11 minutes à chaque palier de température et 3 spectres de dichroïsme circulaire sont mesurés puis moyennés. Les courbes ainsi obtenues sont présentées Figure 3.67.

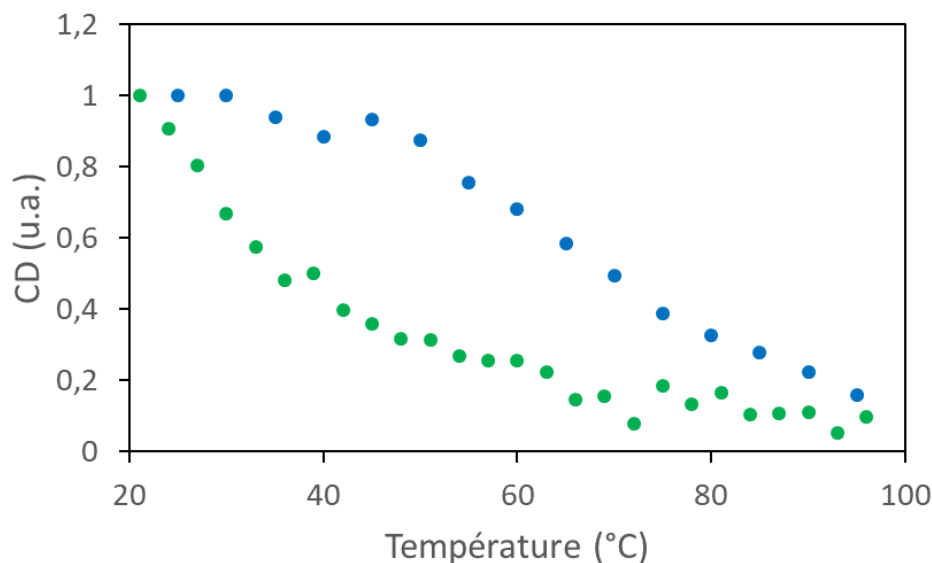


Figure 3.67 : Comparaison de l'évolution de l'intensité du signal de dichroïsme circulaire à 194 nm en fonction de la température de 21°C à 96°C, de la BSA en contact avec les microparticules de PE dans le surnageant (en vert) et de la BSA sans plastique (en bleu).

La présence de microparticules de plastique dans le surnageant empêche de connaître exactement le trajet optique, et donc de normaliser le signal en delta epsilon. Chaque série de spectre a donc été normalisée sur l'intensité du pic à 194 nm, qui correspond au maximum des hélices, à la plus faible température.

Dans le cas de la BSA sans plastique, le signal reste stable jusqu'à 45°C puis diminue linéairement. Ceci signifie que la protéine commence à se dénaturer à partir de 45°C, cette dénaturation étant accompagnée d'un débobinage des hélices⁵³. Dans le cas de la BSA adsorbée sur les microparticules de PE, l'intensité décroît dès 21°C et continue de décroître avec la température, indiquant que la protéine est dénaturée par le chauffage. Puisque nous restons en excès de BSA dans le surnageant, l'absence de changement du rythme de décroissance du signal pour cet échantillon montre que, en plus de la BSA adsorbée sur le plastique, la BSA en solution est également déstabilisée par la présence de microparticules de PE à cette concentration.

Pour la BSA sans plastique 50% de la structure est perdue à 70°C, mais en présence de microplastiques 50% de la structure est perdue dès 36°C, ce qui correspond à une température corporelle. Ceci indique que la présence de microplastiques en forte concentration cause une dénaturation de la BSA à température corporelle, signifiant que les microparticules de plastique, même sans toxicité chimique, ont une toxicité moléculaire. Ce type de déplacement d'équilibre a déjà été observé au laboratoire dans le cas de solutions d'hémoglobine contenant des nanoparticules de silice³⁴. Dans ces expériences, il a été observé que la protéine à pH 7,0 est moins structurée en présence des nanoparticules à température ambiante (65% d'hélices sans nanoparticules, 50% d'hélices avec) et présente un point de fusion plus faible (76°C sans nanoparticules, 57°C avec).

Des sessions supplémentaires au synchrotron seraient nécessaires pour étudier l'effet de ces microparticules de plastique sur l'hémoglobine et l' α -synucléine, ainsi que pour étudier l'effet des microparticules de PP.

6.3. Oxygénation de l'hémoglobine après mise en contact avec les microplastiques

Nous avons réalisé des expériences de tonométrie sur l'hémoglobine se trouvant dans le sous-nageant après mise en contact avec les microplastiques puis séparation de ces derniers. Nous savons déjà que l'hémoglobine en solution reste oxygénée après la mise en contact avec les microplastiques grâce aux mesures de spectroscopie Raman Figure 3.38. Puisque nous travaillons ici en solution, contrairement aux dernières expériences de tonométrie, nous réalisons directement l'acquisition des spectres d'adsorption UV-visibles, représentés Figure 3.68.

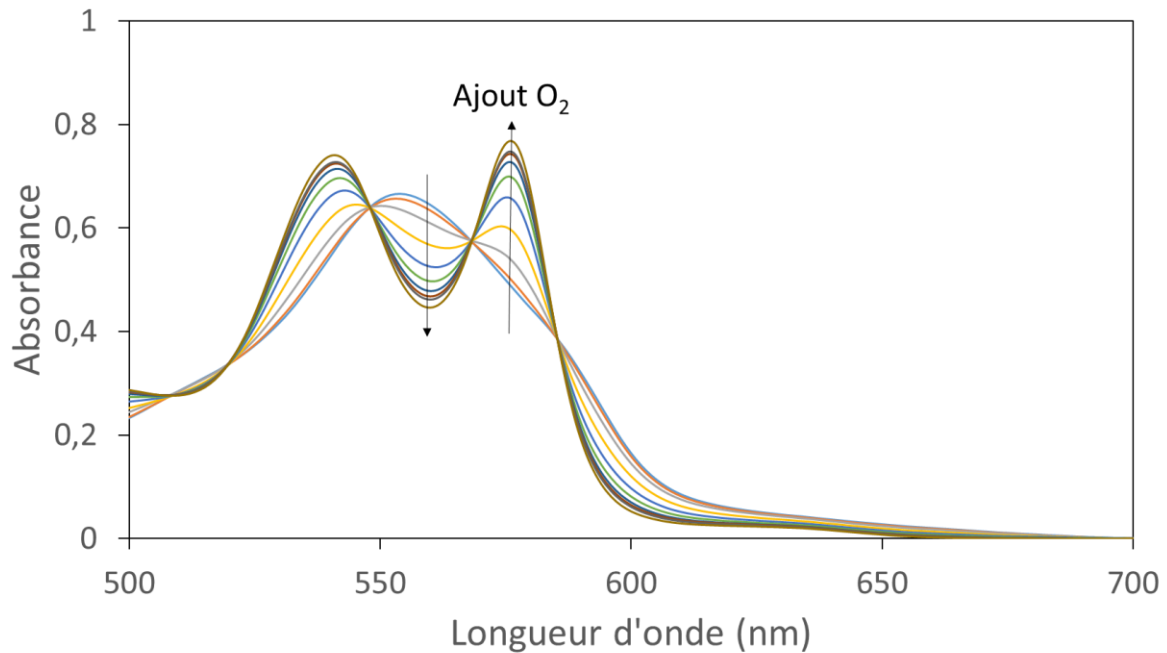


Figure 3.68 : Spectres d'absorbance visibles de l'hémoglobine du sous-nageant séparée des microplastiques après ajouts successifs d'oxygène.

Le signal à 630 nm nous indique la présence de méthémoglobine (environ 5%) mais la présence des points isobestiques montre que cela n'a pas nui aux mesures d'oxygénation. Les valeurs de P_{50} et de n peuvent varier en fonction de 'l'âge' de l'hémoglobine, une mesure sur un échantillon témoin a donc été réalisée simultanément à chaque expérience de tonométrie afin d'assurer que le témoin soit comparable à l'échantillon étudié. Les deux tonomètres ayant des volumes différents, les valeurs de $P(O_2)$ sont donc légèrement différentes entre les courbes pour des volumes identiques d'oxygène

ajouté, ce qui explique le léger décalage des points entre la solution étudiée et le témoin dans chaque étude présentée.

Nous observons que les courbes d'oxygénation, avec et sans microparticules de PP, représentées Figure 3.69, sont proches.

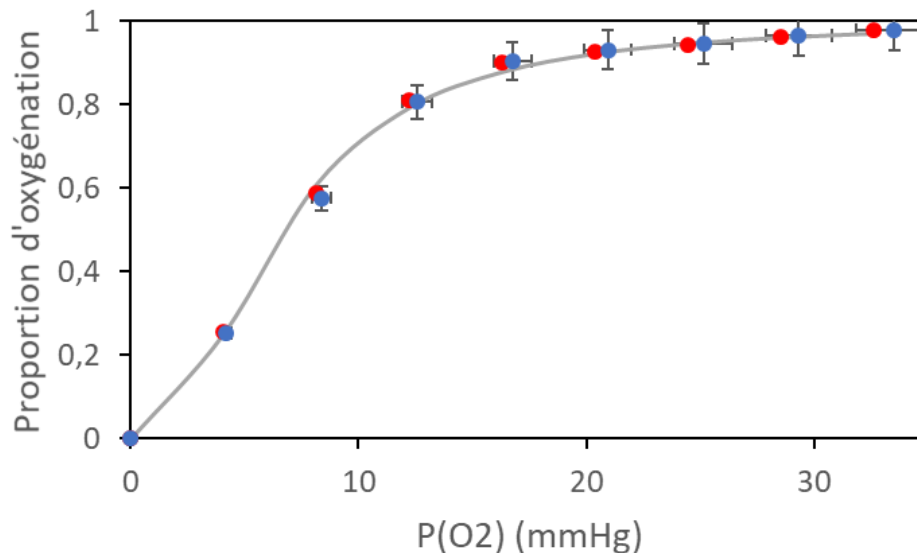


Figure 3.69 : Courbe d'oxygénation de l'hémoglobine dans le sous-nageant après 72 h en contact avec les microparticules de PP puis séparation (points de mesure en rouge, ajustement par la formule de Hill en gris, points de mesure du témoin en bleu).

En suivant la même méthode décrite dans le paragraphe 5.3 de ce chapitre, nous avons ajusté la courbe d'oxygénation en utilisant la formule de Hill. Nous avons ainsi obtenu les valeurs de P_{50} , qui correspond à la pression partielle en dioxygène pour laquelle la moitié de l'hémoglobine est oxygénée, et de n , qui correspond à la coopérativité de l'hémoglobine lors de la fixation du dioxygène. La détermination de ces paramètres, rassemblés dans le Tableau 3.11, confirme que les différences sont négligeables.

| | Hb après 72 h avec PP | Hb témoin |
|-----------------------------------|-----------------------|---------------|
| n | $2,3 \pm 0,2$ | $2,3 \pm 0,2$ |
| P_{50} (mmHg) | $6,6 \pm 0,5$ | $6,9 \pm 0,5$ |

Tableau 3.11 : Valeur de n et de P_{50} pour Hb après contact avec PP et pour le témoin correspondant.

Nous n'observons donc pas de changement de l'activité de l'hémoglobine en solution après mise en contact avec les microparticules de PP.

Nous observons que les courbes d'oxygénation, avec et sans microparticules de PE, représentées Figure 3.70Figure 3.69, sont proches.

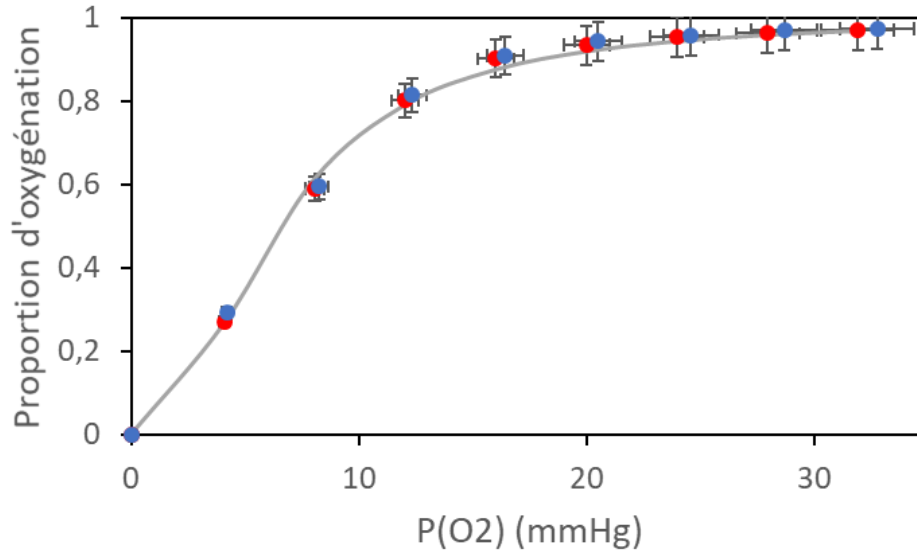


Figure 3.70 : Courbe d'oxygénation de l'hémoglobine dans le sous-nageant après 72 h en contact avec les microparticules de PE puis séparation (points de mesure en rouge, ajustement par la formule de Hill en gris, points de mesure du témoin en bleu).

Une fois de plus la courbe d'oxygénation de l'hémoglobine en solution est ajustée en utilisant la formule de Hill. La détermination des paramètres correspondants, rassemblés dans le Tableau 3.12, confirme que les différences sont négligeables.

| | Hb après 72 h avec PE | Hb témoin |
|------------------------------|-----------------------|-----------|
| n | 2,2 ± 0,2 | 2,3 ± 0,2 |
| P₅₀ (mmHg) | 6,4 ± 0,5 | 6,4 ± 0,5 |

Tableau 3.12 : Valeur de n et de P₅₀ pour Hb après contact avec PE et pour le témoin correspondant.

Nous n'observons donc pas de changement de l'activité de l'hémoglobine en solution après mise en contact avec les microparticules de PP.

Pour l'hémoglobine ayant été en contact avec PP, nous observons une fois de plus que les courbes d'oxygénation, représentées Figure 3.71Figure 3.69, sont proches.

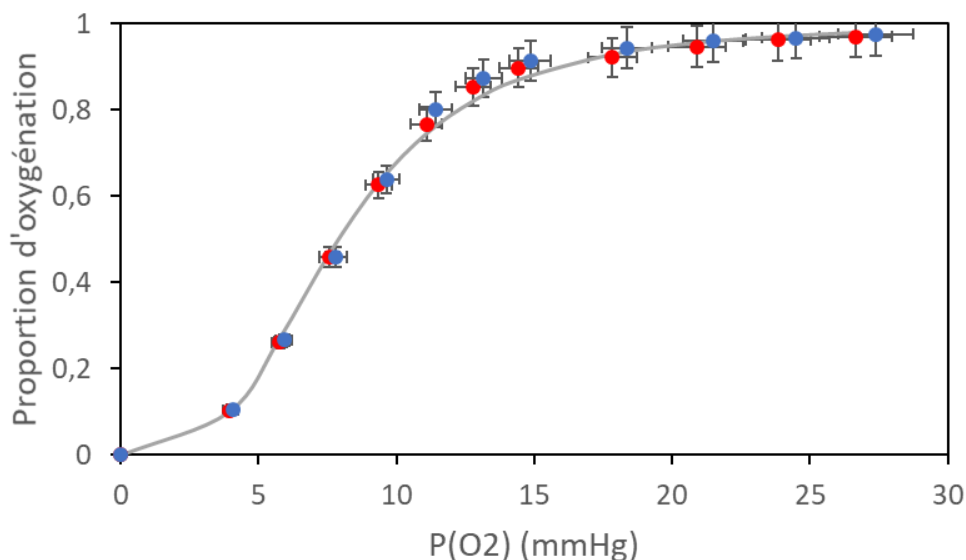


Figure 3.71 : Courbe d'oxygénation de l'hémoglobine de la solution après 72 h de mise en contact avec le filtre en PP (points de mesure en rouge, ajustement par la formule de Hill en gris, points de mesure du témoin en bleu).

Une fois de plus la courbe d'oxygénation de l'hémoglobine en solution est ajustée en utilisant la formule de Hill. La détermination des paramètres correspondants, rassemblés dans le Tableau 3.13, confirme que les différences sont négligeables.

| | Hb après 72 h avec filtre | Hb témoin |
|------------------------------|---------------------------|-----------|
| n | 3,0 ± 0,2 | 3,2 ± 0,3 |
| P₅₀ (mmHg) | 7,8 ± 0,5 | 7,8 ± 0,5 |

Tableau 3.13 : Valeur de n et de P₅₀ pour Hb après contact avec un filtre en PP et pour le témoin correspondant.

Nous n'observons donc pas de modification de l'activité de l'hémoglobine en solution après mise en contact avec un filtre en PP.

7. La méthode de mise en contact a-t-elle une influence sur les interactions plastique/protéines ?

Lorsque de la mise en contact des microparticules de plastique avec des solutions de protéine sur roue, les protéines et le plastique sont en mouvement, et il n'y a pas d'interface air/liquide/solide. En modifiant le mouvement des espèces considérées et les interfaces présentes, il est possible de changer les mécanismes mis en jeu, et ainsi les interactions entre protéines et plastiques.

Nous avons réalisé des expériences exploratoires pour tester deux méthodes de mise en contact supplémentaires. La première est une mise en contact par dip coating, pour laquelle la solution de protéine reste immobile et la surface de plastique est en mouvement, et qui fait intervenir une interface air-liquide-solide. La seconde méthode consiste à faire circuler de la solution de protéine

dans un tube en plastique, la solution de protéine est donc en mouvement pendant que la surface en plastique reste immobile et il n'y a pas d'interface air-liquide-solide.

7.1. Déplacement du plastique dans une solution protéique avec une interface air/liquide

Nous avons également travaillé avec des filtres en PP que nous avons mis en contact avec les solutions de protéines de deux façons, en mettant sur roue des tubes contenant une solution de protéine et des morceaux de filtre ou par dip coating.

Le dip coating consiste à tremper un objet de façon répétée dans un fluide. Ici, il s'agit de tremper un morceau de filtre de façon répétée dans une solution de protéine. Cette méthode de mise en contact implique des interactions différentes par rapport à la mise en contact sur roue, en particulier au niveau des interfaces mises en jeu représentées Figure 3.72.

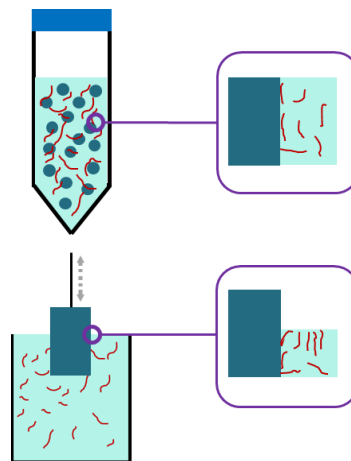


Figure 3.72 : Schémas des interfaces lors d'une mise en contact de plastiques microstructurés avec les protéines dans le cas d'une suspension de microparticules de plastique en solution (en haut) et dans le cas d'un dip coating de filtre en plastique (en bas).

Lors des mises en contact par dip coating nous introduisons une interface plastique/air/liquide, en mouvement au cours du temps, là où la mise en contact avec les microparticules se fait uniquement sur une interface plastique/liquide. Nous avons cherché à comprendre si cette nouvelle interface provoque de nouvelles interactions.

Pour cela nous avons commencé par analyser la solution de protéine avant et après dip coating afin de voir l'influence de la mise en contact sur les protéines. Nous avons ensuite réalisé des mesures de spectres ATR-FTIR du filtre après le dip coating dans le but d'observer directement les protéines adsorbées.

7.1.1. Effet du dip coating sur la solution

L'appareil utilisé pour le dip coating ne pouvant pas être placé en chambre froide à cause de l'humidité, ces expériences sont réalisées à température ambiante.

La couleur du filtre après dip coating visible sur la photo Figure 3.73, montre que nous retirons de la protéine, mais la quantité retirée est négligeable par rapport à la quantité présente en solution, qui est de 2,5 mg pour 5 mL de solution à 500 mg/L.



Figure 3.73 : Photographie d'un filtre en PP après 24 h de dip coating dans une solution d'hémoglobine à 500 mg/L.

Le fait que nous observons un changement de couleur net ici, tandis que nous n'observons pas de changement de couleur lors de la mise en contact des morceaux de filtres sur roue lors des expériences de tonométrie Figure 3.51, montre que la quantité d'hémoglobine sur le filtre est plus importante après une mise en contact par dip coating qu'après une mise en contact sur roue. La méthode de mise en contact a donc un impact sur la quantité de protéine adsorbée dans le cas d'une solution d'hémoglobine sur un filtre en PP.

Nous remarquons que l'hémoglobine se trouve principalement sur une bande. Ceci est parce que l'hémoglobine s'est principalement déposée au niveau de l'interface air-liquide-solide à chaque trempage, et que la position de cette interface a changé au cours de l'expérience à cause de l'évaporation de la solution (comme nous pouvons l'observer sur les parois du creuset). Afin d'éviter l'influence de l'évaporation sur nos expériences suivantes, les creusets ont été déposés dans des boîtes fermées contenant un fond d'eau lors de celles-ci, comme présenté Figure 3.74.

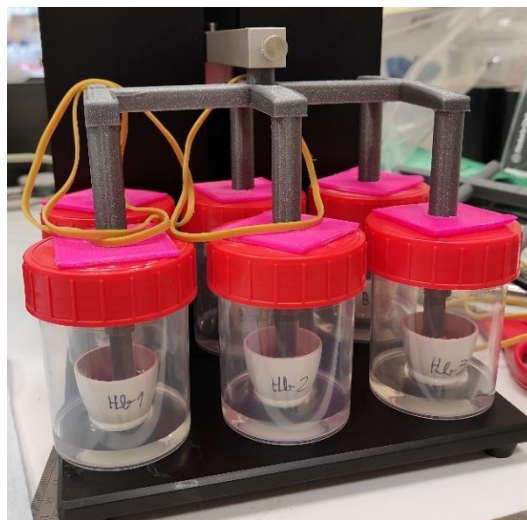


Figure 3.74 : Montage utilisé pour les expériences de dip coating.

Lors de nos premières expériences, réalisées avant que nous ayons accès à l' α -synucléine, nous avons mesuré les spectres d'adsorption UV-visible des solutions avant et après dip coating. Nous avons commencé avec des solutions contenant 500 mg/L de protéines, et les spectres ainsi obtenu pour la BSA sont représentés Figure 3.75.

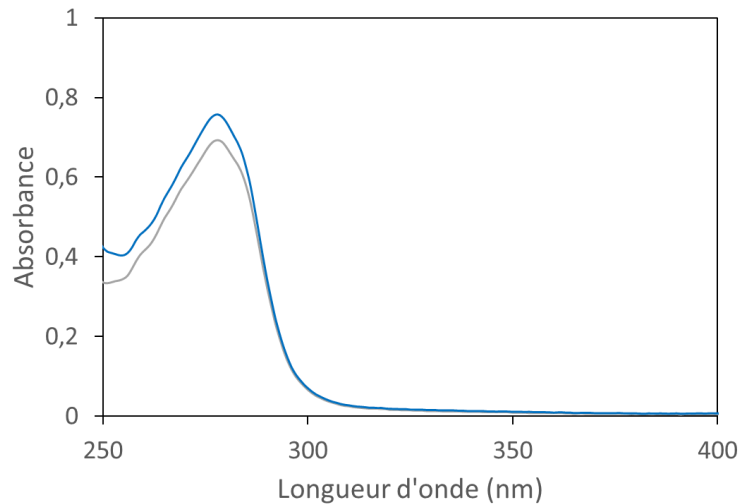


Figure 3.75 : Spectres UV-visibles de la BSA après 24 h de dip coating d'un filtre en PP (en bleu) et sans dip coating (en gris).

La valeur d'absorbance mesurée est plus élevée après le dip coating, et la différence entre le spectre de la solution sans dip coating et les spectres après dip coating est plus élevée aux faibles longueurs d'onde. Ceci peut être causé par de la diffusion, ce qui indiquerait une légère agrégation ou dénaturation de la protéine.

La même expérience a été réalisée pour la methHb (ces expériences ont été réalisées peu après les périodes de confinement, il nous était donc impossible de nous procurer du sang en abattoir pour préparer de l'hémoglobine fraîche), nous donnant les spectres représentés Figure 3.76.

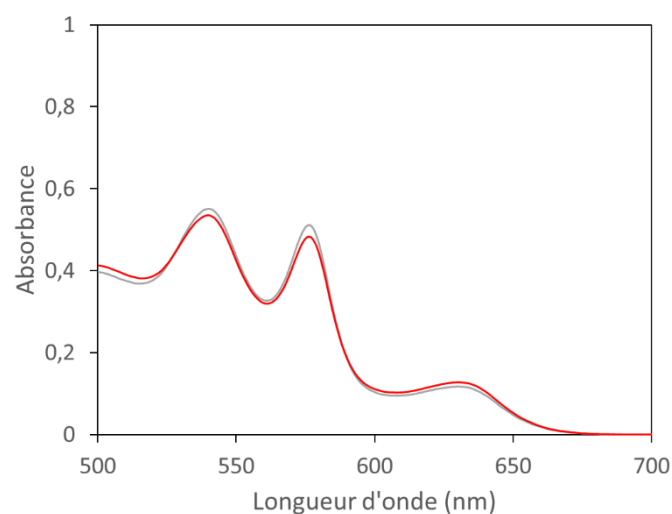


Figure 3.76 : Spectres visibles de méthémoglobine après 24 h de dip coating d'un filtre en PP (en rouge) et sans dip coating (en gris).

Nous n'observons cette fois pas de diffusion, ce qui n'indique pas forcément une absence d'agrégation et peut simplement être causé par le fait que ces spectres sont mesurés à de plus grandes longueurs d'ondes, auxquelles les effets potentiels de la diffusion sont moindres. Nous remarquons également que le spectre de l'hémoglobine n'ayant pas subi de dip coating a des pics plus intenses que les autres spectres à 541 nm et à 577 nm, mais moins intense à 633 nm. Cette modification du spectre peut être causée par une légère modification du pH, puisqu'une partie de la solution peut s'évaporer au cours de l'expérience et ainsi modifier la concentration du tampon.

Nous avons donc réalisé des expériences de dip coating avec une plus faible concentration en protéine, afin d'essayer de quantifier cette perte. Pour cela nous avons utilisé une solution d'hémoglobine à 25 mg/L, et avons observé le pic de Soret représenté Figure 3.77.

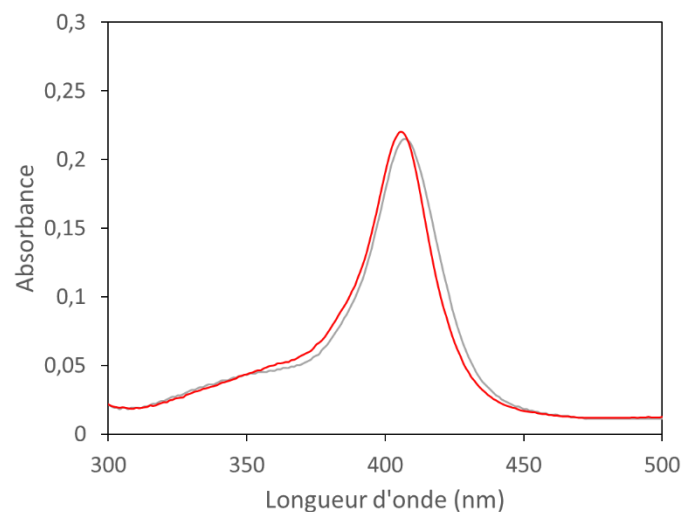


Figure 3.77 : Spectres UV-visibles de méthémoglobine à 25 mg/L après 24 h de dip coating d'un filtre en PP (en rouge) et sans dip coating (en gris).

Malgré les faibles concentrations nous n'observons pas de perte notable de protéine. Nous remarquons toutefois un shift du pic de Soret vers les faibles longueurs d'onde après le dip coating, ce qui peut une fois de plus indiquer un léger changement du pH au cours de la mise en contact.

7.1.2. Effet du dip coating sur le filtre

N'ayant pas observé les pertes de protéines en suivant la concentration en solution, nous avons cherché à observer les protéines perdues sur le filtre, en travaillant à forte concentration puis en mesurant le spectre ATR-FTIR du filtre après dip coating. Afin de reconnaître le spectre des protéines si elles sont visibles, nous avons commencé par mesurer les spectres ATR-FTIR des protéines sèches, que nous avons représentés Figure 3.78. Ces protéines sèches ont été obtenues en laissant quelques gouttes de solution de protéine sécher dans une boîte de Petri, puis en grattant les protéines collées à la boîte après séchage.

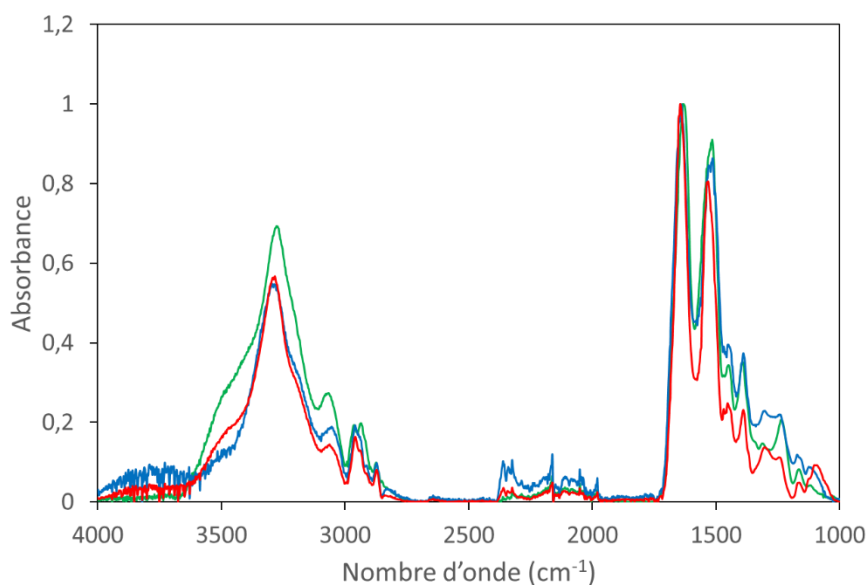


Figure 3.78 : Spectres ATR-FTIR des protéines sèches, normalisés à 1640 cm^{-1} .
Le spectre de la BSA est représenté en bleu, le spectre de l'hémoglobine en rouge et le spectre de l' α -synucléine en vert.

La bande entre 3000 cm^{-1} et 3500 cm^{-1} peut correspondre au signal de l'eau, les protéines n'étant pas parfaitement sèches, ou au signal des liaisons O-H dans les protéines. Le signal que nous allons donc rechercher sur les filtres après dip coating est l'ensemble de pics allant de 1000 cm^{-1} à 1750 cm^{-1} , le polypropylène n'ayant que peu de pics dans cette zone et en particulier aucun entre 1500 cm^{-1} et 1750 cm^{-1} .

Des expériences ont été réalisées avec de l' α -synucléine à 25 mg/L et à 500 mg/L afin de déterminer l'influence de la concentration en protéine, les spectres des filtres en PP après le dip coating étant représentés Figure 3.79. La spectroscopie IR a été choisie puisque les trois protéines étudiées peuvent être détectées par cette technique.

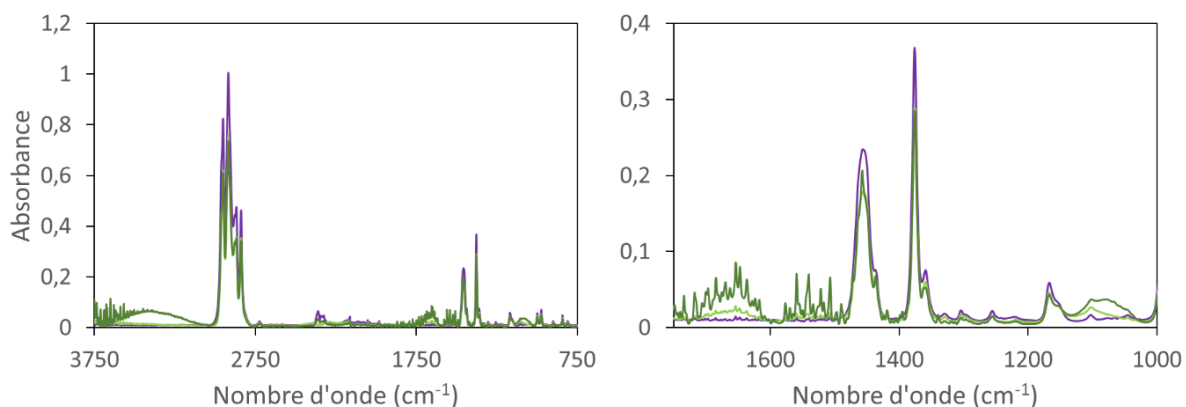


Figure 3.79 : Spectres ATR-FTIR de filtres en PP sans dip coating (en violet), après 24 h de dip coating dans de l' α -synucléine à 25 mg/L (en vert clair) et après 24 h de dip coating dans de l' α -synucléine à 500 mg/L (en vert foncé). Spectre complet à gauche et zoom dans la zone du signal des protéines à droite.

Nous n'observons pas le signal caractéristique des protéines sur le filtre, même après dip coating dans la solution la plus concentrée. Nous remarquons toutefois un signal entre 3000 cm^{-1} et 3500 cm^{-1} qui correspond à de l'eau. Ce signal est uniquement visible sur le filtre après dip coating dans une solution

concentrée en protéine, ce qui indique que le filtre est devenu hydrophile. Des protéines ont donc bien été adsorbées par le filtre, mais en quantité trop faibles pour être visibles par spectroscopie.

Nous avons ensuite réalisé la même expérience de dip coating pour la BSA, l'hémoglobine et l' α -synucléine à 500 mg/L afin de déterminer l'importance de la nature de la protéine, et obtenu les spectres représentés Figure 3.80.

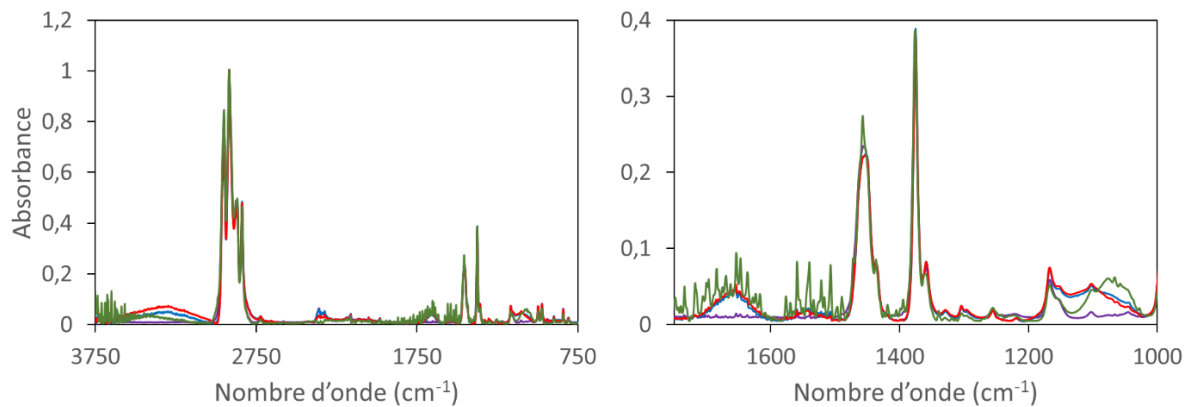


Figure 3.80 : Spectres ATR-FTIR de filtres en PP sans dip coating (en violet), après 24 h de dip coating dans un solution de BSA à 500 mg/L (en bleu), après 24 h de dip coating dans une solution d'hémoglobine à 500 mg/L (en rouge) et après 24 h de dip coating dans une solution d' α -synucléine à 500 mg/L (en vert). Spectre complet à gauche et zoom dans la zone du signal des protéines à droite.

Nous faisons les mêmes observations que pour l' α -synucléine, nous n'observons pas de signal de protéines mais le signal de l'eau est visible, indiquant une fois de plus que le dip coating a réduit l'hydrophobicité des filtres en PP. Dans le cas de l'hémoglobine nous avons observé visuellement la présence de protéine sur le filtre, le fait qu'elle ne soit pas visible par spectroscopie montre donc que la sensibilité de cette technique est relativement faible.

Afin de comparer les différentes méthodes de mise en contact nous avons également mesuré le spectre ATR-FTIR d'un filtre en PP mis en contact avec l'hémoglobine en le laissant dans une solution d'hémoglobine à 1 g/L sur roue tournant à 3 tours/minute pendant 72 heures à 4°C. Ce spectre est comparé à celui d'un filtre après dip coating dans l'hémoglobine Figure 3.81.

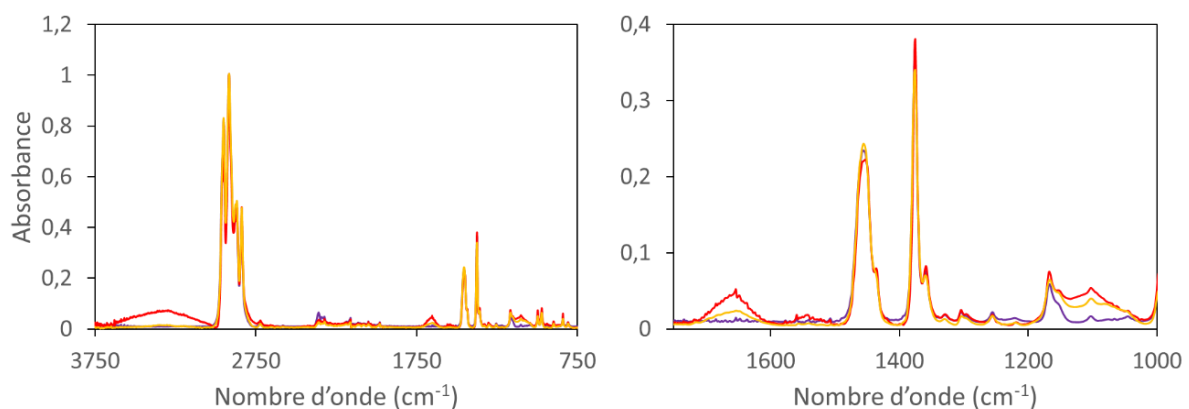


Figure 3.81 : Spectres ATR-FTIR de filtres en PP sans dip coating (en violet), après 24 h de dip coating dans un solution d'hémoglobine à 500 mg/L (en rouge), après 24 h de mise en contact sur roue dans une solution d'hémoglobine à 1 g/L (en orange). Spectre complet à gauche et zoom dans la zone du signal des protéines à droite.

Le spectre de la protéine n'est toujours pas visible sur le filtre, mais dans le cas du filtre mis en contact sur roue nous n'observons pas le signal de l'eau. Ceci peut indiquer que l'adsorption de protéine sur le filtre est moins efficace lors d'une mise en contact sur roue qu'en réalisant une expérience de dip coating, ce qui est en accord avec les observations visuelles des filtres après mise en contact sur roue et par dip coating.

7.2. Circulation d'une solution protéique sur une surface de plastique sans interface air/liquide

Dans le cadre d'une expérience visant à tester une troisième méthode de mise en contact avec les plastiques, en faisant circuler une solution de protéine dans un circuit de tubes Tygon Chemical comprenant des filtres en polypropylène, une désoxygénation de l'hémoglobine a été observée. Le montage, visible sur la photo Figure 3.82, consistait à avoir un bécher contenant une solution d'hémoglobine et une pompe péristaltique faisant circuler la solution dans des tubes en plastique, traversant des filtres en polypropylène et une cuve dans un spectromètre UV-visible.

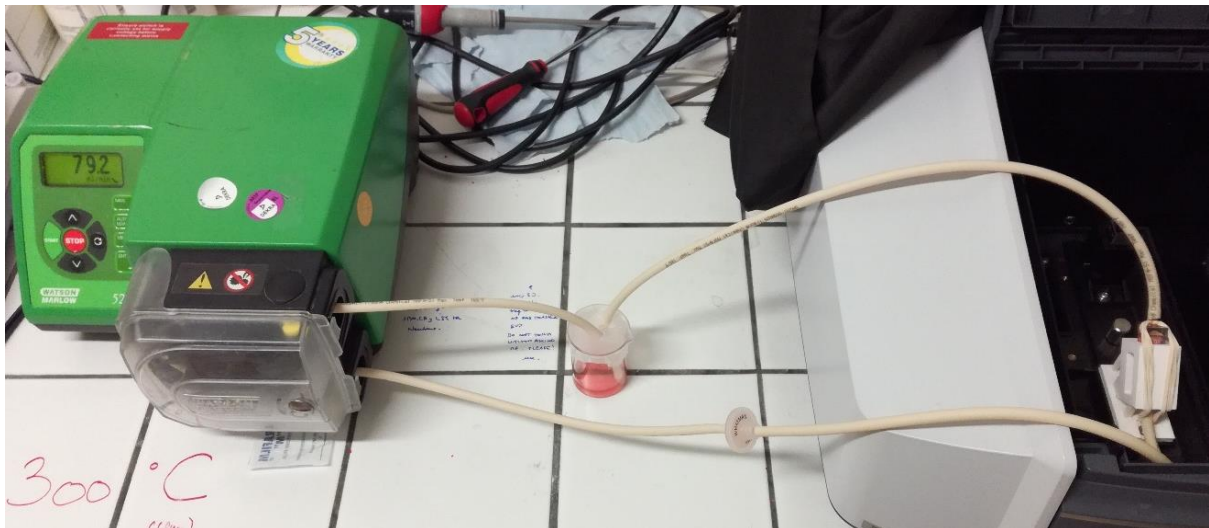


Figure 3.82 : Montage utilisé pour l'étude de solutions de protéines en circulation.

Lors de cette observation l'hémoglobine était maintenue immobile en circuit fermé, et un spectre était mesuré toutes les heures, donnant l'ensemble des spectres représenté Figure 3.83.

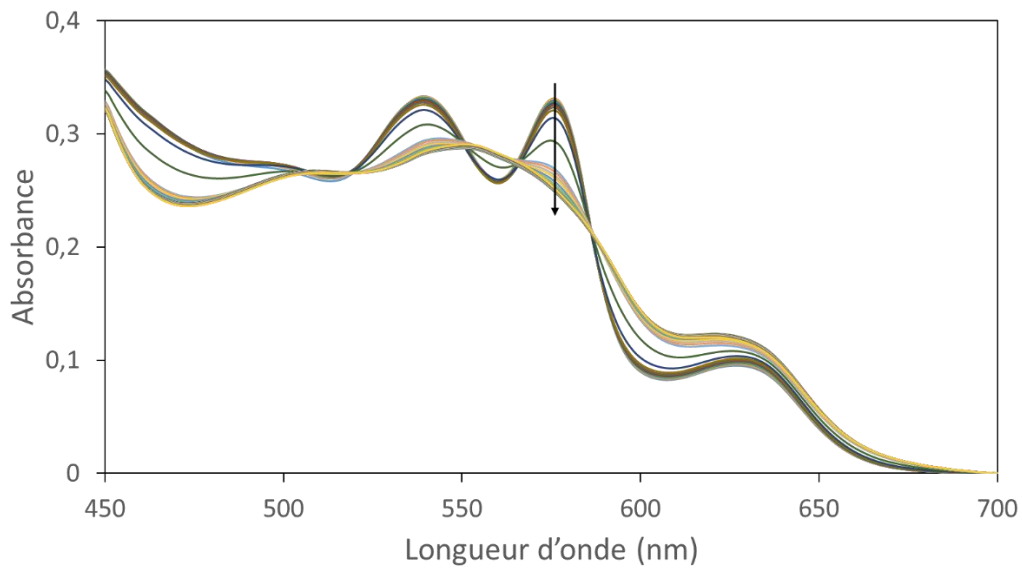


Figure 3.83 : Suivi du spectre UV-visible de Hb en circuit fermé (1 spectre par heure).

Malgré la forte proportion de metHb dans la solution initiale (environ 35%), la présence de points isobestiques nous montre que nous avons un équilibre entre deux formes de l'hémoglobine. Plus précisément, nous observons que l'hémoglobine oxygénée est convertie en hémoglobine désoxygénée au cours de l'expérience.

En suivant l'évolution de l'absorbance à 576 nm et 552 nm, qui correspondent respectivement au pic d'adsorption de l'hémoglobine oxygénée et au pic d'adsorption de l'hémoglobine désoxygénée, nous voyons que la solution reste stable pendant environ 10 heures avant de complètement se désoxygéner en 5 heures (Figure 3.84).

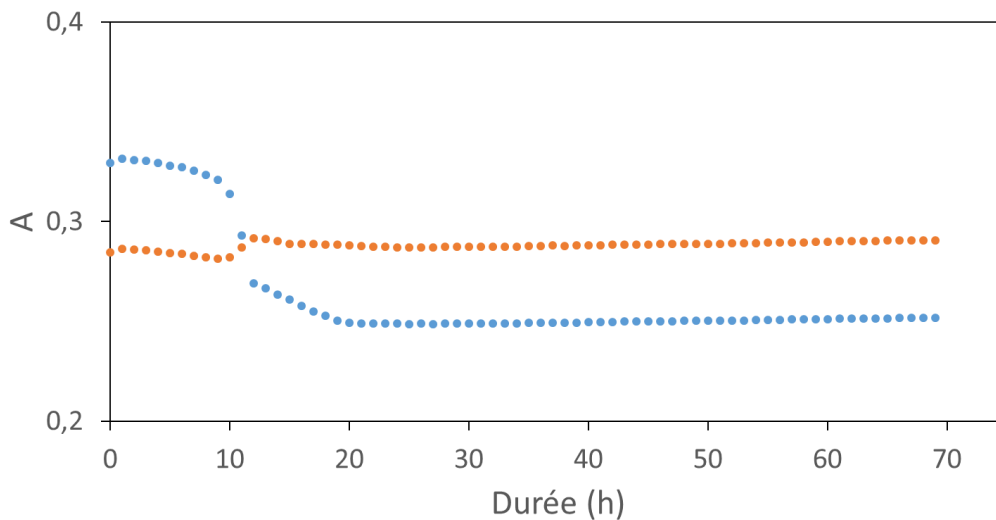


Figure 3.84 : Suivi de l'intensité des pics principaux de l'hémoglobine oxygénée (576 nm, en bleu) et désoxygénée (552 nm, en orange) en circuit fermé.

Cette expérience a été répétée un total de 3 fois et les observations sont restées similaires.

Afin de vérifier que cet effet est dû à la présence du tube, plusieurs morceaux ont été découpés et laissés dans une cuve hermétiquement fermée remplie complètement par une solution d'hémoglobine

de sorte à ne pas laisser d'air. Cette cuve a ensuite été laissée dans un spectrophotomètre pendant 60 heures à température ambiante. Nous avons après cette durée observé un fort changement de couleur de la solution, comme nous pouvons le voir Figure 3.85.

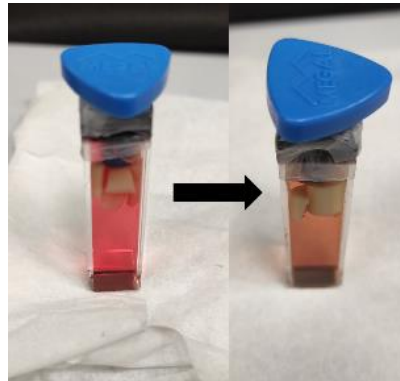


Figure 3.85 : Hémoglobine contenant des morceaux de tube dans une cuve fermée en début de mise en contact et après 60 h à température ambiante.

Dans ces conditions, aucune désoxygénation n'a été observée mais l'observation des points isobestiques indique un équilibre entre deux formes, et la méthémoglobine a été formée de façon constante pour la durée de la mesure, comme nous pouvons le voir aux courbes représentées Figure 3.86.

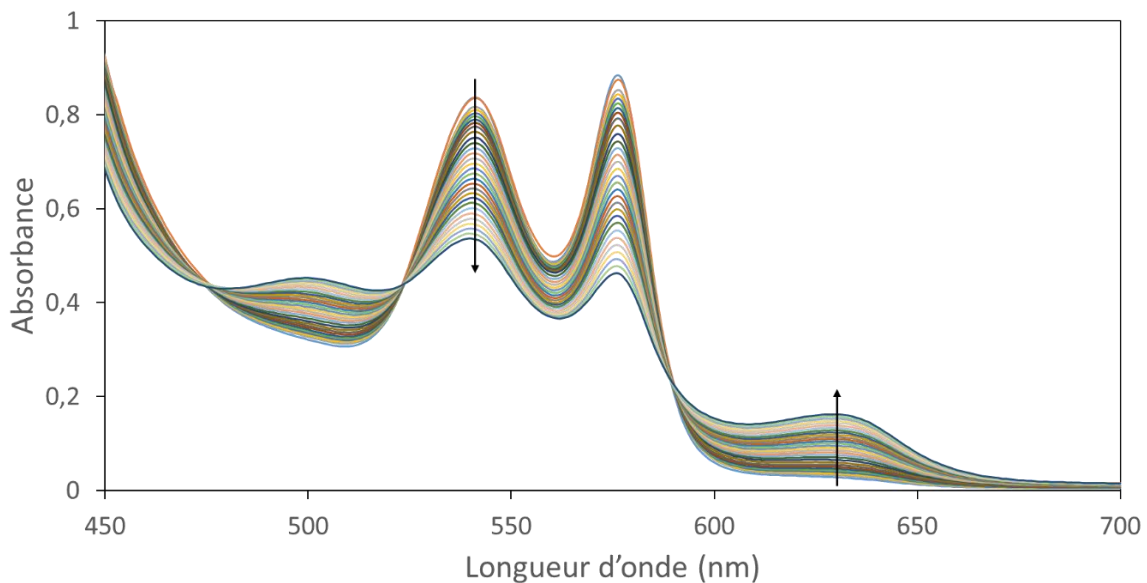


Figure 3.86 : Evolution du spectre UV-visible de l'hémoglobine en 60h dans une cuve fermée avec des morceaux de tubes à 20°C, 1 spectre par heure.

Nous observons que l'hémoglobine, pourtant en contact avec les mêmes tubes que lors de l'acquisition des spectres Figure 3.83, évolue de façon très différente que dans ce cas. Ceci confirme l'importance des conditions de mise en contact entre plastique et protéine.

L'oxydation de l'hémoglobine laissée à température ambiante est attendue, mais l'hémoglobine laissée en contact avec les morceaux de tube a formé de la metHb beaucoup plus rapidement que de l'hémoglobine laissée 24 heures à température ambiante.

Synthèse du chapitre

L'analyse des plastiques microstructurés que nous avons utilisée nous a permis de déterminer leurs dimensions, rassemblées Tableau 3.14.

| | PP (microparticules) | PE (microparticules) | PP (filtre) |
|--|----------------------|----------------------|-------------|
| Rayon médian (μm) | 5,0 | 2,1 | X |
| Surface spécifique (m^2/g) | 1,1 | 2,5 | 0,7 |

Tableau 3.14 : Dimensions des plastiques microstructurés utilisés.

Les analyses par spectroscopie Raman, ATR-FTIR et XPS nous ont permis de déterminer que les plastiques ne présentaient pas d'additifs en quantités notable, mais ont indiqué que les microparticules de PE sont partiellement oxydées, avec une présence d'environ 0,9% d'atomes d'oxygène par rapport à la quantité d'atomes de carbone.

Nous avons tracé les isothermes d'adsorption de nos protéines modèles sur chacun des plastiques étudiés, ce qui nous a permis d'estimer les masses de protéines adsorbées sur chaque plastique et leur affinité. Les isothermes ont pu être ajustées en utilisant le modèle de Langmuir pour déterminer les paramètres rassemblés Tableau 3.15.

| | PP | | PE | |
|--------------------|---|---|---|---|
| | m_{∞} (mg/m^2) | K_{ads} (L/mg) | m_{∞} (mg/m^2) | K_{ads} (L/mg) |
| BSA | $2,6 \pm 0,2$ | $1,0 \pm 0,2$ | $1,4 \pm 0,1$ | $0,7 \pm 0,2$ |
| Hb | $2,2 \pm 0,2$ | 92 ± 8 | $1,0 \pm 0,1$ | 26 ± 3 |
| αsyn | $1,1 \pm 0,1$ | $4,6 \pm 0,5$ | $0,7 \pm 0,1$ | $0,6 \pm 0,1$ |

Tableau 3.15 : Paramètres obtenus après ajustement suivant le modèle de Langmuir des isothermes d'adsorption Des protéines étudiées sur les microparticules de PP et de PE dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7,0.

Ces valeurs indiquent que les trois protéines étudiées s'adsorbent en plus grande quantité sur les microparticules de PP, et ont une plus forte affinité pour ces dernières que pour les microparticules de PE. Nous observons également que l'hémoglobine a une plus forte affinité pour les microparticules de plastique de la BSA et l' α -synucléine, ce qui peut s'expliquer par le fait que l'hémoglobine est plus faiblement chargée au pH auquel nous avons travaillé.

Les mesures turbiscan ont montré que les microparticules de PP ne sont stabilisées en solution par les protéines que pendant quelques heures, les microparticules de PE pouvant rester en solution pendant plus d'une journée, ce qui peut être dû à la plus grande taille des microparticules de PP. Pour les deux plastiques, l'hémoglobine est la protéine qui les stabilise en solution le moins efficacement.

Les mesures des courbes d'oxygénation d'hémoglobine après différentes méthodes de mise en contact avec les plastiques nous a indiqué que l'activité de l'hémoglobine adsorbée sur les filtres en PP était diminuée. Pour l'hémoglobine restant en solution après la mise en contact, quel que soit le type de plastique impliqué, l'activité de la protéine n'est pas modifiée.

L'imagerie Raman nous a permis d'observer l'hémoglobine adsorbée sur les microparticules de plastique. Sur les microparticules de PE nous avons observé la présence d'agrégats d'hémoglobine dénaturée, comme nous pouvons le voir Figure 3.87, et d'une couche d'hémoglobine dénaturée sur l'ensemble de la microparticule qui pourrait correspondre à la corona. Sur les microparticules de PP, nous n'avons pas observé de quantité notable d'hémoglobine.

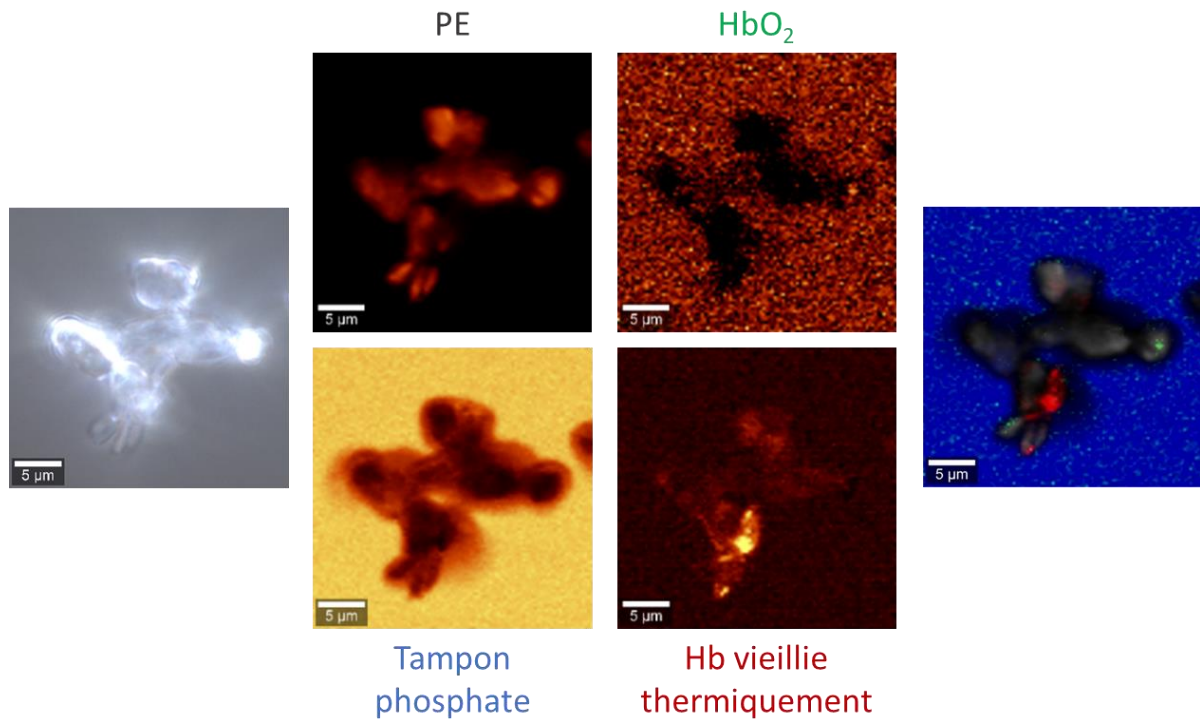


Figure 3.87 : A gauche, image de microparticules de PE ;
 au milieu, composantes obtenues par imagerie pour un ensemble de spectres de référence ;
 à droite, image obtenue en superposant ces composantes
 (PE en gris, tampon phosphate en bleu, HbO₂ en vert et hémoglobine vieillie thermiquement en rouge).

Bibliographie

- (1) Breydo, L.; Wu, J. W.; Uversky, V. N. α -Synuclein Misfolding and Parkinson's Disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **2012**, *1822* (2), 261–285. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.10.002>.
- (2) Amobonye, A.; Bhagwat, P.; Raveendran, S.; Singh, S.; Pillai, S. Environmental Impacts of Microplastics and Nanoplastics: A Current Overview. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 768297. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.768297>.
- (3) Zemb, Th.; Lindner, P. *Neutron, X-Rays and Light. Scattering Methods Applied to Soft Condensed Matter*; Elsevier Science, 2022.
- (4) Hosemann, R.; Bagchi, S. N. Direct Analysis of Diffraction by Matter. *Bull. Société Fr. Minéralogie Cristallogr.* **1963**, *86* (101–102). <https://doi.org/10.1021/ed040pA142.3>.
- (5) Fatnassi, M.; Ben Cheikh Larbi, F.; Halary, J. L. Quantitative Analysis of Semicrystalline Blends SAXS Data: Theoretical Modeling versus Linear Correlation Function. *Int. J. Polym. Sci.* **2010**, *2010*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2010/829752>.
- (6) Koga, M.; Watanabe, R.; Hagihara, H.; Mizukado, J.; Tokita, M.; Shinzawa, H. Accelerated Aging-Induced Variation of Polypropylene (PP) Structure Studied by Two-Dimensional (2D) Small-Angle X-Ray Scattering (SAXS) Correlation Spectroscopy. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1207*, 127764. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.127764>.
- (7) Zamfirova, G.; Pereña, J. M.; Benavente, R.; Pérez, E.; Cerrada, M. L.; Nedkov, E. Mechanical Properties of Ultra High Molecular Weight Polyethylene Obtained with Different Cocatalyst Systems. *Polym. J.* **2002**, *34* (3), 125–131. <https://doi.org/10.1295/polymj.34.125>.
- (8) Machado, G.; Denardin, E. L. G.; Kinast, E. J.; Gonçalves, M. C.; de Luca, M. A.; Teixeira, S. R.; Samios, D. Crystalline Properties and Morphological Changes in Plastically Deformed Isotactic Polypropylene Evaluated by X-Ray Diffraction and Transmission Electron Microscopy. *Eur. Polym. J.* **2005**, *41* (1), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.08.011>.
- (9) Nishino, T.; Matsumoto, T.; Nakamae, K. Surface Structure of Isotactic Polypropylene by X-Ray Diffraction. *Polym Eng Sci* **2000**, No. 40, 336–343. <https://doi.org/10.1002/pen.11167>.
- (10) Geyer, R.; Jambeck, J. R.; Law, K. L. Production, Use, and Fate of All Plastics Ever Made. *Sci. Adv.* **2017**, *6*.
- (11) Gulmine, J. V.; Janissek, P. R.; Heise, H. M.; Akcelrud, L. Polyethylene Characterization by FTIR. *Polym. Test.* **2002**, *21* (5), 557–563. [https://doi.org/10.1016/S0142-9418\(01\)00124-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9418(01)00124-6).
- (12) Chércoles Asensio, R.; San Andrés Moya, M.; de la Roja, J. M.; Gómez, M. Analytical Characterization of Polymers Used in Conservation and Restoration by ATR-FTIR Spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395* (7), 2081–2096. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3201-2>.
- (13) Morent, R.; De Geyter, N.; Leys, C.; Gengembre, L.; Payen, E. Comparison between XPS- and FTIR-analysis of Plasma-treated Polypropylene. *Surf Interface Anal* **2008**, *40*, 597–600. <https://doi.org/10.1002/sia.2619>.

- (14) Hiejima, Y.; Kida, T.; Takeda, K.; Igarashi, T.; Nitta, K. Microscopic Structural Changes during Photodegradation of Low-Density Polyethylene Detected by Raman Spectroscopy. *Polym. Degrad. Stab.* **2018**, *150*, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.02.010>.
- (15) Boerio, F. J. Raman Scattering in Crystalline Polyethylene. *J. Chem. Phys.* **1970**, *52* (7), 3425. <https://doi.org/10.1063/1.1673506>.
- (16) Gopanna, A.; Mandapati, R. N.; Thomas, S. P.; Rajan, K.; Chavali, M. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Raman Spectroscopy and Wide-Angle X-Ray Scattering (WAXS) of Polypropylene (PP)/Cyclic Olefin Copolymer (COC) Blends for Qualitative and Quantitative Analysis. *Polym. Bull.* **2019**, *76* (8), 4259–4274. <https://doi.org/10.1007/s00289-018-2599-0>.
- (17) Schaeberle, M. D.; Karakatsanis, C. G.; Lau, C. J.; Treado, P. J. Raman Chemical Imaging: Noninvasive Visualization of Polymer Blend Architecture. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (23), 4316–4321. <https://doi.org/10.1021/ac00119a018>.
- (18) Andreassen, E. Infrared and Raman Spectroscopy of Polypropylene. In *Polypropylene*; Karger-Kocsis, J., Ed.; Polymer Science and Technology Series; Springer Netherlands: Dordrecht, 1999; Vol. 2, pp 320–328. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4421-6_46.
- (19) XPS O 1s Binding Energies for Polymers Containing Hydroxyl, Ether, Ketone and Ester Groups. **6**.
- (20) García-Álvarez, R.; Vallet-Regí, M. Hard and Soft Protein Corona of Nanomaterials: Analysis and Relevance. *Nanomaterials* **2021**, *11* (4), 888. <https://doi.org/10.3390/nano11040888>.
- (21) Saptarshi, S. R.; Duschl, A.; Lopata, A. L. Interaction of Nanoparticles with Proteins: Relation to Bio-Reactivity of the Nanoparticle. *J. Nanobiotechnology* **2013**, *11* (1), 26. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-26>.
- (22) Bratcher, P. E.; Gaggar, A. Characterization and Prevention of the Adsorption of Surfactant Protein D to Polypropylene. *PLoS ONE* **2013**, *8* (9), e73467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073467>.
- (23) Bhattacharjee, S. DLS and Zeta Potential – What They Are and What They Are Not? *J. Controlled Release* **2016**, *235*, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- (24) Langmuir, I. THE ADSORPTION OF GASES ON PLANE SURFACES OF GLASS, MICA AND PLATINUM. *J. Am. Chem. Soc.* **1918**, *40* (9), 1361–1403. <https://doi.org/10.1021/ja02242a004>.
- (25) 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>.
- (26) 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>.
- (27) Freundlich, H. Über die Adsorption in Lösungen. *Z. Für Phys. Chem.* **1907**, *57U* (1), 385–470. <https://doi.org/10.1515/zpch-1907-5723>.
- (28) Jovanovid, D. S. Physical Adsorption of Gases. **12**.

- (29) Temkin, M.; Pyzhev, V. Kinetics of Ammonia Synthesis on Promoted Iron Catalysts. *Acta Physicochim. URSS* No. 12, 327–356.
- (30) Xu, T.; Fu, R.; Yan, L. A New Insight into the Adsorption of Bovine Serum Albumin onto Porous Polyethylene Membrane by Zeta Potential Measurements, FTIR Analyses, and AFM Observations. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *262* (2), 342–350. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00208-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00208-X).
- (31) Duncan, M. Influence of Surfactants upon Protein/Peptide Adsorption to Glass and Polypropylene. *Int. J. Pharm.* **1995**, *120* (2), 179–188. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)00402-Q](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)00402-Q).
- (32) Needham, J. ADSORPTION OF BOVINE SERUM ALBUMIN TO POLYETHYLENE TUBING REVERSIBILITY AND PH-DEPENDENCE. **1984**, 111.
- (33) Adamczyk, Z.; Weroński, P. Application of the DLVO Theory for Particle Deposition Problems. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1999**, *83* (1–3), 137–226. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(99\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(99)00009-3).
- (34) 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>.
- (35) *Handbook of Powder Science & Technology*; Fayed, M. E., Otten, L., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1997. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6373-0>.
- (36) Morris, M. D. Resonance Raman Spectroscopy. *Anal Chem* **1979**, *51* (2), 182A-192A. <https://doi.org/10.1021/ac50038a751>.
- (37) Strommen, D. P.; Nakamoto, K. Resonance Raman Spectroscopy. *J Chem Educ* **1977**, *54* (8), 474. <https://doi.org/10.1021/ed054p474>.
- (38) Niaura, G.; Gaigalas, A. K.; Vilker, V. L. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Phosphate Anions: Adsorption on Silver, Gold, and Copper Electrodes. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101* (45), 9250–9262. <https://doi.org/10.1021/jp970097k>.
- (39) Zhu, M. F.; Ye, X. P.; Huang, Y. Y.; Guo, Z. Y.; Zhuang, Z. F.; Liu, S. H. Detection of Methemoglobin in Whole Blood Based on Confocal Micro-Raman Spectroscopy and Multivariate Statistical Techniques. *Scanning* **2014**, *36* (5), 471–478. <https://doi.org/10.1002/sca.21143>.
- (40) 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. *Biophys. J.* **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).
- (41) Hisey, A.; Morrison, D. B. THE OXYGEN UPTAKE OF DRIED HEMOGLOBIN. *J. Biol. Chem.* **1939**, *130* (2), 763–775. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)73545-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)73545-X).
- (42) Ellerbrock, R. H.; Gerke, H. H.; Böhm, C. In Situ DRIFT Characterization of Organic Matter Composition on Soil Structural Surfaces. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2009**, *73* (2), 531–540. <https://doi.org/10.2136/sssaj2008.0103>.
- (43) Thennadil, S. N. Relationship between the Kubelka-Munk Scattering and Radiative Transfer Coefficients. *J. Opt. Soc. Am. A* **2008**, *25* (7), 1480. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.25.001480>.
- (44) Hill, A. V. XLVII. THE COMBINATIONS OF HAEMOGLOBIN WITH OXYGEN AND WITH CARBON MON- OXIDE. I. 10.

- (45) Devineau, S. Adsorption des protéines sur les nanomatériaux. *Biochimie et physico-chimie d'un nouveau stress*. 302.
- (46) Zheng, W.; Li, D.; Zeng, Y.; Luo, Y.; Qu, J. Y. Two-Photon Excited Hemoglobin Fluorescence. *Biomed. Opt. Express* **2011**, *2* (1), 71. <https://doi.org/10.1364/BOE.2.000071>.
- (47) Meisl, G.; Kirkegaard, J. B.; Arosio, P.; Michaels, T. C. T.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Linse, S.; Knowles, T. P. J. Molecular Mechanisms of Protein Aggregation from Global Fitting of Kinetic Models. *Nat. Protoc.* **2016**, *11* (2), 252–272. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.010>.
- (48) Mohammad-Beigi, H.; Zanganeh, M.; Scavenius, C.; Eskandari, H.; Farzadfard, A.; Shojaosadati, S. A.; Enghild, J. J.; Otzen, D. E.; Buell, A. K.; Sutherland, D. S. A Protein Corona Modulates Interactions of α -Synuclein with Nanoparticles and Alters the Rates of the Microscopic Steps of Amyloid Formation. *ACS Nano* **2022**, *16* (1), 1102–1118. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c08825>.
- (49) Pandey, L. M.; Pattanayek, S. K.; Delabouglise, D. Properties of Adsorbed Bovine Serum Albumin and Fibrinogen on Self-Assembled Monolayers. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (12), 6151–6160. <https://doi.org/10.1021/jp309483p>.
- (50) Gospodarczyk, W.; Szutkowski, K.; Kozak, M. Interaction of Bovine Serum Albumin (BSA) with Novel Gemini Surfactants Studied by Synchrotron Radiation Scattering (SR-SAXS), Circular Dichroism (CD), and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (29), 8652–8661. <https://doi.org/10.1021/jp5047485>.
- (51) *HBB - Hemoglobin subunit beta - Sus scrofa (Pig) | UniProtKB | UniProt.* <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02067/entry> (accessed 2022-11-22).
- (52) Chen, Y.-H.; Yang, J. T.; Chau, K. H. Determination of the Helix and β Form of Proteins in Aqueous Solution by Circular Dichroism. **1974**, *13* (16), 10.
- (53) Shanmugam, G.; Polavarapu, P. L. Vibrational Circular Dichroism Spectra of Protein Films: Thermal Denaturation of Bovine Serum Albumin. *Biophys. Chem.* **2004**, *111* (1), 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2004.04.005>.

Chapitre 4

Effets du vieillissement des plastiques sur les interactions avec les protéines

Les plastiques se trouvant dans la nature peuvent y rester pendant plusieurs siècles, durée pendant laquelle ils vont vieillir et leurs propriétés vont être modifiées¹⁻³, en particulier lorsqu'ils sont en présence de matière organique⁴. Ces modifications peuvent influencer les propriétés des microparticules de plastique, et en particulier leurs interactions avec les protéines. Dans le cas de nanoparticules de polystyrène, il a déjà été montré que la présence de groupements carbonyle influence ses propriétés de surface et a un impact notable sur la corona de protéines⁵. Généralement, les microparticules de plastique vieilles adsorbent plus facilement les espèces, qu'elles soient polaires ou non-polaires⁶.

Puisque le vieillissement des plastiques entraîne la formation de groupements carbonyle, qui sont facilement observables en spectroscopie ATR-FTIR, nous avons utilisé la détermination de la quantité de groupements carbonyle via le calcul de l'indice carbonyle (IC) pour suivre le vieillissement des plastiques. Nous avons alors testé plusieurs méthodes de vieillissement, incluant un vieillissement par irradiation UV, vieillissement thermique et vieillissement par irradiation par un accélérateur linéaire (rayonnement beta LINAC), afin de déterminer la méthode la plus adaptée pour obtenir des microparticules de polypropylène (PP) et de polyéthylène (PE) vieilles.

Une fois les microparticules de plastique vieilles obtenues, puis analysées de la même façon que les microparticules de plastique non vieilles, nous les avons mis en contact avec les protéines en suivant le même protocole que pour les microparticules de plastique non vieilles. Suite à ces mises en contact nous avons mesuré les isothermes d'adsorption des protéines, observé l'hémoglobine adsorbée sur les microparticules par spectroscopie Raman et observé la stabilité des microparticules de plastique vieilles en solution par mesures turbiscan. Pour chaque expérience, les résultats ont été comparés avec ce qui a été observé dans le cas des plastiques vieillis.

Nous avons également observé la corona de protéine sur des microparticules de plastique vieilles par imagerie de fluorescence. L'analyse de ces mesures n'a toutefois pas été possible puisque, après vieillissement, les microparticules de plastique émettent un signal de fluorescence nous empêchant de les distinguer des protéines.

1. Préparation et caractérisation des microplastiques vieillis

Une méthode couramment utilisée pour faire vieillir des plastiques consiste à utiliser des irradiations UV-visible, mais cette méthode requiert des longues durées (de l'ordre de plusieurs mois) et est peu transférable⁷.

Nous avons testé différentes méthodes de vieillissement pour les microparticules de PP et de PE. Après chaque test, le spectre ATR-FTIR des microparticules a été mesuré pour calculer leur indice carbonyle, qui a été utilisé comme critère d'évaluation du vieillissement du plastique. Nous avons utilisé ce critère

pour déterminer quelles méthodes sont efficaces, et pour évaluer la quantité de groupements carbonyle présents dans le plastique.

Les microparticules de plastique vieilles ont ensuite été caractérisées de la même façon que les microparticules de plastique non vieilles. Leur morphologie a été déterminée par spectroscopie SAXS, la modification de leur structure chimique a été observée par spectroscopie UV-visible, leur homogénéité a été examinée par spectroscopie Raman et leur chimie de surface a été étudiée par XPS.

1.1. Caractérisations du vieillissement des plastiques

Dans la nature les microparticules de plastique peuvent être oxydées par différentes réactions, l'une d'entre elles étant décrite Figure 4.1⁸ résultant en la formation de groupements carbonyle.

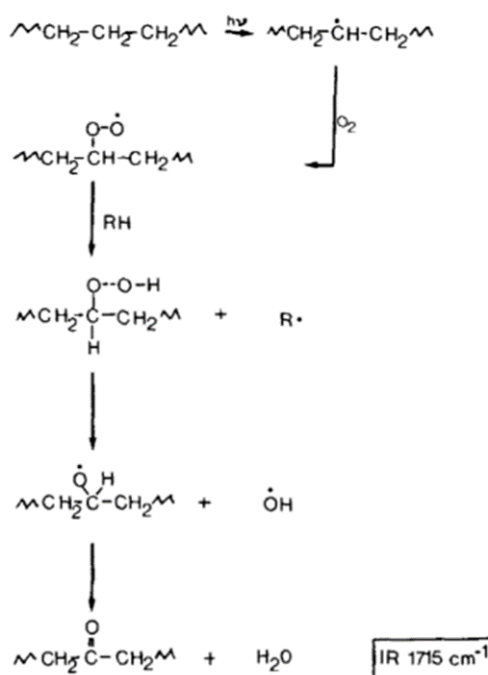


Figure 4.1 : Principaux mécanismes de vieillissements des microplastiques, tiré de *The Mechanism of Biodegradation of Polyethylene*⁸.

D'autres réactions peuvent avoir lieu et causer la formation de différents groupements, en particulier des groupements alcène ou des groupements carboxyle^{9,10}. Nous allons toutefois nous concentrer sur les groupements carbonyle, dont l'observation par spectroscopie ATR-FTIR est souvent utilisée pour suivre et caractériser le vieillissement des plastiques¹⁰. Dans cette partie, nous allons estimer la quantité de groupements carbonyle présents dans les échantillons étudiés en calculant leur indice carbonyle.

L'indice carbonyle est défini par le rapport d'intensité du signal des groupements carbonyle par rapport à celui des groupements méthyle et méthylène. Plus précisément, nous prenons le rapport entre l'aire du signal de 1850 cm⁻¹ à 1650 cm⁻¹, qui correspond à la bande d'absorbance des carbonyle, et l'aire du signal de 1500 cm⁻¹ à 1420 cm⁻¹, qui correspond au pic de cisaillement des ponts méthylène¹¹.

Afin d'obtenir une approximation de la proportion de groupements carbonyle dans nos plastiques vieillis, nous avons mesuré le spectre ATR-FTIR de l'octan-3-one, pour lequel ce rapport est connu. Ce

spectre est représenté Figure 4.2. L'octan-3-one a été sélectionné parce qu'il s'agit d'une molécule accessible et relativement simple d'utilisation, composé d'une chaîne carbonée relativement longue comprenant un groupement carbonyle. Ceci permet donc d'approcher la situation d'un polymère comprenant des groupements carbonyle tout en gardant une molécule de structure connue exactement.

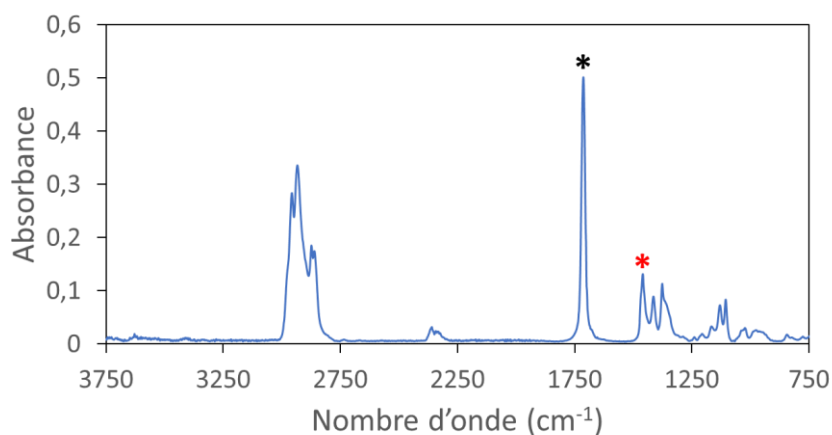


Figure 4.2 : Spectre ATR-FTIR de l'octan-3-one.
Le pic du groupement carbonyle est indiqué par un astérisque noir,
et celui des groupements méthyle par un astérisque rouge.

Les pics d'intérêt pour le spectre de l'octan-3-one sont le pic à 1715 cm^{-1} , qui correspond au groupement carbonyle, et le pic à 1458 cm^{-1} , qui correspond aux groupements méthyle. En prenant le rapport des aires de ces pics, nous obtenons donc l'indice carbonyle de l'octan-3-one (Tableau 4.1).

| | |
|---------------------------------|----------------|
| Aire 1850-1650 cm^{-1} | $11,9 \pm 0,1$ |
| Aire 1500-1420 cm^{-1} | $3,9 \pm 0,1$ |
| Indice carbonyle | $3,0 \pm 0,1$ |

Tableau 4.1 : Calcul de l'indice carbonyle de l'octan-3-one.

Connaissant la proportion d'atomes de carbone appartenant à un groupement carbonyle dans l'octan-3-one, nous en déduisons qu'un indice carbonyle de 3,0 correspond à 12,5% de groupements carbonyle. Nous pouvons donc effectuer une règle de trois pour en déduire la proportion de groupements carbonyle dans nos plastiques vieillis. Cette méthode sera utilisée pour donner un point de départ à nos simulations, qui seront présentées dans le chapitre suivant.

1.2. Méthodes de vieillissement testées

Pour chacun de nos plastiques nous avons testé plusieurs méthodes de vieillissement. La première consiste à laisser les plastiques en mouvement dans de l'eau de mer artificielle pendant une longue durée (deux ans), la deuxième consiste à irradier les plastiques avec des UV, la troisième consiste à chauffer les plastiques et la dernière consiste à irradier les plastiques avec un accélérateur d'électron (LINAC). Nous pouvons noter que d'autres méthodes de vieillissement peuvent être trouvées dans la littérature, par exemple en faisant buller de l'ozone dans une suspension de microplastique⁶.

Seuls les résultats sur les microparticules de plastique sont présentés dans ce chapitre, aucune des méthodes essayées n'ayant modifié de façon notable les filtres en PP. Ceci montre que les filtres, étant des produits industriels, contiennent probablement des stabilisants, en faible quantité puisque nous ne les avons pas détectés lors de la caractérisation (FTIR, XPS) des filtres (voir chapitre précédent). Inversement, le fait que nous ayons réussi à faire vieillir les microparticules de PP et de PE confirme que celles-ci ne contiennent pas d'antioxydants.

1.2.1. Vieillessement dans l'eau de mer artificielle

Nous avons préparé de l'eau de mer artificielle (ASW) en dissolvant dans 1 L d'eau distillée 26,4 g de NaCl, 745 mg de KCl, 1,32 g de CaCl₂·2H₂O, 6,08 g de MgCl₂·6H₂O et 3,94 g de MgSO₄·7H₂O, puis en ajoutant de la soude jusqu'à atteindre un pH de 8,3.

Dans 25 tubes en polypropylène, nous avons introduit 10 mL d'ASW et 200 mg de PP, puis ces tubes sont mis sur roue à 4°C, 3 tours/minute. Le même protocole est suivi pour PE. Ces tubes sont laissés sur roue pendant 2 ans, en les ouvrant une fois toutes les deux semaines pour apporter de l'air, avant de mesurer les spectres ATR-FTIR des plastiques présentés Figure 4.3.

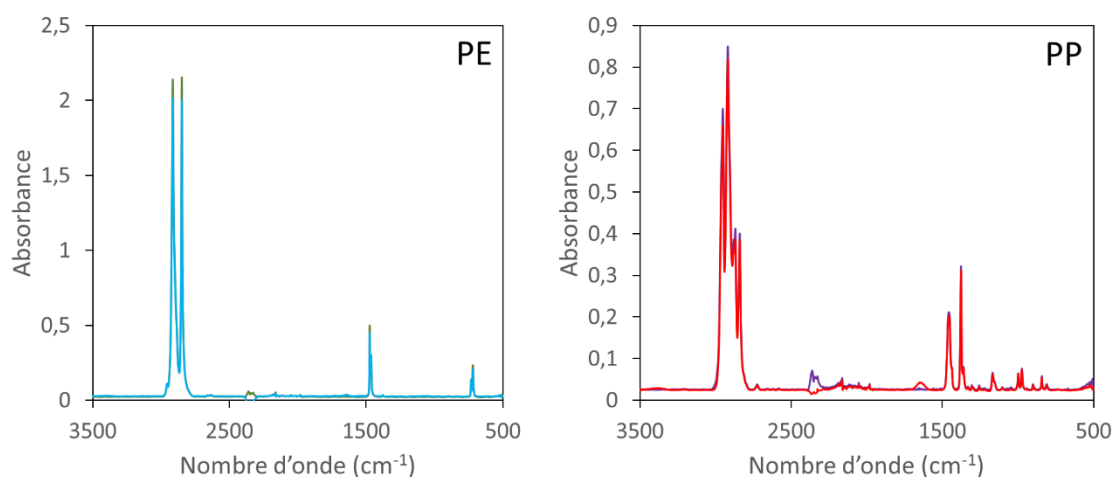


Figure 4.3 : Spectres ATR-FTIR des microparticules de PE avant vieillissement (en vert) et après vieillissement (en bleu) et des microparticules de PP avant vieillissement (en violet) et après vieillissement (en rouge).

Dans ces conditions, le vieillissement des plastiques n'a pas été assez avancé pour que le signal des groupements carbonyle soit observables, comme nous l'indiquent les paramètres rassemblés Tableau 4.2.

| Echantillon | PE natif | PE vieilli 2 ans dans ASW | PP natif | PP vieilli 2 ans dans ASW |
|---------------------------------|-------------|---------------------------|-------------|---------------------------|
| Aire 1850-1650 cm ⁻¹ | 0,0 ± 0,1 | 0,4 ± 0,1 | 0,1 ± 0,1 | 0,6 ± 0,1 |
| Aire 1500-1420 cm ⁻¹ | 5,5 ± 0,1 | 5,1 ± 0,1 | 5,3 ± 0,1 | 5,1 ± 0,1 |
| Indice carbonyle | 0,00 ± 0,02 | 0,08 ± 0,02 | 0,02 ± 0,02 | 0,12 ± 0,02 |
| Ratio O/C | 0,0 % | 0,3 % | 0,08 % | 0,5 % |

Tableau 4.2 : Détermination de l'indice carbonyle et estimation du rapport O/C pour les microparticules de plastique avant et après vieillissement dans ASW à 4°C, 3 tours/minute pendant 2 ans.

Laisser les microparticules de plastique en mouvement dans une solution d'eau de mer artificielle n'est donc pas une méthode efficace pour les faire vieillir. Bien qu'un léger signal soit observé autour de 1700 cm^{-1} pour les microparticules de PP celui-ci reste de faible intensité bien que la durée de vieillissement des microparticules ait dépassé 2 ans, il s'agit donc d'une méthode trop lente pour être exploitable en laboratoire. Des échantillons ont tout de même été laissés à vieillir à l'issue de cette thèse, ce qui permettra d'observer l'effet de cette méthode à très long terme.

1.2.2. Vieillessement thermique

Après avoir laissé les microplastiques dans une étuve à 80°C pendant 2 mois, nous avons obtenu les spectres représentés Figure 4.4.

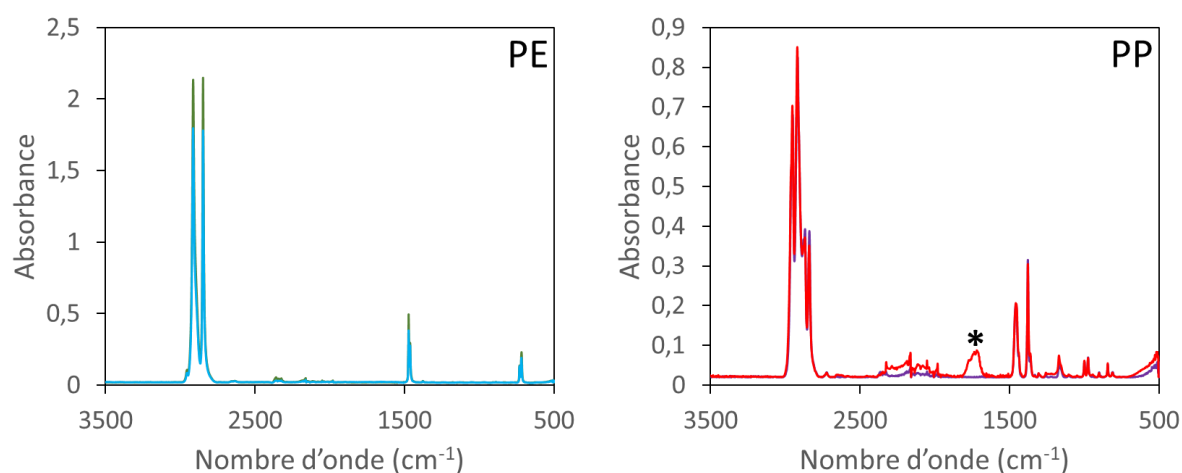


Figure 4.4 : Spectres ATR-FTIR des microparticules de PE avant vieillissement (en vert) et après vieillissement (en bleu) et des microparticules de PP avant vieillissement (en violet) et après vieillissement (en rouge). Le pic correspondant aux groupements carbonyle est indiqué par un astérisque.

Comme nous pouvons le voir au calcul des IC Tableau 4.3, cette méthode n'a pas augmenté de façon significative l'IC de PE, mais a causé un vieillissement de PP.

| Echantillon | PE vieilli 2 mois 80°C | PP vieilli 2 mois 80°C |
|--|--|--|
| Aire $1850\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ | $0,4 \pm 0,1$ | $6,0 \pm 0,1$ |
| Aire $1500\text{-}1420\text{ cm}^{-1}$ | $4,3 \pm 0,1$ | $5,2 \pm 0,1$ |
| Indice carbonyle | $0,09 \pm 0,03$ | $1,15 \pm 0,04$ |
| Ratio O/C | 0,3% | 4,8% |

Tableau 4.3 : Détermination de l'indice carbonyle et estimation du rapport O/C pour les microparticules de plastique après vieillissement thermique à 80°C pendant 2 mois.

Nous avons également utilisé cette méthode sur les filtres en PP mais ces derniers n'ont pas été vieillis par cette méthode, les filtres n'étaient pas jaunis après 2 mois à 80°C et nous n'avons pas observé de signal correspondant à des groupements carbonyle sur les spectres ATR-FTIR.

Cette méthode a donc été utilisée pour faire vieillir les microparticules de PP dans le cadre de cette thèse.

Le vieillissement thermique des plastiques a également déjà été étudié^{12,13}. Ces études confirment le vieillissement du polypropylène à des températures de 50°C à 100°C, et la formation de groupements carboxyle sur plusieurs dizaines de jours, ce qui est en accord avec nos résultats.

1.2.3. Vieillissement par irradiation

Afin d'avoir une irradiation homogène sur l'ensemble de l'échantillon, nous avons fait 4 irradiations successives de 500 kGy en mélangeant l'échantillon entre chaque irradiation (voir le chapitre Matériel et Méthodes). Après une irradiation de 2 MGy, seul le spectre ATR-FTIR de PE est représenté Figure 4.5 puisque le PP devient collant et s'agrège indiquant qu'il ne s'agit plus de microparticules de plastique.

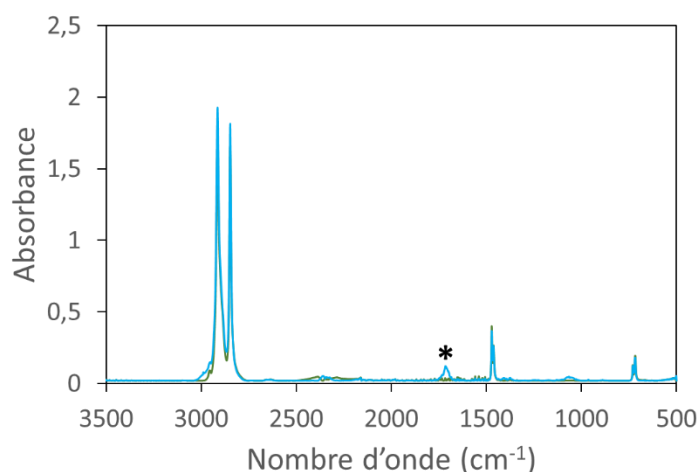


Figure 4.5 : Spectres ATR-FTIR des microparticules de PE avant vieillissement (en vert) et après vieillissement avec une irradiation de 2 MGy (en bleu). Le pic correspondant aux groupements carbonyle est indiqué par un astérisque.

Pour PE, les microplastiques ne changent pas de consistance, et comme nous pouvons le voir à l'indice carbonyle indiqué Tableau 4.4, l'irradiation permet de vieillir les microparticules de PE.

| Echantillon | PE 2MGy |
|---------------------------------|-------------|
| Aire 1850-1650 cm ⁻¹ | 3,18 ± 0,1 |
| Aire 1500-1420 cm ⁻¹ | 4,38 ± 0,1 |
| Indice carbonyle | 0,73 ± 0,04 |
| Ratio O/C | 3,0% |

Tableau 4.4 : Détermination de l'indice carbonyle et estimation du rapport O/C pour les microparticules de PE après vieillissement avec une irradiation de 2 MGy.

Le PE ne jaunit pas aussi fortement que le PP après vieillissement, mais nous observons tout de même un changement de couleur.

Cette méthode a été utilisée pour produire des microparticules de PE vieilles dans le cadre de cette thèse.

Pour conclure cette partie consacrée au vieillissement des plastiques, nous avons déterminé pour chaque plastique une méthode permettant d'oxyder une proportion des atomes de carbone de l'ordre de 4%, ce qui est cohérent avec ce qui est observé sur des microplastiques vieillis dans la nature².

Bien que nos microparticules de plastiques vieilles semblent cohérentes avec les microparticules de plastique trouvées dans la nature, il resterait intéressant pour de futures expériences d'utiliser des plastiques vieillis naturellement. En effet, ceux-ci étant vieillis par différents processus (irradiations par la lumière du soleil, mouvements pour les microparticules dans l'eau, chauffage à des températures dépendant des saisons et de l'heure...) et en contact avec d'autres espèces, ils peuvent présenter des propriétés différentes des plastiques vieillis en laboratoire. Il peut toutefois être difficile de se procurer des microparticules de plastique vieilles de cette façon, et surtout de les utiliser dans le cadre d'expériences reproductibles, puisque des échantillons prélevés dans des lieux différents ou à des moments différents pourront ne pas partager les mêmes caractéristiques. Dans le cadre de cette thèse, nous utiliserons donc les microparticules de plastique vieilles au laboratoire.

1.3. Caractérisation des plastiques vieillis

1.3.1. Morphologie

Les spectres SAXS des microparticules de plastique ont été mesurés par Marion Schwartz après vieillissement afin de déterminer si le vieillissement avait modifié la surface spécifique des microparticules de façon significative.

Les spectres SAXS des microparticules de PE avant et après vieillissement sont représentées Figure 4.6.

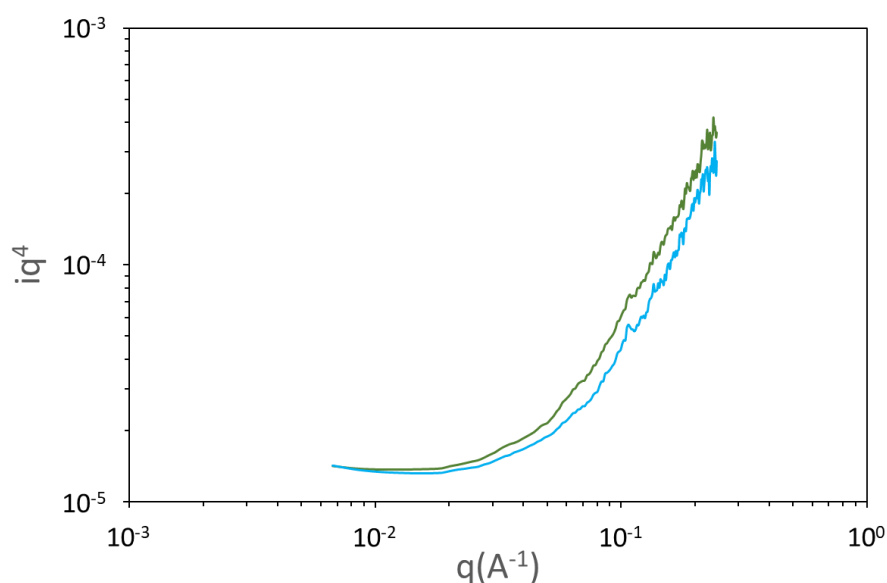


Figure 4.6 : Spectres SAXS des microparticules de PE avant vieillissement (en vert) et après vieillissement avec une irradiation de 2MGy (en bleu).

Les spectres obtenus sont proches. En utilisant la loi de Porod comme décrit dans le chapitre précédent, nous avons déterminé que la surface spécifique des microparticules de PE vieilles est de 2,4 m²/g, celle des microparticules de PE non vieilles étant de 2,5 m²/g. La morphologie des microparticules de PE ne semble donc pas avoir été modifiée de façon notable lors de leur vieillissement.

Les spectres SAXS des microparticules de PP avant et après vieillissement sont représentés Figure 4.7.

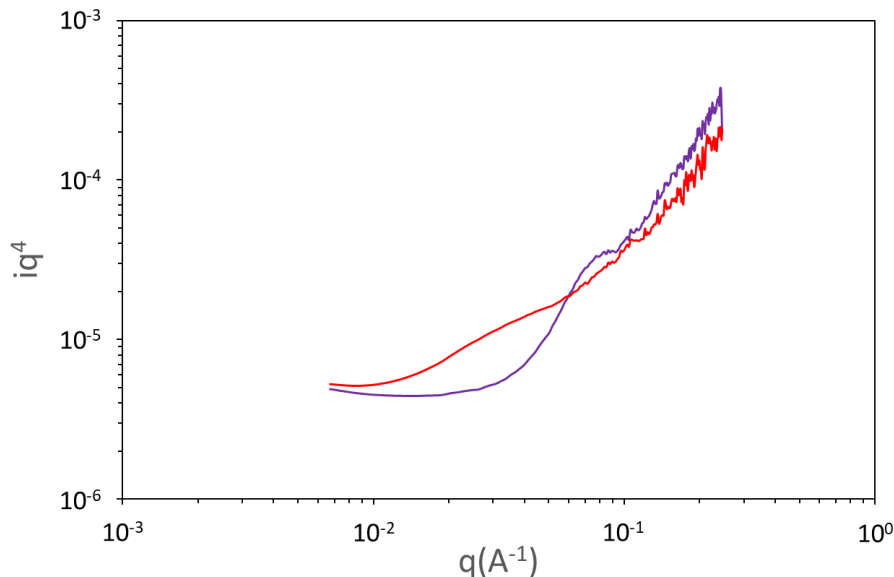


Figure 4.7 : Spectres SAXS des microparticules de PP avant vieillissement (en violet) et après vieillissement thermique à 80°C pendant 2 mois (en rouge).

Les spectres ont des allures fortement différentes, en particulier le spectre du PP vieilli ne présente pas de signal particulier autour de 0,1 A⁻¹. Il semble donc que les particules de PP aient été homogénéisées lors de leur vieillissement.

En utilisant la loi de Porod nous avons déterminé que la surface spécifique des microparticules de PP vieilles est de 1,2 m²/g, celle des microparticules de PP non vieilles étant de 1,1 m²/g. La surface spécifique des microparticules de PP n'est donc que peu modifiée par le changement de morphologie causé par leur vieillissement.

Ces mesures indiquent donc que la structure des microparticules de PP a été modifiée après leur vieillissement, mais que les deux plastiques gardent des surfaces spécifiques proches de ce qu'elles étaient avant vieillissement. Ceci est cohérent puisque le chauffage des microparticules de polypropylène suivi par leur retour à température ambiante est analogue à un recuit, qui tendrait donc à homogénéiser ces particules. Ce type de comportement a déjà été observé dans la littérature¹⁴.

Des mesures de cristallographie aux rayons X ont également été réalisées en collaboration avec Guillaume Brotons sur les microparticules de plastique vieilles. Les comparaisons des diffractogrammes obtenus pour les microparticules de plastique vieilles et non vieilles sont présentées Figure 4.8 pour les microparticules de PE et Figure 4.9 pour les microparticules de PP.

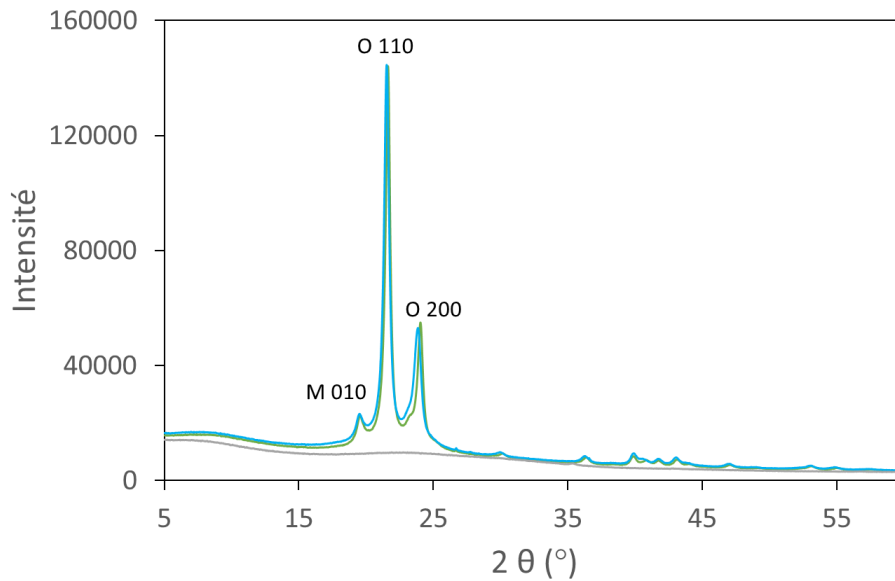


Figure 4.8 : Diffractogrammes des microparticules de PE avant vieillissement (en vert) et après vieillissement avec une irradiation de 2MGy (en bleu), signal du substrat (en gris) et attribution des pics principaux(M = monoclinique, O = orthorhombique).

Comme avec les microparticules non vieilles, nous observons pour les microparticules de PE vieilles un mélange de structure orthorhombique et de structure monoclinique¹⁵, dont les proportions ne semblent pas avoir changé suite au vieillissement. Ceci est cohérent avec l'absence de différences observées sur les spectres SAXS avant et après vieillissement.

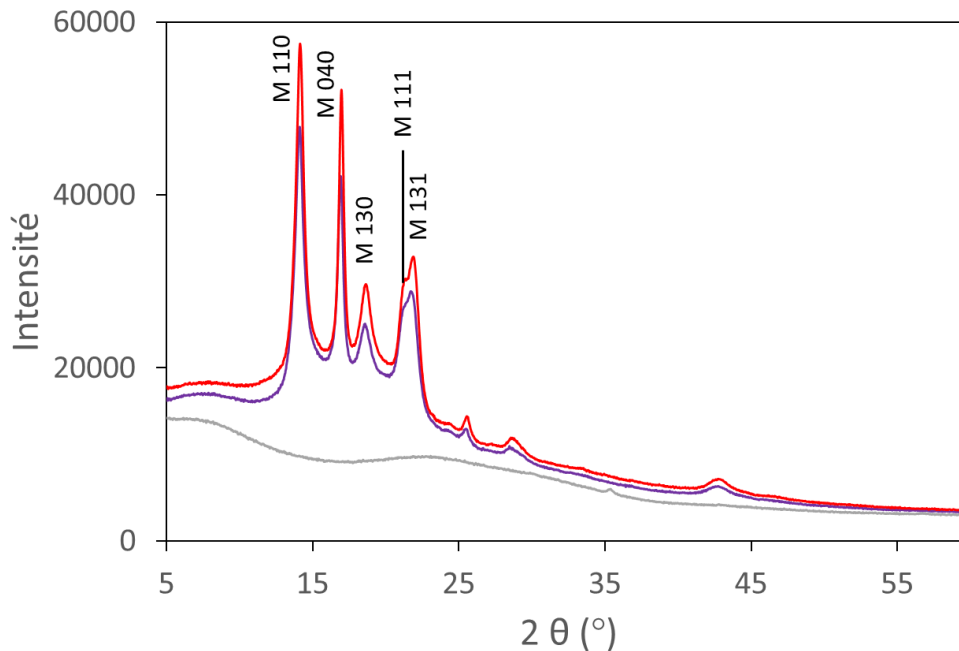


Figure 4.9 : Diffractogrammes des microparticules de PP avant vieillissement (en violet) et après vieillissement avec une irradiation de 2MGy (en rouge), signal du substrat (en gris) et attribution des pics principaux(M = monoclinique).

Comme pour les microparticules de PE, nous n'observons pas de modifications significatives du diffractogramme des microparticules de PP suite à leur vieillissement. Une fois de plus nous observons

une phase cristalline correspondant purement à une structure monoclinique et isotactique, et aucune phase amorphe.

Dans les deux cas, nous observons donc que la structure cristalline des microparticules de plastique n'est pas modifiée de façon significative par leur vieillissement. Ceci est cohérent avec ce que nous trouvons dans la littérature, qui indique que le PP peut être chauffé à des températures allant jusqu'à 110°C sans modifications de sa structure¹⁶ et que le PE peut recevoir de fortes doses d'irradiations sans modifications importantes de sa structure¹⁷.

Les microparticules de plastique vieilles ont également été observées par microscopie optique, les images obtenues ayant été analysées en utilisant Fiji pour déterminer leur rayon moyen. Le diamètre médian (mesuré sur 250 particules) des microparticules de PE vieilles est de 5,8 µm, contre 4,2 µm pour les microparticules de PE non vieilles, et celui des microparticules de PP vieilles est de 9,9 µm, contre 10,0 µm pour les microparticules de PP non vieilles. Le vieillissement des microparticules de PE a donc augmenté leur diamètre de façon notable, ce qui peut être causé par l'agrégation des plus petites microparticules. Puisque l'irradiation des microparticules de PP a causé leur agrégation, cette hypothèse semble cohérente. Le diamètre médian des microparticules de PP n'a pas été affecté par le vieillissement.

1.3.2. Structure chimique

Les spectres ATR-FTIR ont déjà été présentés lors de l'étude des différentes méthodes de vieillissement, nous avons observé que le seul pic notable apparu lors du vieillissement est celui correspondant aux groupements carbonyle.

Pour obtenir l'équivalent des spectres d'adsorption UV-visible des microplastiques, nous avons utilisé une sphère d'intégration pour mesurer les spectres par réflexion diffuse avant d'appliquer la transformation de Kubelka-Munk, en appliquant l'équation 1.

$$KM = \frac{(1 - R) \times (1 - R)}{2 \times R} \quad (eq. 1)$$

Dans cette équation, KM est une grandeur proportionnelle à l'absorbance au niveau de la surface de l'échantillon et R est la réflectance de l'échantillon.

Les spectres ainsi obtenus pour les microparticules de plastiques vieillis sont comparés aux spectres des microparticules de plastiques non-vieillis Figure 4.10.

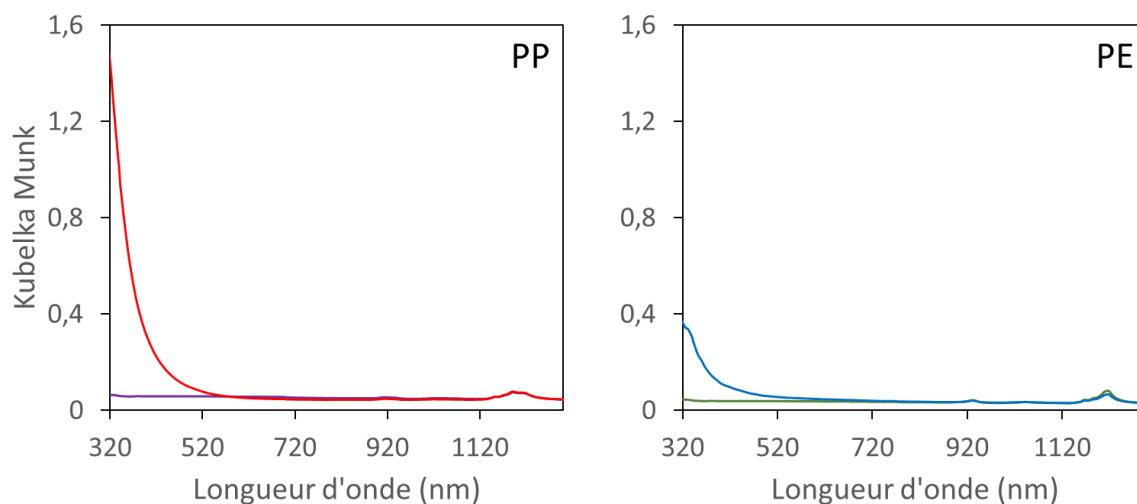


Figure 4.10 : Spectres de réflexion diffuse des microplastiques après transformation de Kubelka-Munk pour les microparticules de PP (à gauche) non vieilles (en violet) et vieilles (en rouge) et pour les microparticules de PE (à droite) non vieilles (en vert) et vieilles (en bleu).

Nous observons dans les deux cas une forte absorbance aux faibles longueurs d'onde, ce qui est en accord avec le jaunissement observé des plastiques. La présence de ce pic d'adsorption indique la formation de doubles liaisons C=C. L'appareil utilisé ne permettant pas de mesurer l'absorbance des microparticules de plastique par réflexion diffuse à des longueurs d'onde inférieures à 320 nm, nous ne pouvons pas déterminer précisément la longueur d'onde correspondant au pic d'adsorption afin d'en tirer des informations supplémentaires.

1.3.3. Homogénéité

Nous avons réalisé en collaboration avec Stéphanie Devineau des expériences d'imagerie Raman sur les microparticules de PE et de PP après vieillissement. Dans les deux cas, les images obtenues avaient des allures identiques à celles des microparticules de plastiques non-vieillis.

Pour le PE vieillis nous avons obtenu 3 composantes différentes, représentées Figure 4.11.

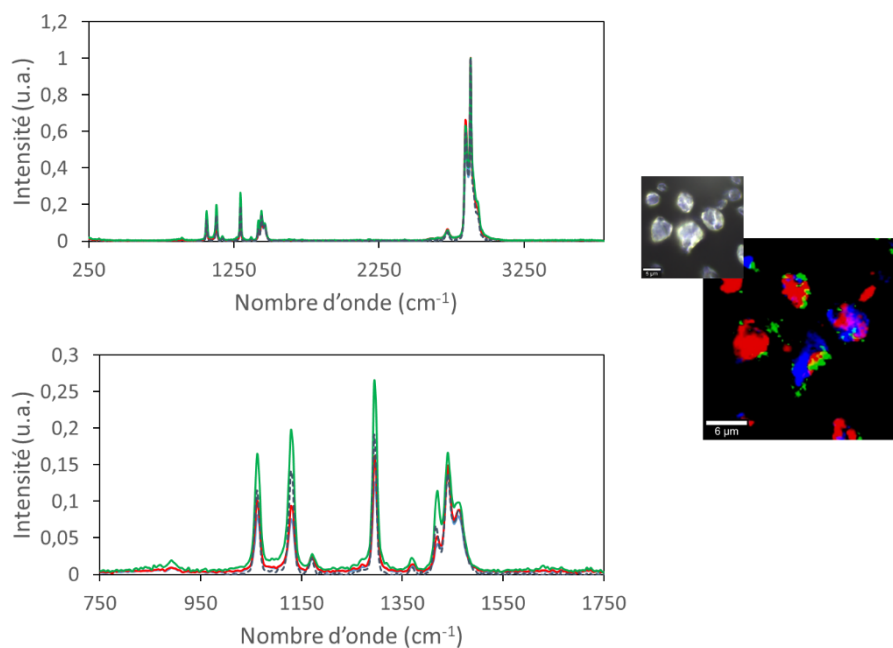


Figure 4.11 : A gauche, spectres Raman des trois composantes observées lors des expériences d'imagerie sur les microparticules de PE vieilles. Spectre complet au-dessus et zoom sur le spectre Raman de 750 cm^{-1} à 1750 cm^{-1} en dessous. A droite, résultat des expériences d'imagerie Raman sur les microparticules de PE vieilles, chaque composante est représentée de la même couleur dans l'image et dans le spectre.

Nous n'avons pas observé de différences notables entre les spectres Raman du PE vieilli et du PE non-vieilli (voir chapitre 3, paragraphe 1.3). L'absence de pic correspondant aux groupements carbonyle n'est pas étonnante, celui-ci étant moins intense en spectroscopie Raman qu'en spectroscopie IR.

Pour le PP vieilli nous avons observé une unique composante, représentée Figure 4.12.

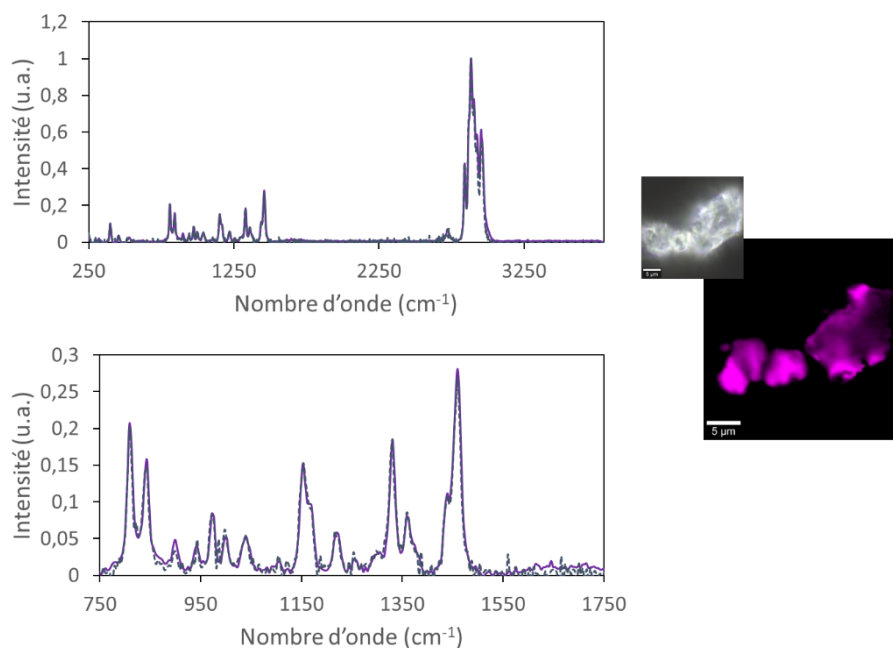


Figure 4.12 : A gauche, spectres Raman observé lors des expériences d'imagerie sur les microparticules de PP vieilles. Spectre complet au-dessus et zoom sur le spectre Raman de 750 cm^{-1} à 1750 cm^{-1} en dessous. A droite, résultat des expériences d'imagerie Raman sur les microparticules de PP vieilles.

Nous n'observons pas de différences entre les spectres Raman du PP avant et après vieillissement (voir chapitre 3, paragraphe 1.3). Le fait que le spectre Raman des microparticules de PP ne soit pas affecté malgré la modification notable du spectre SAXS confirme que ces techniques n'observent pas les mêmes caractéristiques texturales.

Que ce soit pour le PE ou pour le PP, le vieillissement ne semble donc pas affecter l'homogénéité des microparticules de plastique.

1.3.4. Surface

Le spectre XPS des microparticules de PE vieilli a été mesuré par Jocelyne Leroy, comparé à celui du PE non vieilli Figure 4.13.

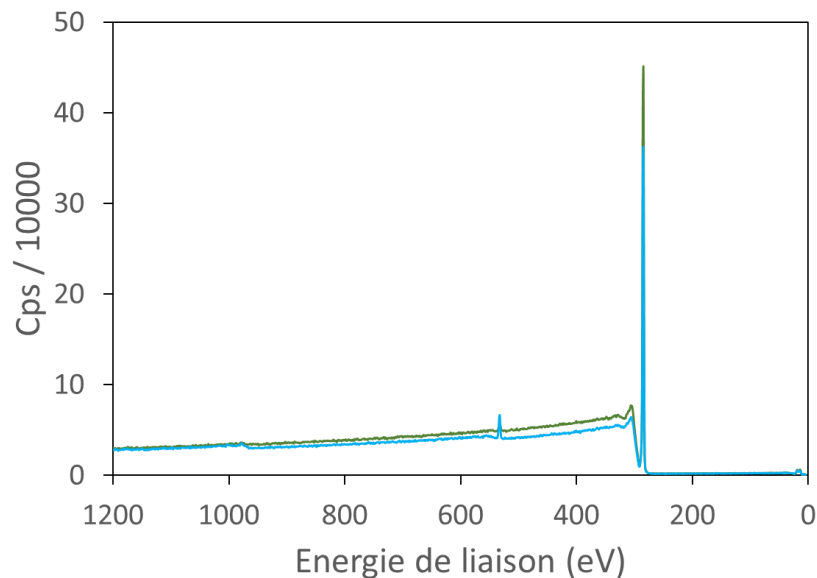


Figure 4.13 : Spectre XPS global des microparticules de PE, avant vieillissement (en vert) et après vieillissement avec une irradiation de 2MGy (en bleu).

Que ce soit pour les microparticules de PE vieilles ou non vieilles nous observons le pic du carbone autour de 285 eV et celui de l'oxygène autour de 533 eV, le pic de l'oxygène étant significativement plus prononcé dans le cas du PE vieilli.

Nous avons réalisé un spectre haute résolution du pic du carbone, que nous comparons à celui obtenu pour les microparticules de PE non vieilles Figure 4.14.

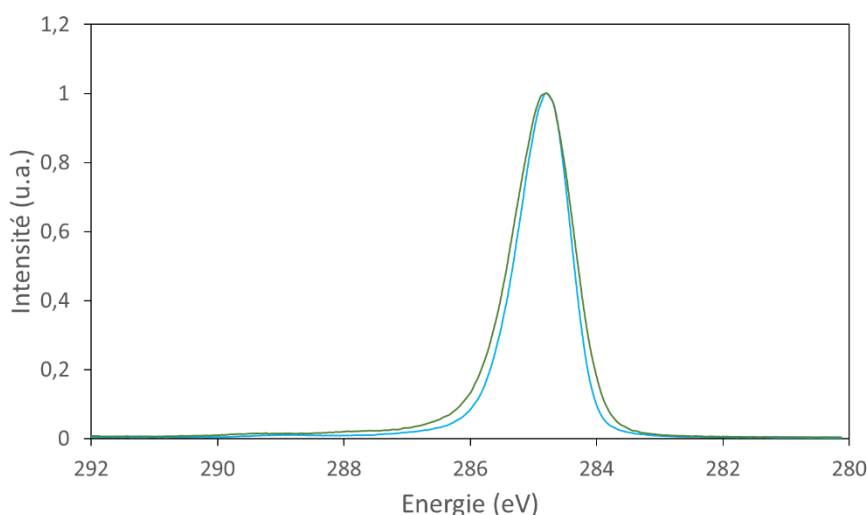


Figure 4.14 : Spectres XPS haute résolution du pic du carbone des microparticules de PE vieilles (en bleu) et non vieilles (en vert), normalisés à leur maximum avec ligne de base corrigée.

Comme pour les microparticules de PE non vieilles nous observons un unique pic centré à 285,0 eV, ce qui correspond à ce qui est attendu pour les atomes de carbone de la chaîne carbonée¹⁸. Nous n'observons donc pas de modification significative de l'environnement des atomes de carbone par XPS, possiblement parce que seule une faible portion de ceux-ci sont oxydés lors du vieillissement.

Nous avons également réalisé un spectre XPS haute résolution du pic de l'oxygène que nous avons décomposé Figure 4.15.

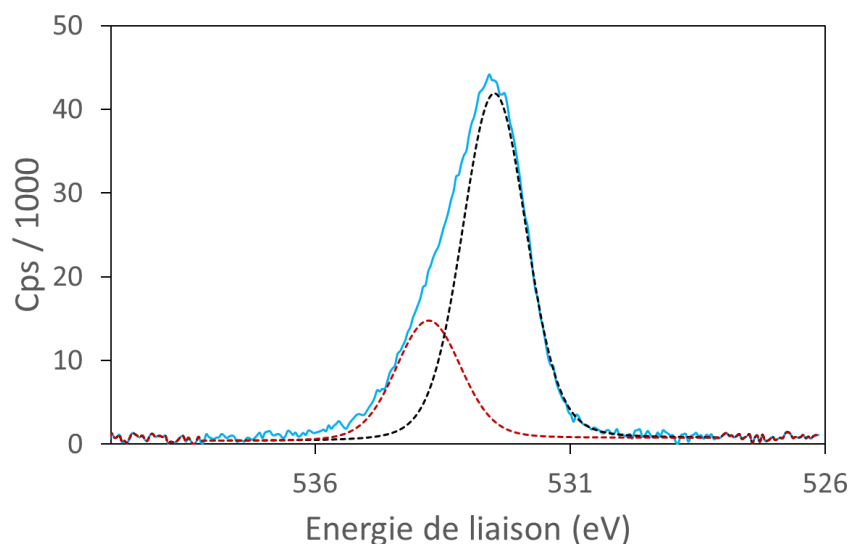


Figure 4.15 : Spectre XPS haute résolution du pic de l'oxygène des microparticules de PE vieilles (en bleu) avec ligne de base corrigée et composantes utilisées pour l'ajustement (en noir et en rouge).

La meilleure résolution de ce spectre permet de remarquer que, comme dans le cas des microparticules de PE non vieilles, le signal de l'oxygène est constitué de 2 composantes, la première à 534 eV pouvant correspondre à des groupements ester et la seconde à 532 eV pouvant correspondre à des groupements carbonyle¹⁸. Par rapport au signal mesuré pour les microparticules de PE non vieilles, présenté Figure 3.13, les composantes correspondent aux mêmes énergies de liaison mais

leurs intensités relatives sont différentes. D'après les aires des pics, dans le cas des microparticules non vieilles le pic à 534 eV correspond à 55% des atomes d'oxygène et celui à 532 eV correspond à 45% des atomes d'oxygène. Pour les microparticules de PE vieilles, le pic à 534 eV correspond à 26% des atomes d'oxygène et celui à 532 eV correspond à 74% des atomes d'oxygène.

Nous avons calculé que la quantité d'atomes d'oxygène est égale à 2,6% de la quantité d'atomes de carbone, ce qui correspond à une forte augmentation comparée aux 0,9% mesurés sur les microparticules de PE avant vieillissement. Connaissant les proportions relatives d'atomes d'oxygène correspondants à chaque pic nous pouvons en déduire les quantités de groupements carbonyle et ester par rapport au nombre d'atomes de carbone. Les microparticules de PE non vieilles contiennent 0,4% de groupements carbonyle et 0,5% de groupements ester, tandis que les microparticules de PE vieilles contiennent 1,9% de groupements carbonyle et 0,7% de groupements ester. Nous observons donc principalement une augmentation de la quantité de groupements carbonyle.

De plus, la quantité d'atomes d'oxygène calculée par XPS est du même ordre de grandeur que la quantité estimée à partir de l'indice carbonyle (3,0%). Les spectres FTIR portent sur une profondeur de l'ordre de 10 μm (correspondant à des microparticules entières) et les spectres XPS sur une profondeur de 10 nm (correspondant uniquement à la surface). Nous pouvons en déduire que l'oxydation des microparticules de PE par notre méthode se fait de façon uniforme. Ceci est cohérent avec les profils d'oxydation trouvés dans la littérature, qui indiquent que la quantité relative de groupements carbonyles dans du polyéthylène vieilli par irradiation est stable sur une épaisseur de l'ordre de 100 μm ¹⁹, bien supérieur au diamètre des microparticules de 4,2 μm .

Le spectre XPS des microparticules de PP vieilles a également été mesuré, comparé à celui du PP non vieilli Figure 4.16.

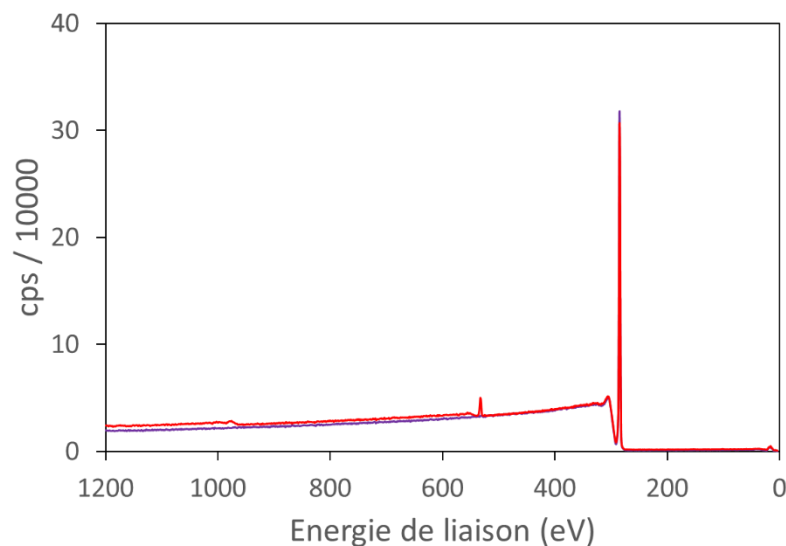


Figure 4.16 : Spectre XPS global des microparticules de PP, avant vieillissement (en violet) et après vieillissement thermique à 80°C pendant 2 mois (en rouge).

Pour les microparticules de PP vieilles et les microparticules de PP non vieilles nous observons le pic du carbone autour de 285 eV. Un pic autour 533 eV, correspondant à l'oxygène, est observé uniquement dans le cas des microparticules de PP vieilles.

Nous avons réalisé un spectre haute résolution du pic du carbone, que nous comparons à celui obtenu pour les microparticules de PP non vieilles Figure 4.17.

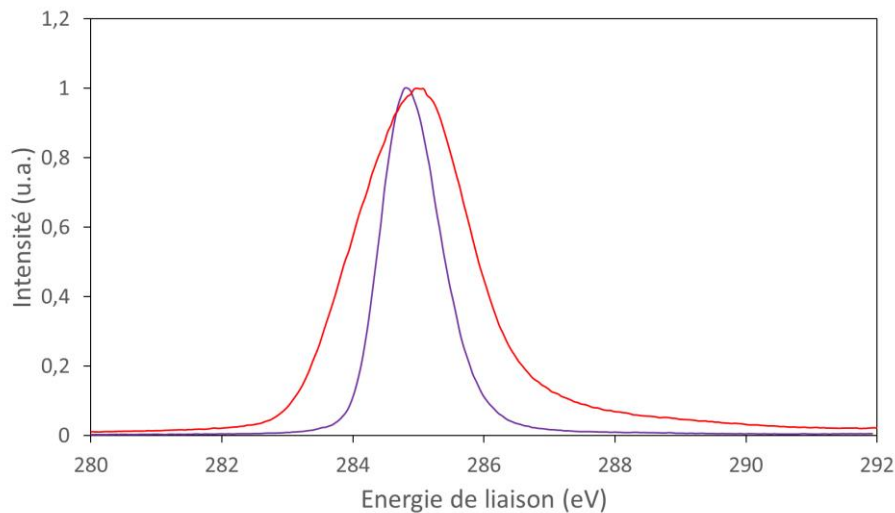


Figure 4.17 : Spectre XPS haute résolution du pic du carbone des microparticules de PP vieilles (en rouge) et non vieilles (en violet), normalisés à leur maximum avec ligne de base corrigée.

Comme pour les microparticules de PP non vieilles nous observons un unique pic centré à 285,0 eV, soit à une énergie légèrement plus élevée que le 284,8 eV. Cette légère augmentation de l'énergie de liaison peut s'expliquer par la présence de groupements carbonyle à proximité des atomes de carbone¹⁸. La largeur importante du pic pour les microparticules de PP vieilles peut être causée par une hétérogénéité importante de l'environnement des atomes de carbone.

Nous avons également réalisé un spectre XPS haute résolution du pic de l'oxygène Figure 4.18.

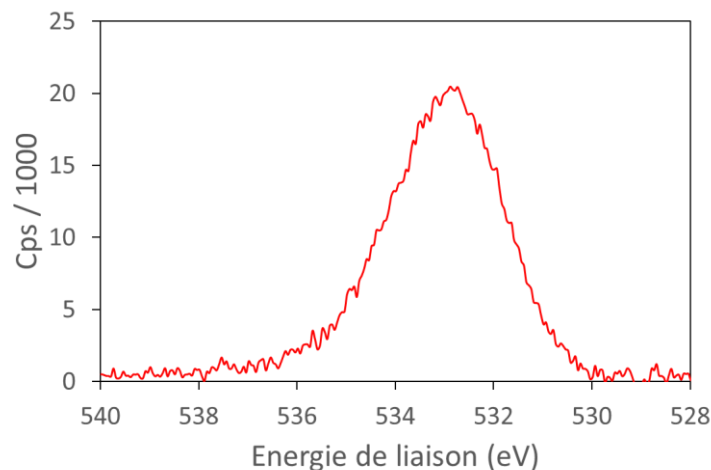


Figure 4.18 : Spectre XPS haute résolution du pic de l'oxygène des microparticules de PP vieilles avec ligne de base corrigée.

Nous n'observons cette fois qu'une seule composante dans le pic de l'oxygène à 533,0 eV. Ce signal peut correspondre à des groupements carbonyle, des alcools ou des liaisons C-O-C¹⁸. Puisque nous avons observé la présence de groupements carbonyle par spectroscopie ATR-FTIR, nous en déduisons que ce pic correspondant aux groupements carbonyle.

Nous avons calculé que la quantité d'atomes d'oxygène est égale à 2,6% de la quantité d'atomes de carbone. Cette quantité est inférieure à ce que nous avons estimé à partir de l'indice carbonyle des microparticules de PP vieilles (4,8%). Cette différence indiquerait une plus forte oxydation au cœur des microparticules de plastique qu'à leur surface. Ceci est incohérent puisqu'il a été mesuré dans la littérature que, pour du PP vieilli thermiquement, la quantité relative de groupements carbonyle diminue linéairement sur une épaisseur de l'ordre de $10 \mu\text{m}^{20}$. Ce résultat montre donc probablement une limite de l'estimation par l'indice carbonyle, et en particulier de la référence utilisée. En effet, l'octan-3-one ne comprenant pas de groupements CH_3 , le groupement carbonyle de cette molécule peut ne pas être représentatif des groupements carbonyle dans le polypropylène.

2. Isothermes d'adsorption des protéines modèles sur des microparticules de plastique vieilles

Nous avons initialement cherché à mesurer les isothermes d'adsorption des protéines sur les microparticules de plastique vieilles en suivant le même protocole que sur les microparticules de plastique non vieilles, décrit dans le chapitre 3.

Après la mise en contact des microplastiques avec la protéine nous remarquons que la crème est moins stable qu'avec les plastiques natifs, les microplastiques retournent plus facilement en solution en cas de mouvement du tube. En particulier, il nous a été impossible d'extraire les microparticules à la surface des solutions après centrifugation sans qu'une quantité importante de plastique ne retourne en solution. Pour cette raison nous n'avons pas pu déterminer les concentrations en protéine par spectroscopie UV-visible, la présence de microparticules en solution rendant ces spectres inexploitable. Nous avons donc utilisé des méthodes différentes pour déterminer ces concentrations.

Dans le cas de la BSA et de l' α -synucléine nous avons mesuré, par fluorescence, les spectres d'émission des résidus tryptophane contenus dans les protéines. Dans le cas de l'hémoglobine, l'émission de fluorescence des résidus tryptophane n'est pas mesurable (voir chapitre 3 paragraphe 5.2), et nous avons donc mesuré le spectre de réflexion diffuse en utilisant une sphère d'intégration.

Nous avons commencé par utiliser les mêmes gammes de concentrations en protéine que dans le cas des plastiques non vieillis mais, pour toutes les protéines, les isothermes mesurées ainsi n'ont pas atteint de plateau. Afin de vérifier si cela était dû à une faible affinité des protéines pour les microparticules de plastique vieilles nous avons répété les expériences en continuant d'utiliser 10 g/L de plastique mais en multipliant par 10 les concentrations initiales de protéines, résultant en des gammes de concentration initiales allant de 50 mg/L à 1 g/L. Les isothermes d'adsorption ainsi obtenues sont réunies Figure 4.19.

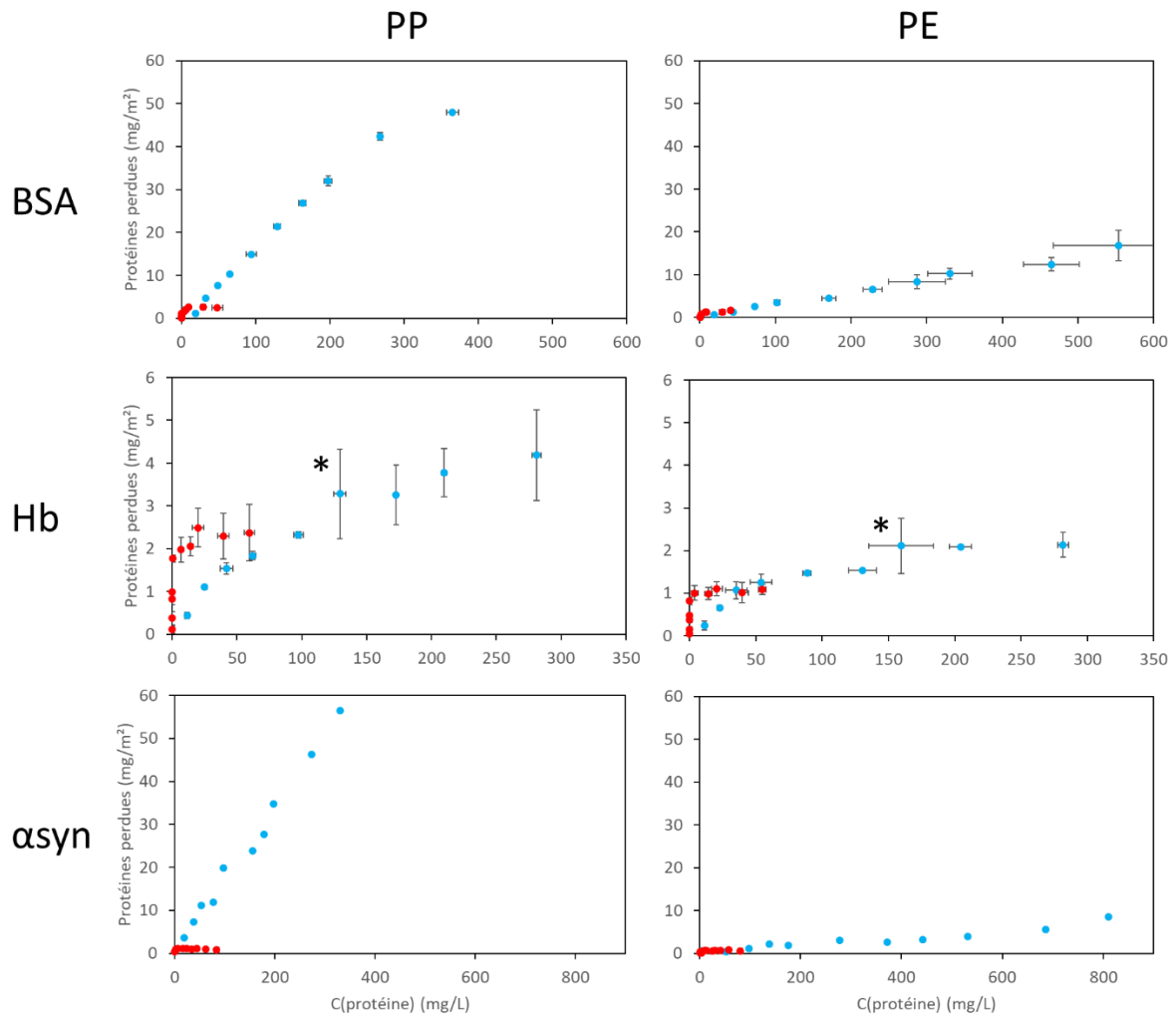


Figure 4.19 : Isothermes d'adsorption de chaque protéine sur chaque microplastique vieilli (en bleu), et comparaison avec les isothermes d'adsorption sur les microplastiques non vieillis (en rouge). Les astérisques indiquent des sauts des isothermes pour les solutions d'hémoglobine.

Pour l' α -synucléine et la BSA nous observons une très forte différence entre les courbes obtenues pour les microparticules de plastique vieilles et non vieilles. Dans le cas des plastiques vieillis nous n'observons pas de plateau, la quantité de protéine perdue augmentant linéairement avec la concentration de protéine en solution.

Afin de vérifier si le spectre de fluorescence des microparticules de plastique vieilles pouvait influencer nos calculs de concentration, nous avons mesuré les spectres d'émission des microparticules de plastique vieilles avec une longueur d'onde d'excitation de 276 nm, et les avons comparés aux spectres d'émission des protéines pour la même longueur d'onde d'excitation. Ces spectres sont rassemblés Figure 4.20.

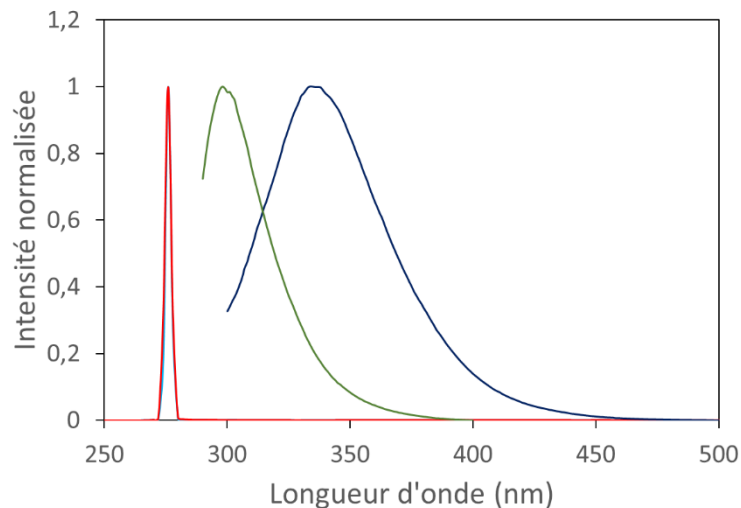


Figure 4.20 : Courbes d'émission de fluorescence (excitation à 276 nm) normalisées à leur maximum pour les microparticules de PP vieilles (en rouge), les microparticules de PE vieilles (en bleu clair), l' α -synucléine (en vert) et la BSA (en bleu foncé).

Notons que le tracé en bleu clair des microparticules de PE vieilles et celui en rouge des microparticules de PP vieilles sont parfaitement superposés et contenus dans le pic à 276 nm. Ce pic correspond au faisceau d'excitation, les microparticules de plastique vieilles n'émettent donc aucun signal de fluorescence aux longueurs d'ondes mesurées. L'allure des isothermes obtenues pour la BSA et l' α -synucléine n'est donc pas causée par un éventuel signal de fluorescence de microparticules de plastique vieilles en solution. Il est toutefois possible que ces particules relarguent d'autres composés en solution, certains pouvant être fluorescents ou causer une extinction (quenching) du signal de fluorescence des protéines²¹⁻²³.

L' α -synucléine est de plus susceptible de s'agréger dans certaines conditions, ce qui modifie son signal de fluorescence^{24,25}. Certaines études ont en effet prouvé que la présence de microparticules de plastique peut influencer l'agrégation de l' α -synucléine²⁶. L'allure obtenue pour l'isotherme d'adsorption pourrait donc être due à une perturbation du signal de fluorescence de la protéine causée par son agrégation.

Pour l'hémoglobine, le signal de fluorescence n'étant pas observable, une sphère d'intégration a été utilisée pour mesurer le signal de transmission diffuse. Les isothermes ainsi obtenues ont des allures proches de ce qui est attendu avec le modèle de Langmuir, mais présentent un saut (repéré par un astérisque sur la Figure 4.19) pour une concentration en hémoglobine libre d'environ 130 mg/L en présence de PP vieilli et 160 mg/L en présence de PE vieilli. Ceci pourrait indiquer la formation d'une seconde couche à partir d'une concentration critique, ou être le résultat d'un relargage par les

microplastiques, il est donc difficile de tirer une conclusion de ces observations sans effectuer de mesures complémentaires.

Dans le cas des isothermes d'adsorption de l'hémoglobine nous observons que la quantité de protéine adsorbée augmente lentement avec la concentration de protéine libre comparé à ce que nous avons observé pour les microparticules de plastique vieilles, et que le plateau est atteint pour une plus forte concentration en protéine. En considérant uniquement les points avant le saut observé sur les courbes (donc jusqu'à 100 mg/L pour les microparticules de PP vieilles et jusqu'à 130 mg/L pour les microparticules de PE vieilles), nous pouvons ajuster ces isothermes avec le modèle de Langmuir pour comparer les paramètres obtenus avec ceux correspondant aux microparticules de plastique non vieilles. Ces paramètres sont regroupés Tableau 4.5.

| | PP | | PE | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------------|----------------------|
| | m_{∞} (mg/m ²) | K_{ads} (L/mg) | m_{∞} (mg/m ²) | K_{ads} (L/mg) |
| Hb + plastique non vieilli | 2,2 ± 0,2 | 92 ± 8 | 1,0 ± 0,1 | 26 ± 3 |
| Hb + plastique vieilli | 4,1 ± 0,2 | 0,014 ± 0,002 | 2,2 ± 0,2 | 0,021 ± 0,005 |

Tableau 4.5 : Paramètres obtenus après ajustement suivant le modèle de Langmuir des isothermes d'adsorption de l'hémoglobine sur les microparticules de PP et de PE vieilles et non vieilles dans un tampon phosphate 100 mM à pH 7,0.

Ces paramètres confirment que, dans le cas de l'hémoglobine, la protéine a une plus faible affinité pour les microparticules de plastique vieilles mais peut être adsorbée en plus forte quantité. La variation de K_{ads} est particulièrement importante, avec un facteur entre la valeur estimée pour les microparticules vieilles et non-vieilles de 1000 pour les microparticules de PE et 10000 pour les microparticules de PP. La principale différence entre les microparticules de plastique avant et après vieillissement étant la présence d'atomes d'oxygène, nous pouvons en déduire que ces derniers sont la cause de cette variation. Comme lors de l'analyse des isothermes d'adsorption sur les microparticules de plastique vieilles, nous pouvons expliquer nos observations par la théorie DLVO²⁷, et en particulier par l'influence des charges. En effet, les atomes d'oxygène peuvent causer la présence de charge de surface, favorisant donc les forces répulsives entre les protéines et les microparticules de plastique vieilles. Un impact aussi important de la charge de surface serait cohérent avec ce qui a été observé au laboratoire pour l'adsorption d'hémoglobine sur des microparticules de silice. Pour ces systèmes, il a été démontré que mettre les microparticules en contact avec l'hémoglobine à pH 9,0 au lieu de 7,0 peut entièrement empêcher l'adsorption de la protéine, à cause de l'apparition de charge sur cette dernière²⁸. Mesurer précisément l'impact des charges de surface des microparticules de plastique serait difficile, leur hydrophobicité empêchant d'obtenir une dispersion de microparticules en solution sans protéines pour mesurer leur potentiel zêta par zétamétrie.

Cette diminution de l'affinité rend l'augmentation des valeurs de m_{∞} inattendue, puisqu'une adsorption plus lente devrait laisser plus de temps aux protéines de se déformer une fois adsorbées, rendant la corona plus fine. Une explication possible de cette observation serait que les atomes d'oxygène à la surface des microparticules limitent la déformation de l'hémoglobine, la forçant à prendre une conformation plus compacte. Puisqu'il a déjà été démontré que le caractère hydrophobe ou hydrophile d'une surface affecte les changements de conformation des protéines adsorbées²⁹, cette explication semble probable. Une autre hypothèse serait que la présence d'atomes d'oxygène empêche les interactions entre protéines d'hémoglobine adsorbées, qui influe également la déformation des protéines adsorbées³⁰. Il est également envisageable que les microparticules de

plastique vieilles favorisent l'adsorption d'agrégats d'hémoglobine observée en spectroscopie Raman, qui pourrait permettre d'adsorber une plus grande quantité de protéine tout en maintenant une plus faible surface de contact.

3. Dispersion des plastiques vieillis en solution par les protéines

Nous avons suivi l'évolution de solutions de BSA au turbiscan après mise en contact avec des plastiques vieillis.

Pour chaque plastique la mesure a été effectuée pour une solution de BSA à 100 mg/L et pour une solution à 700 mg/L. Les courbes obtenues en suivant l'évolution de la transmission des solutions sont présentées Figure 4.21.

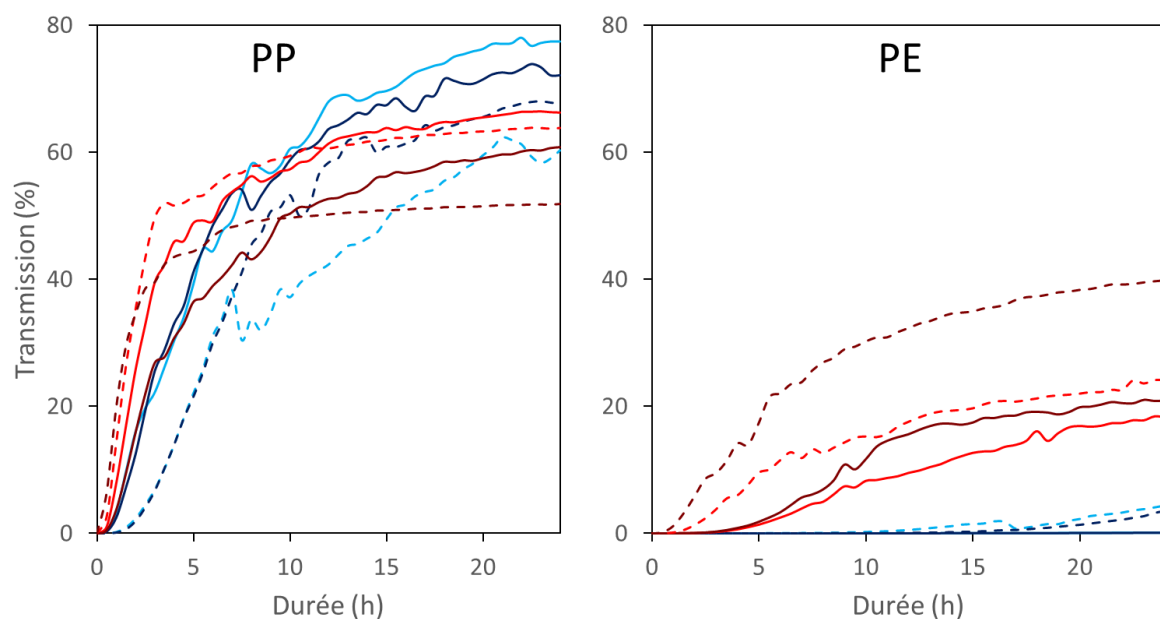


Figure 4.21 : Suivi de la transmission des solutions de protéine après 72 h de mise en contact des microparticules de plastique vieillis dans des solutions de BSA (en bleu) et d'hémoglobine (en rouge) de concentration 100 mg/L (en clair) et 700 mg/L (en foncé) pour le PP (à gauche) et pour le PE (à droite).

Les courbes obtenues pour les microparticules de plastique non vieillis sont indiquées en pointillés (mêmes couleurs).

Comme dans le cas des microparticules de plastique non vieillis, nous pouvons interpréter ces vitesses de crémage à partir de la loi de Stokes (voir chapitre 3, paragraphe 4). L'augmentation plus rapide de la transmission pour les microparticules de PP vieillis que pour les microparticules de PE vieillis s'explique donc une fois de plus par la plus faible taille de ces dernières.

Dans le cas du polypropylène nous observons une légère augmentation de la vitesse de crémage pour les microparticules de plastique vieillis, en particulier aux temps longs. Puisque la taille des microparticules n'a pas été modifiée au cours de leur vieillissement, ceci peut indiquer une corona de plus grande taille sur les microparticules de polypropylène vieillis. Une plus grande taille de la corona serait également en accord avec la plus grande valeur de m_{∞} calculée à partir des isothermes d'adsorption de l'hémoglobine sur les microparticules de plastique vieillis. Il s'agit donc d'un argument supplémentaire pour suggérer que la présence d'atomes d'oxygène à la surface des

microparticules de plastique influence la conformation des protéines adsorbées. Comme pour les isothermes d'adsorption, cette observation peut également s'expliquer par l'adsorption d'agrégats de protéine qui résulterait en la formation d'objets de plus grande taille.

Inversement, dans le cas des microparticules de polyéthylène vieilles, nous observons une plus faible vitesse de crémage pour les microparticules de plastique vieilles que pour les microparticules de plastique non vieilles. Cette observation est d'autant plus inattendue que nous avons observé une augmentation du diamètre des microparticules de polyéthylène lors de leur vieillissement, de 4,2 μm à 5,8 μm . La diminution de la vitesse de crémage malgré l'augmentation du rayon des microparticules pourrait s'expliquer par une augmentation de leur densité, diminuant la valeur de $\Delta\rho$ dans l'équation de Stokes. Il a été montré que le vieillissement du polyéthylène peut augmenter la cristallinité du polymère^{31,32}, et donc sa densité, ce qui expliquerait nos résultats.

Pour chaque protéine et chaque plastique étudié, l'influence de la concentration en protéine sur la vitesse de sédimentation est minime.

L'évolution de la rétrodiffusion a également été suivie, et les courbes ainsi obtenues sont représentées Figure 4.22.

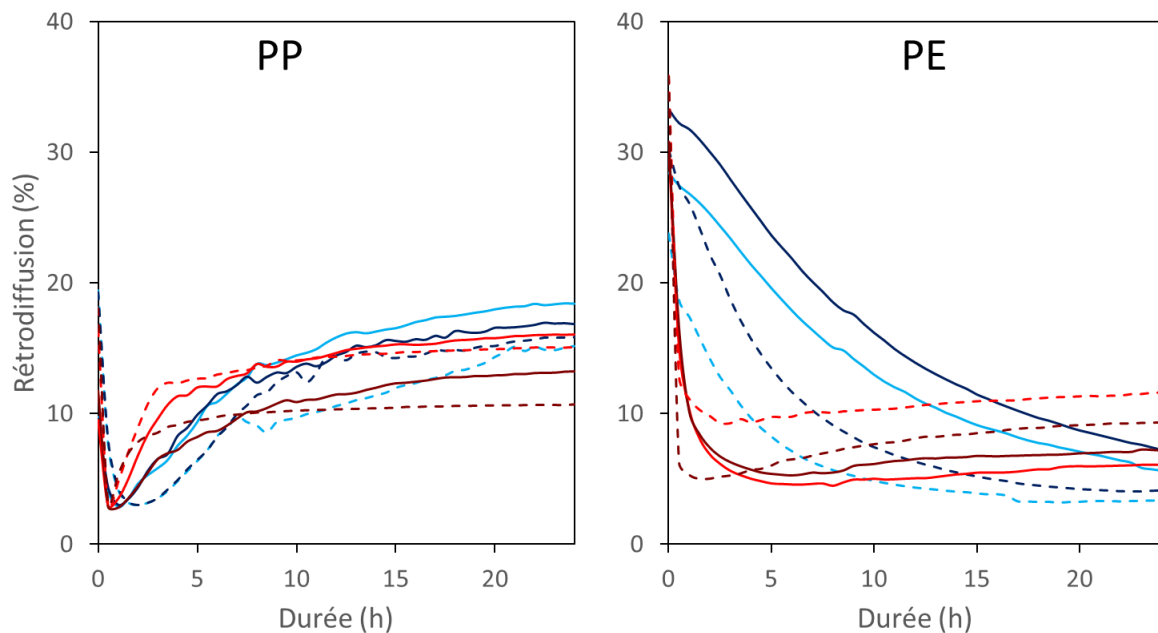


Figure 4.22 : Suivi de la rétrodiffusion des solutions de protéine après 72 h de mise en contact des microparticules de plastique vieilles dans des solutions de BSA (en bleu) et d'hémoglobine (en rouge) de concentration 100 mg/L (en clair) et 700 mg/L (en foncé) pour le PP (à gauche) et pour le PE (à droite).

Les courbes obtenues pour les microparticules de plastique non vieilles sont indiquées en pointillés (mêmes couleurs).

Les courbes d'évolution de la rétrodiffusion des solutions sont similaires à celles observées avec les microparticules de plastique non vieilles. En particulier, comme expliqué dans le paragraphe 4 du chapitre 3, nous observons une agrégation actuellement inexpliquée des protéines en présence de microparticules de polypropylène vieilli et de l'hémoglobine en présence de microparticules de polyéthylène vieilli après le début du crémage.

D'une façon générale, nous observons que les différences de comportement observées lors du passage d'un plastique non vieilli à un plastique vieilli sont moins importantes que celles observées lors du

changement de la protéine en solution. Ceci montre que la couronne protéique a un rôle plus important que le caractère vieilli des plastiques pour leur stabilisation en solution.

Nous observons également que l'influence du vieillissement des microparticules de plastique sur les courbes mesurées au turbiscan est beaucoup moins importante que l'influence sur les isothermes d'adsorption. Ceci indique que le vieillissement des microparticules de plastique a une plus forte influence sur l'affinité des protéines pour le plastique que sur la stabilisation des microparticules en solution par les protéines. Cette conclusion est cohérente puisque l'affinité des protéines pour les microparticules est liée aux charges de surface, tandis que la vitesse de crémage des microparticules dépend principalement de leurs dimensions.

4. Etat des protéines dans la corona

Afin d'étudier l'effet éventuel du vieillissement des microparticules de plastique sur les protéines adsorbées, nous avons réalisé des mesures d'imagerie Raman sur des microparticules de plastique vieilles après 72 heures de mise en contact dans des solutions d'hémoglobine à 1 g/L dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7,0.

La méthodologie suivie est la même que celle décrite dans le chapitre précédent, les acquisitions ont été réalisées sur les microparticules de plastique vieilles après mise en contact puis des spectres de référence ont été utilisés pour obtenir des composantes d'imagerie Raman. Nous avons utilisé les mêmes spectres de référence que lors des mesures sur les microparticules de plastique non vieilles (voir paragraphe 5 chapitre 3), puisque les microparticules de plastiques vieilles ont les mêmes spectres que celles-ci. Les images obtenues à partir de ces composantes sont rassemblées Figure 4.23. Une fois de plus, nous avons réalisé des mesures sur deux particules pour chaque plastique. Les images qui ne sont pas présentées ici, le sont en Annexe (Figure A.5).

Pour chaque composante d'intérêt, des spectres ont été analysés manuellement pour vérifier si la composante de l'image correspond bien à la présence de l'espèce associée ou à des artefacts lors de l'ajustement par le logiciel.

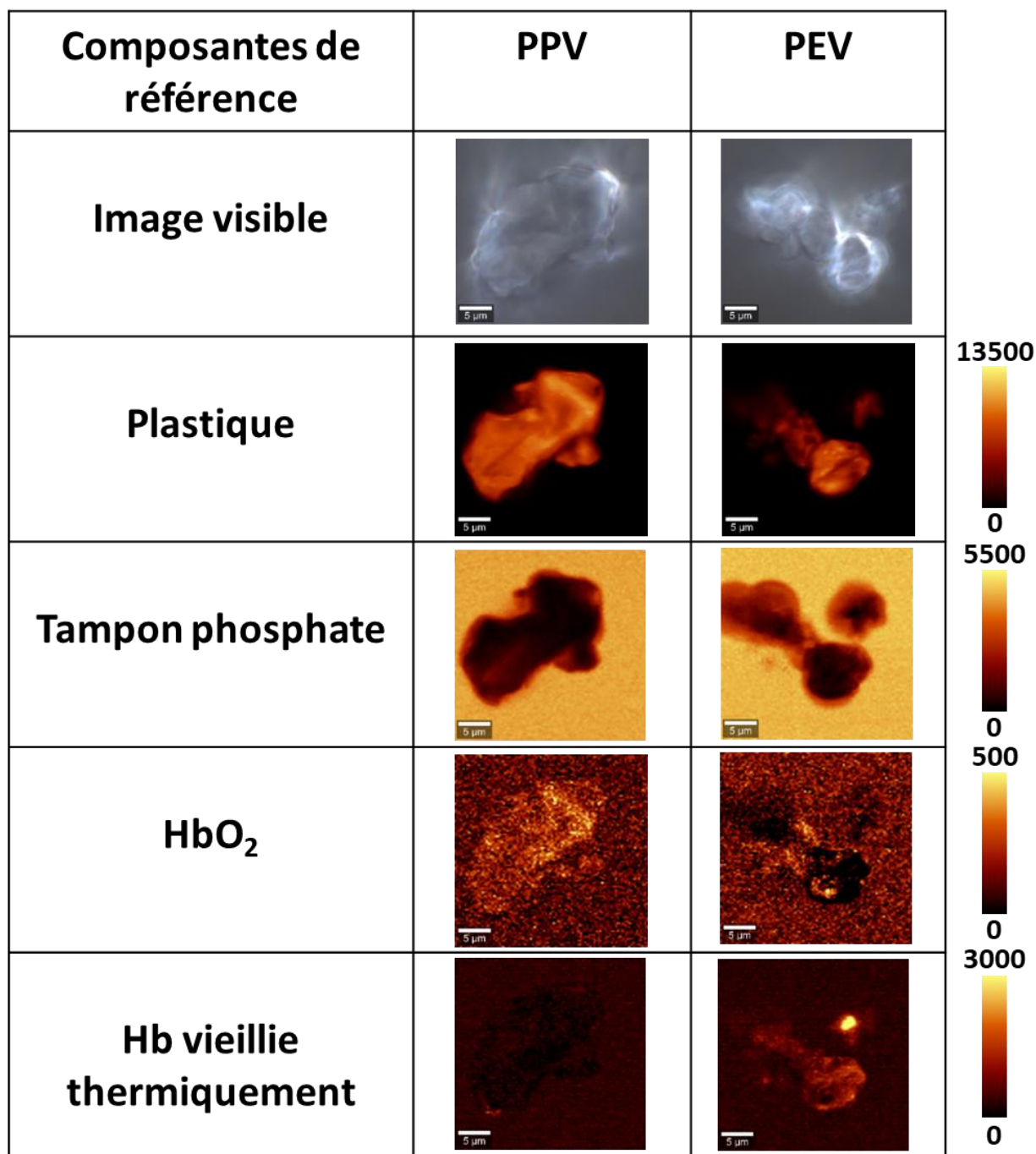


Figure 4.23 : Imagerie des composantes observées en spectroscopie Raman après 72 heures de mise en contact des microparticules de polypropylène vieilles (PPV) et des microparticules de polyéthylène vieilles (PEV) avec l'hémoglobine.

Comme dans le cas des microparticules de PP non vieilles, les résultats d'imagerie Raman suggèrent de plus la présence d'hémoglobine oxygénée sur l'ensemble de la surface des microparticules de PP vieilles. Nous avons donc observé les spectres mesurés au niveau des microparticules de PP, comme présenté Figure 4.24.

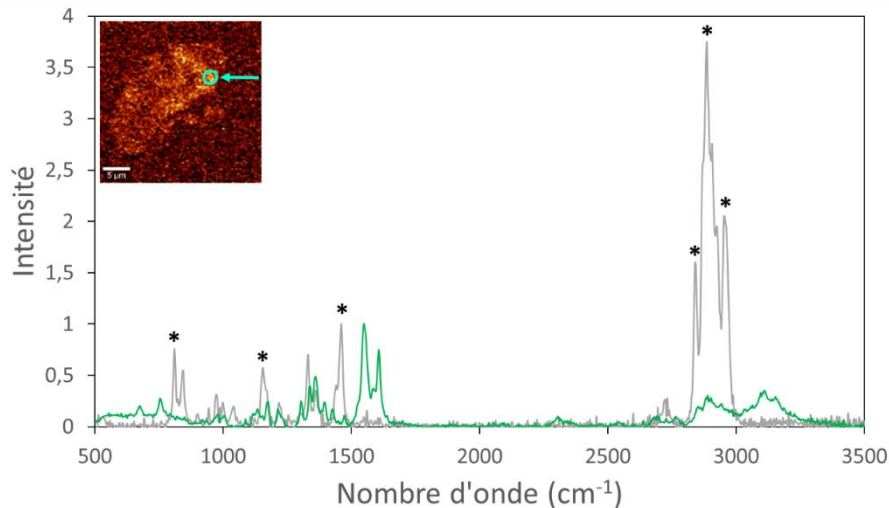


Figure 4.24 : Spectres Raman, en gris, mesuré en un point sur le PP vieilli (position indiquée en haut à gauche sur la composante 'Hb oxygénée'), et comparaison au spectre de référence de l'hémoglobine oxygénée (en vert). Les étoiles distinguent les pics majoritaires du PP.

Nous n'observons pas de signal correspondant à l'hémoglobine oxygénée sur les microparticules de PP vieilles, comme dans le cas des microparticules de PP non vieilles, il s'agit donc à nouveau d'un artefact lors de l'ajustement.

Sur les microparticules de PP vieilles nous observons globalement très peu d'hémoglobine, mais nous semblons avoir des traces d'hémoglobine dénaturée dans le coin inférieur droit de la microparticule, comme présenté Figure 4.25.

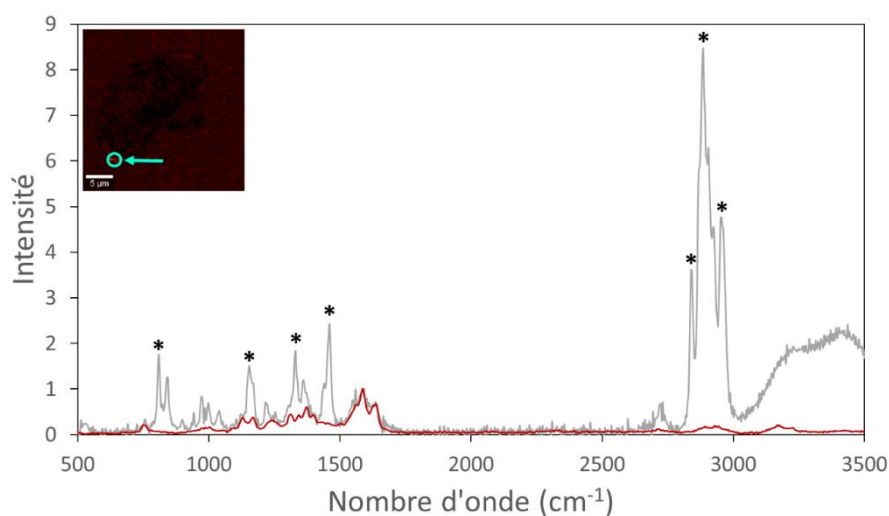


Figure 4.25 : Spectres Raman, en gris, mesuré en un point sur le PP vieilli (position indiquée en haut à gauche sur la composante 'Hb vieillie thermiquement'), et comparaison au spectre de référence de l'hémoglobine vieillie thermiquement (en rouge). Les étoiles distinguent les pics majoritaires du PP.

Cette zone correspond bien à de l'hémoglobine dénaturée, mais elle est de petite taille et d'une intensité relativement faible par rapport aux agrégats observés sur les microparticules de PE. Ceci est semblable à l'hémoglobine observée sur le PP après 48 heures de mise en contact (Figure 3.50).

Sur la microparticule de polyéthylène vieillis nous semblons avoir un agrégat d'hémoglobine dénaturée, visible Figure 4.26.

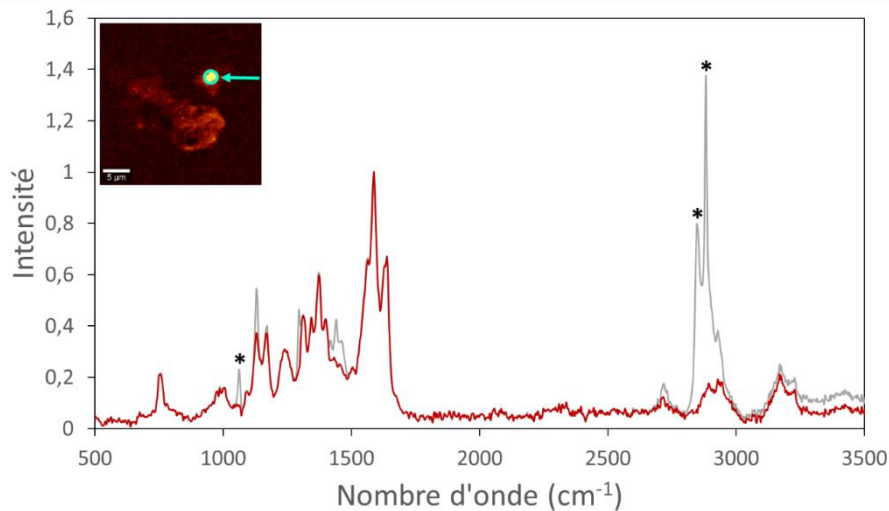


Figure 4.26 : Spectres Raman, en gris, mesuré en un point sur le PE vieilli (position indiquée en haut à gauche sur la composante 'Hb vieillie thermiquement'), et comparaison au spectre de référence de l'hémoglobine vieillie thermiquement (en rouge). Les étoiles distinguent les pics majoritaires du PE.

Une comparaison des spectres confirme la présence d'un agrégat d'hémoglobine dénaturée. Ce type d'agrégat est donc observé à la surface des microparticules de PE qu'elles soient vieilles ou non.

En plus de cet agrégat, la composante obtenue indique la présence d'hémoglobine dénaturée sur l'ensemble de la microparticule. Afin de vérifier cela nous avons donc comparé le spectre mesuré sur la microparticule au spectre de référence de l'hémoglobine dénaturée, comme représenté Figure 4.27.

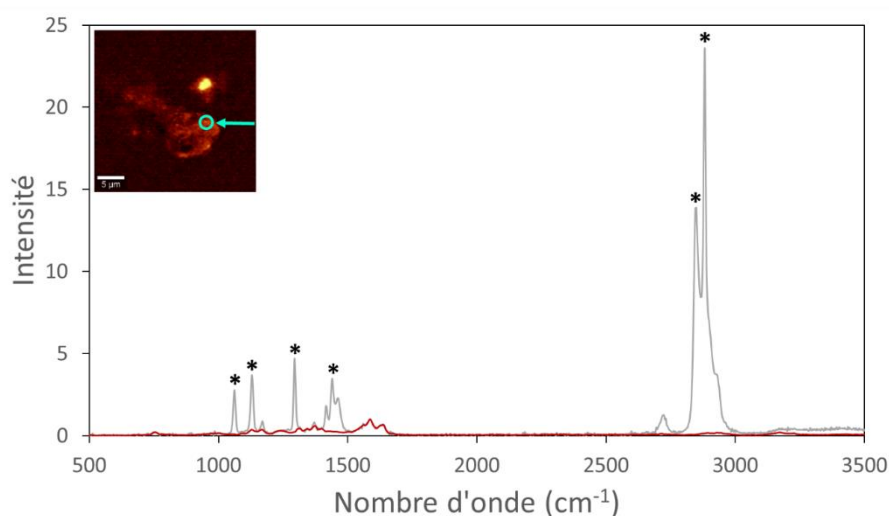


Figure 4.27 : Spectres Raman, en gris, mesuré en un point sur le PE vieilli (position indiquée en haut à gauche sur la composante 'Hb vieillie thermiquement'), et comparaison au spectre de référence de l'hémoglobine vieillie thermiquement (en rouge). Les étoiles distinguent les pics majoritaires du PE.

L'observation du spectre confirme la présence d'hémoglobine dénaturée, en particulier par la présence de signal à 1600 cm^{-1} . Comme dans le cas des microparticules de PE non vieilles, nous observons donc une couche d'hémoglobine dénaturée sur l'ensemble du plastique, qui peut correspondre à la corona ou à des débuts d'agrégation.

Sur la microparticule de PE vieillie nous semblons également observer la présence d'hémoglobine oxygénée, ce que nous avons cherché à confirmer en observant le spectre présenté Figure 4.28.

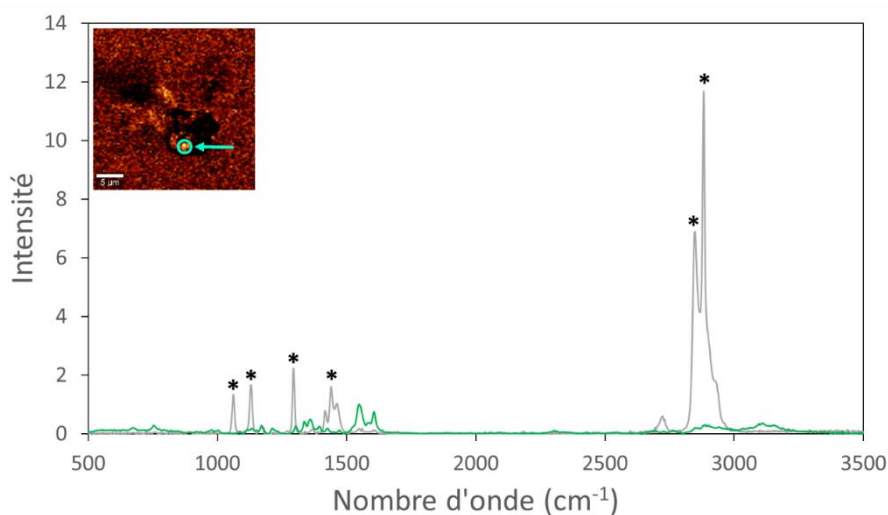


Figure 4.28 : Spectres Raman, en gris, mesuré en un point sur le PE vieilli (position indiquée en haut à gauche sur la composante 'Hb oxygénée'), et comparaison au spectre de référence de l'hémoglobine oxygénée (en vert). Les étoiles distinguent les pics majoritaires du PE.

Bien que le signal soit faible, nous observons la forme caractéristique du spectre de l'hémoglobine oxygénée autour de 1600 cm^{-1} , malgré l'absence du signal de l'eau confirmant que l'hémoglobine observée se trouve bien sur le plastique. Toutefois, l'intensité du signal de l'hémoglobine étant faible il est difficile de confirmer s'il s'agit d'hémoglobine oxygénée ou dénaturée. Cette composante se trouve spécifiquement sur les zones de la microparticule sur lesquelles nous n'observons pas la composante correspondant à la référence de l'hémoglobine dénaturée. Ceci peut indiquer que de l'hémoglobine est restée oxygénée après son adsorption sur certaines parties de la surface ou que l'intensité du signal est trop faible pour permettre au logiciel de différencier l'hémoglobine dénaturée et l'hémoglobine oxygénée. Pour confirmer cette observation, il serait intéressant de réaliser des mesures d'imagerie Raman à plus haute résolution centrées autour de 1600 cm^{-1} . Réaliser des mesures de tonométrie sur l'hémoglobine adsorbée pourrait aussi permettre de différencier l'oxyhémoglobine et la méthémoglobine. Pour cela il serait nécessaire de mettre en place un protocole permettant de mesurer l'activité de l'hémoglobine adsorbée en dehors de la solution, sans sécher cette hémoglobine puisque cela causerait son oxydation et donc la formation de méthémoglobine.

En imagerie Raman, nous observons globalement le même comportement de l'hémoglobine à la surface des microparticules de plastique vieilles qu'à la surface des microparticules de plastique non vieilles, que l'on considère les microparticules de PE ou de PP. L'exception est la présence éventuelle d'hémoglobine oxygénée sur les microparticules de PE vieilles, qui reste à confirmer par des mesures complémentaires.

Synthèse du chapitre

Les microparticules de PP ont été vieilles en étant laissées pendant 2 mois à 80°C.

Les microparticules de PE ont été vieilles en étant irradiées par 4 irradiations électroniques successives de 500 kGy chacune.

Le vieillissement n'a pas causé de modifications notables de la surface spécifique des microparticules de plastique. Dans le cas des microparticules de PP, le vieillissement a causé une homogénéisation des microparticules, observable par analyse du spectre SAXS. Dans le cas des microparticules de PE, le vieillissement a causé une augmentation du diamètre des microparticules, indiquant une possible agrégation de celles-ci.

Les comparaisons des résultats obtenus suite aux expériences sur les microparticules de plastique vieilles sont regroupées Tableau 4.6.

| Méthode | PPV/PEV | PPV/PP | PEV/PE |
|--|--|---|--|
| SAXS | La surface spécifique des microparticules de PPV (1,2 m ² /g) est inférieure à celle des microparticules de PEV (2,4 m ² /g). | Les microparticules de PP sont plus homogènes après vieillissement. | Nous n'observons pas de différences notables. |
| Spectres Raman | Le spectre Raman de PPV est plus complexe que celui de PEV. | Nous n'observons pas de différences notables. | Nous n'observons pas de différences notables. |
| XPS | La quantité d'atomes d'oxygène en surface est la même pour les deux plastiques (2,6% de la quantité d'atomes de carbone). Seuls des groupements carbonyle sont observés sur les microparticules de PPV, tandis que les microparticules de PEV contiennent des groupements carbonyle et ester. | Le signal du carbone est légèrement déplacé vers les hautes énergies de liaison, et le pic est fortement élargie. | La quantité de groupements ester est légèrement augmentée par le vieillissement (de 0,5% de la quantité d'atomes de carbone à 0,7%), tandis que la quantité de groupements carbonyle est fortement augmentée (de 0,4% à 1,9%). |
| Isothermes d'adsorption | Nous observons une plus forte affinité des protéines, et une plus grande quantité adsorbée, pour les microparticules de PPV. | Seule l'isotherme de l'hémoglobine est exploitable pour PPV, montrant une augmentation de la quantité de protéine adsorbée et une diminution très importante de l'affinité. | Seule l'isotherme de l'hémoglobine est exploitable pour PEV, montrant une augmentation de la quantité de protéine adsorbée et une diminution très importante de l'affinité. |
| Turbiscan | La vitesse de crémage est plus importante pour les microparticules de PPV, dont le diamètre est plus important. | La vitesse de crémage est légèrement plus faible pour les microparticules de PPV, pouvant indiquer une diminution de la densité des microparticules après vieillissement. | La vitesse de crémage est légèrement plus importante pour les microparticules de PEV, pouvant indiquer une corona de plus grande taille. |
| Imagerie Raman avec HbO₂ | De l'hémoglobine dénaturée (agrégats + couche) est observée uniquement sur les microparticules de PEV. | Nous n'observons pas de différences notables. | Nous observons une présence possible d'hémoglobine oxygénée à la surface des microparticules vieilles, qui reste à confirmer. |

Tableau 4.6 : Comparaison des résultats obtenus suite aux expériences sur les microparticules de plastique vieilles.

Bibliographie

- (1) Ren, Z.; Gui, X.; Xu, X.; Zhao, L.; Qiu, H.; Cao, X. Microplastics in the Soil-Groundwater Environment: Aging, Migration, and Co-Transport of Contaminants – A Critical Review. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *419*, 126455. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126455>.
- (2) Liu, P.; Qian, L.; Wang, H.; Zhan, X.; Lu, K.; Gu, C.; Gao, S. New Insights into the Aging Behavior of Microplastics Accelerated by Advanced Oxidation Processes. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53* (7), 3579–3588. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00493>.
- (3) Liu, Z.; Zhu, Y.; Lv, S.; Shi, Y.; Dong, S.; Yan, D.; Zhu, X.; Peng, R.; Keller, A. A.; Huang, Y. Quantifying the Dynamics of Polystyrene Microplastics UV-Aging Process. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2021**, *acs.estlett.1c00888*. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.1c00888>.
- (4) Qiu, X.; Ma, S.; Zhang, J.; Fang, L.; Guo, X.; Zhu, L. Dissolved Organic Matter Promotes the Aging Process of Polystyrene Microplastics under Dark and Ultraviolet Light Conditions: The Crucial Role of Reactive Oxygen Species. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, *56* (14), 10149–10160. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c03309>.
- (5) Lundqvist, M.; Stigler, J.; Elia, G.; Lynch, I.; Cedervall, T.; Dawson, K. A. Nanoparticle Size and Surface Properties Determine the Protein Corona with Possible Implications for Biological Impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (38), 14265–14270. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805135105>.
- (6) Liu, J.; Zhang, T.; Tian, L.; Liu, X.; Qi, Z.; Ma, Y.; Ji, R.; Chen, W. Aging Significantly Affects Mobility and Contaminant-Mobilizing Ability of Nanoplastics in Saturated Loamy Sand. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53* (10), 5805–5815. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00787>.
- (7) Bain, A.; Preston, T. C. Hygroscopicity of Microplastic and Mixed Microplastic Aqueous Ammonium Sulfate Systems. *Environ. Sci. Technol.* **2021**. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c04272>.
- (8) Albertsson, A.-C.; Andersson, S. O.; Karlsson, S. The Mechanism of Biodegradation of Polyethylene. *Polym. Degrad. Stab.* **1987**, *18* (1), 73–87. [https://doi.org/10.1016/0141-3910\(87\)90084-X](https://doi.org/10.1016/0141-3910(87)90084-X).
- (9) Gewert, B.; Plassmann, M. M.; MacLeod, M. Pathways for Degradation of Plastic Polymers Floating in the Marine Environment. *Environ. Sci. Process. Impacts* **2015**, *17* (9), 1513–1521. <https://doi.org/10.1039/C5EM00207A>.
- (10) Wu, X.; Zhao, X.; Chen, R.; Liu, P.; Liang, W.; Wang, J.; Teng, M.; Wang, X.; Gao, S. Wastewater Treatment Plants Act as Essential Sources of Microplastic Formation in Aquatic Environments: A Critical Review. *Water Res.* **2022**, *221*, 118825. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118825>.
- (11) Almond, J.; Sugumaar, P.; Wenzel, M. N.; Hill, G.; Wallis, C. Determination of the Carbonyl Index of Polyethylene and Polypropylene Using Specified Area under Band Methodology with ATR-FTIR Spectroscopy. *E-Polym.* **2020**, *20* (1), 369–381. <https://doi.org/10.1515/epoly-2020-0041>.
- (12) Kruczala, K.; Varghese, B.; Bokria, J. G.; Schlick, S. Thermal Aging of Heterophasic Propylene–Ethylene Copolymers: Morphological Aspects Based on ESR, FTIR, and DSC. *Macromolecules* **2003**, *36* (6), 1899–1908. <https://doi.org/10.1021/ma025700y>.
- (13) Mowery, D. M.; Assink, R. A.; Derzon, D. K.; Klamo, S. B.; Clough, R. L.; Bernstein, R. Solid-State ¹³C NMR Investigation of the Oxidative Degradation of Selectively Labeled Polypropylene by Thermal

Aging and γ -Irradiation. *Macromolecules* **2005**, *38* (12), 5035–5046. <https://doi.org/10.1021/ma047381b>.

(14) Law, A.; Simon, L.; Lee-Sullivan, P. Effects of Thermal Aging on Isotactic Polypropylene Crystallinity. *Polym. Eng. Sci.* **2008**, *48* (4), 627–633. <https://doi.org/10.1002/pen.20987>.

(15) Zamfirova, G.; Pereña, J. M.; Benavente, R.; Pérez, E.; Cerrada, M. L.; Nedkov, E. Mechanical Properties of Ultra High Molecular Weight Polyethylene Obtained with Different Cocatalyst Systems. *Polym. J.* **2002**, *34* (3), 125–131. <https://doi.org/10.1295/polymj.34.125>.

(16) Kotek, J.; Kelnar, I.; Baldrian, J.; Raab, M. Structural Transformations of Isotactic Polypropylene Induced by Heating and UV Light. *Eur. Polym. J.* **2004**, *40* (12), 2731–2738. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.07.017>.

(17) Murray, K. A.; Kennedy, J. E.; McEvoy, B.; Vrain, O.; Ryan, D.; Higginbotham, C. L. The Effects of High Energy Electron Beam Irradiation on the Thermal and Structural Properties of Low Density Polyethylene. *Radiat. Phys. Chem.* **2012**, *81* (8), 962–966. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2011.09.011>.

(18) López, G. P.; Castner, D. G.; Ratner, B. D. XPS O 1s Binding Energies for Polymers Containing Hydroxyl, Ether, Ketone and Ester Groups. *Surf Interface Anal* *17*, 267–272. <https://doi.org/10.1002/sia.740170508>.

(19) Papet, G.; Jirackova-Audouin, L.; Verdu, J. Diffusion Controlled Radiochemical Oxidation of Low Density Polyethylene—I. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part C Radiat. Phys. Chem.* **1987**, *29* (1), 65–69. [https://doi.org/10.1016/1359-0197\(87\)90063-4](https://doi.org/10.1016/1359-0197(87)90063-4).

(20) Gutiérrez, G.; Fayolle, F.; Régnier, G.; Medina, J. Thermal Oxidation of Clay-Nanoreinforced Polypropylene. *Polym. Degrad. Stab.* **2010**, *95* (9), 1708–1715. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.05.020>.

(21) Fuller, J.; White, D.; Yi, H.; Colley, J.; Vickery, Z.; Liu, S. Analysis of Volatile Compounds Causing Undesirable Odors in a Polypropylene - High-Density Polyethylene Recycled Plastic Resin with Solid-Phase Microextraction. *Chemosphere* **2020**, *260*, 127589. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127589>.

(22) Pfohl, P.; Wagner, M.; Meyer, L.; Domercq, P.; Praetorius, A.; Hüffer, T.; Hofmann, T.; Wohlleben, W. Environmental Degradation of Microplastics: How to Measure Fragmentation Rates to Secondary Micro- and Nanoplastic Fragments and Dissociation into Dissolved Organics. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, acs.est.2c01228. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c01228>.

(23) Mairesse, M.; Petit, J. M.; Cheron, J.; Falcy, M. Produits de Dégradation Thermique Des Matières Plastiques, 1999. <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ND%202097>.

(24) Dusa, A.; Kaylor, J.; Edridge, S.; Bodner, N.; Hong, D.-P.; Fink, A. L. Characterization of Oligomers during R-Synuclein Aggregation Using Intrinsic Tryptophan Fluorescence. 9.

(25) Fink, A. L. The Aggregation and Fibrillation of α -Synuclein. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39* (9), 628–634. <https://doi.org/10.1021/ar050073t>.

(26) Mohammad-Beigi, H.; Zanganeh, M.; Scavenius, C.; Eskandari, H.; Farzadfar, A.; Shojaosadati, S. A.; Enghild, J. J.; Otzen, D. E.; Buell, A. K.; Sutherland, D. S. A Protein Corona Modulates Interactions of α -Synuclein with Nanoparticles and Alters the Rates of the Microscopic Steps of Amyloid Formation. *ACS Nano* **2022**, *16* (1), 1102–1118. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c08825>.

- (27) Adamczyk, Z.; Weroński, P. Application of the DLVO Theory for Particle Deposition Problems. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1999**, *83* (1–3), 137–226. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(99\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(99)00009-3).
- (28) 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>.
- (29) Roach, P.; Farrar, D.; Perry, C. C. Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (22), 8168–8173. <https://doi.org/10.1021/ja042898o>.
- (30) 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>.
- (31) Rodriguez, A. K.; Mansoor, B.; Ayoub, G.; Colin, X.; Benzerga, A. A. Effect of UV-Aging on the Mechanical and Fracture Behavior of Low Density Polyethylene. *Polym. Degrad. Stab.* **2020**, *180*, 109185. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109185>.
- (32) Shi, X.; Wang, J.; Stapf, S.; Mattea, C.; Li, W.; Yang, Y. Effects of Thermo-Oxidative Aging on Chain Mobility, Phase Composition, and Mechanical Behavior of High-Density Polyethylene. *Polym. Eng. Sci.* **2011**, *51* (11), 2171–2177. <https://doi.org/10.1002/pen.21988>.

Chapitre 5

Etude par simulation des interactions de peptides modèles avec des nanoplastiques

Afin de compléter nos résultats expérimentaux nous avons réalisé des simulations. L'objectif final de celles-ci est de caractériser les interactions entre protéines et nanoplastiques, et nous avons pour cela procédé par étapes. Nous avons commencé par générer des acides aminés puis des peptides variés, que nous avons mis en contact avec une même nanoparticule de polyéthylène (PE) pour estimer l'impact des différents acides aminés sur les interactions. Nous avons travaillé sur une nanoparticule, et non sur une microparticule, afin de garder des temps de calcul raisonnables mais également parce que, dans le cas d'un peptide, la taille d'une microparticule par rapport à celui-ci serait suffisamment grande pour être considérée comme une surface plane. Lors de ces simulations nous avons de plus testé deux modèles d'eau différents.

Ensuite, avec l'aide d'une stagiaire de master 2, nous avons généré des nanoparticules de PE différentes que nous avons mises en présence de peptides, en travaillant sur un nombre limité de peptides pour permettre la réalisation de triplicatas et ainsi estimer la répétabilité des simulations. La réalisation de ces simulations exploratoires nous a apporté une compréhension nécessaire pour commencer des simulations plus complexes. Celles-ci comprennent la mise en contact d'un plus grand nombre de peptides avec une nanoparticule de plastique pour former une corona, et la réalisation d'une plus grande nanoparticule de plastique suivie de sa mise en contact avec une protéine.

Comme pour les expériences, les simulations sur les peptides ont été réalisées avec des nanoparticules de plastique non vieilles et avec des nanoparticules vieilles, le vieillissement correspondant ici à l'ajout de groupements carbonyle dans le polymère. Toutefois seules des nanoparticules de polyéthylène (PE) ont été générées. Générer du PP pour des simulations nécessite de savoir si le polymère est isotactique, syndiotactique ou atactique (Figure 5.1), les propriétés du polymère dépendant de sa tacticité¹.

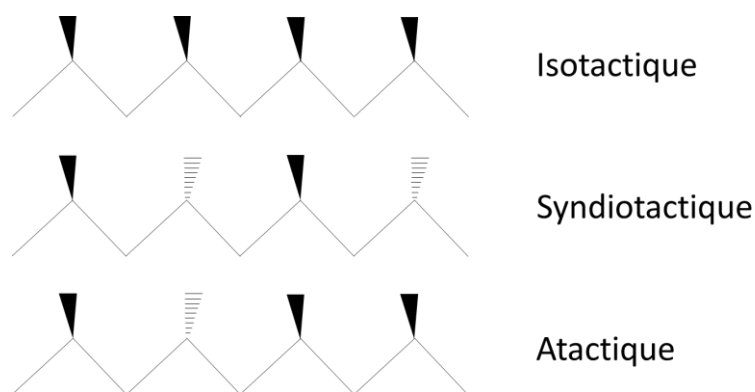


Figure 5.1 : Représentation des différentes formes de tacticité du polypropylène.

Nos mesures de DRX, présentées dans le paragraphe 1.3 du chapitre 3, montrent que le polypropylène que nous avons utilisé est isotactique. Pour faire des simulations portant sur des nanoparticules de PP comparables aux particules utilisées pour nos expériences, il faudrait donc générer du PP isotactique. De telles simulations pourront être réalisées à l'avenir au CEA, mais dans le cadre de cette thèse nous

avons fait le choix de travailler sur des nanoparticules de PE. Les simulations que nous avons réalisées ont nécessité l'utilisation de 70 000 heures GPU et 500 000 heures CPU sur Topaze (voir chapitre 2 paragraphe 7.3.).

Une séquence peptidique, générée *in silico*, a été sélectionnée pour les simulations. La séquence a pour but de maximiser les degrés de liberté de l'acide aminé étudié en limitant la gêne stérique autour de cet acide aminé.

Une fois les nanoparticules de plastique et les peptides générés, l'eau est ajoutée avec si nécessaire des ions Na⁺ ou Cl⁻ pour neutraliser le système, puis nous avons suivi l'évolution de plusieurs grandeurs pour caractériser les mises en contact. En particulier, nous avons observé l'évolution du rayon de giration du peptide avant et après contact pour déterminer l'effet de l'adsorption sur la forme des différents peptides, et nous avons également estimé le déplacement du peptide à la surface du plastique. Nous avons aussi comptabilisé le nombre de contact avec les différents acides aminés pour déterminer lesquels ont la plus forte affinité pour le plastique.

En plus des calculs, nous avons réalisé des expériences avec deux des peptides testés en simulation. La quantité de peptides à notre disposition étant très limitée (20 mg de chaque peptide) nous avons uniquement mesuré des isothermes d'adsorption sur les microparticules de plastique non vieilles.

1. Calculs de dynamique moléculaire sur un système nanoparticule-peptide

1.1. Premières simulations, systèmes explorés et paramètres utilisés

Les premières simulations ont été réalisées avec un ordinateur local. Les simulations permettent d'étudier les interactions entre particules à l'échelle atomique, nous allons donc utiliser cette méthode pour analyser les interactions de nanoparticules de plastique avec différents acides aminés. Puisque ces premières simulations sont exploratoires, nous avons dans un premier temps utilisé des peptides simples et de petite taille, afin d'obtenir des systèmes nécessitant moins de temps de calcul et des résultats plus simples à analyser. Nous avons tout de même privilégié l'étude de peptides à celle d'acides aminés seuls pour avoir des systèmes plus représentatifs des systèmes biologiques réels.

La séquence peptidique a été choisie afin de pouvoir comparer l'influence d'un acide aminé particulier. Cette séquence est :

SGGXGGXGGXGGS, où X est l'acide aminé étudié.

G est le plus petit acide aminé, et S est le plus petit acide aminé polaire, cette formule permet donc à l'acide aminé étudié (X) d'interagir au maximum avec le nanoplastique, en limitant la gêne stérique et la limitation de ses degrés de liberté par le reste du peptide. Cette séquence a de plus un intérêt biologique, la répétition XGG étant retrouvée dans des domaines de liaison d'ARN, et des séquences similaires ont déjà été étudiées au laboratoire².

Nous avons généré un peptide suivant cette formule pour chacun des 20 acides aminés naturels afin d'observer comment leurs différentes propriétés, résumées Figure 5.2, affectent leurs interactions avec la nanoparticule de PE.

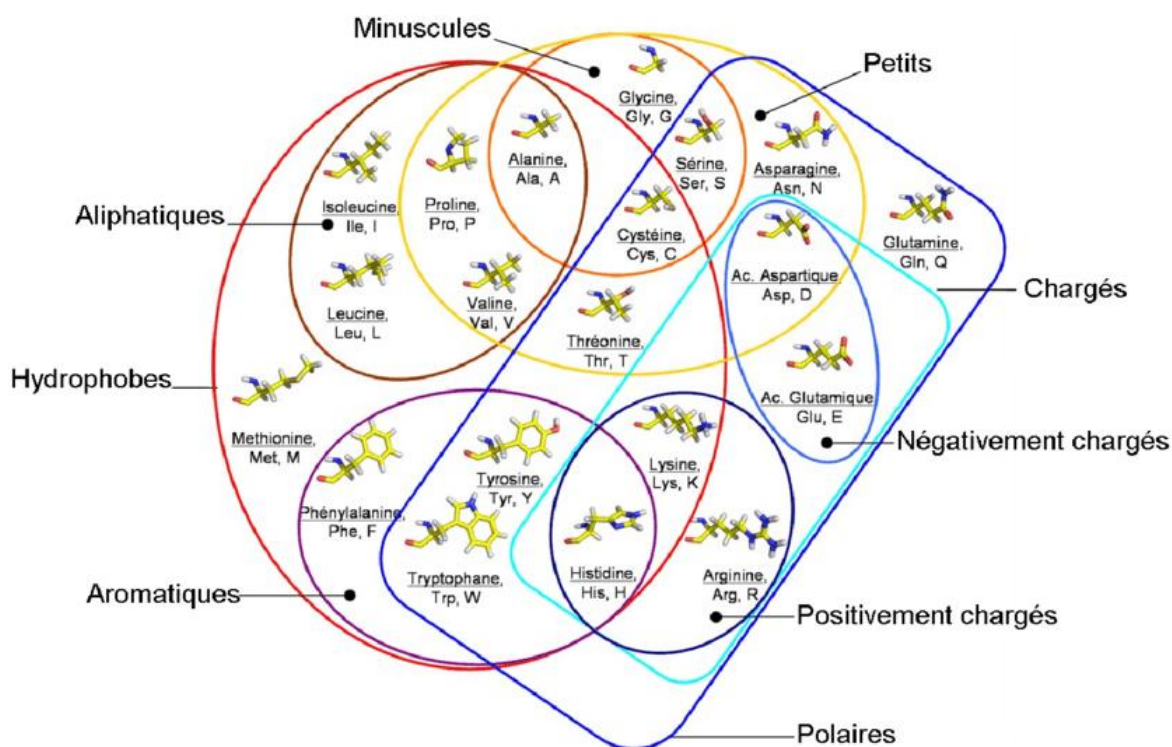


Figure 5.2 : Diagramme de Venn des 20 acides aminés naturels, tiré de *Structural studies of new therapeutic targets of HVMV revealed by bensimidazoles derivatives ribonucleoside*³.

Pour les simulations nous générons une nanoparticule de polyéthylène, la taille des microplastiques étant trop importante pour pouvoir simuler des systèmes en une durée raisonnable. Il est donc important de considérer que les propriétés de ces nanoplastiques pourraient différer de celles des microplastiques lors de l'analyse de nos résultats. Nous n'avons pas eu accès à des nanoparticules de PE ou de PP pour nos expériences, mais de futurs travaux pourraient être réalisés sur des nanoparticules pour permettre une comparaison plus directe des résultats de simulation.

1.1.1. Champs de force et modèles d'eau

Dans la littérature, ce type de système n'a commencé à être simulé que récemment, et plusieurs champs de force sont actuellement utilisés⁴. Il existe des champs de force très spécifiques utilisés par une communauté « matériaux » pour étudier des systèmes tels que des polymères, et d'autres champs de force utilisés spécifiquement par une communauté « protéine » pour étudier des systèmes tels que des peptides. Puisque notre système réunit ces deux éléments nous utilisons OPLS-AA, qui est un champ de force classique très généraliste⁵⁻⁷. Comme nous visons principalement à étudier les interactions avec des acides aminés, il n'était pas approprié d'utiliser des champs de force plus spécialisés qui visent à maintenir les structures tridimensionnelles des protéines.

La surface du plastique est hydrophobe tandis que le peptide est hydrophile, le rôle de l'hydratation et des interactions hydrophobes est donc central⁸⁻¹¹. Pour étudier l'importance du modèle d'eau nous avons donc utilisé deux modèles classiques, le modèle SPC/E¹² et le modèle TIP3P¹³. Les paramètres correspondants à ces modèles¹⁴ sont regroupés Tableau 5.1.

| Modèle | SPC/E | TIP3P |
|----------------------|--------|--------|
| d_{OH} (Å) | 1,0 | 0,9572 |
| θ_{H-O-H} (°) | 109,47 | 104,52 |
| σ (Å) | 3,1656 | 3,1506 |
| (ϵ/k) (K) | 78,20 | 76,54 |
| q_H (e) | 0,4238 | 0,417 |

Tableau 5.1 : Paramètres des modèles d'eau SPC/E et TIP3P.

d_{OH} correspond à la distance moyenne entre l'atome d'oxygène et les atome d'hydrogène, θ_{H-O-H} correspond à l'angle entre les deux liaisons O-H, σ et ϵ correspondent aux paramètres du potentiel de Lennard-Jones et q_H correspond à la charge des atomes d'hydrogène (les atomes d'oxygène sont chargés de sorte à neutraliser le système).

Ces différences entre les paramètres utilisés causent des différences notables entre les propriétés de ces modèles d'eau. En particulier l'eau SPC/E reproduit précisément la densité de l'eau tout en sous-estimant sa constante diélectrique¹⁵, tandis que l'eau TIP3P reproduit la constante diélectrique précisément tout en sous-estimant la densité du liquide¹³. Le modèle TIP3P peut également surestimer le facteur de diffusion des espèces à cause des plus faibles interactions entre les molécules d'eau¹⁶. Une différence particulièrement importante dans le cas des systèmes que nous étudions est que des interactions hydrophobes plus fortes sont observées dans l'eau SPC/E, ce qui résulte des plus fortes interactions entre les molécules d'eau¹⁷.

1.1.2. Génération des nanoplastiques et peptides

Nos premières simulations ont été réalisées sur des nanoparticules de PE non-vieillies. Au cours de cette partie, nous avons établi comment préparer des systèmes adaptés pour les simulations et quels paramètres analyser pour en tirer les informations importantes.

Nous avons généré des chaînes de polymères constituées de résidus PE (Figure 5.3) dont le nombre a été choisie pour obtenir une nanoparticule d'environ 3 nm de rayon. Au départ, le but était de pouvoir utiliser cette même nanoparticule pour les mises en contact avec les protéines, nous avons donc choisi ce rayon pour que la taille de la particule soit du même ordre de grandeur que celle d'une protéine. La taille relativement grande de la particule lui permet également de présenter différentes morphologies qui seront analysées par la suite.

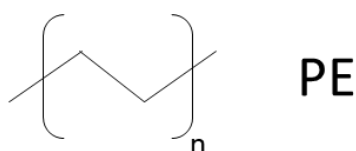


Figure 5.3 : Formule topologique du résidu polyéthylène (PE).

Nous avons généré une première nanoparticule de PE non vieillie en utilisant CHARMM-GUI pour préparer un melt¹⁸ de 9 chaînes de polymères, chacune composée de 576 résidus PE en suivant le protocole décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes et résumé Figure 5.4. Ce melt correspond à une étape de chauffage réalisée en absence d'eau pour replier les chaînes de polymère pour obtenir directement une nanoparticule. Nous avons décidé de partir de 9 chaînes pour des raisons techniques,

puisque commencer des simulations avec une seule chaîne carbonée de grande taille nécessiterait d'établir un système de taille déraisonnable pour le melt ou le recuit simulé initial.

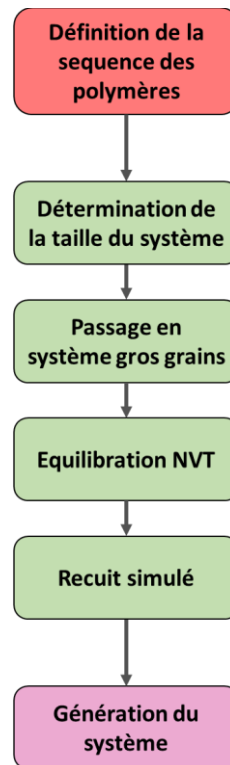


Figure 5.4 : Protocole suivi pour préparer une nanoparticule de PE avec CHARMM-GUI.

Après avoir suivi ce protocole le système obtenu n'a pas formé une nanoparticule stable. Comme nous pouvons le voir Figure 5.5, les différentes chaînes de PE semblent s'être repliées individuellement mais ne pas s'être agrégées entre elles. Pour terminer la préparation de la nanoparticule, un recuit simulé supplémentaire a donc été réalisé sur une station local. Pour cela, le système a été hydraté puis équilibré en température et pression dans l'eau en utilisant GROMACS¹⁹. Il a ensuite été soumise à un recuit simulé, dans l'eau SPC/E ou l'eau TIP3P, en utilisant le profil de température représenté Figure 5.5.

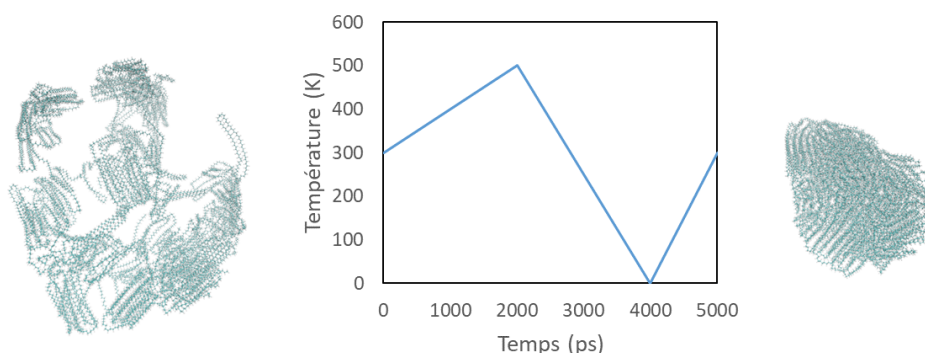


Figure 5.5 : A gauche, nanoparticule de PE obtenue en utilisant CHARMM-GUI, au centre, profil de température suivi lors du recuit simulé des nanoparticules de PE, à droite, nanoparticule obtenue après recuit simulé. Images réalisées sous VMD, nanoparticule en représentation CPK.

Ce recuit simulé permet à la nanoparticule d'explorer différentes conformations lors de l'augmentation de la température, puis de piéger une structure de plus basse énergie lors de la diminution de la température²⁰. Nous obtenons ainsi des nanoparticules de PE avec rayon de giration de :

$$3,18 \pm 0,14 \text{ nm dans l'eau SPC/E et de} \\ 3,21 \pm 0,14 \text{ nm dans l'eau TIP3P.}$$

Par ailleurs, des peptides sont générés en utilisant PEP-FOLD 2.0²¹, suivant la séquence SGGXGGXGGXGGS, où X représente l'acide aminé d'intérêt pour chaque peptide.

Pour chaque peptide nous générons alors un système comprenant la nanoparticule de plastique centrée et le peptide à environ 2 nm du plastique. Une boîte de simulation est ensuite générée autour de la nanoparticule et du peptide en maintenant une distance minimale de 3,0 nm entre les parois et les atomes. Cette boîte de simulation est alors remplie de molécules d'eau, résultant en un système tel que celui présenté Figure 5.6.

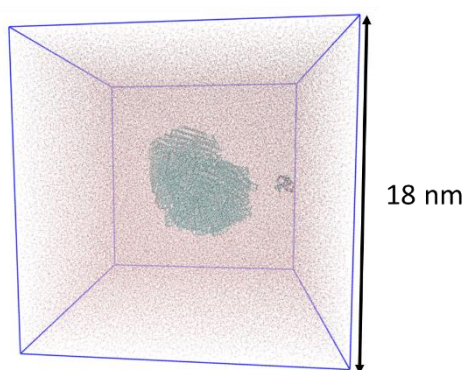


Figure 5.6 : Etat initial du système pour la mise en contact d'un peptide avec une nanoparticule de PE. Image réalisé sous VMD, peptide et nanoparticule en représentation CPK et eau en représentation dots.

Les systèmes ainsi générés contiennent environ 820 000 atomes dans un cube de 18 nm de côté. Des conditions périodiques sont appliquées aux bords de la boîte. Lors de nos calculs nous avons simulé 4 systèmes en parallèle sur la même station, nécessitant un temps de calcul d'environ 10 jours pour 50 ns de simulation. Ceci nous permet d'observer l'adsorption du peptide, représentée Figure 5.7.

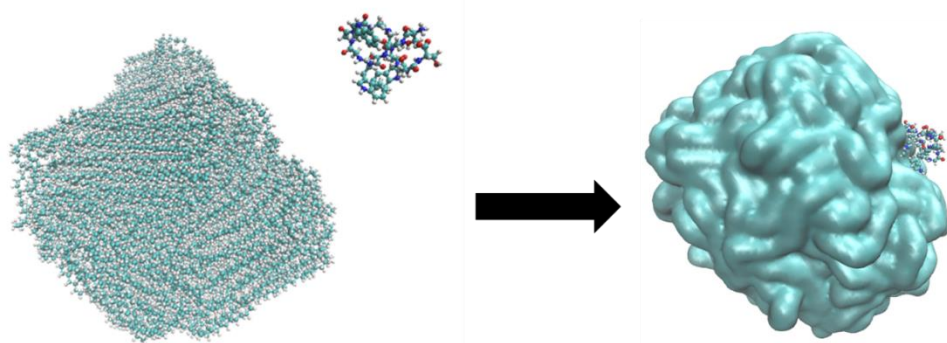


Figure 5.7 : Représentation de la mise en contact d'un peptide avec une nanoparticule de PE. Image réalisée sous VMD, peptide en représentation CPK et nanoparticule en représentation CPK à gauche et en représentation QuickSurf* à droite.

*Par la suite, la représentation QuickSurf sera privilégié pour mettre en évidence les phénomènes de surface et les contacts.

Le protocole décrit pour la génération de la nanoparticule de plastique et sa mise en contact avec les peptides est résumé Figure 5.8.

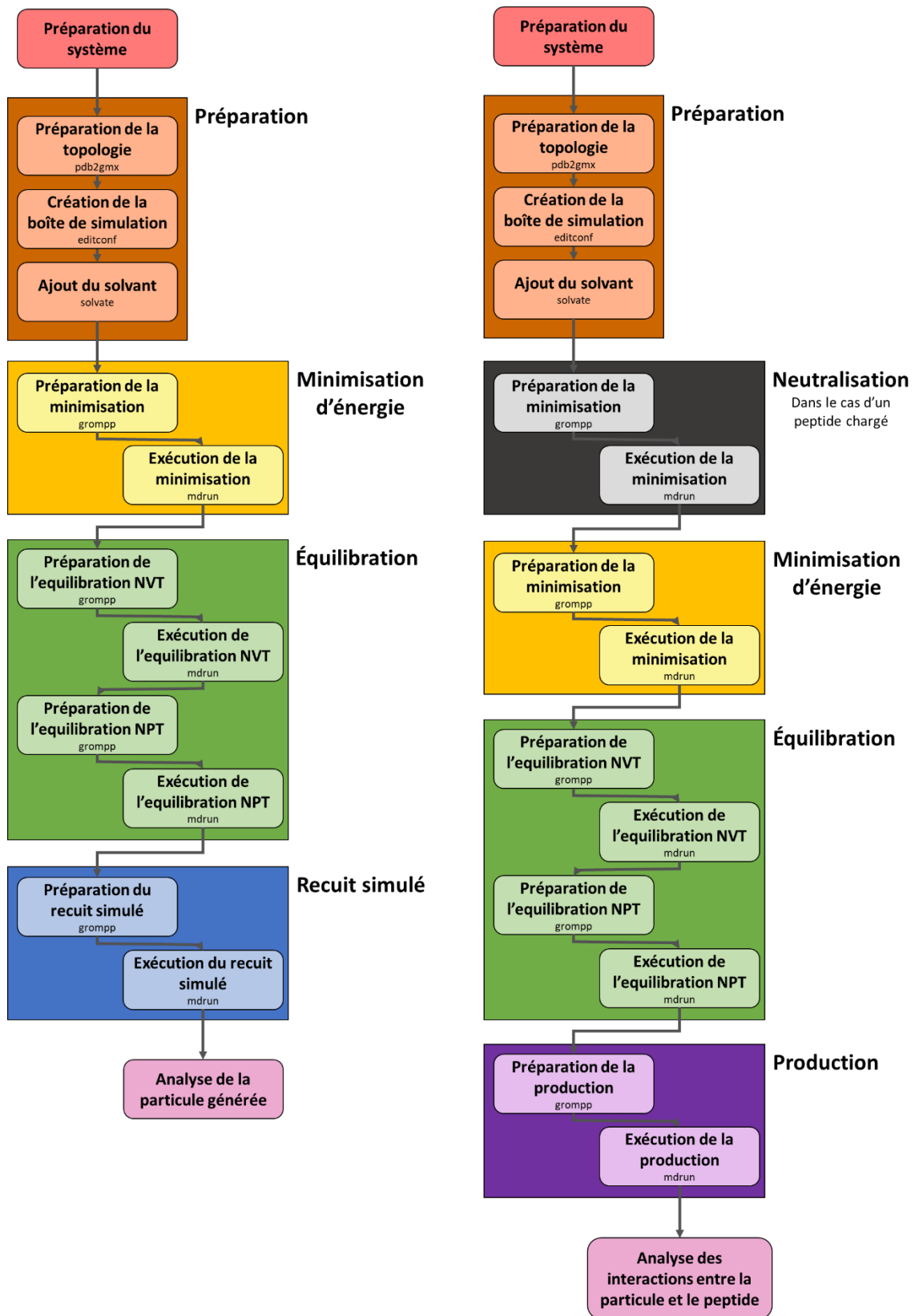


Figure 5.8 : Protocole suivi pour générer la nanoparticule de PE (à gauche) puis pour la mettre en contact avec les peptides (à droite).

Chaque système a été simulé pendant 50 ns, puis la trajectoire a été visualisée en utilisant VMD afin d'observer si le peptide a été adsorbé sur le nanoplastique. Si le peptide n'a pas été adsorbé, ou s'il a été adsorbé dans les dernières 5 ns de la simulation, une simulation de 50 ns supplémentaire est lancée.

Sur une trajectoire non traitée, des artefacts visuels sont présents à cause des conditions de bord, comme nous pouvons le voir Figure 5.9. Tous les traitements présentés dans cette partie ont donc été réalisés après avoir stabilisé la nanoparticule de PE au centre de la boîte d'eau en suivant le protocole détaillé dans le chapitre Matériel et Méthodes.

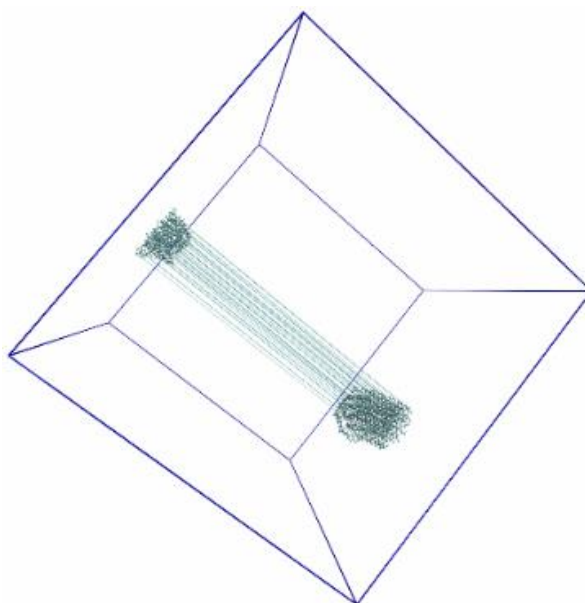


Figure 5.9 : Visualisation des effets de bord.
Image réalisée sous VMD en représentation CPK.

Après ce premier traitement, des artefacts peuvent persister et influencer les paramètres d'analyse, en particulier le calcul du RMSD lorsque le peptide franchit les bords du système. Le calcul du RMSD du peptide par rapport à la nanoparticule, qui est défini par l'équation 1, sera utilisé pour évaluer le déplacement du peptide adsorbé sur la surface de la particule.

$$RMSD(t) = \sqrt{\frac{1}{N} \times \sum_{i=1}^N (r_i(t) - r_i^{ref})^2} \quad (eq. 1)$$

Dans cette équation, RMSD(t) est le RMSD du peptide par rapport à la nanoparticule de PE à l'instant t, N est le nombre d'atomes dans le peptide, $r_i(t)$ est la position de l'atome i à l'instant t et r_i^{ref} est la position de l'atome i à l'instant t = 0. Les positions des atomes sont calculées dans le référentiel de la nanoparticule de plastique. En suivant la valeur de RMSD(t) à partir de l'adsorption du peptide sur la nanoparticule, une grande valeur de l'écart-type indique un fort déplacement du peptide à la surface du plastique et une petite valeur de l'écart-type indique un faible déplacement du peptide à la surface du plastique.

Les courbes de RMSD(t) sont donc tracées pour chaque système afin d'éliminer manuellement ces perturbations. Après avoir centré la trajectoire sur la nanoparticule, le nanoplastique ne peut plus traverser les bords mais le peptide le peut encore. Ceci ne perturbe pas le calcul du rayon de giration

mais peut poser problème pour le calcul du RMSD, causant l'apparition de sauts ou de pics. Lorsque nous travaillons sur le RMSD, nous commençons donc par visualiser le RMSD pour retirer ces sauts manuellement Figure 5.10.

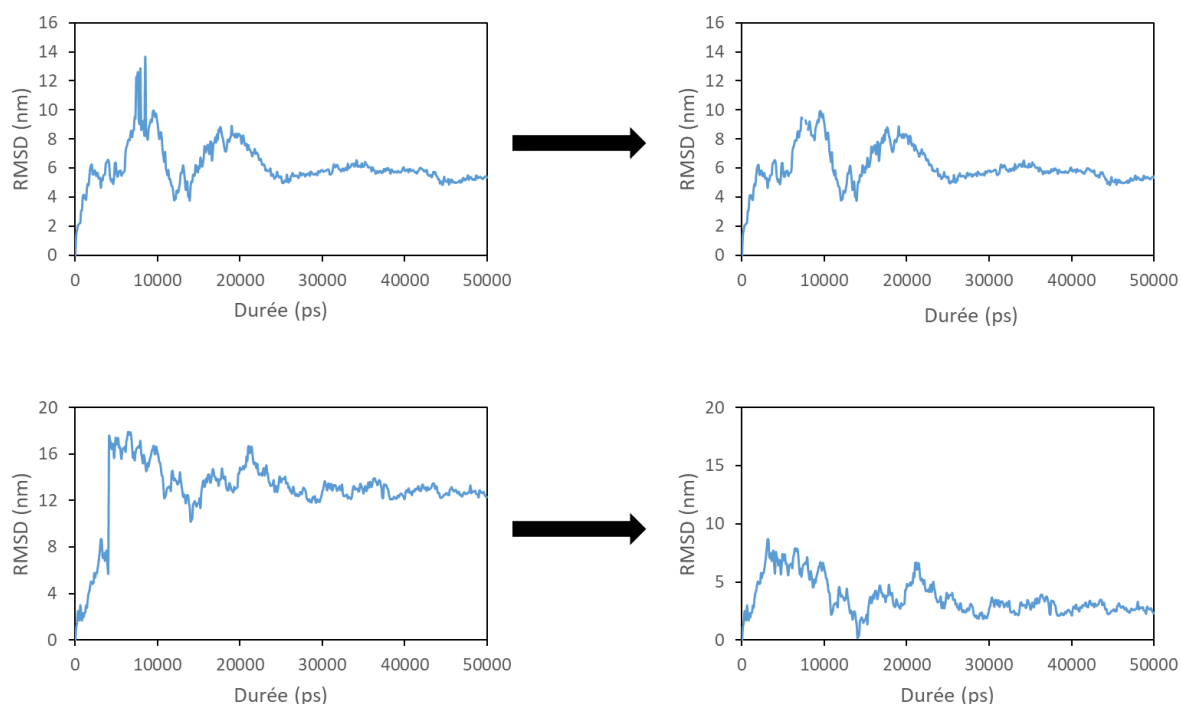


Figure 5.10 : Exemples de correction sur des courbes de suivi du RMSD d'un peptide au cours d'une simulation : retrait de pics pour le peptide D dans l'eau SPC/E, en haut et élimination d'un saut pour le peptide P dans l'eau TIP3P, en bas.

Dans le cas des pics, nous éliminons les points correspondants aux pics. Dans le cas des sauts, une valeur constante égale à l'écart avant et après le saut est soustraie aux valeurs suivant le saut.

La durée de simulation pendant laquelle le peptide est adsorbé sur le nanoplastique diffère entre les peptides considérés. Ces durées sont rassemblées dans le Tableau 5.2. Dans ce tableau, ainsi que pour le reste de ce chapitre, les peptides de la forme SGGXGGXGGXGGS seront nommés par l'abréviation à une lettre correspondant au peptide d'intérêt X.

Nous observons que, d'une façon générale, tous les peptides finissent par s'adsorber sur la nanoparticule. En particulier, nous avons observé une adsorption irréversible de tous les peptides sur la nanoparticule avec au moins l'un des modèles d'eau, que le peptide soit chargé positivement, négativement ou neutre. Les simulations pour lesquelles nous n'avons pas observé d'adsorption du peptide correspondent à celles pour lesquelles nous n'avons observé aucun contact entre le peptide et la nanoparticule. Celles-ci sont lors de la rédaction de cette thèse en cours de prolongation dans le but d'observer des contacts.

| Peptide | Durée de simulation après adsorption dans l'eau TIP3P (ns) | | Durée de simulation après adsorption dans l'eau SPC/E (ns) | |
|---------|--|----------------------------|--|----------------------------|
| | Durée de simulation après adsorption | Durée de simulation totale | Durée de simulation après adsorption | Durée de simulation totale |
| N | 47 | 50 | - | 200 |
| Q | 46 | 300 | 36 | 50 |
| D | 31 | 300 | 50 | 500 |
| E | - | 400 | 8 | 200 |
| K | 33 | 150 | 25 | 50 |
| R | 35 | 50 | - | 150 |
| H | 14 | 50 | - | 350 |
| Y | 14 | 100 | 50 | 500 |
| W | 16 | 100 | 46 | 100 |
| F | 57 | 200 | 50 | 150 |
| I | 12 | 150 | 40 | 50 |
| L | 9 | 50 | - | 150 |
| V | 47 | 100 | 50 | 300 |
| A | 20 | 50 | - | 150 |
| G | 47 | 250 | 48 | 250 |
| M | 8 | 50 | 9 | 50 |
| C | 40 | 200 | - | 600 |
| S | 12 | 100 | 50 | 100 |
| T | 17 | 50 | 26 | 250 |
| P | 24 | 150 | - | 200 |

Tableau 5.2 : Durées de simulation totale et à partir de leur adsorption, pour les différents peptides et pour chaque modèle d'eau. Les traits rouges indiquent les peptides qui ne se sont pas adsorbés sur la nanoparticule de PE.

Nous pouvons remarquer que la durée nécessaire à l'adsorption du peptide sur la nanoparticule est très variable et souvent élevée, pouvant être de plusieurs centaines de ns. Une explication possible de cette observation serait une taille trop importante de la boîte de simulation, ce que nous vérifierons en simulant des systèmes de plus petite taille dans la partie suivante. Une autre explication possible est que le contact avec la nanoparticule doit avoir lieu sur des zones particulières du peptide pour permettre son adsorption, certaines zones des acides aminés utilisés étant plus hydrophobes que d'autres comme représenté Figure 5.11.

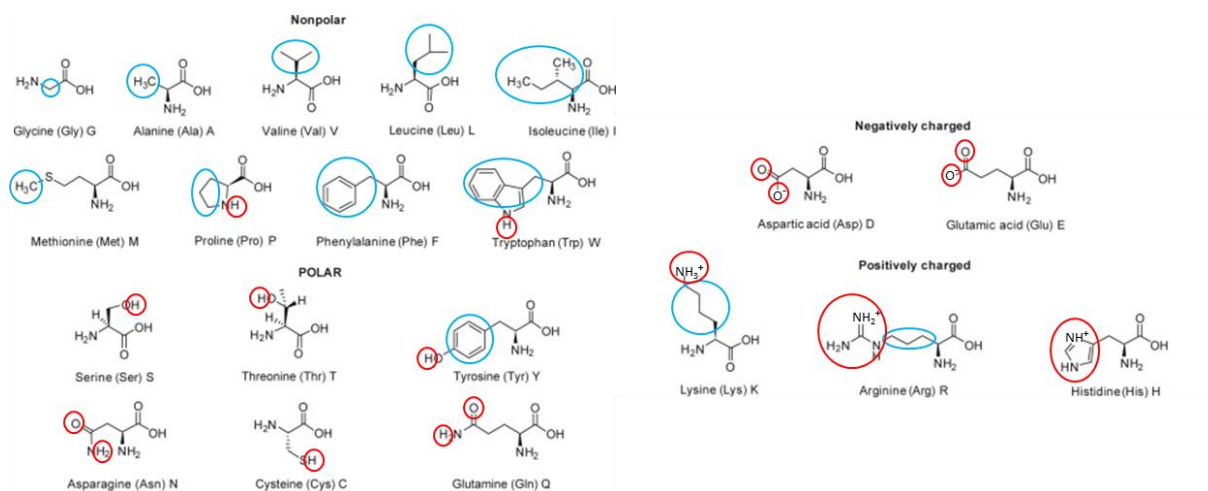


Figure 5.11 : Représentation schématique des groupes hydrophobes (en bleu) et des groupes donneurs/accepteurs de liaisons hydrogène (en rouge), présents dans les chaînes latérales des acides aminés. Adapté de *Introduction to Protein Mass Spectroscopy*²².

Nous pouvons noter que tous les peptides peuvent former des liaisons hydrogène au niveau de leurs liaisons peptidiques, qui contiennent un atome d'hydrogène lié à un atome d'azote (donneur de liaisons hydrogène) et un atome d'oxygène doublement lié à un atome de carbone (accepteur de liaisons hydrogène). Cette remarque est également valable pour les groupements chargés O^- et H_3N^+ aux extrémités du peptide. Le PE non vieilli ne présente pas de groupements donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène, cependant la présence de charges sur le peptide peut influencer son interaction avec la surface. La nanoparticule de PE étant hydrophobe, il est attendu que les contacts avec les zones hydrophobes des peptides soient favorisés. Dans ce cas, il est cohérent que tous les peptides étudiés puissent être adsorbés sur la nanoparticule puisqu'ils contiennent tous des résidus glycine qui présentent une zone hydrophobe accessible.

Dans le cas des peptides A, H, R et W dans l'eau SPC/E, nous avons observé des contacts lors desquels le peptide n'a pas été adsorbé (ou, dans le cas du peptide W, a été adsorbé pendant quelques ns avant de retourner en solution) suivi d'un éloignement du peptide par rapport la nanoparticule. Dans le cas du peptide W, après prolongation de la simulation un second contact a été observé et accompagné de l'adsorption irréversible du peptide. Ceci va dans le sens de la seconde explication proposée précédemment, il est ainsi possible que la zone de contact avec le peptide n'était pas propice à l'adsorption lors du premier contact, mais l'était lors du second. Dans le cas des peptides A, H et R, nous n'avons pas encore observé de seconds contacts et les simulations restent en cours de prolongation.

Nous n'avons de plus pas remarqué de tendance d'adsorption des peptides sur des morphologies particulières pour la particule étudiée. Comme illustré Figure 5.12, nous avons observé des adsorptions sur des faces possédant des morphologies planes, creuses ou bombées, sans liens particuliers entre les propriétés des peptides ou le modèle d'eau utilisé et la morphologie de la surface sur laquelle ils sont adsorbés. De la même façon, nous n'observons pas toujours de lien entre l'orientation de la chaîne peptidique et celle des chaînes carbonées de la nanoparticule.

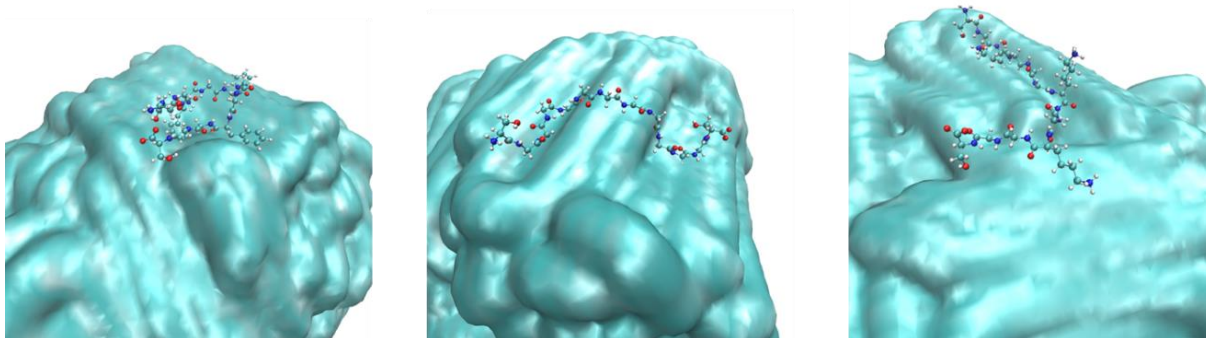


Figure 5.12 : Peptides adsorbés sur des surfaces de différentes morphologie (modèle d'eau SPC/E).
 A gauche, peptide F adsorbé sur une surface creuse,
 au milieu, peptide G adsorbé sur une surface bombée perpendiculairement aux chaînes carbonées,
 à droite, peptide K adsorbé sur une surface plane parallèlement aux chaînes carbonées.
 Images réalisées sous VMD, peptide en représentation CPK et nanoparticule en représentation QuickSurf.

Pour les peptides pour lesquels nous n'observons aucun contact avec la nanoparticule, cette absence de contact peut être due au caractère aléatoire du mouvement du peptide en solution. Pour le confirmer nous avons observé l'évolution de la distance entre le centre de masse de la nanoparticule de plastique et du peptide pour un peptide adsorbé et pour un peptide non-adsorbé, présenté Figure 5.13.

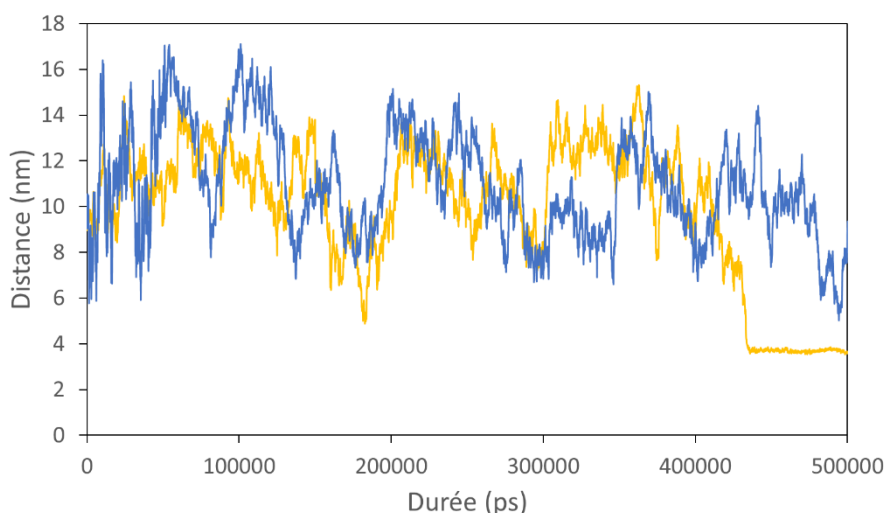


Figure 5.13 : Evolution de la distance entre les centres de masse de la nanoparticules de PE et du peptide dans l'eau SPC/E, pour un peptide dont nous avons observé l'adsorption (peptide Y, en jaune), et un peptide pour lequel nous n'avons pas observé de contact (peptide C, en bleu).

Jusqu'au contact du peptide Y avec la nanoparticule de plastique la distance mesurée évolue de façon similaire pour les deux peptides, indiquant dans chaque cas une évolution aléatoire résultant d'un mouvement brownien. Nous remarquons de plus la présence de ce qui semble être une « distance critique » pour l'adsorption du peptide Y. En effet, une fois celui-ci assez proche de la nanoparticule sa distance par rapport à cette dernière diminue rapidement jusqu'à son adsorption. Cette observation nous conforte dans l'idée que l'adsorption du peptide nécessite que celui-ci s'approche suffisamment de la nanoparticule en suivant une trajectoire aléatoire, et donc que son adsorption nécessitera moins de temps si la taille de la boîte de simulation est diminuée.

Nous avons également suivi la distance entre le centre de masse du peptide et celui de la nanoparticule de PE pour un même peptide adsorbé pour les deux modèles d'eau utilisés. Les courbes sont présentées Figure 5.14.

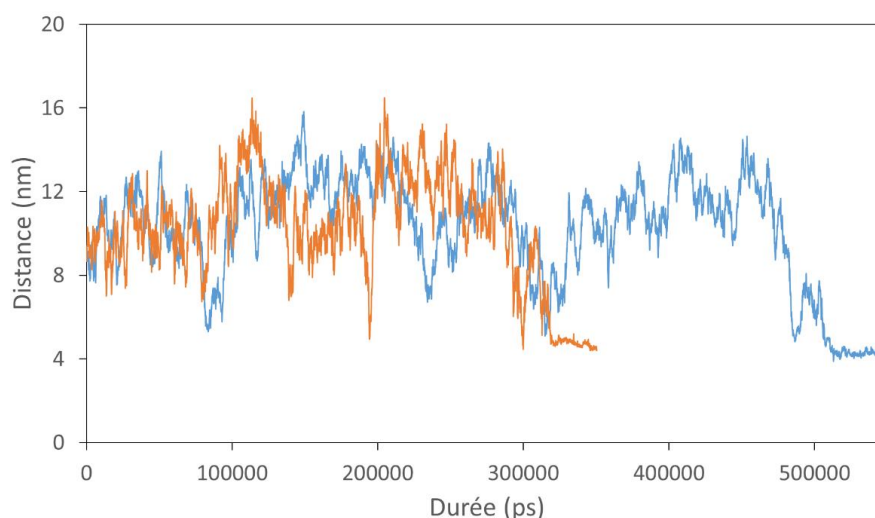


Figure 5.14 : Evolution de la distance entre les centres de masse de la nanoparticule de PE et du peptide D, dans l'eau SPC/E (en bleu) et dans l'eau TIP3P (en orange).

Nous n'observons pas de différences notables de comportement du peptide en solution en fonction du modèle d'eau à partir de ces deux courbes. En particulier, nous observons une fois de plus un comportement suggérant la présence d'une « distance critique » pour l'adsorption du peptide sur la nanoparticule, que ce soit dans l'eau SPC/E ou dans l'eau TIP3P.

1.2. Influence du modèle d'eau sur le peptide

Les peptides ont été suivis dans l'eau puis sur la nanoparticule de PE afin de déterminer l'effet de l'adsorption ainsi que du modèle d'eau utilisé. Pour cela nous avons mesuré le rayon de giration des peptides au cours des simulations ainsi que leur RMSD par rapport à la nanoparticule de plastique. Nous avons également suivi le MSD des peptides en solution avant leur adsorption sur la nanoparticule.

Le RMSD du peptide par rapport à la nanoparticule a déjà été présenté paragraphe 1.1.2. de cette partie. Le calcul de son écart-type nous donne une information sur le déplacement du peptide à la surface de la nanoparticule.

Le rayon de giration d'un peptide est défini par l'équation 2, et permet de déterminer si le peptide se replie sur lui-même (petit rayon de giration) ou est déplié (grand rayon de giration).

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_i m_i \times (r_i - r_{CM})^2}{\sum_i m_i}} \quad (eq.2)$$

Dans cette équation, R_g est le rayon de giration, r_{CM} est la position du centre de masse, r_i est la position de l'atome i et m_i est la masse de cet atome.

Le MSD du peptide est défini par rapport à l'équation 3, il permet de calculer le coefficient de diffusion du peptide en solution.

$$MSD(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i(t) - r_i(0))^2 \quad (eq.3)$$

Dans cette équation, MSD(t) est le MSD du peptide à l'instant t, N est le nombre d'atomes dans le peptide et $r_i(t)$ est la position de l'atome i à l'instant t. Dans un système à 3 dimensions, aux temps longs nous avons $MSD(t) = 6 \times D \times t$, où D est le coefficient de diffusion du peptide.

Afin de pouvoir comparer les valeurs des écarts-types calculés entre les différents systèmes, les valeurs de rayons de giration, de RMSD sont prises sur 10 ns de simulation en solution et sur 10 ns de simulation une fois le peptide adsorbé. Pour les peptides adsorbés moins de 10 ns avant la fin de la simulation, ces valeurs sont calculées sur la durée totale de leur adsorption.

1.2.1. Influence du modèle d'eau sur le peptide en solution

L'évolution du rayon de giration des peptides en solution, c'est-à-dire avant leur adsorption par la nanoparticule, a été extrait de la simulation. Les rayons de giration des peptides en solution pour les 2 types d'eau sont rassemblés Figure 5.15.

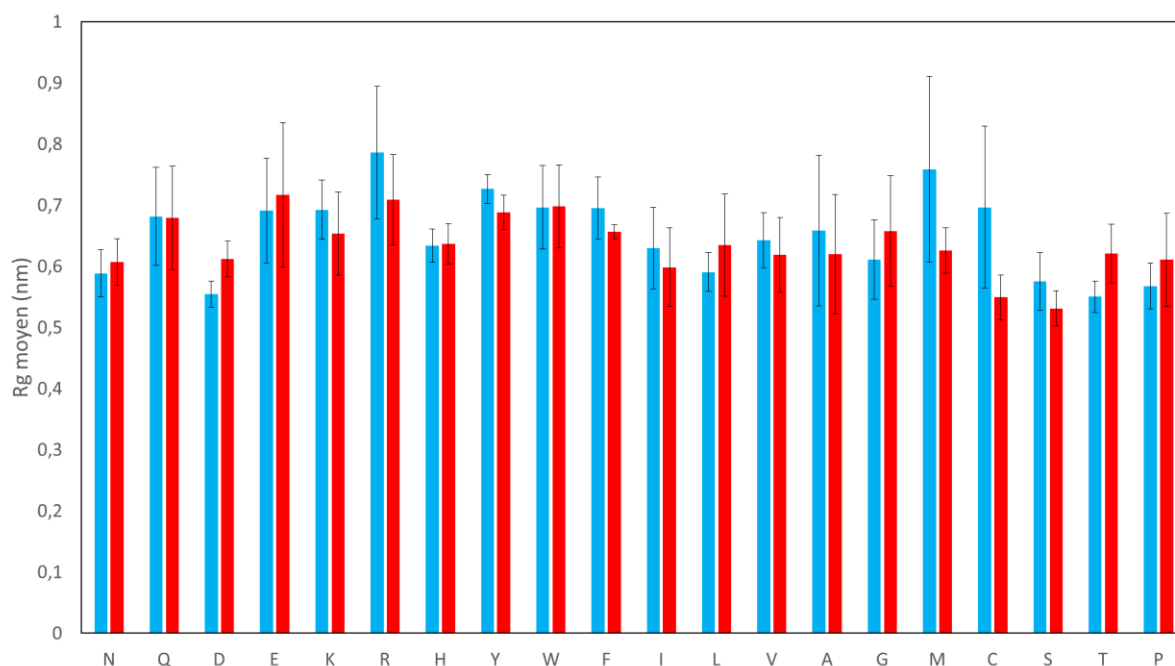


Figure 5.15 : Rayon de giration de chaque peptide en solution dans l'eau SPC/E (en bleu) et dans l'eau TIP3P (en rouge), et écart-type sur 10 ns de simulation (barres d'erreur).

Dans cette figure, les acides aminés ont été organisés en fonction de leurs propriétés présentées dans le diagramme de Venn Figure 5.2. De gauche à droite, nous trouvons les peptides polaires, en particulier les peptides négativement chargés puis les peptides positivement chargés, puis les peptides aromatiques, suivis par les peptides hydrophobes.

Un rayon de giration moyen plus élevé indique que le peptide est plus étendu, tandis qu'un rayon de giration moyen plus faible indique que le peptide est plus replié. L'écart-type augmente lorsque le rayon de giration varie plus fortement sur la durée de calcul, donc s'il y a de fortes fluctuations autour de la conformation moyenne.

D'une façon générale le modèle d'eau utilisé ne semble pas influencer de façon notable le rayon de giration des peptides, aucun des peptides ne présentant une différence particulièrement importante de la moyenne ou de l'écart-type de son rayon de giration en solution entre l'eau SPC/E et l'eau TIP3P. En moyenne, nous mesurons un rayon de giration de 0,65 nm pour les peptides dans l'eau SPC/E et de 0,64 nm pour les peptides dans l'eau TIP3P, ce qui confirme la faible influence de l'eau. La longueur maximale d'un peptide étendu est d'environ 4 Å par acides aminés²³, ce qui correspondrait à une longueur de 5,2 nm. En estimant la longueur des peptides simulés comme étant le double de leur rayon de giration, soit environ 1,3 nm en moyenne, nous pouvons donc en déduire que ceux-ci sont fortement repliés en solution.

Les écarts les plus importants observés sont pour les peptides soufrés M et C pour lesquels le rayon de giration dans l'eau TIP3P est 18% et 21% plus faibles respectivement que dans l'eau TIP3P. Les acides aminés correspondants sont hydrophobes, mais nous n'observons pas de différence importante pour les autres peptides associés à des acides aminés hydrophobes. Il pourrait être intéressant de répéter ces simulations ou de simuler les peptides seuls dans l'eau pendant de plus longues durées pour déterminer si ces différences résultent simplement d'une variabilité de la conformation des peptides à l'échelle de la durée d'une mesure.

De la même façon nous avons suivi l'évolution du MSD du peptide en solution avant son adsorption par la nanoparticule. En réalisant une régression linéaire, nous avons ainsi déterminé le coefficient de diffusion de chaque peptide dans chacun des deux modèles d'eau, ces résultats étant regroupés Figure 5.16.

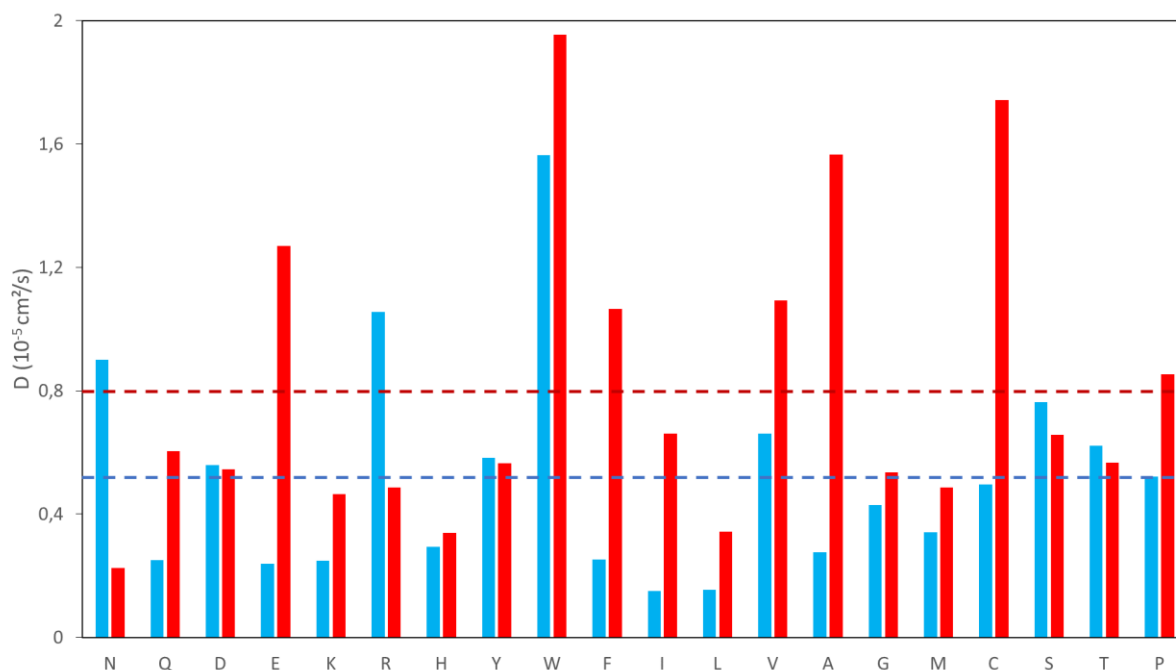


Figure 5.16 : Coefficient de diffusion de chaque peptide en solution dans l'eau SPC/E (en bleu) et dans l'eau TIP3P (en rouge). La valeur moyenne calculée pour chaque modèle d'eau est indiquée par une ligne pointillée de la couleur correspondante.

Le calcul du coefficient de diffusion montre une influence du modèle d'eau utilisé, avec une valeur moyenne plus élevée dans l'eau TIP3P que dans l'eau SPC/E ($8,3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ contre $5,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$). Dans chaque cas, l'ordre de grandeur des coefficients de diffusion reste cohérent pour des peptides dans de l'eau²⁴. Le plus faible coefficient de diffusion des peptides dans l'eau SPC/E peut expliquer pourquoi les peptides requièrent généralement un temps de simulation plus long pour être adsorbés dans l'eau SPC/E que dans l'eau TIP3P (Tableau 5.2).

Bien que les rayons de giration des peptides soient peu affectés par le modèle d'eau, la mesure de coefficients de diffusion plus élevés dans l'eau TIP3P est cohérente avec ce qui est généralement observé pour ce modèle. En effet, les interactions entre molécules d'eau sont plus faibles dans l'eau TIP3P, ce qui tend à réduire le rayon hydrodynamique des peptides, et donc à augmenter leur coefficient de diffusion, puisque moins de molécules d'eau se lient au peptide¹⁶. Cette explication est de plus cohérente avec le fait que l'augmentation du facteur de diffusion dans l'eau TIP3P est plus importante pour les peptides composés d'acides aminés hydrophobes.

1.2.2. Influence du modèle d'eau sur le peptide adsorbé

En fonction des interactions entre la nanoparticule de plastique et le peptide, l'adsorption de ce dernier peut influencer ou non son rayon de giration, comme nous pouvons le voir Figure 5.17.

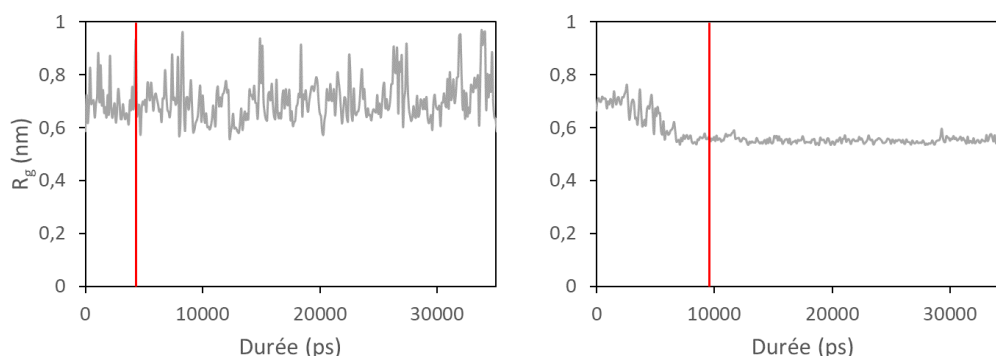


Figure 5.17 : Evolution du rayon de giration d'un peptide au cours d'une simulation, le trait rouge indiquant l'adsorption du peptide.

La courbe de gauche représente un cas où l'adsorption n'influence pas le rayon de giration (peptide W dans l'eau SPC/E), et la courbe de droite représente un cas où l'adsorption stabilise le rayon de giration (peptide I dans l'eau SPC/E).

Le fait que le rayon de giration puisse être stabilisé lors de l'adsorption du peptide indique possiblement un changement de la dynamique du peptide causé par les interactions entre le peptide et la nanoparticule.

Une fois les peptides adsorbés, nous avons donc moyenné leur rayon de giration sur le reste de la simulation, et calculé l'écart-type sur cette période, afin de déterminer si l'adsorption du peptide a modifié sa dynamique. Les résultats obtenus sont rassemblés Figure 5.18. Pour les histogrammes comparants des données sur des peptides adsorbés, les données manquantes correspondent aux peptides qui ne sont pas entrés en contact avec la nanoparticule.

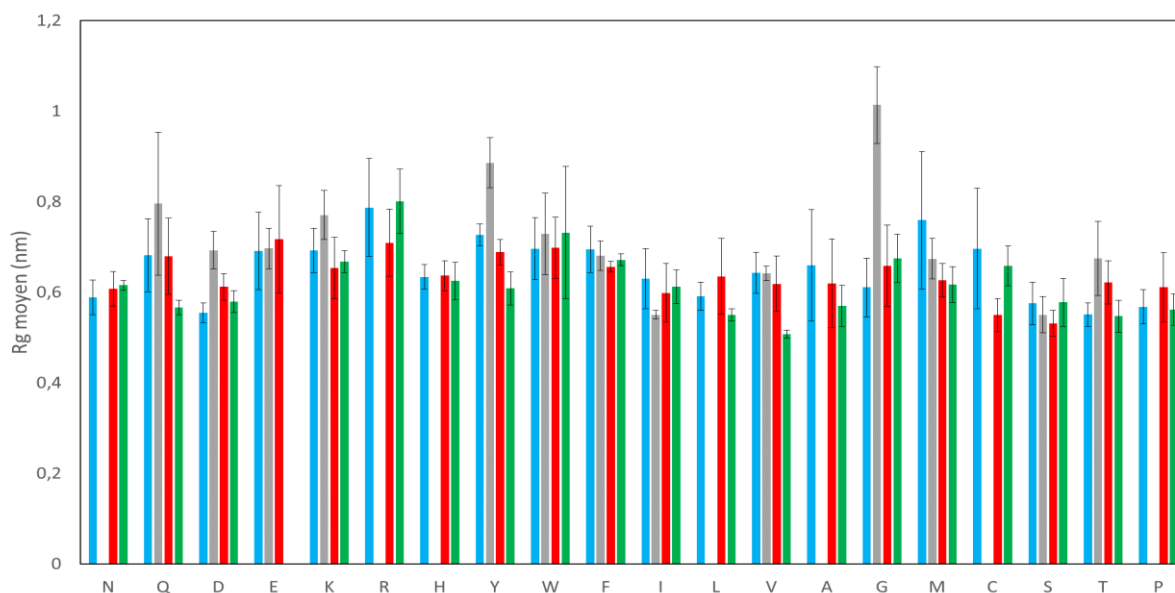


Figure 5.18 : Rayons de giration de chaque peptide en solution dans l'eau SPC/E (en bleu) et dans l'eau TIP3P (en rouge), puis adsorbé sur la nanoparticule dans l'eau SPC/E (en gris) et dans l'eau TIP3P (en vert), et écart-type sur 10 ns de simulation (barres d'erreur).

Nous remarquons que, dans l'eau TIP3P, le rayon de giration est peu affecté par l'adsorption de peptide, la différence de rayon avant et après l'adsorption étant au plus de l'ordre de 15% (-16% pour le peptide Q, +20% pour le peptide C et -18% pour le peptide V). Dans l'eau SPC/E les rayons de giration sont également peu changés par l'adsorption à l'exception des peptides G (+66%), T (+23%) et Y (+22%). Ces fortes augmentations du rayon de giration sont causées par un accroissement de la surface de contact entre la nanoparticule de plastique et le peptide, poussant ce dernier à se déplier. Il est cohérent que ce comportement soit favorisé par l'eau SPC/E, puisque les plus fortes interactions entre les molécules d'eau favorisent les interactions hydrophobes du soluté.

Après adsorption, les rayons de giration mesurés sont globalement plus élevés pour les peptides adsorbés dans l'eau SPC/E que dans l'eau TIP3P. Le rayon de giration moyen des peptides adsorbés est de 0,72 nm dans l'eau SPC/E et de 0,62 nm dans l'eau TIP3P. Ceci indique une forte influence du modèle d'eau sur la conformation des peptides adsorbés, ce qui se confirme en observant les systèmes avec VMD, comme nous pouvons le voir Figure 5.19.

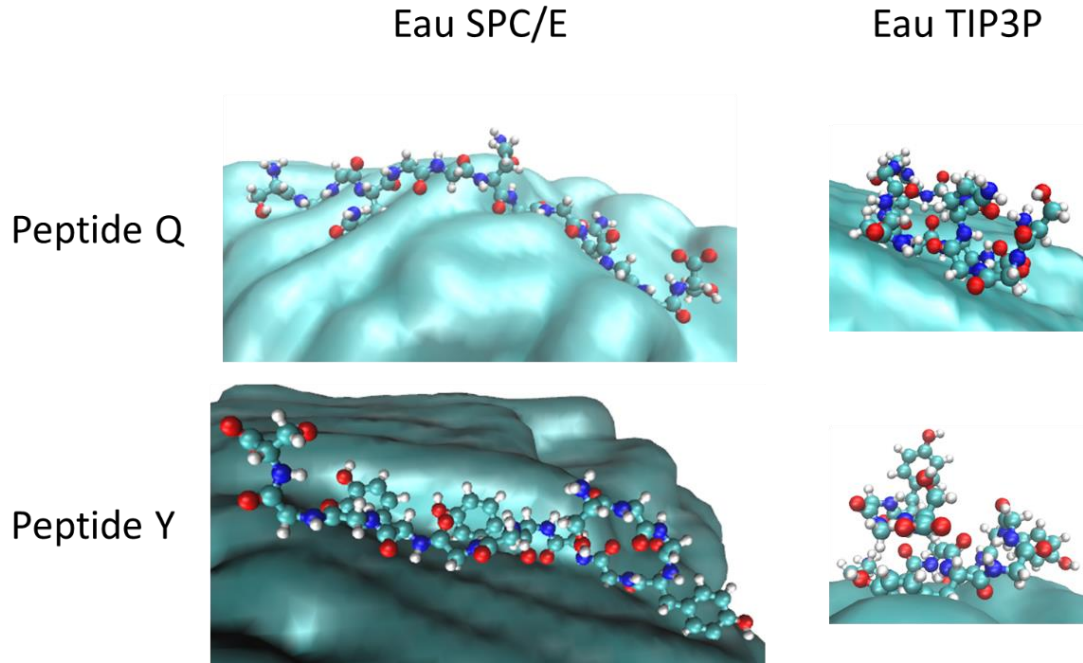


Figure 5.19 : Peptides Q (en haut) et Y (en bas) adsorbés sur une nanoparticule de PE, dans l'eau SPC/E (à gauche) et dans l'eau TIP3P (à droite).
 Images réalisées sous VMD, peptide en représentation CPK et nanoparticule en représentation QuickSurf.

De plus, tandis que les écarts-type des rayons de giration des peptides en solution sont proches, de 0,062 nm dans l'eau SPC/E et 0,059 nm dans l'eau TIP3P, l'écart-type moyen des rayons de giration des peptides adsorbés est de 0,058 nm dans l'eau SPC/E et de 0,039 nm dans l'eau TIP3P. Ces plus grandes valeurs du rayon de giration et de son écart-type dans le cas des peptides adsorbés dans l'eau SPC/E peut indiquer que l'augmentation de la surface de contact entre la nanoparticule et le peptide est favorisée mais ne stabilise pas fortement la conformation du peptide. Dans l'eau TIP3P, l'augmentation de la surface de contact semble moins favorisée mais le plus faible écart-type du rayon de giration suggère une stabilisation de sa structure. Pour vérifier les liens entre la structure des peptides et la modèle d'eau, nous avons tracé des diagrammes de Ramachandran.

Un diagramme de Ramachandran correspond à la représentation des conformations possibles des acides aminés présents dans un peptide ou une protéine à partir des angles dièdres ϕ et ψ . L'angle ϕ est défini par les atomes successifs C-N-C $_{\alpha}$ -C, où le premier carbone correspond au groupement carbonyle du résidu précédent, et l'angle ψ est défini par les atomes successifs N-C $_{\alpha}$ -C-N, où le dernier azote correspond au groupement amide du résidu suivant. Ces angles sont représentés Figure 5.20.

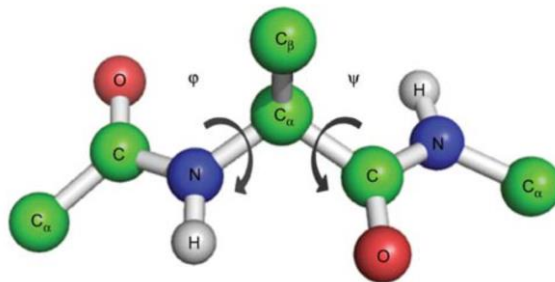


Figure 5.20 : Représentation graphique des angles ϕ et ψ utilisé pour définir les diagrammes de Ramachandran.
 Tiré de *A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins*²⁵.

Dans le cas des protéines, un diagramme de Ramachandran permet d'observer la présence de structures secondaires comme des hélices ou des feuillettes. Puisque les peptides étudiés ici sont déstructurés les diagrammes ne correspondent pas à ces structures, mais permettent d'observer les espaces conformationnels explorés par ces peptides.

Nous avons tracé les diagrammes de Ramachandran avant et après adsorption des peptides dont le rayon de giration présente la plus forte évolution (G, Q et Y dans l'eau SPC/E) et d'un peptide dont le rayon de giration présente une évolution négligeable (V dans l'eau SPC/E). Les diagrammes de Ramachandran de ces peptides dans l'eau TIP3P, en solution et adsorbés, ont également été tracés. Chacun de ces diagrammes a été calculé sur une durée de 10 ns, et est présenté Figure 5.21.

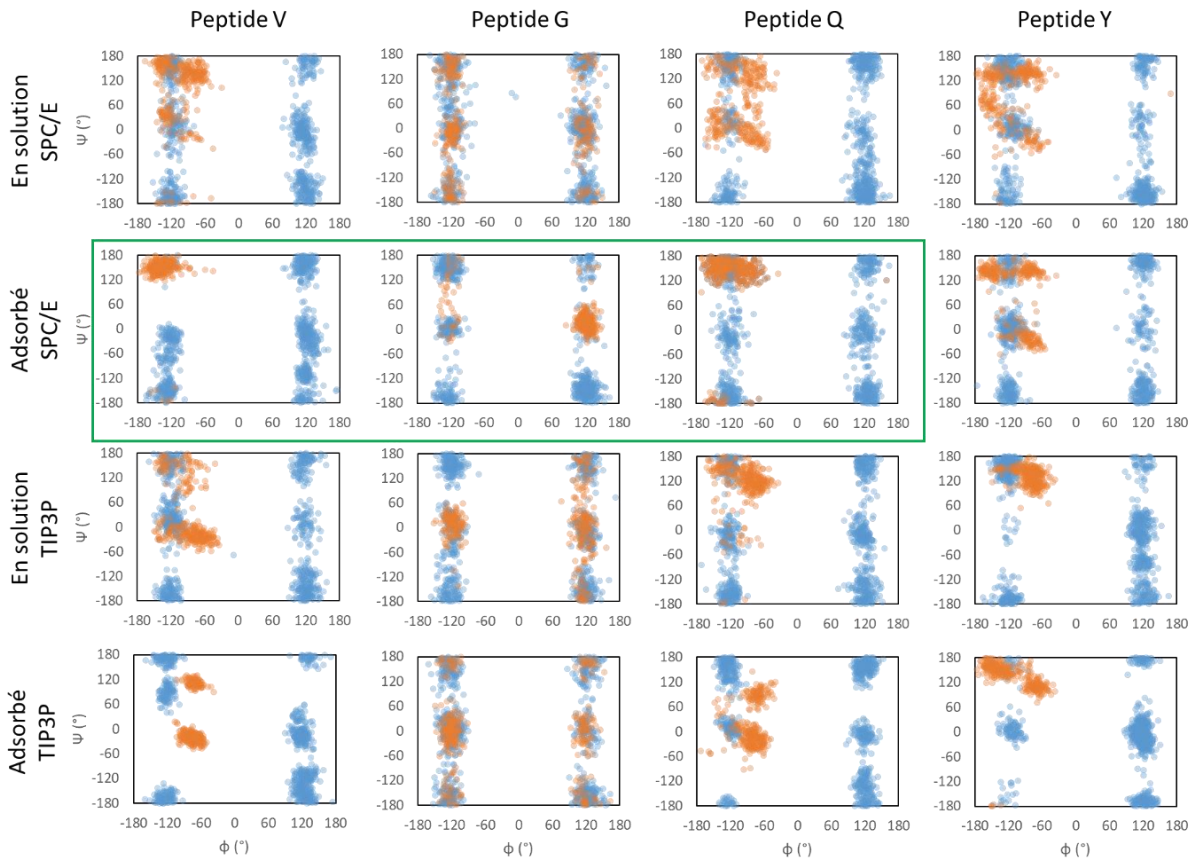


Figure 5.21 : Diagrammes de Ramachandran de différents peptides, en solution et adsorbé sur la nanoparticule de plastique, dans l'eau SPC/E et dans l'eau TIP3P. Les points oranges correspondent aux angles d'un résidu X à un instant donné et les points bleus correspondent aux angles d'un résidu G à un instant donné. Les points sont transparents, les zones foncées indiquent donc les zones de forte densité. Les 3 diagrammes encadrés en vert présentent les espaces conformationnels les plus restreints.

D'après les données trouvées dans la littérature, les diagrammes de Ramachandran en solution correspondent à ceux attendus pour ce type de peptides²⁶. En particulier, nous observons pour chaque peptide les deux bandes caractéristiques de la glycine, que le peptide soit en solution ou adsorbé. D'une façon générale, nous observons que l'espace conformationnel exploré par les peptides adsorbés est proche de celui exploré en solution, mais plus restreint. Ceci indique que les interactions entre la nanoparticule et le peptide limitent les structures accessibles à ce dernier.

Pour les peptides en solution nous observons que les espaces conformationnels explorés sont similaires dans les deux modèles d'eau, mais généralement plus restreints dans l'eau TIP3P. Dans ces

conditions le peptide Y est le plus affecté, son espace conformationnel étant significativement plus restreint par rapport aux autres peptides. Le peptide V, qui est le plus hydrophobe des peptides considérés, est le moins affecté. Les modèles d'eau ont donc une influence sur les structures accessibles aux peptides même lorsque ceux-ci sont en solution.

Dans le cas des peptides adsorbés, nous observons que les espaces conformationnels des peptides G, V et Q sont plus restreints dans l'eau SPC/E que dans l'eau TIP3P. Les cartes de Ramachandran correspondantes, encadrées en vert Figure 5.21, présentent d'ailleurs les espaces les plus restreints parmi toutes nos mesures, indiquant qu'il s'agit des conformations les plus stabilisées. Ceci est cohérent puisque l'eau SPC/E favorise les interactions hydrophobes, qui peuvent stabiliser la conformation des peptides adsorbés sur la surface de la nanoparticule. Nous remarquons par ailleurs que, pour les peptides V et Q, les espaces conformationnels des peptides adsorbés dans l'eau SPC/E sont différents de ceux des peptides adsorbés dans l'eau TIP3P. Ceci indique une fois de plus que ces deux modèles d'eau stabilisent des populations différentes. Le peptide Y a un comportement à part, avec une zone commune aux deux modèles d'eau et une zone uniquement explorée dans l'eau SPC/E. Ceci peut être causé par le fait que l'acide aminé Y est formé d'un cycle aromatique qui lui confère des propriétés hydrophobes, sur lequel est greffé un groupe hydroxyle polaire, ce qui peut favoriser des interactions spécifiques avec l'eau par formation de liaison hydrogène. Globalement, les différences de conformation des peptides en fonction du modèle d'eau sont significativement plus importantes pour les peptides adsorbés que pour les peptides en solution. Ceci illustre une fois de plus l'importance des interactions avec l'eau dans le phénomène d'adsorption des peptides.

D'une façon générale, nous observons que l'adsorption des peptides dans l'eau SPC/E restreint leur espace conformationnel tout en restant dans des zones explorées par le peptide en solution. Dans l'eau TIP3P, les zones explorées par les peptides adsorbés sont généralement séparées des zones explorées par ces mêmes peptides en solution. Des études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si ce comportement est toujours observé. En particulier, il serait intéressant de réaliser plusieurs simulations pour un même système initial puis d'analyser les diagrammes de Ramachandran du peptide adsorbé après chaque simulation. Ceci permettrait de déterminer si l'espace conformationnel d'un peptide adsorbé dépend de paramètres liés à son adsorption, par exemple de sa zone de contact initiale avec la nanoparticule.

Nous pouvons également noter que l'étude des diagrammes de Ramachandran nous apporte plus d'informations que la comparaison des rayons de giration, puisque nous voyons que l'espace conformationnel exploré par le peptide V dans l'eau SPC/E est plus restreint lorsque le peptide est adsorbé, alors que son rayon de giration n'est pas modifié. D'une façon générale nous observons que l'espace conformationnel exploré par les peptides adsorbés est similaire à celui exploré par les peptides en solution mais légèrement plus restreints. Ceci indique que les peptides restent plus proches de leur conformation moyenne une fois adsorbés. Cette information pouvait être tirée de la forte diminution de l'écart type des rayons de giration des peptides lors de leur adsorption dans l'eau TIP3P (de 0,059 à 0,039 nm), mais la faible diminution de cet écart-type dans l'eau SPC/E (de 0,062 à 0,058 nm) n'aurait pas suffi pour tirer cette conclusion.

De la même façon, deux comportements différents peuvent être observés en suivant le RMSD des peptides par rapport à la nanoparticule de plastique. Celui-ci peut continuer à varier une fois adsorbé ou devenir stable après adsorption, comme nous pouvons le voir Figure 5.22.

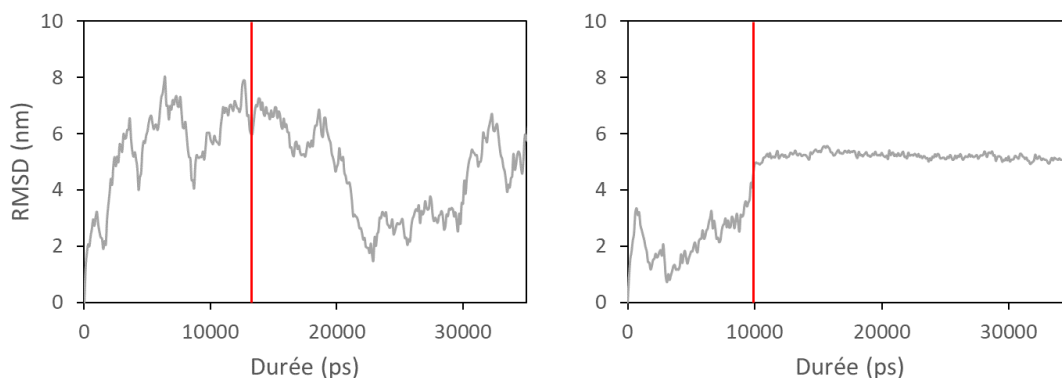


Figure 5.22 : Evolution du RMSD d'un peptide au cours d'une simulation, le trait rouge indiquant l'adsorption du peptide. La courbe de gauche représente un cas où l'adsorption n'influence pas le RMSD (peptide R dans l'eau SPC/E) et la courbe de droite représente un cas où l'adsorption stabilise le RMSD (peptide I dans l'eau SPC/E).

Une stabilisation du RMSD lors de l'adsorption indique que le peptide conserve sa position à la surface de la nanoparticule une fois adsorbé, tandis qu'un RMSD continuant de varier après adsorption indique que le peptide se déplace sur la surface de la nanoparticule.

L'écart-type du RMSD des peptides par rapport à la nanoparticule de plastique à partir de leur adsorption a également été calculé, et les valeurs obtenues sont rassemblées Figure 5.23. Un écart-type plus important du RMSD indique un déplacement du peptide à la surface de la particule.

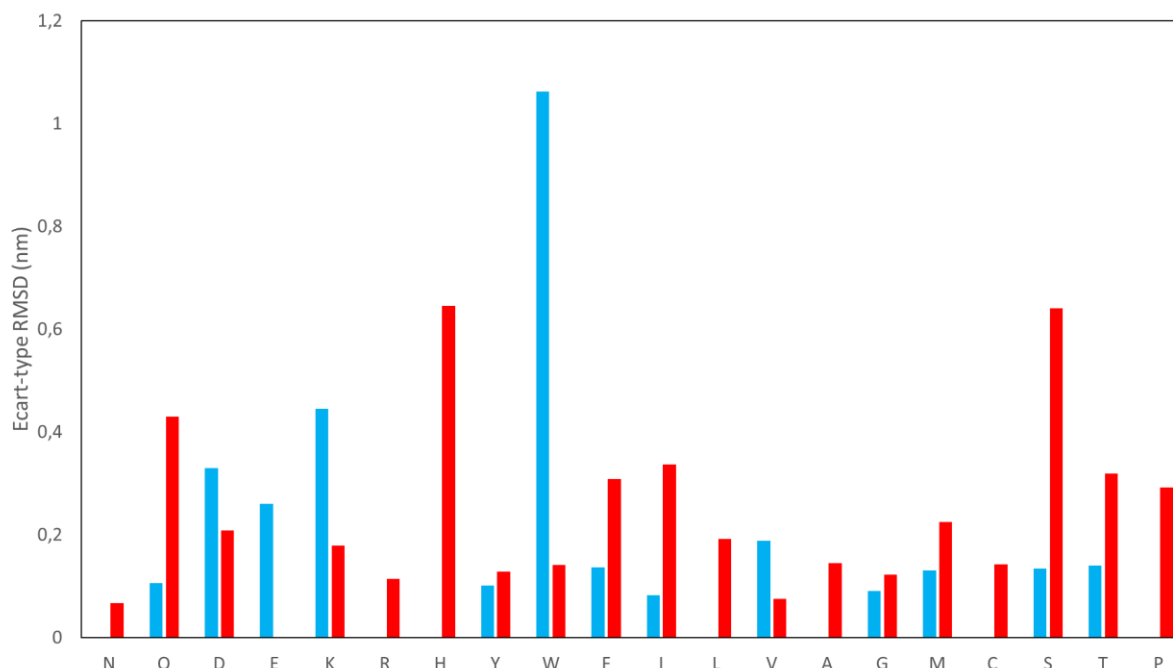


Figure 5.23 : Ecart-type du RMSD de chaque peptide adsorbé sur la nanoparticule dans l'eau SPC/E (en bleu) et dans l'eau TIP3P (en rouge), calculés sur 10 ns de simulation.

Bien que les valeurs moyennes des écarts-type des RMSD soient très proches (0,246 nm dans l'eau SPC/E et 0,248 nm dans l'eau TIP3P), nous observons des comportements très différents en fonction du modèle d'eau pour certains peptides. Par exemple la valeur obtenue pour le peptide W est de 1,06 nm dans l'eau SPC/E et de 0,14 nm dans l'eau TIP3P, tandis que nous obtenons pour le peptide S

0,13 nm dans l'eau SPC/E et 0,64 nm dans l'eau TIP3P. Ces différences de comportement se confirment en regardant les courbes entières, comme montré Figure 5.24.

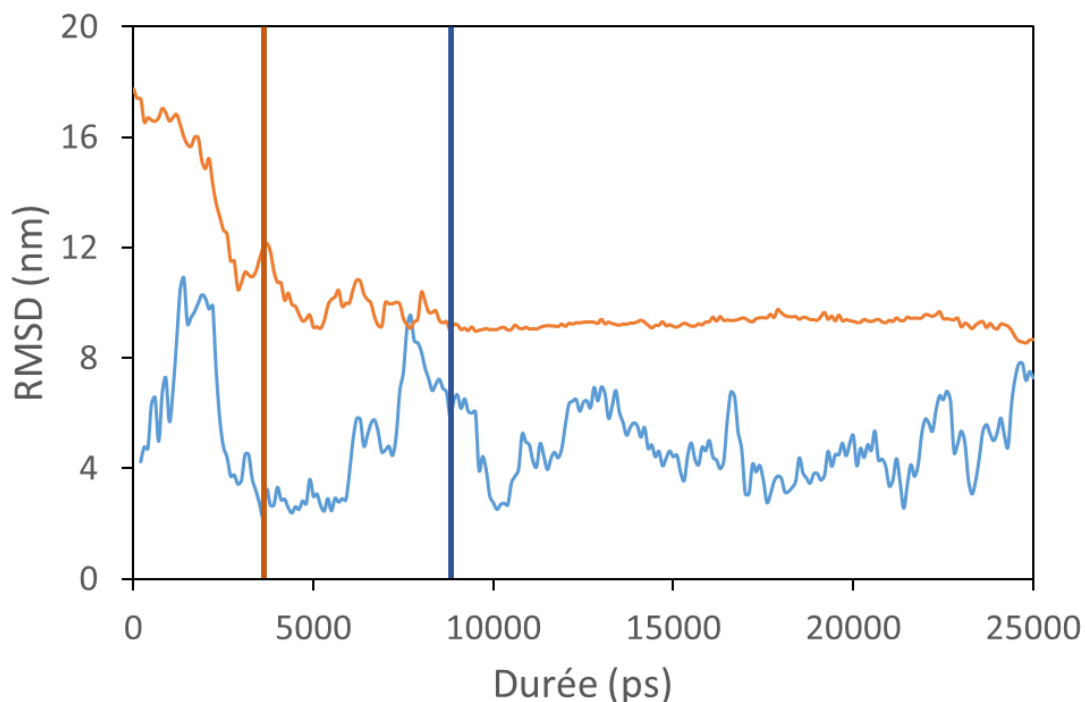


Figure 5.24 : Evolution du RMSD du peptide W au cours d'une simulation, dans l'eau SPC/E (en bleu) et dans l'eau TIP3P (en orange), le trait vertical bleu indique l'adsorption du peptide dans l'eau SPC/E et le trait vertical orange dans l'eau TIP3P.

Nous ne remarquons pas de points communs particuliers entre les peptides dont l'écart-type du RMSD est plus important dans l'eau SPC/E ou dans l'eau TIP3P. Dans la partie suivante des triplicatas de mise en contact de peptides avec une nanoparticule seront réalisés, ce qui pourrait nous permettre de déterminer si les écarts observés sont attribuables aux différences observées pour un même système simulé plusieurs fois.

Afin d'estimer l'affinité de chaque acide aminé pour la nanoparticule de plastique nous avons également calculé pour chaque système la proportion des contacts entre l'acide aminé considéré et le plastique. Pour cela nous calculons le nombre de contacts entre le peptide et la nanoparticule (à chaque frame, un contact est compté pour chaque résidu du peptide se trouvant à moins de 0,4 nm de la surface de la nanoparticule), puis le nombre de contacts entre chacun des 3 résidus correspondants à l'acide aminé considéré et la nanoparticule. Nous comptons ici le nombre de contact par résidus, et pas par atomes. Nous calculons ensuite le rapport du nombre de contacts de l'acide aminé considéré par rapport au nombre de contacts du peptide entier avec la nanoparticule. Les proportions obtenues sont rassemblées Figure 5.25. Pour les peptides G et S, les contacts sont uniquement comptés sur les acides aminés aux position 4, 7 et 10 de la séquence, et pas pour les acides aminés faisant partie de la formule générale de celle-ci.

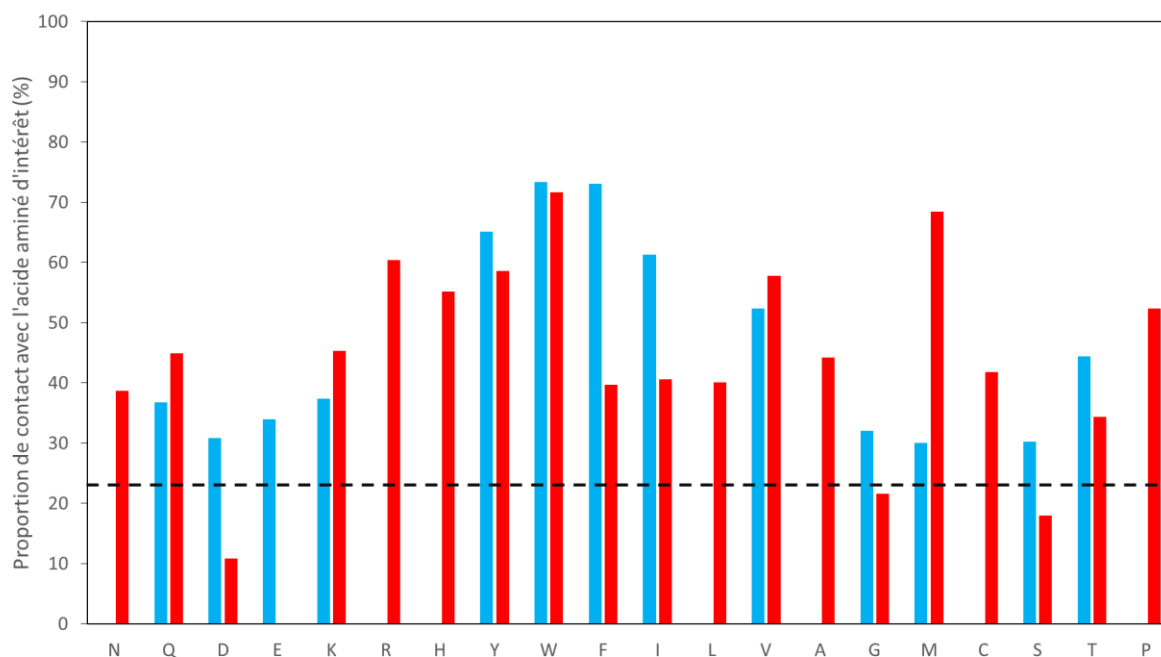


Figure 5.25 : Pourcentage de contact de chaque peptide avec la nanoparticule de PE se faisant avec l'acide aminé d'intérêt dans l'eau SPC/E (en bleu) et dans l'eau TIP3P (en rouge). La valeur correspondant à un contact uniforme entre le peptide et la nanoparticule (23%) est indiquée en pointillés.

Puisque l'acide aminé d'intérêt constitue 3 des 13 résidus du peptide, si le contact était uniforme entre le peptide et le plastique la proportion du contact se faisant avec l'acide aminé d'intérêt serait de 23% ($3/13 = 0,23$). Les proportions que nous avons calculées sont supérieures pour la plupart des peptides, et une plus forte proportion des contacts se faisant avec l'acide aminé étudié indique une plus forte affinité de ce dernier pour le plastique. En particulier nous observons que, pour tous les acides aminés hydrophobes, la proportion de contact est d'au moins 30%, ce qui confirme l'importance des interactions hydrophobes entre le plastique et le peptide. D'une façon générale nous observons que plus de 23% des contacts entre le peptide et la nanoparticule se font au niveau de l'acide aminé étudié, les exceptions étant les peptides D, G et S, et uniquement dans l'eau TIP3P. La séquence du peptide G étant uniforme en dehors des acides aminés terminaux, il est cohérent qu'aucun d'entre eux ne soit particulièrement favorisé pour interagir avec la nanoparticule, et que nous retrouvons donc une valeur proche de 23%. Les peptides S et D sont de petites tailles, en particulier leur chaîne latérale est courte ce qui peut limiter l'accessibilité à la surface. Cependant, nous n'observons pas de pourcentage de contact inférieur à 23% pour les autres petits acides aminés (N, V, A, G, C, T et P), ceci ne semble donc pas être une explication suffisante. Ceux-ci sont également polaires mais nous n'observons pas de faibles pourcentages de contact pour les autres acides aminés polaires, il est donc peu probable qu'il s'agisse de la cause de ces faibles valeurs. Une autre possibilité est que ces valeurs dépendent également de paramètres qui ne sont pas contrôlés dans le cadre de ces simulations, comme la zone de contact du peptide lors de son adsorption. Réaliser des duplicatas lors des prochaines simulations pourrait nous informer sur la cohérence de cette possibilité, qui semblerait plus probable si nous observons de fortes variations du pourcentage de contact avec l'acide aminé d'intérêt entre plusieurs simulations réalisées pour un même système initial.

Les acides aminés aromatiques semblent avoir une affinité particulièrement forte pour la nanoparticule, ces acides aminés représentant plus de 50% des contacts entre le peptide associé et la nanoparticule à l'exception de l'acide aminé F dans l'eau TIP3P, correspondant à 40% des contacts.

Ceci est cohérent puisque le cycle aromatique présent dans ces acides aminés est hydrophobe, et va donc réduire ses interactions avec l'eau en se liant à la nanoparticule.

En comparant les résultats obtenus en calculant les différentes grandeurs nous ne remarquons aucune corrélation entre le rayon de giration des peptides adsorbés, l'écart-type de leur RMSD et la proportion de contacts ayant lieu avec l'acide aminé étudié.

En moyenne le pourcentage de contacts se faisant avec l'acide aminé étudié est de 46% dans l'eau SPC/E et de 44% dans l'eau TIP3P. Malgré ces moyennes proches nous observons de fortes variations entre les deux modèles d'eau pour certains peptides, pour lesquels nous pouvons obtenir une valeur plus importante dans l'eau SPC/E (peptides D, F et I) ou dans l'eau TIP3P (peptides Q, K et M). Nous ne remarquons pas de propriétés communes entre ces peptides qui permettraient d'expliquer ces différences. Dans le paragraphe suivant, nous allons réaliser des triplicatas de simulations sur des systèmes qui pourront permettre de déterminer si l'ordre de grandeur de ces différences est comparable à celui des différences entre réplicas pour un même système.

1.3. Etude de l'influence de la nanoparticule

Après cette phase exploratoire, qui nous a permis de cerner la problématique, nous avons cherché à réaliser des simulations ayant un sens d'un point de vue statistique. Pour cela, 3 trajectoires ont été générées par systèmes et chacune d'entre elles a été prolongée pour observer le peptide adsorbé pendant au moins 50 ns. Ces études auront par ailleurs l'avantage d'autoriser les comparaisons entre systèmes. Cette partie a été développée par Mona Rysak dans le cadre de son master (Ecole Centrale Nantes, 2022, Plastiques, peptides et protéines : Approche de leurs interactions par dynamique moléculaire) sur des nanoparticules de PE vieilles ou non vieilles, uniquement en utilisant le modèle d'eau TIP3P. L'objectif de ces simulations est d'analyser les résultats de mise en contact de peptides avec différentes nanoparticules de PE vieilles pour les comparer aux mises en contact avec des nanoparticules de PE non vieilles.

Afin de permettre la réalisation de simulations sur de multiples systèmes, et en particulier de triplicatas sur la durée de ce stage, les calculs ont été réalisés sur des supercalculateurs. Le premier supercalculateur utilisé est Topaze, installé dans le Très Grand Centre de Calcul du CEA (TGCC), et le second est le supercalculateur Jean Zay, installé au centre de calcul du CNRS, l'IDRIS. Sur ces calculateurs, la simulation de 50 ns de nos systèmes peut être réalisée en une demi-journée.

1.3.1. Génération et analyse des nanoparticules de plastique vieilles

La taille des nanoparticules de PE générées dans le cadre de cette partie est plus petite que celle de la nanoparticule générée lors de la partie précédente. Ici les nanoparticules sont constituées de 9 chaînes de 60 résidus chacune, permettant d'obtenir des nanoparticules d'environ 1,5 nm de rayon. La taille des chaînes étant suffisamment faible pour les agencer dans une boîte de simulation de taille suffisamment faible pour réaliser un recuit simulé du système. Ce recuit causera l'agrégation des chaînes de polymère pour former une nanoparticule, ce qui est une méthode régulièrement utilisée dans la littérature²⁷⁻²⁹. Réaliser le recuit localement plutôt que d'utiliser CHARMM-GUI nous permettra de modifier les conditions initiales du système afin d'observer leur impact sur la nanoparticule générée. De plus, puisque nous chercherons uniquement à faire interagir ces nanoparticules avec des

peptides, une taille inférieure est plus adaptée pour que la surface de contact entre la nanoparticule et le peptide ne puisse pas être considérée comme plane à l'échelle de ce dernier.

Nous avons généré des chaînes de polymère constituées de résidus polyéthylène (PE), et dans le cadre des nanoparticules vieilles de résidus polycétone (PK) (Figure 5.26) dont la quantité a été déterminée en fonction de l'indice carbonyle mesuré pour nos plastiques vieillis (Voir chapitre 4 paragraphe 1.2). Certaines chaînes de nanoparticules de PE vieilles ont été générées en espaçant régulièrement les groupements carbonyle dans les chaînes carbonées, et d'autres en les plaçant aléatoirement.

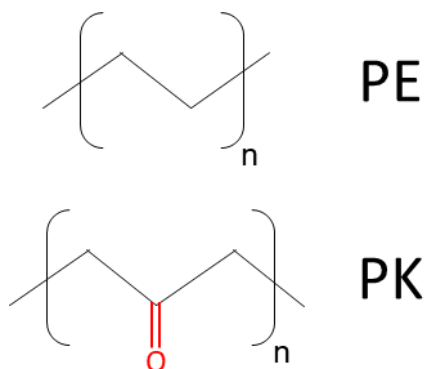


Figure 5.26 : Formules topologiques du résidu polyéthylène (PE, au dessus) et du résidu polycétone (PK, en dessous).

Les chaînes ont été générées en suivant deux protocoles différents :

-Pour les groupements carbonyle régulièrement espacés, nous avons généré une chaîne suivant la formule $H-[PE_xPK_1PE_{11-x}]_5-H$.

-Pour les groupements carbonyle espacés de façon aléatoire nous avons pris une chaîne composée de 55 résidus PE et avons ajouté 5 résidus PK à des positions aléatoires.

Dans chaque cas nous avons donc généré des chaînes avec 55 résidus PE et 5 résidus PK, afin d'obtenir un ratio de 4 atomes d'oxygène pour 100 atomes de carbone, en cohérence avec ce qui est trouvé dans la littérature³⁰ et ce que nous avons observé sur les échantillons de microparticules de plastique vieilles en laboratoire (voir chapitre 4 paragraphe 1.2).

Lors de la génération des nanoparticules de plastique nous avons utilisé 9 de ces chaînes (les 9 chaînes d'une même nanoparticule sont préparées en suivant le même protocole mais avec des emplacements différents pour les groupements PK), pour un total de 540 résidus par nanoplastique. Afin que ces chaînes se replient pour former une nanoparticule, elles ont été regroupées puis un recuit simulé a été effectué en suivant le profil de température présenté Figure 5.27. Pour garantir que les nanoparticules atteignent un état d'équilibre avant les mises en contact, chaque nanoparticule est simulée seule dans une boîte d'eau pendant 20 ns et la valeur de son RMSD est suivie afin de vérifier qu'elle atteint un plateau. Cette étape est représentée par le plateau de température Figure 5.27.

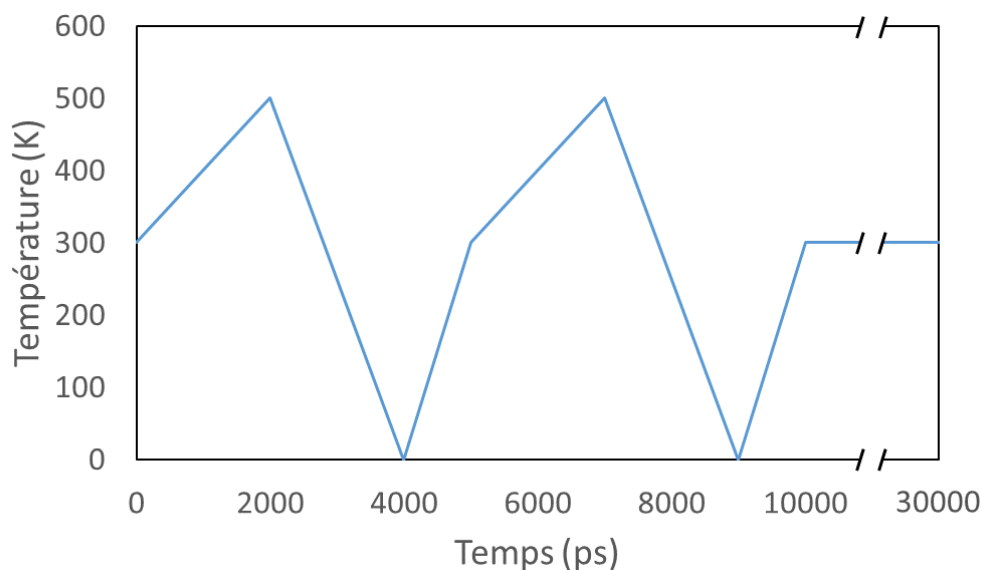


Figure 5.27 : Profil de température suivi lors du recuit simulé des nanoparticules de PE vieilles.

Après un recuit simulé, les chaînes carbonées se sont repliées pour former des nanoparticules de plastique, comme ce qui est représenté Figure 5.28.

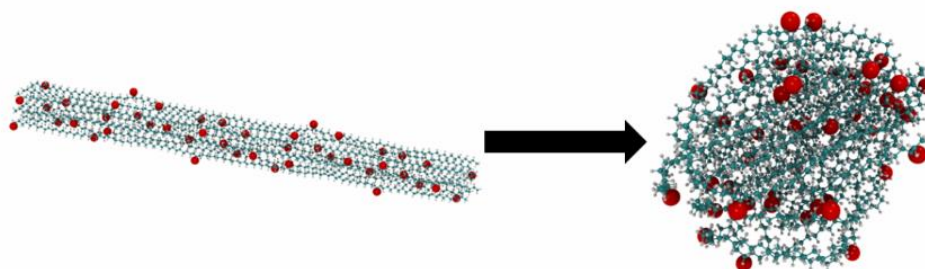


Figure 5.28 : Configuration initiale parallèle des chaînes de PE et nanoparticule de PE vieillie obtenue après recuit. Image réalisée sous VMD, nanoparticule en représentation CPK et atomes d'oxygène en représentation de van der Waals.

Les nanoparticules de PE obtenues ont des propriétés différentes, qu'il s'agisse de leur degré de cristallinité ou de la proportion d'atomes oxygène se trouvant en surface. Le pourcentage de cristallinité est ici défini comme la proportion d'angles dièdres dont la valeur absolue est supérieure à 160° le long des chaînes carbonées. Un fort pourcentage de cristallinité indique ainsi de plus longues portions linéaires et parallèles dans les chaînes, donc des nanoparticules plus structurées. Ces propriétés sont regroupées Tableau 5.3.

Nous observons qu'environ 10% de la surface des nanoparticules est occupée par des atomes d'oxygène, alors que les chaînes ne comprennent que 4% d'atomes d'oxygène. Ceci indique que le repliement des nanoparticules de PE est affecté par la présence des atomes d'oxygène, ce qui s'explique puisque les groupements carbonyle sont plus hydrophiles que le reste du plastique. Cette plus forte affinité des atomes d'oxygène pour la surface est confirmée par le fait que plus de 70% des atomes d'oxygène se trouvent à la surface pour toutes les nanoparticules. Cette proportion est fortement affectée par la répartition initiale des groupements carbonyle, en moyenne 74% des atomes d'oxygène se trouvent en surface lorsque les groupements sont répartis uniformément contre 85% lorsque ces groupements sont répartis aléatoirement.

| Particule | Proportion d'atomes d'oxygène exposés | Proportion de surface occupée par des atomes d'oxygène | Surface totale (nm ²) | Rayon de giration (nm) | Pourcentage de cristallinité |
|-----------|---------------------------------------|--|-----------------------------------|------------------------|------------------------------|
| NPv1 | 77,8 % | 9,4 % | 75,1 | 1,55 | 62,1 % |
| NPv2 | 73,3 % | 9,2 % | 73,0 | 1,52 | 58,9 % |
| NPv3 | 75,6 % | 8,4 % | 76,1 | 1,57 | 66,0 % |
| NPv4 | 71,1 % | 10,0 % | 74,0 | 1,55 | 62,5 % |
| NPv5 | 73,3 % | 8,3 % | 76,6 | 1,58 | 65,3 % |
| NPv6 | 73,3 % | 9,6 % | 72,5 | 1,52 | 61,4 % |
| NPv7 | 77,8 % | 10,8 % | 72,4 | 1,54 | 65,8 % |
| NPv8 | 88,9 % | 11,3 % | 74,4 | 1,54 | 62,6 % |
| NPv9 | 84,4 % | 10,8 % | 72,4 | 1,52 | 64,4 % |
| NPv10 | 88,9 % | 12,8 % | 71,5 | 1,52 | 63,8 % |
| NPv11 | 84,4 % | 10,4 % | 73,8 | 1,59 | 66,0 % |

Tableau 5.3 : Données mesurées sur les nanoparticules de PE vieilles.
 Les particules NPv1 à NPv6 (en bleu) correspondent aux groupements carbonyle espacés régulièrement, les particules NPv7 à NPv11 (en rouge) correspondent aux groupements carbonyle espacés aléatoirement, la particule NPv11 a été obtenue en plaçant initialement les chaînes carbonées en étoile.

Malgré la différence observée sur la proportion d'atomes d'oxygène en surface, la répartition des groupements carbonyle dans les chaînes carbonées n'affecte pas significativement la taille de la surface, le rayon de giration ou le pourcentage de cristallinité des nanoparticules de plastique.

Nous avons également testé une position initiale différente pour les chaînes carbonées, en étoile, illustrée Figure 5.29.

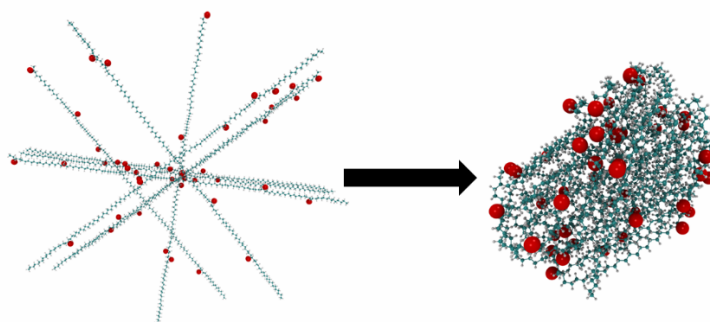


Figure 5.29 : Configuration initiale en étoile des chaînes de PE et nanoparticule NPv11 obtenue après recuit. Image réalisée sous VMD, nanoparticule en représentation CPK et atomes d'oxygène en représentation de van der Waals.

La nanoparticule obtenue pour cette configuration initiale, NPv11, n'a pas présenté de différences significatives avec les autres nanoparticules générées. Des simulations ont ensuite été réalisées en

utilisant les nanoparticules NPv5, NPv10 et NPv11. NPv5 est la nanoparticule avec la surface totale la plus importante et la plus faible proportion de sa surface accessible occupée par des atomes d'oxygène, NPv10 ayant inversement la plus petite surface totale et la plus grande proportion de surface accessible occupée par des atomes d'oxygène. Ceci nous permettra de déterminer si la quantité d'atomes d'oxygène en surface influence l'adsorption des peptides. NPv11 a le rayon de giration le plus important et le plus grand degré de cristallinité, et nous permettra de déterminer si la configuration initiale des chaînes de polymère affecte les interactions de la nanoparticule avec les peptides.

Des nanoparticules de PE non vieilles ont également été générées en suivant le même protocole avec 60 résidus PE. Comme pour les nanoparticules de PE vieilles, nous avons regroupé les surfaces, rayons et pourcentages de cristallinité de ces nanoparticules Tableau 5.4.

| Particule | Surface totale (nm ²) | Rayon de giration (nm) | Pourcentage de cristallinité |
|-----------|-----------------------------------|------------------------|------------------------------|
| NPnv1 | 70,6 | 1,61 | 78,4 % |
| NPnv2 | 70,8 | 1,61 | 77,3 % |
| NPnv3 | 72,04 | 1,58 | 69,9 % |
| NPnv4 | 70,75 | 1,51 | 75,3 % |
| NPnv5 | 69,9 | 1,52 | 74,4 % |

Tableau 5.4 : Surface totale, rayon de giration et pourcentage de cristallinité mesurés sur chaque nanoparticule de PE non vieillie.

Comparés aux nanoparticules de PE vieilles, les surfaces et rayons de giration obtenus sont du même ordre de grandeur. En moyenne les nanoparticules de PE vieilles ont une surface totale de 73,8 nm² et un rayon de giration de 1,55 nm, tandis que les nanoparticules de PE non vieilles ont une surface totale de 70,82 nm² et un rayon de giration de 1,57 nm. Le pourcentage de cristallinité des nanoparticules non vieilles est toutefois notablement supérieur à celui des nanoparticules de PE vieilles, avec une moyenne de 63,5% pour les nanoparticules vieilles et 75,1% pour les non vieilles. Ce résultat diffère de nos observations expérimentales en DRX présentées chapitre 4 paragraphe 1.3, où nous n'avons pas observé de modification de la structure des microparticules de PE lors de leur vieillissement. Cette différence peut s'expliquer par le fait que nos expériences portent sur du PE qui était déjà sous forme de particules lors de leur vieillissement, tandis que les simulations ont été réalisées avec des chaînes de PE vieilles avant la formation de la particule.

Nous avons réalisé les simulations de mise en contact de nanoparticules avec des peptides pour la nanoparticule NPnv1, que nous noterons NPnv pour le reste de ce chapitre. Nous pourrons ainsi comparer les résultats des simulations avec des nanoparticules vieilles et une nanoparticule non vieillie dans les mêmes conditions.

1.3.2. Mise en contact des peptides avec les nanoparticules de PE.

Notre but étant d'étudier l'impact des propriétés du plastique sur les interactions, nous allons nous limiter à 5 peptides afin de pouvoir simuler plusieurs systèmes pour chaque peptide (mise en contact de chaque peptide avec 4 nanoparticules différentes, et réalisation de 3 simulations pour chaque système).

Lors des simulations, nous avons mis dans une boîte d'eau un peptide et un nanoplastique, puis le système a été simulé jusqu'à avoir 50 ns de contact, comme représenté Figure 5.30.

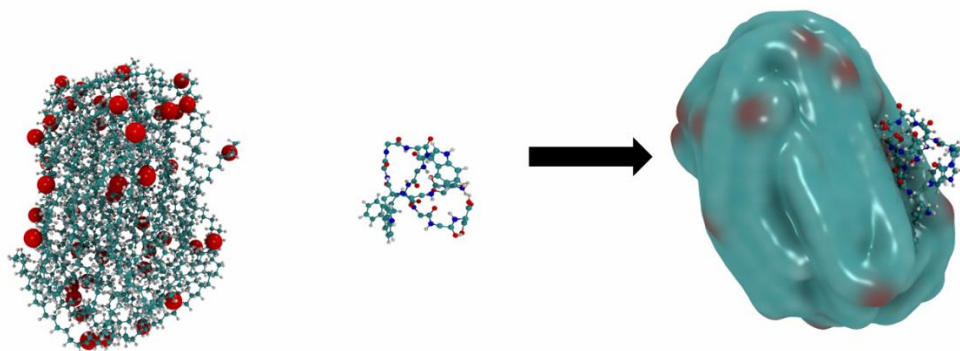


Figure 5.30 : Représentation de la mise en contact d'un peptide avec une nanoparticule de PE vieillie. Images réalisées sous VMD, peptide en représentation CPK, nanoparticule en représentation CPK avec les atomes d'oxygène en représentation de van der Waals à gauche et en représentation QuickSurf à droite.

Ici, les systèmes obtenus sont composés d'environ 300000 atomes dans une boîte de 13 nm de côté. Le protocole suivi pour obtenir ces systèmes est résumé Figure 5.31, la différence la plus notable avec le celui présenté Figure 5.8 étant l'ajout d'une étape de stabilisation (20 ns) sur la nanoparticule seule avant l'ajout du peptide.

Afin d'avoir le temps de réaliser des triplicatas pour toutes les simulations sur les nanoparticules de plastique vieilles, seuls 5 acides aminés ont été étudiés, les acides aminés W, Y, V, K et E.

Les peptides correspondant aux acides aminés W et Y ont été choisis parce qu'ils sont fluorescents, ce qui permettra de les utiliser pour des expériences à comparer aux résultats des simulations. Les peptides correspondant aux acides aminés K et E sont chargés, respectivement positivement et négativement, et ont donc été choisis pour observer l'influence de la charge totale du peptide sur ses interactions avec le nanoplastique. Le peptide correspondant à l'acide aminé V ne contient pas de cycle aromatique et est hydrophobe, le rendant complémentaire aux autres peptides sélectionnés.

Chacun de ces peptides a été mis en contact avec chacune des 4 nanoparticules mentionnées à la fin de la partie précédente. Chaque système a été simulé jusqu'à ce que le peptide ait été adsorbé par la nanoparticule pendant au moins 40 ns, et des triplicatas ont été réalisés pour observer les différences pouvant avoir lieu d'une simulation à l'autre pour un même système.

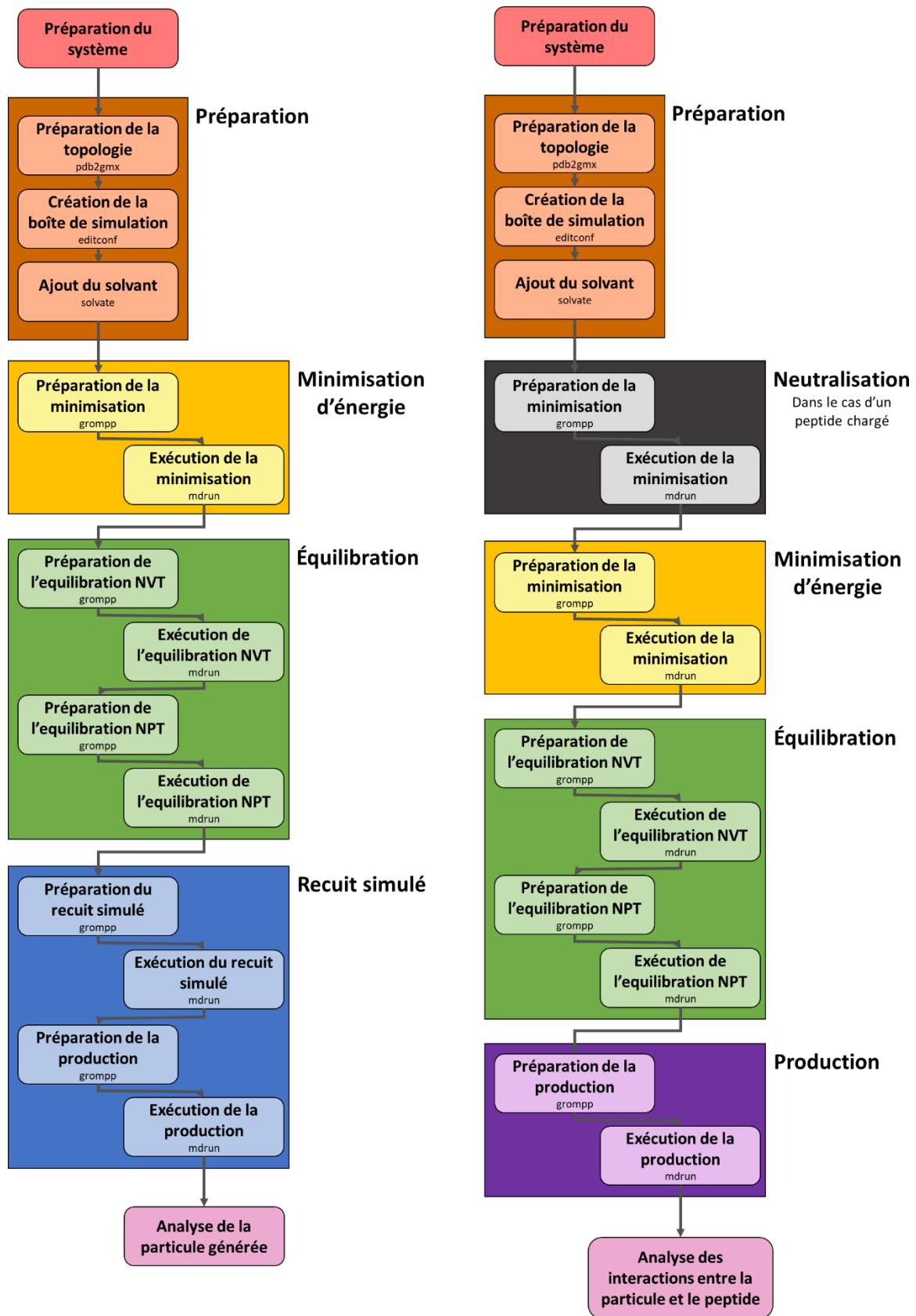


Figure 5.31 : Protocole suivi pour générer une nanoparticule de PE (à gauche). puis pour la mettre en contact avec les peptides (à droite).

1.3.3. Analyse des résultats

Une première différence de ces simulations comparées à celles présentées dans le paragraphe précédent est que, pour tous les systèmes, le peptide a été adsorbé en moins de 50 ns. Ces simulations ont donc permis d'obtenir des adsorptions beaucoup plus rapidement que les systèmes précédents, où le contact entre le peptide et la nanoparticule ne se faisait parfois qu'après plus de 200 ns simulées. Cette différence peut simplement être causée par la différence de taille entre les systèmes simulés. En effet, la boîte de simulation générée dans cette partie est 2,7 fois plus petite en volume que celle générée dans la partie précédente. Puisque nous utilisons des conditions périodiques, cela revient à simuler un système dans lequel la concentration en peptide et en plastique est 2,7 fois plus importante, favorisant ainsi les contacts. Le fait que cette diminution de la taille du système diminue fortement la durée nécessaire pour observer des adsorptions est cohérent avec notre hypothèse selon laquelle les variations de durée avant contact étaient principalement causées par le caractère aléatoire du mouvement du peptide en solution.

Afin d'estimer l'impact de la présence d'atomes d'oxygène sur l'adsorption des peptides, nous avons à l'issue de chaque simulation calculé le pourcentage de la surface de contact entre le peptide et la nanoparticule correspondant à un contact entre le peptide et un atome d'oxygène. Le nombre de contacts est ici compté par atome. En comparant ce pourcentage au pourcentage de la surface de la nanoparticule occupée par les atomes d'oxygène, nous pouvons en déduire si le contact avec les atomes d'oxygène est favorisé ou non par les peptides. Les résultats obtenus sont regroupés Tableau 5.5.

Nous observons que les variations des résultats entre les nanoparticules sont du même ordre de grandeur que les variations entre les tests sur une même nanoparticule. Par exemple, dans le cas du test 1, pour le peptide W, nous observons que le pourcentage de contact entre le peptide et les atomes d'oxygène de la nanoparticule est de 5,5% sur NPv11 et de l'ordre de 2% sur NPv5 et NPv10. Cet écart peut sembler important, mais lors du troisième test il est de 6% sur NPv5 et NPv10, et de 4,2% sur NPv11.

Nous en déduisons que les différences entre les 3 nanoparticules choisies n'influencent pas de façon notable la probabilité pour qu'un peptide soit adsorbé au niveau d'un atome d'oxygène. De la même façon nous avons observé que les différences entre ces nanoparticules ne modifient pas le rayon de giration, le RMSD des peptides adsorbés, ou la proportion de contact entre le peptide et la nanoparticule se faisant au niveau de l'acide aminé étudié (Tableau 5.5). Afin de simplifier la comparaison avec la nanoparticule non vieillie NPnv, nous moyennerons les valeurs obtenues avec les 3 nanoparticules vieilles NPv5, NPv10 et NPv11 (voir Tableau 5.9 et Tableau 5.10).

| Peptide E | | | | |
|------------------|--------|--------|--------|---|
| Particule | Test 1 | Test 2 | Test 3 | Surface accessible occupée par des atomes d'oxygène |
| NPv5 | 4,9 % | 6,3 % | 1,9 % | 8,30% |
| NPv10 | 4,4 % | 4,2 % | 5,7 % | 12,77% |
| NPv11 | 6,9 % | 2,6 % | 3,2 % | 10,24% |
| Peptide K | | | | |
| Particule | Test 1 | Test 2 | Test 3 | Surface accessible occupée par des atomes d'oxygène |
| NPv5 | 5,5 % | 3,6 % | 1,3 % | 8,30% |
| NPv10 | 4,4 % | 6,7 % | 3,2 % | 12,77% |
| NPv11 | 2,5 % | 2,9 % | 4,8 % | 10,24% |
| Peptide Y | | | | |
| Particule | Test 1 | Test 2 | Test 3 | Surface accessible occupée par des atomes d'oxygène |
| NPv5 | 5,9 % | 5,5 % | 1,7 % | 8,30% |
| NPv10 | 2,7 % | 3,6 % | 4,5 % | 12,77% |
| NPv11 | 6,4 % | 8,0 % | 4,0 % | 10,24% |
| Peptide W | | | | |
| Particule | Test 1 | Test 2 | Test 3 | Surface accessible occupée par des atomes d'oxygène |
| NPv5 | 1,9 % | 3,2 % | 6,2 % | 8,30% |
| NPv10 | 2,2 % | 3,7 % | 6,0 % | 12,77% |
| NPv11 | 5,5 % | 7,4 % | 4,2 % | 10,24% |
| Peptide V | | | | |
| Particule | Test 1 | Test 2 | Test 3 | Surface accessible occupée par des atomes d'oxygène |
| NPv5 | 3,0 % | 4,3 % | 3,3 % | 8,30% |
| NPv10 | 3,8 % | 3,0 % | 6,3 % | 12,77% |
| NPv11 | 5,4 % | 4,5 % | 4,8 % | 10,24% |

Tableau 5.5 : Pourcentage de contact entre le peptide et les nanoparticules de PE vieilles se faisant au niveau des atomes d'oxygène et comparaison avec la surface accessible de la nanoparticule occupée par les atomes d'oxygène.

Pour chaque simulation en présence d'une nanoparticule vieillie, la proportion de contacts entre le peptide et les atomes d'oxygène de la nanoparticule est inférieure à la proportion de la surface couverte par des atomes d'oxygène. Ceci peut indiquer que les peptides évitent les atomes d'oxygène, ou que des parties spécifiques du peptide sont adsorbées au niveau des atomes d'oxygène et empêchent le reste du peptide de se lier à l'oxygène par gêne stérique. En observant les trajectoires des peptides lors de leur adsorption, nous remarquons la formation de liaisons fortes entre les atomes d'oxygène de la nanoparticule et les groupes donneurs de liaisons hydrogène des peptides (présentés Figure 5.11). L'importance de ces liaisons se confirme en observant l'évolution de la distance entre un atome d'oxygène de la nanoparticule et un groupe donneur de liaison hydrogène d'un peptide, comme présenté Figure 5.32.

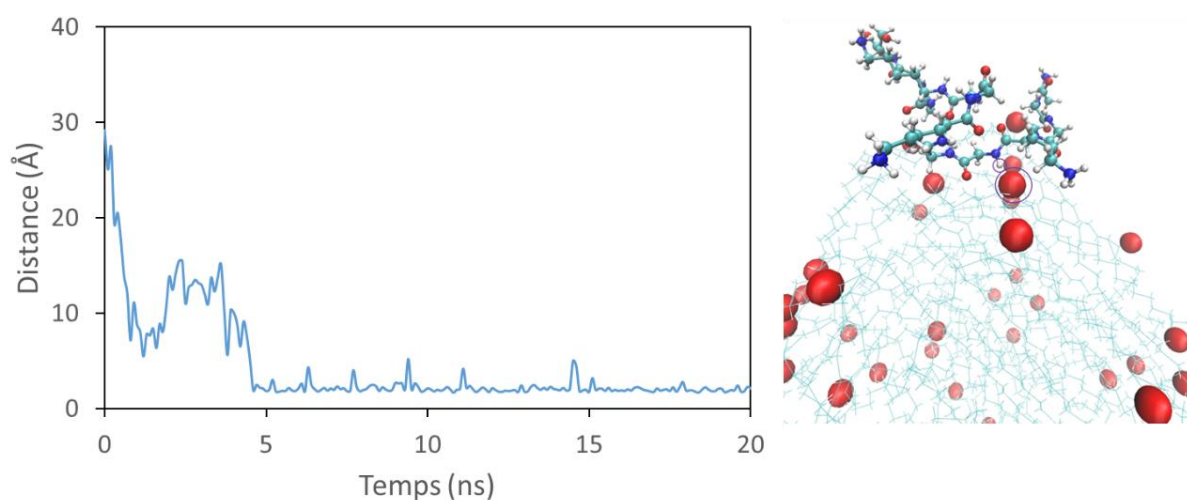


Figure 5.32 : A gauche, suivi de l'évolution au cours du temps de la distance entre un atome d'oxygène de la nanoparticule NPv10 et un atome d'hydrogène du peptide K, à droite, représentation du peptide adsorbé sur la surface de la nanoparticule, les atomes suivis étant entourés en violet. Image réalisée sous VMD, peptide en représentation CPK, nanoparticule en représentation QuickSurf et atomes d'oxygène en représentation van der Waals.

Le suivi de cette distance met en évidence la présence d'une interaction entre l'atome d'hydrogène du peptide et l'atome d'oxygène de la nanoparticule à partir d'environ 5 ns. La distance entre ces atomes est maintenue à 2,0 Å, ce qui est plus petit que les 2,7 à 3 Å attendus pour une liaison hydrogène³¹. Cette faible distance montre qu'il s'agit d'une interaction forte, et que les atomes d'oxygène peuvent être des points d'ancrage pour les peptides. De plus, puisque cette liaison entre la nanoparticule et le peptide s'est formée au niveau d'une liaison peptidique et non sur une chaîne latérale, ce phénomène peut avoir lieu pour tous les peptides.

Nous avons ensuite comparé le pourcentage de contact d'un acide aminé d'intérêt avec la nanoparticule, le rayon de giration du peptide adsorbé et l'écart-type du RMSD du peptide pour l'ensemble des trajectoires avec la nanoparticule non vieillie. Une fois de plus, nous comptons le nombre de contacts par résidus et pas par atomes.

Les valeurs du pourcentage de contact entre le peptide et NPnv se faisant sur l'acide aminé lors de chaque simulation sur la nanoparticule sont regroupées Tableau 5.6.

| Pourcentages de contacts sur l'acide aminé étudié | Peptide E | Peptide K | Peptide Y | Peptide W | Peptide V |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Simulation 1 | 40,9 % | 35,4 % | 51,4 % | 79,8 % | 50,3 % |
| Simulation 2 | 34,9 % | 31,2 % | 73,4 % | 75,9 % | 43,4 % |
| Simulation 3 | 38,3 % | 39,0 % | 65,1 % | 46,9 % | 49,0 % |
| Moyenne | 38 % | 35 % | 63 % | 68 % | 48 % |

Tableau 5.6 : Comparaison du pourcentage de contact entre le peptide et la nanoparticule non vieillie se faisant au niveau de l'acide aminé étudié lors des 3 simulations de NPnv avec chaque peptide.

Nous observons une forte variabilité des résultats, en particulier pour les peptides aromatiques pour lesquels nous pouvons obtenir, pour le même système, une valeur de l'ordre de 50% ou une valeur supérieure à 70%. Cette variabilité observée sur plusieurs trajectoires d'un même système peut expliquer la variabilité des résultats entre des systèmes proches, par exemple la valeur de 40% obtenue pour le peptide F dans l'eau TIP3P contre 73% dans l'eau SPC/E lors de nos premières mesures (Figure 5.25), ainsi que les valeurs inférieures à 23% obtenues pour certains peptides. De plus, cette variabilité nous informe que certains paramètres que nous ne contrôlons pas dans nos simulations, comme la zone de contact, peuvent influencer sur les interactions entre le peptide et la nanoparticule. Des simulations supplémentaires réalisées en bloquant ces paramètres pourraient nous donner des informations sur leur influence.

Les rayons de giration moyens des peptides adsorbés lors de chaque simulation avec la nanoparticule non vieillie sont rassemblés Tableau 5.7.

| Rayon de giration (nm) | Peptide E | Peptide K | Peptide Y | Peptide W | Peptide V |
|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Simulation 1 | 0,69 | 0,67 | 0,63 | 0,83 | 0,66 |
| Simulation 2 | 0,71 | 0,73 | 0,73 | 0,75 | 0,65 |
| Simulation 3 | 0,69 | 0,64 | 0,74 | 0,65 | 0,54 |
| Moyenne | 0,70 | 0,68 | 0,70 | 0,74 | 0,62 |

Tableau 5.7 : Comparaison du rayon de giration moyen du peptide adsorbé lors des 3 simulations de NPnv avec chaque peptide.

Nous observons une faible variation des rayons de giration entre les différentes simulations. Ceci peut être parce que les peptides peuvent diffuser à la surface des nanoparticules de PE non vieilles, sans atomes d'oxygène qui pourraient se lier au peptide et stabiliser sa conformation.

De la même façon, nous avons regroupé les valeurs de l'écart-type du RMSD des peptides adsorbés sur la nanoparticule NPnv Tableau 5.8.

| Ecart-type du RMSD du peptide adsorbé (nm) | Peptide E | Peptide K | Peptide Y | Peptide W | Peptide V |
|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Simulation 1 | 0,66 | 0,77 | 0,78 | 0,29 | 0,93 |
| Simulation 2 | 1,06 | 0,49 | 0,36 | 0,51 | 0,27 |
| Simulation 3 | 0,81 | 0,55 | 0,86 | 0,58 | 0,10 |
| Moyenne | 0,84 | 0,60 | 0,67 | 0,46 | 0,43 |
| Ecart-type | 0,20 | 0,15 | 0,27 | 0,15 | 0,44 |

Tableau 5.8 : Comparaison de l'écart-type du RMSD du peptide adsorbé par rapport à la nanoparticule lors des 3 simulations de NPnv avec chaque peptide.

Cette fois, nous observons une forte variabilité des résultats entre simulations pour un même système. Ici, pour chaque peptide la valeur la plus importante obtenue est au moins de l'ordre du double de la valeur la plus faible. Ceci renforce l'importance de répéter chaque simulation et de réaliser des études statistiques pour comparer les résultats entre différents systèmes. Pour nos futures simulations nous augmenterons d'ailleurs le nombre de simulations jusqu'à obtenir des valeurs d'écart-type plus raisonnables (ici l'écart-type peut aller jusqu'à dépasser la valeur moyenne dans le cas du peptide V).

Pour le reste de cette partie, afin de comparer les différents systèmes, nous allons moyenner les valeurs des trois simulations sur la nanoparticule non vieillie (voir Tableau 5.9 et Tableau 5.10).

Afin de déterminer l'influence de la présence des atomes d'oxygène sur la structure des peptides adsorbés et l'affinité des différents acides aminés pour la nanoparticule nous avons calculé pour chaque système le rayon de giration du peptide adsorbé, l'écart-type de son RMSD et le pourcentage de contacts entre le peptide et la nanoparticule se faisant au niveau de l'acide aminé étudié. Ces données ont été moyennées sur les nanoparticules vieillies (NPv5, NPv10 et NPv11) et comparées à la nanoparticule non vieillie NPnv. Les rayons de giration des peptides adsorbés sont rassemblés et comparés aux rayons de giration en solution Tableau 5.9.

| | Rg du peptide en solution (nm) | Rg du peptide adsorbé (nm) | |
|------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|--|
| | | NPnv | Moyenne NP vieillies NPv5-NPv10-NPv11 |
| Peptide E | 0,62 | 0,70 | 0,67 |
| Peptide K | 0,72 | 0,68 | 0,67 |
| Peptide Y | 0,65 | 0,70 | 0,69 |
| Peptide W | 0,67 | 0,74 | 0,70 |
| Peptide V | 0,59 | 0,62 | 0,64 |

Tableau 5.9 : Comparaison du rayon de giration de chaque peptide en solution et adsorbé sur une nanoparticule de PE vieillie ou non vieillie.

Le rayon de giration est généralement plus élevé pour les peptides adsorbés que pour les peptides en solution, ce qui est cohérent avec une augmentation de la surface d'interaction entre le peptide et la nanoparticule. Ces modifications du rayon de giration restent toutefois faibles, ce qui indique que le

rayon de giration n'est pas un indicateur idéal pour suivre les changements de conformations moyennes des peptides.

Nous avons également calculé l'écart-type du RMSD des peptides adsorbés par rapport à la nanoparticule, ainsi que le pourcentage de contact entre le peptide et la nanoparticule se faisant sur l'acide aminé étudié. Ces données sont rassemblées Tableau 5.10.

| | Ecart-type du RMSD du peptide adsorbé (nm) | | Pourcentages de contacts sur l'acide aminé étudié | |
|------------------|--|--------------------------------------|---|--------------------------------------|
| | NPnv | Moyenne NP vieilles NPv5-NPv10-NPv11 | NPnv | Moyenne NP vieilles NPv5-NPv10-NPv11 |
| Peptide E | 0,84 | 0,60 | 38 % | 34 % |
| Peptide K | 0,60 | 0,48 | 35 % | 35 % |
| Peptide Y | 0,67 | 0,43 | 60 % | 63 % |
| Peptide W | 0,46 | 0,32 | 68 % | 67 % |
| Peptide V | 0,43 | 0,37 | 48 % | 52 % |

Tableau 5.10 : Comparaison des propriétés des peptides adsorbés sur des nanoparticules de PE vieilles et une nanoparticule de PE non vieilles.

Le pourcentage des contacts entre le peptide et la nanoparticule se faisant avec l'acide aminé étudié sur les nanoparticules vieilles diffère peu de ce qui est observé sur la nanoparticule NPnv. En particulier nous continuons d'observer une plus forte affinité pour les acides aminés aromatiques hydrophobes, une faible plus faible affinité pour l'acide aminé hydrophobe mais non aromatique, et une affinité encore plus faible pour les acides aminés chargés.

Les atomes d'oxygène présents dans les nanoparticules de plastique ne semblent donc pas avoir d'impact important sur la structure des peptides adsorbés ou sur l'affinité des acides aminés étudiés pour le plastique. Il serait toutefois intéressant d'étudier l'impact de ces atomes d'oxygène sur la formation d'une corona par adsorptions successives de peptides. En effet, si les portions de surface de la nanoparticule ne contenant pas d'atomes d'oxygène sont déjà occupées par des peptides, les peptides suivants pourraient être forcés d'interagir avec les atomes d'oxygène, affectant potentiellement leurs propriétés de façon différente. Nous avons commencé à réaliser ce type de simulations, et nos premiers résultats seront présentés dans le chapitre suivant.

Nous remarquons que les écarts-types des RMSD des peptides par rapport au plastique sont significativement plus petits dans le cas des nanoparticules vieilles que dans celui de la nanoparticule non vieilles. Ceci indique que les peptides adsorbés se déplacent moins sur la surface des nanoparticules vieilles que sur celle de la nanoparticule non vieilles, ce qui est cohérent avec la présence de liaisons hydrogène mise en évidence Figure 5.32. Dans le but d'analyser de façon plus précise le déplacement de peptides à la surface de la nanoparticule, nous avons suivi l'évolution des coordonnées de leur centre de masse dans le référentiel centré sur la nanoparticule de PE stabilisée. L'observation de ces trajectoires met en évidence une très forte modification du comportement des peptides lors de leur adsorption, comme nous pouvons le voir Figure 5.33.

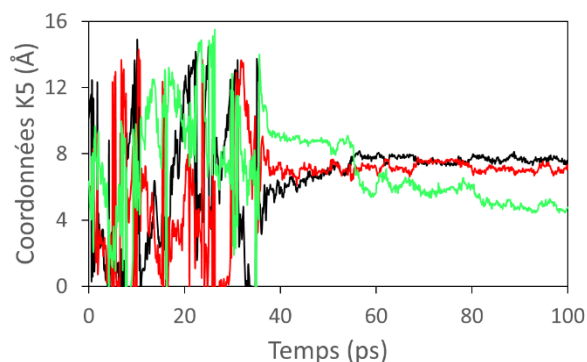


Figure 5.33 : Coordonnées du centre de masse du peptide K au cours de la simulation 1 avec la nanoparticule NPv5. Les axes (x en noir, y en vert et z en rouge) sont définis arbitrairement et l'origine est placée au centre de masse de la NP.

Sur cette trajectoire, ainsi que sur toutes les autres trajectoires observées, nous remarquons que la position du peptide en solution par rapport au peptide évolue de façon chaotique. Les mouvements du peptide ont une amplitude importante, de l'ordre d'une dizaine de nanomètre, et ne présentent pas de comportements spécifiques. Une fois le peptide adsorbé, l'amplitude et la vitesse des mouvements du peptide deviennent fortement limité. Afin de présenter en détails les types de déplacements des peptides adsorbés, l'ensemble des courbes obtenues pour le peptide K, qui sont représentatives des courbes obtenues pour les autres peptides, sont représentées Figure 5.34.

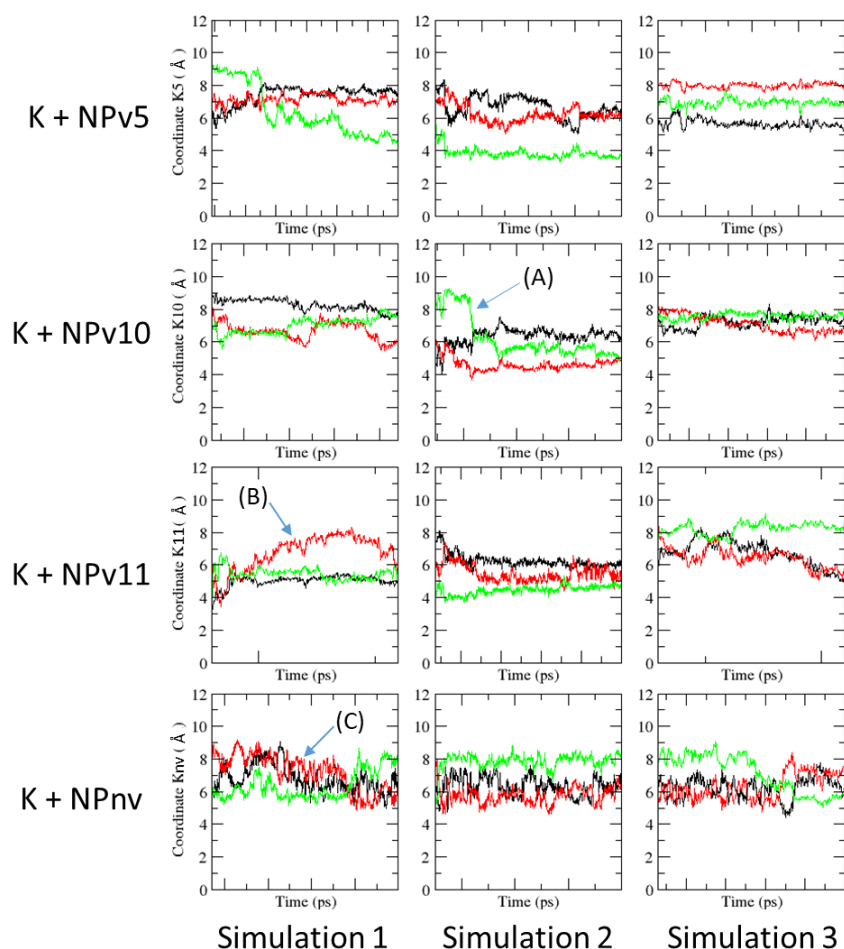


Figure 5.34 : Coordonnées du centre de masse du peptide K adsorbé au cours des simulations. Les axes (x en noir, y en vert et z en rouge) sont définis arbitrairement et l'origine est placée au centre de masse de la NP. A indique un exemple de saut, B un phénomène de diffusion et C un cas d'oscillation.

Comme nous l'avait indiqué les fortes variations de l'écart-type du RMSD entre les simulations, les déplacements du peptide à la surface de la nanoparticule diffèrent de façon importante entre plusieurs simulations d'un même système. Nous observons principalement 3 types de déplacements du peptide, indiqués sur les courbes Figure 5.34 : des sauts, des phénomènes de diffusion et des oscillations autour d'une position d'équilibre.

(A) Les sauts correspondent à des mouvements rapides sur une distance de 1 Å à 3 Å. Ici il est plus probable que ces sauts correspondent à des phénomènes physiques, par exemple à un peptide passant au-dessus d'une rugosité à la surface de la particule. Une observation du saut montre qu'il peut s'agir du passage du peptide d'une arrête à un creux, comme représenté Figure 5.35.

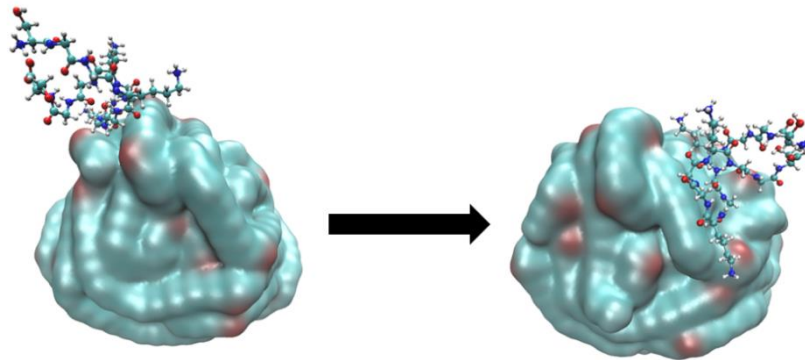


Figure 5.35 : Position du peptide K avant et après le saut indiqué sur NPv10.
Images réalisées sous VMD, peptide en représentation CPK et nanoparticule en représentation QuickSurf.

(B) Les phénomènes de diffusion correspondent à un déplacement continu du peptide dans une direction constante. Sur la courbe indiquée Figure 5.34, nous avons réalisé un ajustement de la trajectoire par la formule $x(t) = 2 \times \sqrt{Dt}$ afin d'estimer le coefficient de diffusion correspondant. En ajustant par minimisation de l'écart des carrés, nous avons calculé $D = 6,5 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$. Le système le plus proche que nous avons trouvé dans la littérature correspond à de la BSA sur du PMMA³², pour lequel le coefficient de diffusion est $D = 5,6 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$. L'ordre de grandeur du coefficient que nous avons calculé est donc cohérent mais petit, indiquant que la diffusion du peptide à la surface du nanoplastique est gênée. Ceci est cohérent avec le fait que nous n'avons observé ce phénomène de diffusion que pour un faible nombre de systèmes.

(C) Les oscillations correspondent à un mouvement aléatoire rapide, d'amplitude d'environ 1 Å. Ce mouvement aléatoire résulte principalement de l'agitation thermique, et est essentiellement observé sur la nanoparticule non vieillie. Puisque toutes les simulations sont réalisées à la même température, la réduction de cette amplitude dans le cas du peptide adsorbé sur une nanoparticule vieillie est due à la stabilisation de ce dernier par les liaisons hydrogènes formées avec les atomes d'oxygène du PE vieilli.

Globalement, nous observons que les déplacements des peptides se font principalement par sauts sur les nanoparticules vieillies et par oscillation sur la nanoparticule non vieillie. Ceci peut indiquer que, sur les nanoparticules vieillies, le déplacement des peptides est influencé par la position des atomes d'oxygène. L'écart-type moyen des coordonnées sur les nanoparticules vieillies, calculé sur 10 ns, est de 0,22 Å, contre 0,40 Å sur la nanoparticule non-vieillie. Ceci confirme la stabilisation de la position des peptides par les atomes d'oxygène. Ceci montre aussi les limites de l'étude de l'écart-type du

RMSD, puisque pour le peptide K nous avons calculé le même écart-type sur les nanoparticules vieilles et non vieilles.

2. Des simulations aux expériences sur deux peptides modèles

Nous avons commandé des peptides avec la même séquence que celle utilisée en simulations afin de pouvoir leur comparer des résultats expérimentaux. Pour ce travail nous avons commandé les peptides W et Y, correspondant aux séquences SGGWGGWGGWGS et SGGYGGYGGYGS, ceux-ci étant fluorescents ils permettent de travailler à des gammes de concentrations plus larges, et d'utiliser des méthodes expérimentales plus variées.

Nous avons mesuré les isothermes d'adsorption de ces peptides sur les microparticules de PP et de PE et comparé les informations obtenues à partir de ces isothermes aux informations tirées des simulations. L'objectif de ces comparaisons est de confirmer la validité de nos simulations, et idéalement de déterminer quel modèle d'eau est le plus représentatif du phénomène d'adsorption de ces peptides.

Des mesures d'isothermes ont été tentées avec les microparticules de plastique vieilles mais les résultats obtenus ne sont pas présentables. Comme pour les protéines, il semblerait qu'une forte concentration en peptide soit nécessaire pour atteindre le plateau de l'isotherme. Nous n'avons pas pu travailler à ces concentrations avec les peptides, en partie à cause de la faible quantité de peptides à notre disposition (20 mg de chaque au total) mais aussi à cause de la faible solubilité du peptide W dans l'eau.

Puisque les résultats obtenus lors de ces mesures ne sont pas exploitables, ils ne seront pas présentés dans cette partie.

Lors des mises en contact des peptides avec les microplastiques, nous avons utilisé des concentrations en peptide de 0,1 mg/L à 5 mg/L.

Bien que les microplastiques soient passés en solution, à ces concentrations en peptide une quantité relativement importante restait en surface des solutions, comme nous pouvons l'observer Figure 5.36.

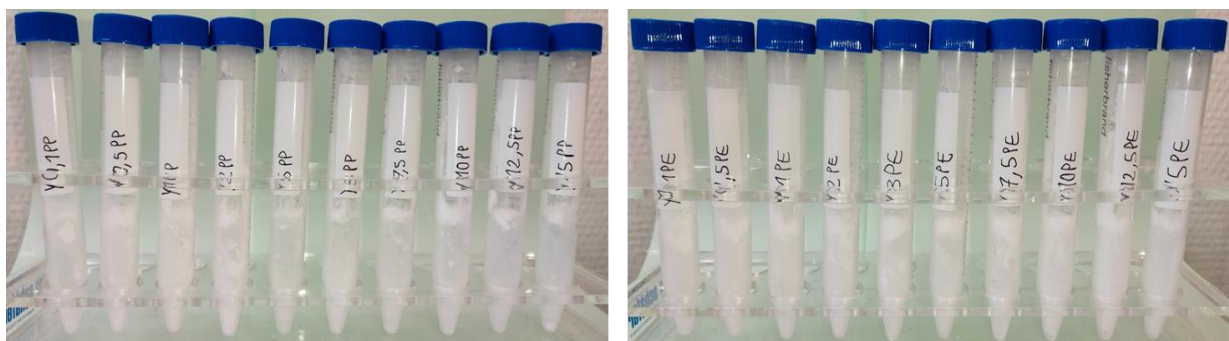


Figure 5.36 : Peptide Y à différentes concentrations, de 0,5 mg/L à 5 mg/L, après 72h de mise en contact avec des microparticules de PP (à gauche) et de PE (à droite).

Après avoir centrifugé les solutions pour en extraire les microparticules de plastique, les concentrations ont été mesurées par spectroscopie de fluorescence pour déterminer les quantités de peptides perdues. Les isothermes d'adsorption correspondantes ont été tracées Figure 5.37.

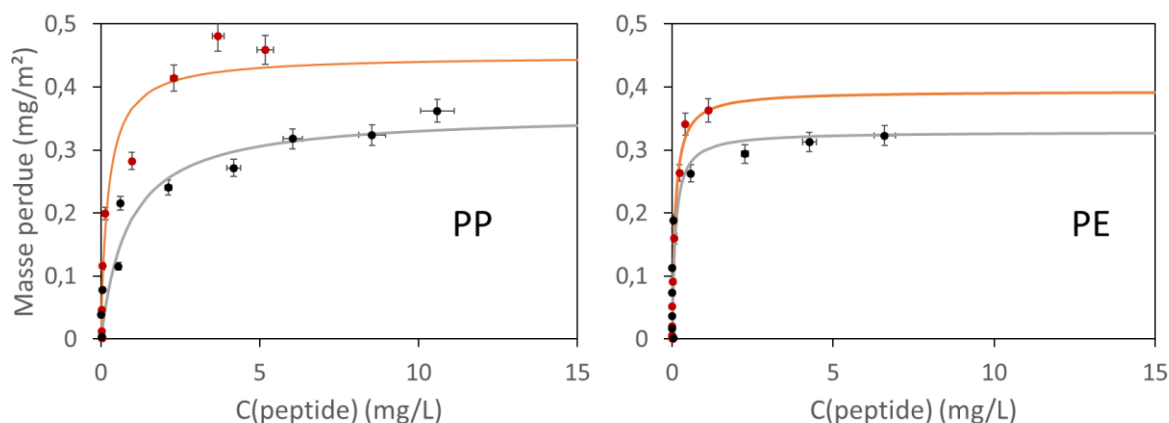


Figure 5.37 : Isothermes d'adsorption du peptide W (en orange) et du peptide Y (en noir) sur les microparticules de PP (à gauche) et de PE (à droite) et ajustements par le modèle de Langmuir.

Comparé aux isothermes d'adsorption obtenues avec les protéines, nous observons que les paliers des isothermes avec les peptides commencent à de plus faibles concentrations. Ceci est cohérent puisque, les peptides étant de plus petite taille que les protéines, la masse d'une monocouche de peptide sera inférieure à celle d'une monocouche de protéine.

Il ne nous a pas été possible de travailler avec des concentrations plus importantes en peptides, en partie à cause de la quantité limitée à notre disposition. Nous pouvons tout de même remarquer que les isothermes obtenues peuvent une fois de plus être ajustées par le modèle de Langmuir. Nous avons donc réalisé un ajustement par minimisation des carrés des écarts en suivant la formule de Langmuir (eq. 4).

$$C_{ads} = m_{\infty} \times \frac{C \times K_{ads}}{1 + C \times K_{ads}} \quad (eq. 4)$$

Dans cette formule, nous rappelons que m_{∞} correspond à la masse maximum de peptide pouvant être adsorbée par unité de surface des microparticules de plastique, et K_{ads} correspond à l'affinité du peptide pour les microparticules. Les paramètres obtenus lors de ces ajustements sont rassemblés Tableau 5.11.

| | PP | | PE | |
|-----------|-----------------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|
| | m_{∞} (mg/m ²) | K_{ads} (L/mg) | m_{∞} (mg/m ²) | K_{ads} (L/mg) |
| Peptide W | 0,45 ± 0,05 | 4,43 ± 1,5 | 0,39 ± 0,02 | 10,56 ± 2,0 |
| Peptide Y | 0,36 ± 0,03 | 1,17 ± 0,4 | 0,33 ± 0,02 | 10,0 ± 3,0 |

Tableau 5.11 : Paramètres obtenus par l'ajustement des isothermes d'adsorption des peptides avec le modèle de Langmuir.

Sur les microparticules de polypropylène, nous observons que le peptide W a une plus forte affinité pour le plastique que le peptide Y. Cette plus forte affinité semble accompagnée d'une plus grande valeur de m_{∞} , contrairement à ce que nous avons observé pour les protéines pour lesquelles une plus forte affinité était corrélée avec une diminution de la valeur de m_{∞} . Pour les protéines, cet effet résulte de la cinétique d'adsorption qui, pour les protéines ayant une forte affinité, devenait importante devant la cinétique de réarrangement des protéines adsorbées. Il est cohérent que cet effet ne soit pas observé pour les peptides, leur faible taille réduisant l'impact d'un possible réarrangement sur la surface occupée sur la particule. Inversement, il est possible que la plus grande affinité cause une

augmentation de la surface de contact du peptide avec le plastique, et donc une plus faible quantité de peptide adsorbé par quantité de surface.

Sur les microparticules de polyéthylène, nous observons à nouveau une plus grande quantité de peptide adsorbé par unité de surface pour le peptide W que pour le peptide Y, mais nous observons une affinité presque égale pour les deux peptides. Une explication possible de cette observation est que la surface des microparticules est saturée en peptide dans chaque cas, et que la différence de m_{∞} résulte simplement d'une différence de surface entre les peptides. Afin de vérifier cette hypothèse, tout en aidant à déterminer quel modèle d'eau est le plus adapté pour simuler ces interactions, nous avons calculé la valeur de m_{∞} qui correspondrait à une monocouche de peptide si la surface de contact entre le peptide et la microparticule est maximisée (cas observé en simulation dans l'eau SPC/E, comme illustré Figure 5.19). Pour cela nous avons calculé la surface d'une face du peptide, considéré comme étant la moitié de la surface accessible au solvant lorsque le peptide est en solution. Nous calculons ainsi une surface de 6,95 nm² pour le peptide W et 6,40 nm² pour le peptide Y. Pour cela, nous avons simulé ces peptides seuls pendant 50 ns en utilisant les mêmes paramètres de simulation que lors des mises en contact avec les nanoparticules de PE. La fonction sasa de Gromacs a ensuite été utilisée pour calculer la surface totale du peptide. Nous avons alors moyenné cette valeur sur les 50 ns de la simulation, puis l'avons divisée par 2 pour obtenir la surface d'une face du peptide. Sachant que le peptide W a une masse molaire de 1207 g/mol et le peptide Y a une masse molaire de 1138 g/mol, nous en déduisons une valeur de m_{∞} de 0,29 mg/m² pour le peptide W et 0,30 mg/m² pour le peptide Y. Ces valeurs sont rassemblées et comparées aux valeurs déterminées à partir des isothermes d'adsorption Tableau 5.12.

| Peptide | W | Y |
|---|-------------|-------------|
| m_{∞} calculée (mg/m ²) | 0,29 | 0,30 |
| m_{∞} mesurée expérimentalement (mg/m ²) | 0,39 ± 0,02 | 0,33 ± 0,02 |

Tableau 5.12 : Comparaison des valeurs de m_{∞} des peptides sur les microparticules de PE calculées à partir des simulations et déterminées expérimentalement à partir des isothermes d'adsorption.

Nous observons que les valeurs calculées sont très proches des valeurs expérimentales, en particulier pour le peptide Y, ce qui indique que les peptides adsorbés maximisent leur surface de contact avec le PE. Ceci suggère que, pour simuler ces systèmes, le modèle d'eau SPC/E est plus adapté puisque nous observons de plus grandes surfaces de contact entre les peptides et les particules de PE en utilisant ce modèle (comme illustré Figure 5.19).

Pour le peptide W, nous observons une plus grande affinité et une plus faible quantité de peptide adsorbé par unité de surface sur les microparticules de PE que sur les microparticules de PP. Les mêmes tendances sont observées pour le peptide Y. Dans chaque cas, les différences de m_{∞} sont du même ordre de grandeur que les incertitudes de calcul, les différences de quantité de peptide adsorbé ne sont donc pas significatives. Pour commenter sur la cohérence de ces observations, il serait nécessaire de réaliser des simulations des peptides avec des nanoparticules de PP.

Afin de comparer les résultats obtenus pour les peptides à ceux obtenus pour les protéines, nous avons rassemblé les paramètres obtenus en ajustant chaque isothermes d'adsorption Tableau 5.13.

| | PP | | PE | |
|--------------|-----------------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|
| | m_{∞} (mg/m ²) | K_{ads} (L/mg) | m_{∞} (mg/m ²) | K_{ads} (L/mg) |
| Peptide W | 0,5 ± 0,05 | 4,4 ± 1,5 | 0,4 ± 0,02 | 10,6 ± 2,0 |
| Peptide Y | 0,4 ± 0,03 | 1,2 ± 0,4 | 0,3 ± 0,02 | 10,0 ± 3,0 |
| BSA | 2,6 ± 0,2 | 1,0 ± 0,2 | 1,4 ± 0,1 | 0,7 ± 0,2 |
| Hémoglobine | 2,2 ± 0,2 | 92 ± 8 | 1,0 ± 0,1 | 26 ± 3 |
| α-synucléine | 1,1 ± 0,1 | 4,6 ± 0,5 | 0,7 ± 0,1 | 0,6 ± 0,1 |

Tableau 5.13 : Comparaison des paramètres obtenus après ajustement suivant le modèle de Langmuir des isothermes d'adsorption des peptides et des protéines sur les microparticules de PP et de PE.

Par rapport aux isothermes d'adsorption des protéines, nous observons des affinités pour les peptides du même ordre de grandeur que pour la BSA et l'α-synucléine. Ceci est cohérent avec notre hypothèse sur l'importance de la charge des protéines et peptides puisque la valeur du pI des peptides W et Y, calculée en utilisant ProtParam, est de 5,2. Il est donc attendu d'obtenir pour ces peptides des valeurs de K_{ads} plus proches de celles la BSA et de l'α-synucléine, dont le pI est de l'ordre de 4,7^{33,34}, que de celles de l'hémoglobine dont le pI est de 7,0³⁵. Nous observons également pour les peptides des valeurs de m_{∞} plus faibles que pour n'importe quelle protéine. Ceci est cohérent puisque les peptides sont de plus faible taille que les protéines, une monocouche de peptide a donc une masse plus petite qu'une monocouche de protéine.

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de mesures d'isothermes d'adsorption de peptides sur des microparticules de plastique, mais nous avons comparé nos résultats avec ceux obtenus lors de la mesure d'isothermes d'adsorption de peptides sur des nanoparticules de silice². Les paramètres obtenus lors des ajustements des isothermes par le modèle de Langmuir sont rassemblés Tableau 5.14.

| Peptide | m_{∞} (mg/m ²) | K_{ads} (L/mg) |
|-----------------------------|-----------------------------------|------------------|
| SRGGSRGGSRGGWGGRRGGSRRGGARG | 0,38 ± 0,02 | 0,36 ± 0,06 |
| SKGGSKGGSKGGWGGKGGSKGGAKG | 0,24 ± 0,01 | 0,24 ± 0,05 |
| WGGRRGGSRRGGARG | 0,10 ± 0,05 | 0,11 ± 0,05 |
| WGGKGGSKGGAKG | 0,09 ± 0,02 | 0,10 ± 0,04 |

Tableau 5.14 : Paramètres obtenus par ajustement suivant le modèle de Langmuir Des isothermes d'adsorption de peptides sur des nanoparticules de silice.

Tiré de Importance of Post-translational Modifications in the Interaction of Proteins with Mineral Surfaces: The Case of Arginine Methylation and Silica surfaces².

Nous observons que les valeurs de m_{∞} obtenues sont du même ordre de grandeur, ce qui est cohérent puisque les peptides sont de tailles similaires et semblent former des monocouches dans chaque cas, puisque toutes les isothermes ont pu être ajustées par le modèle de Langmuir.

Les valeurs de K_{ads} déterminées indiquent que l'affinité des peptides pour les microparticules de PP est de 3 à 44 fois plus élevée que pour les nanoparticules de silice, et leur affinité pour les microparticules de PE est de 27 à 106 fois plus élevée que pour les nanoparticules de silice. Ceci semble indiquer une plus grande affinité de ces peptides pour les particules hydrophobes, comme les microparticules de plastique. Ce résultat pourrait être confirmé par des expériences de titration calorimétrique

isotherme³⁶, mais la mise en place de celles-ci serait complexe puisque les microparticules de plastique ne sont pas stables en solution.

Un autre outil pour comparer les résultats des différentes simulations serait la méthode MM/PBSA^{37,38}, applicable aux simulations réalisées avec GROMACS. Cette méthode consiste à calculer la différence entre l'énergie libre du système contenant le peptide adsorbé par la nanoparticule, et la somme des énergies libres du peptide seul en solution et de la nanoparticule seule en solution pour déterminer l'énergie de liaison du peptide sur la nanoparticule. Ceci permettrait de comparer les valeurs pour différents peptides et d'observer l'influence éventuelle du modèle d'eau.

Pour compléter ces expériences il serait intéressant de réaliser des mesures turbiscan pour comparer la stabilisation des microparticules de plastique par les peptides à celle par les protéines. Ces expériences requièrent des quantités plus importantes de peptides, que nous n'avons pas à notre disposition pour cette thèse.

Ainsi, malgré les limites de cette étude, nous pouvons conclure que les simulations de dynamique moléculaire peuvent être une bonne façon de comprendre les interactions fondamentales de nanoparticules de plastique avec des peptides, et quels éléments peuvent favoriser ces interactions. En particulier, nos résultats indiquent une plus forte affinité des peptides hydrophobes et aromatiques pour les particules de plastique. Nous avons également montré que l'adsorption des peptides stabilise leur conformation en réduisant l'espace conformationnel qui leur est accessible. Les méthodes que nous avons établies dans ce chapitre pourront par la suite être utilisées sur des systèmes plus complexes, comportant des protéines et de plus grosses nanoparticules, pour déterminer l'affinité de protéines pour les particules de plastique et l'influence de leur adsorption sur leur structure.

Synthèse du chapitre

Pour simuler l'adsorption de peptides avec des nanoparticules de plastique, le choix d'un modèle d'eau approprié est particulièrement important, celui-ci pouvant fortement influencer les interactions observées.

Nos simulations ont montré que les acides aminés hydrophobes, et en particulier les acides aminés aromatiques ont une forte affinité pour les nanoparticules de plastique, confirmant l'importance des interactions hydrophobes pour le phénomène d'adsorption des peptides.

Les simulations de peptides en présence de nanoparticules de PE vieilles nous ont également permis de renforcer l'hypothèse émise dans le chapitre précédent concernant le comportement des protéines en présence de microparticules de plastique vieilles. Nous avons pu observer que des liaisons se forment entre les peptides et les atomes d'oxygène présents dans les nanoparticules. L'étude de l'influence de ces liaisons sur la formation d'une corona, en simulant l'adsorption de plusieurs peptides sur une même nanoparticule vieillie, pourrait nous permettre de mieux comprendre les fortes différences des valeurs de m_{∞} et de K_{ads} déterminées à partir des isothermes d'adsorption de l'hémoglobine sur les microparticules de plastique vieilles.

En nous basant sur ces résultats nous avons commencé à simuler l'adsorption de plusieurs peptides sur une nanoparticule. Les premiers résultats de ces simulations seront présentés dans les perspectives.

Nous avons également obtenu des pistes pour simuler l'adsorption de protéines sur des nanoparticules de plastique. En particulier, nous avons établi l'importance de répéter chaque simulation en mettant en évidence la variabilité des résultats entre simulations pour un même système initial. Nous avons pour le moment choisi d'utiliser le champ de force OPLS-AA avec le modèle d'eau TIP3P, mais d'autres champs de force seront testés lors des simulations de systèmes comprenant des protéines.

Bibliographie

- (1) Tzounis, P.-N.; Argyropoulou, D. V.; Anogiannakis, S. D.; Theodorou, D. N. Tacticity Effect on the Conformational Properties of Polypropylene and Poly(Ethylene–Propylene) Copolymers. *Macromolecules* **2018**, *51* (17), 6878–6891. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b01099>.
- (2) Marichal, L.; Renault, J.-P.; Chédin, S.; Lagniel, G.; Klein, G.; Aude, J.-C.; Tellier-Lebegue, C.; Armengaud, J.; Pin, S.; Labarre, J.; Boulard, Y. Importance of Post-Translational Modifications in the Interaction of Proteins with Mineral Surfaces: The Case of Arginine Methylation and Silica Surfaces. *Langmuir* **2018**, *34* (18), 5312–5322. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00752>.
- (3) Couvreur, A. Études structurales de nouvelles cibles thérapeutiques du CMVH révélées par les dérivés benzimidazolés ribonucléosides. **2009**, 281.
- (4) Oliveira, Y. M.; Vernin, N. S.; Maia Bila, D.; Marques, M.; Tavares, F. W. Pollution Caused by Nanoplastics: Adverse Effects and Mechanisms of Interaction *via* Molecular Simulation. *PeerJ* **2022**, *10*, e13618. <https://doi.org/10.7717/peerj.13618>.
- (5) Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (45), 11225–11236. <https://doi.org/10.1021/ja9621760>.
- (6) Ponder, J. W.; Case, D. A. Force Fields for Protein Simulations. In *Advances in Protein Chemistry*; Elsevier, 2003; Vol. 66, pp 27–85. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(03\)66002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(03)66002-X).
- (7) Kaminski, G.; Duffy, E. M.; Matsui, T.; Jorgensen, W. L. Free Energies of Hydration and Pure Liquid Properties of Hydrocarbons from the OPLS All-Atom Model. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98* (49), 13077–13082. <https://doi.org/10.1021/j100100a043>.
- (8) Visalakshan, R. M.; MacGregor, M. N.; Sasidharan, S.; Ghazaryan, A.; Mierczynska-Vasilev, A. M.; Morsbach, S.; Mailänder, V.; Landfester, K.; Hayball, J. D.; Vasilev, K. Biomaterial Surface Hydrophobicity-Mediated Serum Protein Adsorption and Immune Responses. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (31), 27615–27623. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b09900>.
- (9) Roach, P.; Farrar, D.; Perry, C. C. Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (22), 8168–8173. <https://doi.org/10.1021/ja042898o>.
- (10) Horinek, D.; Serr, A.; Geisler, M.; Pirzer, T.; Slotta, U.; Lud, S. Q.; Garrido, J. A.; Scheibel, T.; Hugel, T.; Netz, R. R. Peptide Adsorption on a Hydrophobic Surface Results from an Interplay of Solvation, Surface, and Intrapeptide Forces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (8), 2842–2847. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707879105>.
- (11) 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>.
- (12) Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P. The Missing Term in Effective Pair Potentials. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91* (24), 6269–6271. <https://doi.org/10.1021/j100308a038>.

- (13) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- (14) Vega, C.; Sanz, E.; Abascal, J. L. F. The Melting Temperature of the Most Common Models of Water. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122* (11), 114507. <https://doi.org/10.1063/1.1862245>.
- (15) Kusalik, P. G.; Svishchev, I. M. The Spatial Structure in Liquid Water. *Science* **1994**, *265* (5176), 1219–1221. <https://doi.org/10.1126/science.265.5176.1219>.
- (16) Yagasaki, T.; Matsumoto, M.; Tanaka, H. Lennard-Jones Parameters Determined to Reproduce the Solubility of NaCl and KCl in SPC/E, TIP3P, and TIP4P/2005 Water. *J. Chem. Theory Comput.* **2020**, *16* (4), 2460–2473. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00941>.
- (17) Bauer, B. A.; Patel, S. Role of Electrostatics in Modulating Hydrophobic Interactions and Barriers to Hydrophobic Assembly. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (24), 8107–8117. <https://doi.org/10.1021/jp101995d>.
- (18) Choi, Y. K.; Park, S.-J.; Park, S.; Kim, S.; Kern, N. R.; Lee, J.; Im, W. CHARMM-GUI Polymer Builder for Modeling and Simulation of Synthetic Polymers. *J. Chem. Theory Comput.* **2021**, *17* (4), 2431–2443. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00169>.
- (19) Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX* **2015**, *1–2*, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
- (20) Tidor, B. Simulated Annealing on Free Energy Surfaces by a Combined Molecular Dynamics and Monte Carlo Approach. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97* (5), 1069–1073. <https://doi.org/10.1021/j100107a015>.
- (21) Thevenet, P.; Shen, Y.; Maupetit, J.; Guyon, F.; Derreumaux, P.; Tuffery, P. PEP-FOLD: An Updated de Novo Structure Prediction Server for Both Linear and Disulfide Bonded Cyclic Peptides. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (W1), W288–W293. <https://doi.org/10.1093/nar/gks419>.
- (22) Pradip K. Ghosh. *Introduction to Protein Mass Spectrometry*; 2015.
- (23) Ainavarapu, S. R. K.; Brujić, J.; Huang, H. H.; Wiita, A. P.; Lu, H.; Li, L.; Walther, K. A.; Carrion-Vazquez, M.; Li, H.; Fernandez, J. M. Contour Length and Refolding Rate of a Small Protein Controlled by Engineered Disulfide Bonds. *Biophys. J.* **2007**, *92* (1), 225–233. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.091561>.
- (24) Longworth, L. G. Diffusion Measurements, at 25°, of Aqueous Solutions of Amino Acids, Peptides and Sugars. **1953**, 75.
- (25) Hollingsworth, S. A.; Karplus, P. A. A Fresh Look at the Ramachandran Plot and the Occurrence of Standard Structures in Proteins. *Biomol. Concepts* **2010**, *1* (3–4), 271–283. <https://doi.org/10.1515/bmc.2010.022>.
- (26) Bayrak, C. S.; Erman, B. Conformational Transitions in the Ramachandran Space of Amino Acids Using the Dynamic Rotational Isomeric State (DRIS) Model. *Mol BioSyst* **2014**, *10* (3), 663–671. <https://doi.org/10.1039/C3MB70433E>.
- (27) Hollóczki, O.; Gehrke, S. Nanoplastics Can Change the Secondary Structure of Proteins. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 16013. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52495-w>.

- (28) Ramalho, J. P. P.; Dordio, A. V.; Carvalho, A. J. P. The Fate of Three Common Plastic Nanoparticles in Water: A Molecular Dynamics Study. *J. Mol. Struct.* **2022**, *1249*, 131520. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131520>.
- (29) Li, L.; Xu, Y.; Li, S.; Zhang, X.; Feng, H.; Dai, Y.; Zhao, J.; Yue, T. Molecular Modeling of Nanoplastic Transformations in Alveolar Fluid and Impacts on the Lung Surfactant Film. *J. Hazard. Mater.* **2022**, *427*, 127872. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127872>.
- (30) Liu, P.; Qian, L.; Wang, H.; Zhan, X.; Lu, K.; Gu, C.; Gao, S. New Insights into the Aging Behavior of Microplastics Accelerated by Advanced Oxidation Processes. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53* (7), 3579–3588. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00493>.
- (31) Herschlag, D.; Pinney, M. M. Hydrogen Bonds: Simple after All? *Biochemistry* **2018**, *57* (24), 3338–3352. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00217>.
- (32) Tilton, R. D.; Gast, A. P.; Robertson, C. R. Surface Diffusion of Interacting Proteins. Effect of Concentration on the Lateral Mobility of Adsorbed Bovine Serum Albumin. *Biophys. J.* **1990**, *58* (5), 1321–1326. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(90\)82473-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(90)82473-5).
- (33) Furukawa, K.; Aguirre, C.; So, M.; Sasahara, K.; Miyanoiri, Y.; Sakurai, K.; Yamaguchi, K.; Ikenaka, K.; Mochizuki, H.; Kardos, J.; Kawata, Y.; Goto, Y. Isoelectric Point-Amyloid Formation of α -Synuclein Extends the Generality of the Solubility and Supersaturation-Limited Mechanism. *Curr. Res. Struct. Biol.* **2020**, *2*, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2020.03.001>.
- (34) Malamud, D.; Drysdale, J. W. Isoelectric Points of Proteins: A Table. *Anal. Biochem.* **1978**, *86* (2), 620–647. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90790-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90790-X).
- (35) Hempe, J. M.; Craver, R. D. Separation of Hemoglobin Variants with Similar Charge by Capillary Isoelectric Focusing: Value of Isoelectric Point for Identification of Common and Uncommon Hemoglobin Variants. *Electrophoresis* **2000**, *21* (4), 743–748. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000301\)21:4<743::AID-ELPS743>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000301)21:4<743::AID-ELPS743>3.0.CO;2-1).
- (36) Freire, E.; Mayorga, O. L.; Straume, M. Isothermal Titration Calorimetry. *Anal. Chem.* **1990**, *62* (18), 950A-959A.
- (37) Hou, T.; Wang, J.; Li, Y.; Wang, W. Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51* (1), 69–82. <https://doi.org/10.1021/ci100275a>.
- (38) Kumari, R.; Kumar, R.; Open Source Drug Discovery Consortium; Lynn, A. *G_mmpbsa* —A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54* (7), 1951–1962. <https://doi.org/10.1021/ci500020m>.

Chapitre 6 : Conclusions et perspectives

Des méthodes expérimentales pour l'étude de protéines adsorbées sur des MNPs

Nous avons utilisé plusieurs méthodes expérimentales pour observer directement l'impact des interactions entre des protéines et des MNPs. En particulier nous avons (i) déterminé l'affinité des protéines pour des microparticules de plastique et les quantités adsorbées par mesures d'isothermes d'adsorption, (ii) réalisé des mesures de tonométrie pour observer l'impact des plastiques sur l'activité de l'hémoglobine et (iii) observé directement les protéines adsorbées par imagerie.

(i) Les mesures d'isothermes d'adsorption nous ont permis de déterminer l'affinité des différentes protéines étudiées avec des microparticules de plastique. Nous avons ainsi montré que, à pH 7, l'hémoglobine a une affinité pour les microparticules de plastique beaucoup plus forte que celles de la BSA et de l' α -synucléine. De plus, la BSA et l' α -synucléine ont des affinités proches pour les microparticules de plastique. Nous en avons déduit que le paramètre important pour expliquer l'affinité des protéines est leur charge globale, le point isoélectrique de l'hémoglobine étant de 7,0 et ceux de la BSA et de l' α -synucléine d'environ 4,8. L'impact de la charge globale des protéines sur leur adsorption sur des surfaces hydrophobes a déjà été observée dans la littérature¹, ce qui conforte notre déduction dans le cas du plastique.

(ii) La tonométrie nous a permis de suivre l'activité de l'hémoglobine, et nous avons en particulier établi un protocole pour suivre l'oxygénation d'hémoglobine adsorbée sur du plastique microstructuré en utilisant une sphère d'intégration. Grâce à ces expériences, nous avons mis en évidence une diminution de l'activité de l'hémoglobine adsorbée mais pas de celle en solution après mise en contact avec des MNPs. Ceci peut indiquer que l'effet du plastique sur l'hémoglobine est réversible, ou que seule l'hémoglobine adsorbée est affectée. A notre connaissance, les travaux les plus proches de cette étude sont le suivi de la fonction de l'hémoglobine adsorbée par les particules de silice réalisée au laboratoire². Les résultats de ces études seront comparés plus tard dans ce chapitre.

(iii) Des méthodes d'imagerie ont été utilisées pour observer directement les protéines adsorbées sur les particules de plastique. Les méthodes adaptées diffèrent en fonction des propriétés des protéines étudiées, ici nous avons observé l'hémoglobine par imagerie Raman de résonance et la BSA par imagerie de fluorescence. L'imagerie de fluorescence serait également une méthode adaptée pour observer l' α -synucléine, mais nécessiterait d'obtenir du temps de faisceau sur synchrotron. En observant les microparticules de plastique après leur mise en contact avec la BSA, nous avons pu visualiser la corona et n'avons pas remarqué d'agrégats de protéine. Dans le cas de l'hémoglobine, nous avons remarqué la présence d'agrégats uniquement sur ces particules, et avons de plus montré que l'hémoglobine présente dans ces agrégats est dénaturée. Ceci peut indiquer que les particules de PE causent la dénaturation et l'agrégation de l'hémoglobine ou qu'elles ont une affinité particulièrement grande pour les agrégats d'hémoglobine déjà présents en solution. L'agrégation des protéines adsorbées sur des microparticules est un comportement connu, en particulier de nombreuses études observent l'agrégation de MNPs recouvertes d'une corona de protéines. Il s'agit toutefois, à notre connaissance, de la première observation directe d'agrégats de protéines adsorbés sur des microparticules de plastique. De plus, seule de l'hémoglobine dénaturée a été observée sur les microparticules de PE, ce qui suggère que la corona est composée principalement d'hémoglobine dénaturée.

Par la suite, il serait intéressant de répéter ces expériences avec des nanoparticules de plastiques. L'utilisation de nanoparticules pourrait impacter les protéines de façon différente en les mettant en contact avec des particules du même ordre de grandeur qu'elles. De plus, ces nouvelles conditions expérimentales nous permettraient d'utiliser des techniques expérimentales qui n'étaient pas exploitables en travaillant avec des microparticules. En effet, l'utilisation de nanoparticules permettrait de limiter la diffusion de la lumière par le milieu et ainsi d'améliorer la précision de techniques spectroscopiques comme le dichroïsme circulaire sur les solutions contenant des particules. Leur petite taille diminuerait leur vitesse de crémage (d'après l'équation de Stokes présentée dans le paragraphe 4 du chapitre 3), rendant ainsi les suspensions stables pour de plus longues durées. Ceci permettrait de réaliser des expériences comme des mesures de tonométrie, sur les solutions contenant des particules de plastique sans que celles-ci aient le temps de passer en surface. Les nanoparticules faciliteraient également l'utilisation de spectroscopies vibrationnelles en augmentant la masse de protéine adsorbée par une masse donnée de plastique. En effet, ce rapport peut être considéré comme la masse d'une corona de protéine divisée par la masse d'une particule, exprimé par l'équation 1.

$$\theta = \frac{N_T \times m_{prot}}{m_{part}} \quad (eq.1)$$

Dans cette équation, θ correspond au rapport de la masse de la corona de protéine sur la masse de la particule couverte, N_T correspond au nombre de protéines adsorbées sur une particule, m_{prot} correspond à la masse d'une protéine et m_{part} à la masse d'une particule. En considérant la corona comme une monocouche de protéine nous pouvons reprendre l'expression de N_T présentée dans le paragraphe 3 du chapitre 3. En exprimant la masse d'une protéine en fonction de sa masse molaire et la masse d'une particule en fonction de sa densité, nous obtenons ainsi l'équation 2.

$$\theta = \frac{\frac{4\pi}{2\sqrt{3}} \left(\frac{R}{r}\right)^2 \times \frac{M}{N_A}}{d \times \frac{4}{3}\pi R^3} = \frac{\sqrt{3}}{2} \times \frac{M}{N_A r^2 d R} \quad (eq.2)$$

Dans cette équation, R est le rayon d'une particule, r est le rayon de giration d'une protéine, M est la masse molaire de la protéine, N_A est le nombre d'Avogadro et d est la densité des particules. D'après cette expression, le rapport entre la masse de protéine et la masse de plastique est inversement proportionnel au rayon des particules de plastique. En particulier, en appliquant cette formule à la BSA et aux particules de plastique, nous pouvons estimer que la masse des protéines qui composent la corona correspond à environ 0,4% de la masse du plastique dans le cas des microparticules de PE de 2,1 μm de rayon que nous avons utilisé dans ce travail, et à 8% dans le cas de nanoparticules de PE de 100 nm de rayon. Ceci confirme que les coronas de protéines seraient plus faciles à analyser par des méthodes de spectroscopies vibrationnelles dans le cas de nanoparticules.

Comparaison de l'adsorption de protéines sur les microparticules de PE et de PP avec des nanoparticules de silice (SiO₂) et de polystyrène (PS)

Afin de déterminer les effets spécifiques des plastiques hydrophobes comme le PE et le PP, nous avons comparé nos résultats expérimentaux à des résultats obtenus lors de la formation de coronas de

protéines sur des particules hydrophiles. En particulier, nous nous sommes intéressés aux isothermes d'adsorption obtenues pour des protéines sur des nanoparticules de SiO₂ et sur des nanoparticules de PS fonctionnalisées.

Pour les nanoparticules de silice, nous avons utilisé les résultats obtenus au laboratoire lors de la mise en contact de ces particules avec de la BSA et de l'hémoglobine par Devineau et al.³ et avec des peptides par Marichal et al.⁴. Dans cette première étude, les mises en contact de BSA et d'hémoglobine avec des nanoparticules de silice ont eu lieu à pH 6, la BSA était donc chargée négativement et l'hémoglobine était chargée positivement. La seconde étude a été réalisée sur plusieurs peptides, et nous en avons extrait les résultats portant sur les 4 peptides dont les séquences sont les plus proches de celles que nous avons utilisé. Dans chaque cas, la taille des nanoparticules utilisées est de 20 nm. Nous noterons les peptides étudiés de la façon suivante :

R1 : SRGGSRGGSRGGWGGRGGSRGGARG

K1 : SKGGSKGGSKGGWGGKGGSKGGAKG

R2 : WGGRGGSRGGARG

K2 : WGGKGGSKGGAKG

Pour les nanoparticules de PS (200 nm), nous montrerons ici les résultats obtenus par Baier et al.⁵ en mettant en contact à différents pH de la BSA avec des nanoparticules de PS fonctionnalisées et non-fonctionnalisées. Plus précisément, les mises en contact ont été réalisées à pH 3, auquel la charge globale de la BSA est positive, et à pH 6, auquel la charge globale de la BSA est négative (le point isoélectrique de la BSA étant d'environ 4,8⁶). 4 types de nanoparticules de PS ont été utilisées, en comptant les nanoparticules non fonctionnalisées (notées PS). Des nanoparticules chargées positivement ont été obtenues en ajoutant au PS du chlorhydrate de méthacrylate de 2-aminoéthyle (AEMH, pK_a = 8,8). Deux types de nanoparticules de PS chargées négativement ont été utilisées, les premières fonctionnalisées avec du méthacrylate de 2-sulfoéthyle (SEMA, pK_a = 1,1), et les secondes avec de l'acide 4-vinylbenzophosphonique (VBPA, pK_a = 2,2 ; pK_a = 7,3). Pour la suite, les nanoparticules de PS_AEMH seront notées PS⁺, les nanoparticules de PS_SEMA seront notées PS^A et les nanoparticules de PS_VBPA seront notées PS^B. Toutes ces nanoparticules ont une taille d'environ 200 nm.

Toutes ces études ont mesuré les isothermes d'adsorption des protéines étudiées sur les particules correspondantes et en ont tiré les valeurs de m_∞, rassemblées Figure 6.1, et de K_{ads} telles que présentées avec l'équation de Langmuir dans le paragraphe 3 du chapitre 3. Les résultats obtenus pour des microparticules de plastique vieilles sont également présentés sur cette figure mais seront discutés dans une partie suivante.

Les résultats obtenus sur les microparticules de plastique semblent indiquer que les quantités de protéines adsorbées dépendent principalement de la taille des protéines adsorbées et des particules. Nous observons en effet de plus grandes valeurs de m_∞ pour la BSA et l'hémoglobine, qui sont les plus grosses protéines que nous avons étudiées, et de plus petites valeurs pour les peptides. De la même façon nous avons déterminé de plus grandes valeurs sur les microparticules de PP, dont le rayon est d'environ 5 μm, que sur les microparticules de PE, dont le rayon est d'environ 2 μm. Dans chacun de ces cas, les valeurs obtenues sont cohérentes avec la formation d'une monocouche complète de protéines sur les particules.

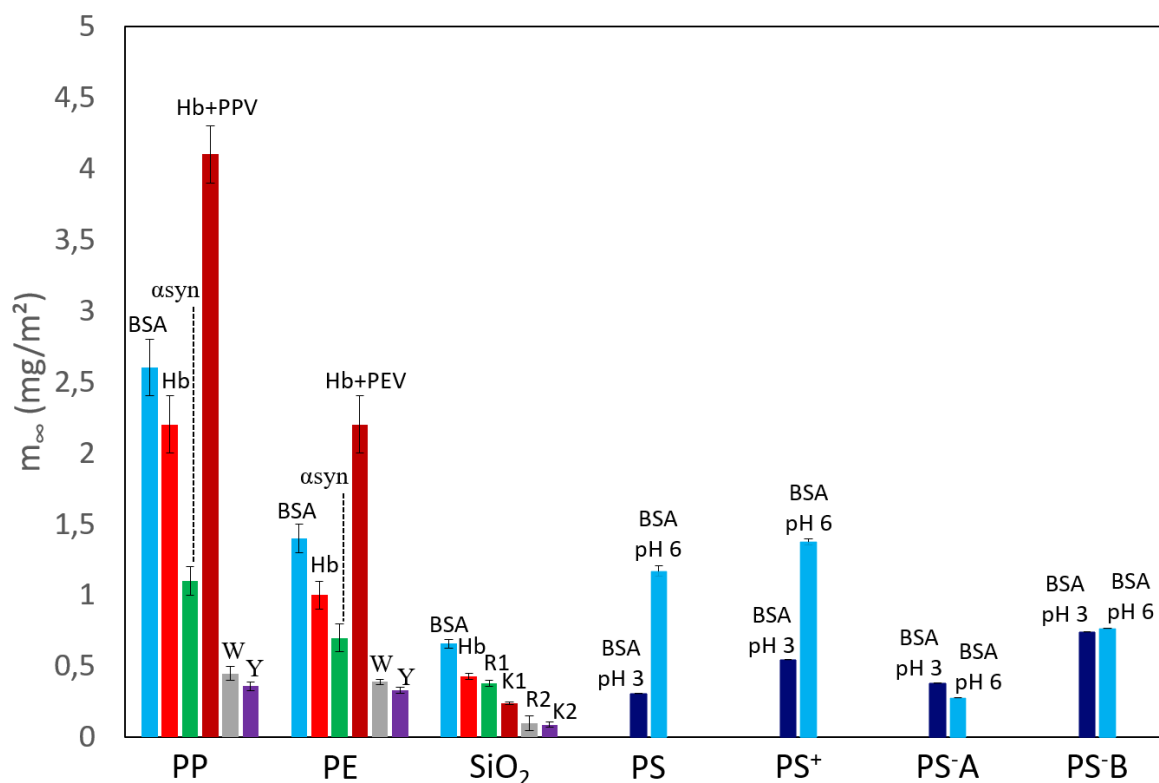


Figure 6.1 : Valeurs de m_{∞} obtenues dans ce travail sur les microparticules de PP et de PE et comparaison avec des valeurs trouvées dans la littérature pour des nanoparticules de silice (SiO_2), de polystyrène (PS) et de polystyrène fonctionnalisé (PS^+ , PS-A et PS-B). Les résultats sur les nanoparticules de SiO_2 sont tirés de Importance of Post-translational Modifications in the Interaction of Proteins with Mineral Surfaces: The Case of Arginine Methylation and Silica surfaces⁴ et de Adsorption des protéines sur les nanomatériaux, Biochimie et physico-chimie d'un nouveau stress³. Les résultats sur les nanoparticules de PS et de PS fonctionnalisé sont tirés de BSA Adsorption on Differently Charged Polystyrene Nanoparticles using Isothermal Titration Calorimetry and the Influence on Cellular Uptake⁵.

Globalement nous observons que de plus grandes quantités de protéines sont adsorbées sur les microparticules de PE et PP hydrophobes que sur les nanoparticules SiO_2 , PS^+ , PS-A et PS-B hydrophiles, mais cet effet peut être causé par la plus grande taille des microparticules que nous avons utilisées. Les études sur les nanoparticules de PS indiquent aussi que le pH peut avoir une influence sur les résultats. Cette étude détermine que les variations de m_{∞} peuvent être causées par la répulsion entre la protéine et les groupements fonctionnels présents sur le PS lorsque ceux-ci sont de même charge. Ces variations peuvent aussi être causées par des répulsions entre les molécules de BSA, dont la structure change de façon réversible lorsque le pH est inférieur à 4⁷.

Au vu de ces résultats, il serait intéressant de répéter nos expériences à différents pH pour déterminer si nous observons le même type d'effets sur des microparticules de plastique hydrophobes.

Les ordres de grandeur des valeurs de K_{ads} obtenues variant fortement en fonction des études nous avons calculé $\Delta G^{\circ} = -RT \times \ln(K_{\text{ads}})$, pour K_{ads} exprimé en M^{-1} , et avons rassemblé les valeurs obtenues Figure 6.2. Une fois de plus les résultats obtenus avec les microparticules de plastique vieilles sont inclus dans cette figure et seront discutés dans une partie suivante.

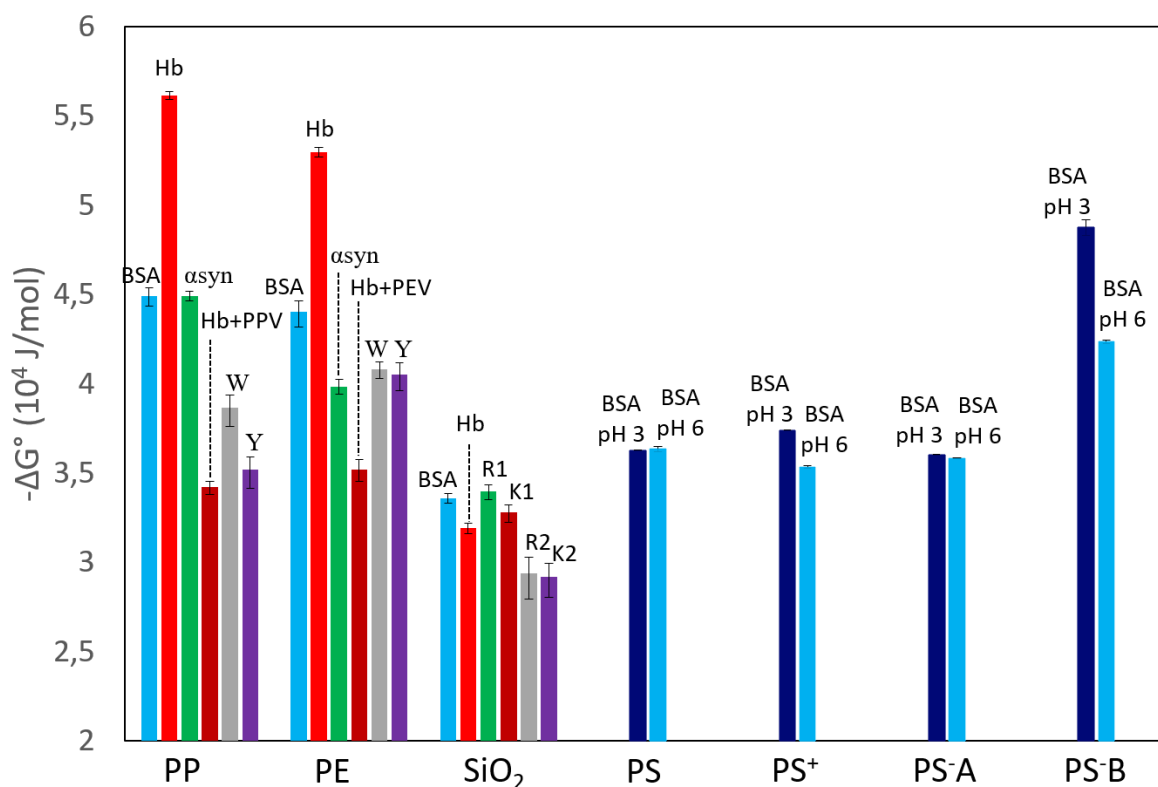


Figure 6.2 : Valeurs de $-\Delta G^\circ$ obtenues dans ce travail sur les microparticules de PP et de PE et comparaison avec des valeurs trouvées dans la littérature pour des nanoparticules de silice (SiO₂)^{3,4}, de polystyrène (PS) et de polystyrène fonctionnalisé (PS⁺, PS-A et PS-B)⁵. Les résultats sont tirés des mêmes sources citées Figure 6.3.

Lors de l'analyse de ces histogrammes il est important de prendre en compte le fait que, puisque ΔG° est proportionnel au logarithme de K_{ads} , un écart relativement faible de sa valeur peut correspondre à des K_{ads} significativement différents. Par exemple, l'écart de $1,1 \times 10^4$ J/mol entre les valeurs de ΔG° de la BSA et de l'hémoglobine sur les microparticules de PP correspond à un facteur proche de 100 entre les K_{ads} correspondants (92 L/mg pour l'hémoglobine et 1,0 L/mg pour la BSA, voir tableau 3.6).

Les résultats obtenus sur les microparticules de plastique semblent montrer l'influence de la charge des protéines sur leur affinité pour les microparticules de PP et de PE bien que ces dernières ne présentent pas de charge. L'hémoglobine, dont la charge globale est neutre au pH auquel nous avons travaillé (7,0) a une affinité significativement plus élevée que la BSA, de l'alpha-synucléine et des peptides, dont la charge globale est négative à ce pH.

Il est généralement considéré que l'affinité des protéines pour une surface augmente avec l'hydrophobicité de celle-ci, ce qui est cohérent avec la plupart des résultats ici. En effet, les protéines étudiées présentent dans presque tous les cas une plus forte affinité pour les microparticules de plastique hydrophobes que pour les nanoparticules hydrophiles. La seule exception notable est la BSA adsorbée sur PS-B, dont l'affinité pour la surface à pH 3 est fortement supérieure à l'affinité que nous avons mesurée pour les microparticules de PE et de PP. Cette forte affinité peut s'expliquer par le fait que, à pH 3, la BSA est chargée positivement tandis que les nanoparticules PS-B sont chargées négativement, favorisant les interactions électrostatiques entre la protéine et la particule. Cet effet n'est toutefois pas observé avec les nanoparticules PS⁺ et PS-A, ce que l'étude interprète comme étant dû à la plus grande densité de groupements fonctionnels à la surface des particules PS-B. Les interactions hydrophobes semblent donc généralement avoir un impact plus important sur les

interactions entre protéines et particules, mais les interactions électrostatiques peuvent avoir un effet plus important si les charges présentes sur les particules sont suffisamment denses. Nos expériences sur les microparticules de PP et de PE n'ayant été menées qu'à un seul pH, suscitent l'intérêt de les répéter à différents pH pour étudier son impact sur ces systèmes.

Comme mentionné au début de ce chapitre, en plus des isothermes d'adsorption, les courbes d'oxygénation de l'hémoglobine adsorbée sur des nanoparticules de silice ont également été mesurées². Ces études ont montré que l'hémoglobine adsorbée sur des nanoparticules de silice possède une plus forte affinité pour l'oxygène que l'hémoglobine en solution. L'effet observé est donc très différent que dans le cas du plastique, où l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène est diminuée lorsque celle-ci est adsorbée. Ceci montre que l'hémoglobine n'est pas affectée de la même façon par les surfaces hydrophiles et hydrophobes. Cette différence peut s'expliquer par les différences d'interactions entre la protéine et la particule lors de son adsorption sur une surface hydrophile ou hydrophobe, qui modifieraient sa structure et donc son affinité de façons différentes. Pour confirmer cette hypothèse, nous pourrions essayer de réaliser des mesures de dichroïsme circulaire sur de l'hémoglobine adsorbée sur des nanoparticules de PP et de PE. Une autre méthode serait de réaliser des simulations de dynamique moléculaire pour observer directement les modifications de structure de l'hémoglobine lors de son adsorption sur des nanoparticules de PP, de PE et de silice.

Une étude intéressante serait de travailler directement sur le site actif de l'hémoglobine par spectroscopie d'absorption X (XANES et EXAFS). Cette méthode permettrait de mesurer les éventuelles modifications de structure de l'hème (porphyrine-fer) quand l'hémoglobine est adsorbée sur des nanoparticules de plastique. Cette méthode a déjà été utilisée pour observer des modifications structurales du site actif dans le cas de l'hémoglobine adsorbée sur des nanoparticules de silice⁸.

Des méthodes de vieillissement des MNPs et effet du vieillissement sur leurs interactions avec les protéines

Nous avons mis au point des protocoles de vieillissement des microparticules de plastique. La méthode la plus adaptée dépend de la nature du plastique, le PE ne pouvant pas être vieilli thermiquement à 85°C sur une durée de quelques mois tandis que le PP s'aggrave quand il est vieilli par irradiation. Ces observations indiquent une plus forte stabilité du PE que du PP. Ceci est cohérent avec la structure chimique de ces polymères, les groupements méthyle du PP pouvant être des points d'amorçages de réactions d'oxydation des plastiques. Cette plus grande stabilité du PE a également été observée dans la littérature⁹. Les microparticules de plastique que nous utilisons ont été vieillis en suivant des protocoles permettant dans chaque cas un suivi précis de l'énergie apportée au système, ce qui permettra de les répéter de façon consistante.

L'introduction de MNPs vieillis rendent les mesures sur les solutions plus difficiles, en particulier nous n'avons pas pu exploiter les signaux d'émission par fluorescence de ces solutions même après avoir extrait les MNPs. Malgré cela, nous avons réussi à observer des effets, principalement sur l'hémoglobine.

En effet, en utilisant une sphère d'intégration nous avons mesuré les isothermes d'adsorption de l'hémoglobine sur les microparticules de plastique vieillis. En ajustant ces isothermes avec la formule de Langmuir, nous avons obtenu les paramètres représentés Figure 6.1 et Figure 6.2. Comparé aux résultats obtenus sur les microparticules non vieillis, nous observons que l'affinité de l'hémoglobine est significativement plus faible mais qu'une plus grande quantité est adsorbée. La plus faible affinité peut s'expliquer par la présence d'atomes d'oxygène à la surface des particules, qui peuvent empêcher

les interactions hydrophobes entre celles-ci et l'hémoglobine. La plus grande valeur de m_{∞} peut être causée par une restriction de la conformation des protéines adsorbées ou des interactions entre protéines adsorbées causées par les atomes d'oxygène. Ces effets pourraient forcer l'hémoglobine adsorbée à maintenir des conformations plus compactes, permettant d'adsorber un plus grand nombre de protéines par unité de surface. Une autre explication serait une contribution favorable à l'adsorption d'agrégats d'hémoglobine, ou une plus forte tendance à provoquer l'agrégation de l'hémoglobine adsorbée.

Nous avons également analysé des microparticules de plastique vieilles par imagerie Raman après mise en contact avec de l'hémoglobine. Nous observons généralement les mêmes comportements que pour les microparticules de plastique non vieilles, mais les images obtenues suggèrent la présence d'hémoglobine oxygénée à la surface des microparticules de PE vieilles, ce que nous n'avons pas observé sur les autres particules étudiées. Ce point reste toutefois à confirmer, par exemple en réalisant des mesures de spectroscopie Raman à plus haute résolution.

Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour établir des protocoles d'observation des effets de MNPs vieillis sur BSA et α -synucléine.

Des protocoles basés sur l'étude des microparticules de plastique vieilles nous ont permis de modéliser des nanoparticules de PE vieilles pour des simulations de dynamique moléculaire. Ces simulations nous ont permis de mieux comprendre l'impact de l'oxydation des particules de PE sur leurs interactions avec les peptides à l'échelle moléculaire. En particulier, nous avons observé la formation de liaisons hydrogène entre les peptides et les atomes d'oxygène de la particule. Ces atomes d'oxygène deviennent alors des « points d'ancrage » pour les peptides, restreignant leur diffusion à la surface de la particule. Des analyses complémentaires, ainsi que des simulations sur des systèmes plus complexes, permettront également de mieux comprendre l'impact de ces atomes d'oxygène sur la structure des peptides adsorbés.

A l'avenir, pour travailler sur des microparticules de plastique vieilles plus représentatives de celles trouvées dans la nature, nous pourrions essayer d'utiliser des microparticules de plastique vieilles en conditions naturelles. A cette fin, nous avons laissé des microparticules de plastique en extérieur depuis 2 ans. Le vieillissement de ces microplastiques est toujours en cours (Figure 6.3).



Figure 6.3 : Photographie d'échantillons de microparticules de PP et de microparticules de PE laissés vieillir en extérieur.

Une fois l'oxydation de ces particules observée, nous pourrions répéter nos expériences en les utilisant pour observer les éventuelles différences avec les particules que nous avons utilisées.

Etude des peptides et comparaisons aux protéines

La petite taille des peptides nous a permis de réaliser des simulations de dynamique moléculaire sur des systèmes comprenant un peptide et une nanoparticule de PE ou un peptide et une nanoparticule de PE vieillie. La simulation de nanoparticules complètes, et pas seulement d'une surface modèle, lors d'une simulation d'adsorption de biomolécules est plutôt récente. Nous avons réussi à établir un protocole permettant d'observer les effets des nanoparticules de PE sur plusieurs peptides, chacun permettant de favoriser les interactions avec un acide aminé différent. Nous avons de plus montré la forte influence du modèle d'eau utilisé sur les résultats obtenus.

Nous avons observé l'adsorption de tous les peptides simulés sur la nanoparticule de PE, y compris les peptides chargés, que ce soit sur les nanoparticules non vieilles ou vieilles. Nous avons tout de même observé que certains acides aminés semblent favoriser les interactions avec la particule, notamment les acides aminés contenant des cycles aromatiques hydrophobes. Ceci est cohérent, puisque l'adsorption de biomolécules sur les MNPs s'explique en grande partie par les interactions hydrophobes. Ces simulations nous ont également permis d'observer que, même dans le cas de peptides déstructurés, l'adsorption d'un peptide sur une surface cause une modification notable de son espace conformationnel.

Nous avons également obtenu deux peptides pour réaliser des expériences afin de pouvoir comparer des résultats expérimentaux aux simulations. Nous avons mesuré leurs isothermes d'adsorption, les paramètres déterminés en ajustant ces isothermes avec la formule de Langmuir étant présentés Figure 6.1 et Figure 6.2. Ces peptides présentent une affinité pour les microparticules de PP et de PE légèrement inférieure à ce qui est observé pour les protéines. Ceci est cohérent avec le modèle de Norde, puisque ces peptides ne sont pas structurés leur adsorption n'est pas favorisée par un gain d'entropie conformationnelle que pourrait apporter la perte d'une structure. Nous remarquons toutefois que, comme les protéines, les peptides présentent une affinité significativement plus forte pour les microparticules de plastique que pour les nanoparticules de silice. Ceci montre que l'importance des interactions hydrophobes dans l'adsorption des peptides sur les particules.

Afin de compléter nos analyses par dynamique moléculaire, nous pourrions générer des nanoparticules de PP et des nanoparticules de PP vieilles avec lesquelles répéter nos simulations de mise en contact. Sur le plan expérimental, des études supplémentaires pourraient permettre d'étudier leur stabilité en suspension dans des solutions de protéines ou leurs interactions avec des MNPs vieilles. Toutefois, ces expériences nécessiteraient de se procurer de plus grandes quantités de peptides ou d'établir des protocoles permettant d'effectuer ces mesures sur des échantillons plus petits ou moins concentrés.

Perspectives des études par simulation de dynamique moléculaire

Les simulations de dynamique moléculaire sont encore en cours au laboratoire, et nous avons en particulier commencé à générer de nouveaux systèmes. Dans un premier temps, afin de pouvoir étudier les interactions de protéines avec des nanoparticules de plastique, nous avons établi un protocole permettant de générer une nanoparticule de plus grande taille. Pour cela, nous avons mis en contact 3 nanoparticules de PE identiques puis avons effectué un recuit simulé du système pour cause leur agrégation. Cette étape est répétée pour obtenir des particules de plus en plus grandes, comme représenté Figure 6.4.

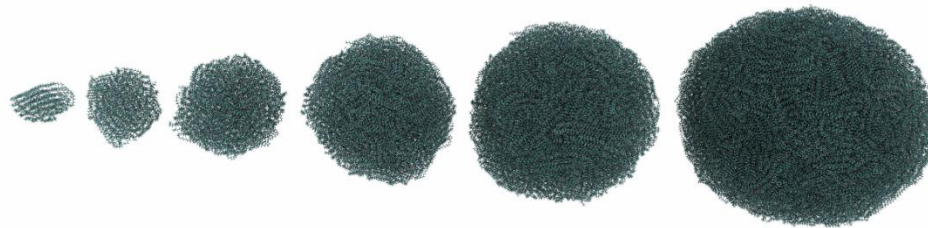


Figure 6.4 : Représentation de la formation d'une nanoparticule de PE de 10 nm à partir d'une nanoparticule de 1,5 nm..
Image réalisée sous VMD en représentation CPK.

En utilisant cette méthode, nous avons généré une nanoparticule d'environ 10 nm de rayon après 5 itérations. La taille de cette particule étant supérieure à celle d'une protéine, nous avons commencé la simulation de systèmes composés initialement d'une nanoparticule de PE et d'une protéine, comme illustré Figure 6.5 dans le cas de l' α -synucléine.

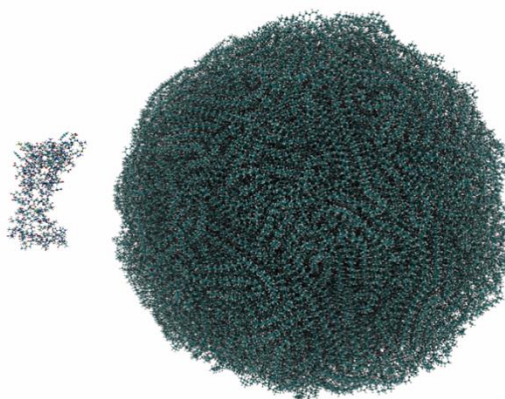


Figure 6.5 : α -synucléine à proximité d'une nanoparticule de PE de 10 nm.
Image réalisée sous VMD en représentation CPK.

Actuellement, nous n'avons observé de contact entre la protéine et la nanoparticule qu'en appliquant des contraintes sur la distance entre le centre de masse de la protéine et celui de la particule. Le fait de forcer l'adsorption de la protéine sur la nanoparticule pourrait permettre d'obtenir des informations thermodynamiques sur cette interaction.

L'analyse des résultats obtenus et les paramètres à prendre en compte lors de la mise en place du système et des protocoles de simulation devront aussi possiblement être modifiés pour ces systèmes. Par exemple, l'angle d'approche de la protéine pourra être un paramètre important, et de nouvelles séries de simulations pourront permettre de déterminer son influence. Les durées de simulation seront aussi plus importantes que pour les systèmes contenant des peptides, puisqu'il a été montré que l'adsorption d'une protéine sur une surface de PE est précédé d'une longue phase de déshydratation, dont la durée peut être de l'ordre de 70 ns¹⁰.

En plus de ces calculs nous avons également commencé à étudier la formation d'une corona en simulant l'adsorption de plusieurs peptides sur une même nanoparticule. Pour cela nous mettons la nanoparticule en présence de 3 peptides, le système est ensuite simulé jusqu'à leur adsorption. Une fois les 3 peptides adsorbés, un nouveau système est généré comprenant la nanoparticule, les peptides adsorbés, et 3 nouveaux peptides en solution. Maintenir le système avec 3 peptides en solution, plutôt que de mettre tous les peptides dans le système en même temps, permet d'éviter leur agrégation en

solution. En suivant ce protocole, nous avons commencé à observer la formation d'une corona de peptides, comme illustré Figure 6.6.

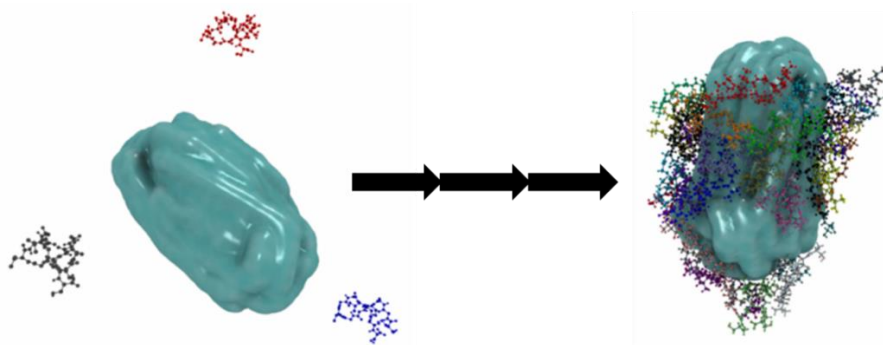


Figure 6.6 : Représentation du principe de formation d'une corona de peptide sur une nanoparticule de PE de 1,5 nm. Image réalisée sous VMD, peptides en représentation CPK et nanoparticule en représentation QuickSurf.

- Quand la corona sera entièrement formée autour de la nanoparticule, nous pourrons observer si celle-ci consiste en une monocouche ou présente des agrégats. Nous pourrons également observer les espaces conformationnels des peptides dans la corona et les comparer à ceux de peptides adsorbés seuls sur une nanoparticule.
- Après avoir établi les protocoles pour générer et analyser la corona de peptides, et avoir mis en contact une nanoparticule de PE avec une protéine, nous pourrons chercher à combiner ces protocoles pour simuler et analyser la formation d'une corona de protéines sur une nanoparticule de PE. Ces protocoles pourront ensuite être appliqués à des nanoparticules de PP, et ces simulations pourront être comparées à nos résultats expérimentaux.
- Une fois ces systèmes maîtrisés, il pourrait de plus être possible de modéliser la présence d'additifs à la surface des particules de plastique pour observer leurs effets sur les interactions avec les nanoparticules de plastique. Ces additifs ayant un impact important sur la toxicité du plastique, il serait intéressant de voir si cet effet est observable par simulation.

La complémentarité de cette thèse avec celle de Marion Schwartz nous a permis de rédiger deux articles. Le premier, publié dans Scientific Reports, porte sur la déstabilisation des protéines en contact avec des surfaces plastiques macroscopiques¹¹. Le second, resoumis -à ce jour- à Langmuir après révisions, porte sur l'impact de la corona protéique sur le comportement colloïdal des microplastiques¹². Ce second article apporte en particulier des informations sur la capacité des protéines à stabiliser les microplastiques en solution. Ce comportement peut avoir une application environnementale puisqu'il facilite l'extraction de microplastiques dans une solution et pourrait donc être utilisé pour réduire la pollution des microplastiques.

Bibliographie

- (1) Ouberai, M. M.; Xu, K.; Welland, M. E. Effect of the Interplay between Protein and Surface on the Properties of Adsorbed Protein Layers. *Biomaterials* **2014**, *35* (24), 6157–6163. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.012>.
- (2) 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>.
- (3) Devineau, S. Adsorption des protéines sur les nanomatériaux. Biochimie et physico-chimie d'un nouveau stress. *Univ. Paris Sud - Paris XI* **2013**, NNT: . tel-00903842v1.
- (4) Marichal, L.; Renault, J.-P.; Chédin, S.; Lagniel, G.; Klein, G.; Aude, J.-C.; Tellier-Lebegue, C.; Armengaud, J.; Pin, S.; Labarre, J.; Boulard, Y. Importance of Post-Translational Modifications in the Interaction of Proteins with Mineral Surfaces: The Case of Arginine Methylation and Silica Surfaces. *Langmuir* **2018**, *34* (18), 5312–5322. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00752>.
- (5) Baier, G.; Costa, C.; Zeller, A.; Baumann, D.; Sayer, C.; Araujo, P. H. H.; Mailänder, V.; Musyanovych, A.; Landfester, K. BSA Adsorption on Differently Charged Polystyrene Nanoparticles Using Isothermal Titration Calorimetry and the Influence on Cellular Uptake. *Macromol. Biosci.* **2011**, *11* (5), 628–638. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000395>.
- (6) Malamud, D.; Drysdale, J. W. Isoelectric Points of Proteins: A Table. *Anal. Biochem.* **1978**, *86* (2), 620–647. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90790-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90790-X).
- (7) Bloomfield, V. The Structure of Bovine Serum Albumin at Low PH. *Biochemistry* **1966**, *5* (2), 684–689. <https://doi.org/10.1021/bi00866a039>.
- (8) Giraudon--Colas, G.; Devineau, S.; Marichal, L.; Barruet, E.; Zitolo, A.; Renault, J.-P.; Pin, S. How Nanoparticles Modify Adsorbed Proteins: Impact of Silica Nanoparticles on the Hemoglobin Active Site. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (4), 3659. <https://doi.org/10.3390/ijms24043659>.
- (9) Harmon, R. E.; SriBala, G.; Broadbelt, L. J.; Burnham, A. K. Insight into Polyethylene and Polypropylene Pyrolysis: Global and Mechanistic Models. *Energy Fuels* **2021**, *35* (8), 6765–6775. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.1c00342>.
- (10) Wei, T.; Carignano, M. A.; Szleifer, I. Lysozyme Adsorption on Polyethylene Surfaces: Why Are Long Simulations Needed? *Langmuir* **2011**, *27* (19), 12074–12081. <https://doi.org/10.1021/la202622s>.
- (11) Schvartz, M.; Saudrais, F.; Devineau, S.; Aude, J.-C.; Chédin, S.; Henry, C.; Millán-Oropeza, A.; Perrault, T.; Pieri, L.; Pin, S.; Boulard, Y.; Brotons, G.; Renault, J.-P. A Proteome Scale Study Reveals How Plastic Surfaces and Agitation Promote Protein Aggregation. *Sci. Rep.* **2023**, *13* (1), 1227. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28412-7>.
- (12) Schvartz, M.; Saudrais, F.; Devineau, S.; Chédin, S.; Jamme, F.; Leroy, J.; Rakotozandriny, K.; Taché, O.; Boulard, Y.; Pin, S.; Brotons, G.; Renault, J.-P. The Role of the Protein Corona in the Colloidal Microplastic Behavior. *Langmuir* **Resoumis après révisions**.

Annexes

La Figure A.1 correspond au spectre ATR-FTIR des filtres en polypropylène (PP) que nous avons utilisé. Celui-ci est identique au spectre mesuré sur les microparticules de PP (voir chapitre 3 Figure 3.8).

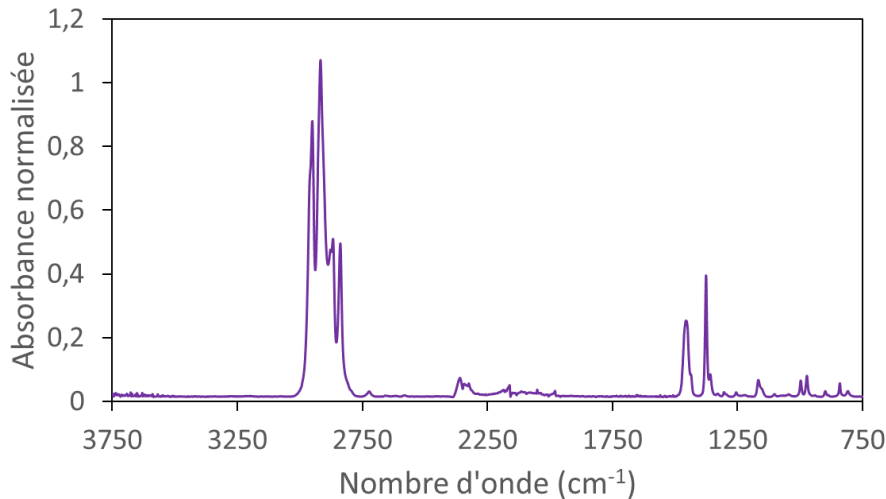


Figure A.1 : Spectre ATR-FTIR d'un filtre en polypropylène.
Le bruit entre 2000 cm⁻¹ et 2500 cm⁻¹ correspond au signal du CO₂.

Les annexes suivantes correspondent aux images Raman qui n'ont pas encore été présentées dans ce manuscrit. Plus précisément, la Figure A.2A correspond aux images obtenues sur les microparticules de PE et de PP non-vieillies après 72 heures de mise en contact avec l'hémoglobine (voir chapitre 3 paragraphe 5.1). La Figure A. correspond aux images obtenues sur les microparticules de PE non-vieillies après 24 et 48 heures de mise en contact (voir chapitre 3 paragraphe 5.1). La Figure A. correspond aux images obtenues sur les microparticules de PP non-vieillies après 24 et 48 heures de mise en contact (voir chapitre 3 paragraphe 5.1). La Figure A. correspond aux images obtenues pour les microparticules de PE et de PP vieilles après 72 heures de mise en contact (voir chapitre 4 paragraphe 4).

La seule différence notable observée entre ces images et celles que nous avons présentées dans les chapitres 3 et 4, est la présence d'un agrégat d'hémoglobine dénaturée sur la microparticule de PP non-vieillie après 72 heures de mise en contact avec l'hémoglobine (Figure A.2). La composition de cet agrégat est vérifiée Figure A..

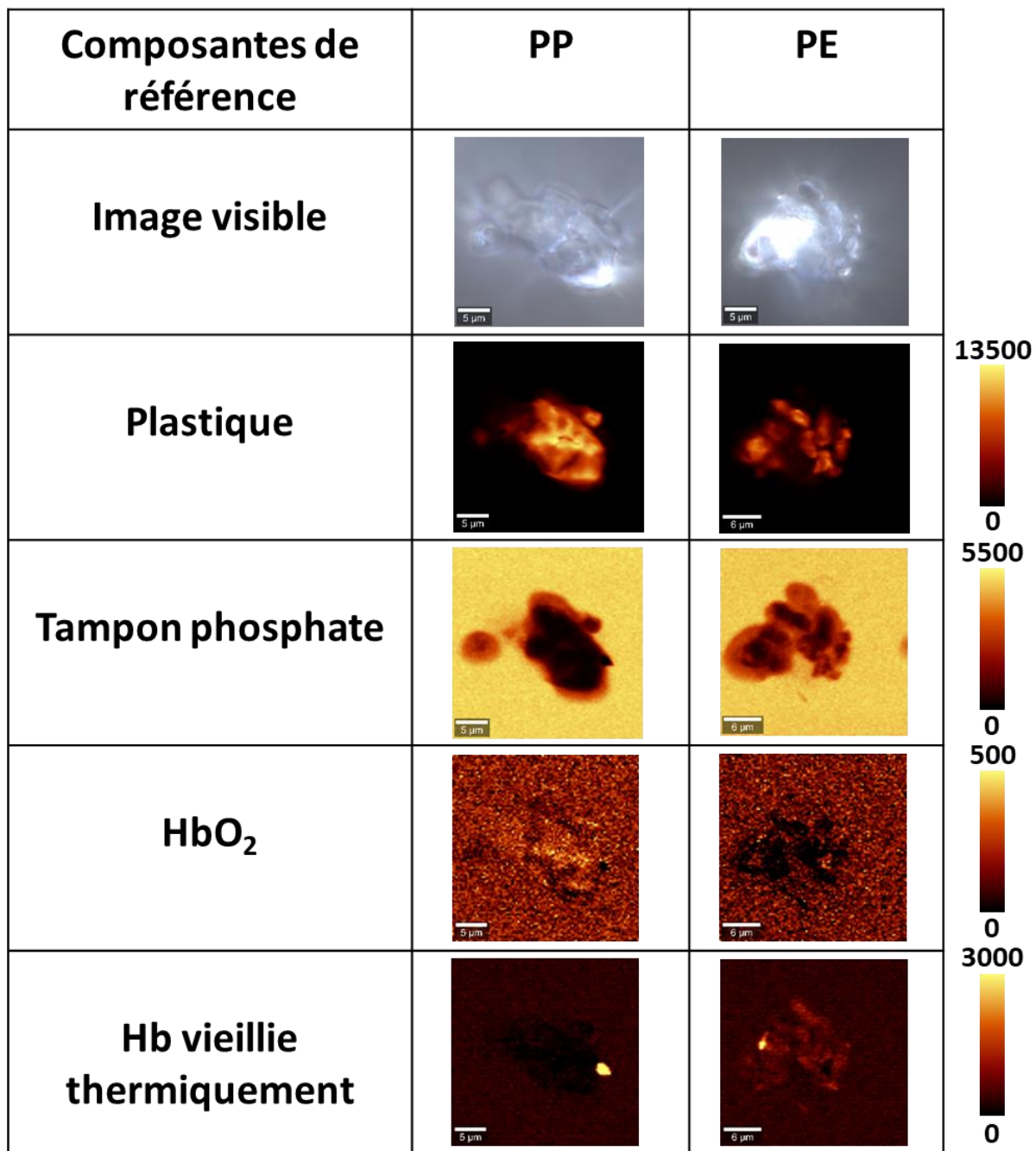


Figure A.2A : Images Raman des composantes après 72 h de mise en contact des microplastiques avec Hb.
 La barre d'échelle mesure 5 μm pour les image de PP et 6 μm pour les images de PE.

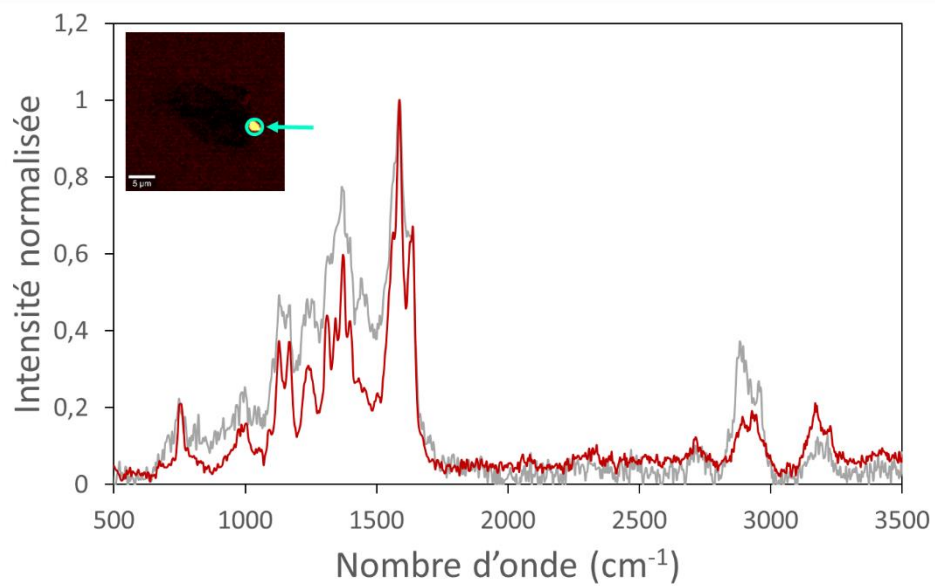


Figure A.2B : Spectres Raman, en gris, mesuré en un point sur le PP (position indiquée en haut à gauche sur la composante 'Hb vieillie thermiquement'), et comparaison au spectre de référence de l'hémoglobine vieillie thermiquement (en rouge).

Le signal mesuré sur cette zone correspond précisément au signal de l'hémoglobine dénaturée thermiquement, qui n'est par ailleurs pas observé sur le reste de la particule. Nous ne remarquons pas de contribution du signal du PP en ce point. Dans le cas de tous les autres agrégats d'hémoglobine observés, le signal du plastique est très visible. Ce comportement unique ne semble donc pas être représentatif des systèmes étudiés, et n'a pas été analysé dans le cadre de ce travail.

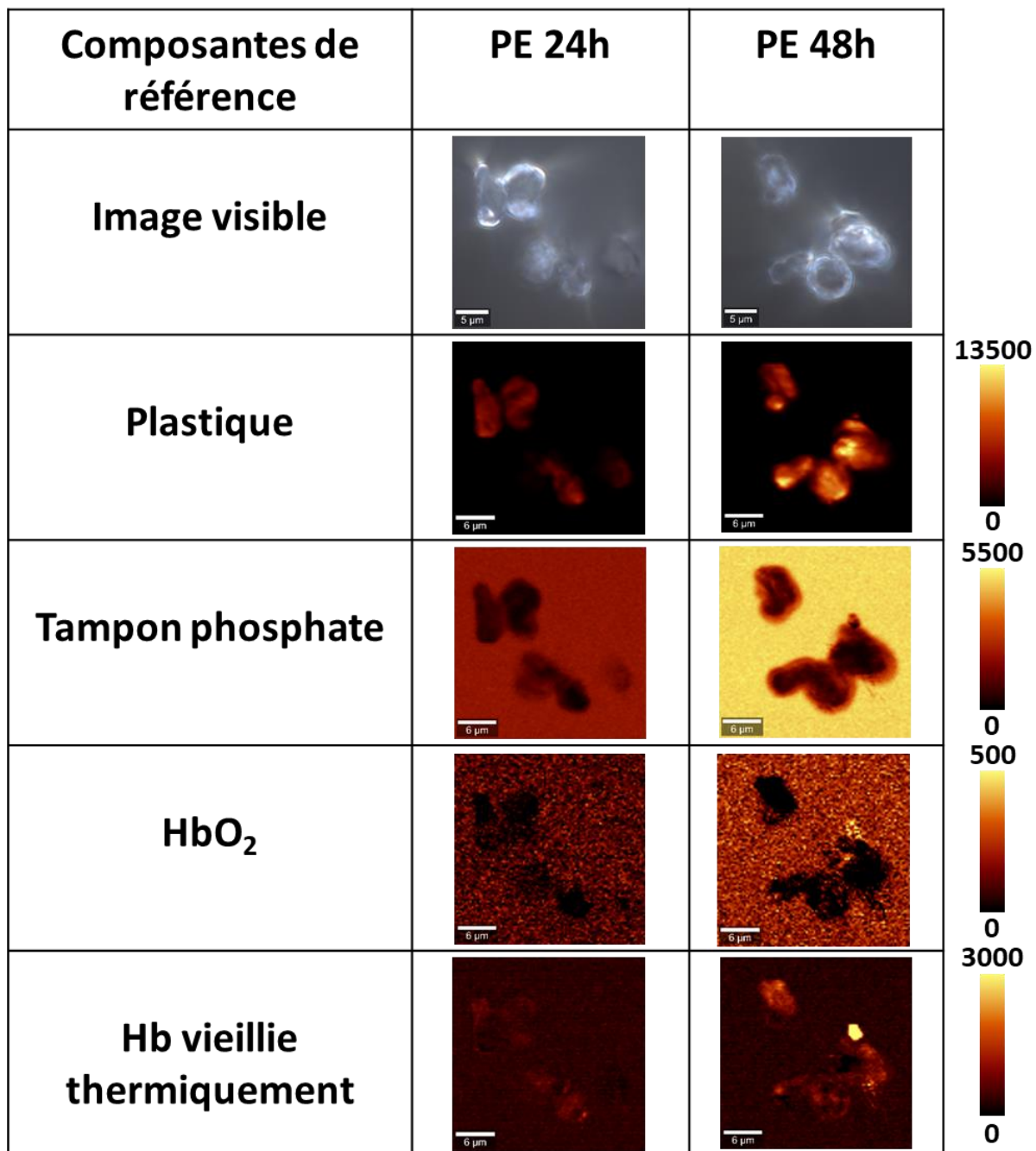


Figure A.3 : Images Raman des composantes après 24 h et 48 h de mise en contact des microparticules de PE avec Hb. La barre d'échelle mesure 6 μm pour chaque image.

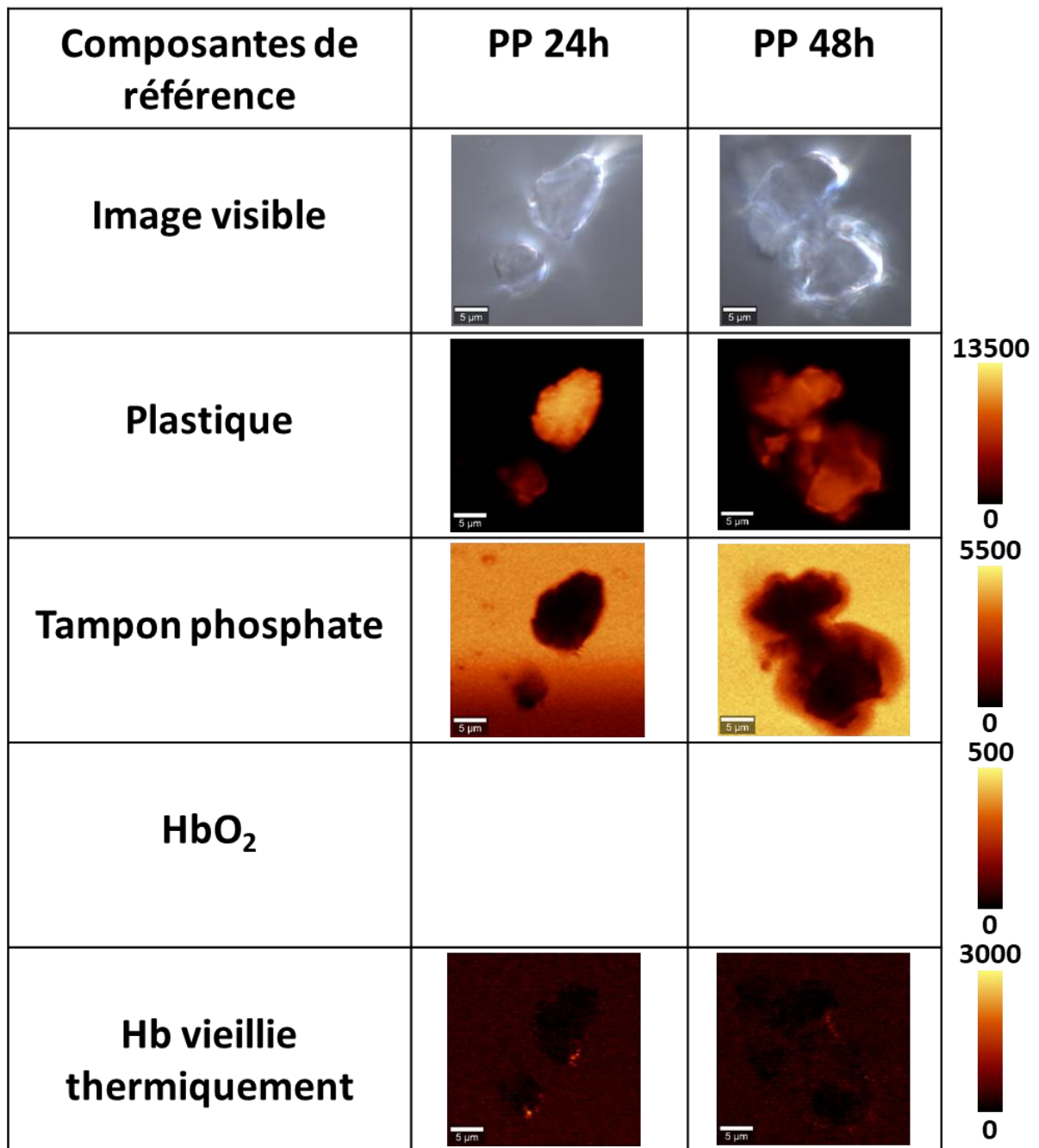


Figure A.4 : Images Raman des composantes après 24 h et 48 h de mise en contact des microparticules de PE avec Hb. La barre d'échelle mesure 5 μm pour chaque image.

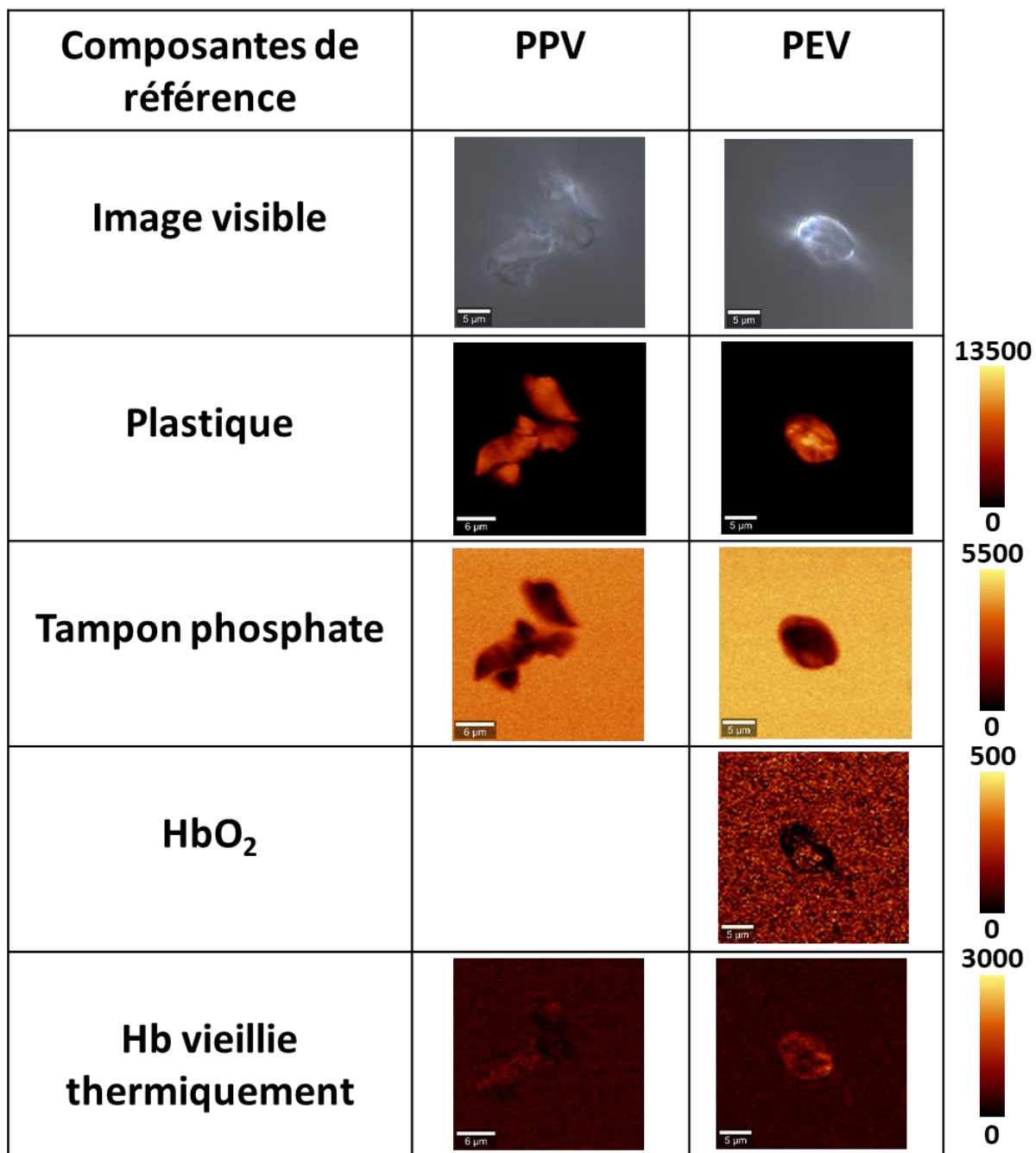


Figure A.5 : Images Raman des composantes après 72 h de mise en contact des microplastiques vieillis avec Hb.
 La barre d'échelle mesure 6 μm pour les image de PPV et 5 μm pour les images de PEV.

Titre : Physico-chimie des interactions de plastiques microstructurés avec des protéines ou des peptides modèles par des approches expérimentales et *in silico*.

Mots clés : Plastiques ; Micro-nanoparticules ; Protéines ; Peptides ; Adsorption ; Corona

Résumé : Les micro- et nanoparticules, et en particulier celles de plastique, constituent un sujet d'actualité important. L'augmentation toujours croissante des quantités de plastiques utilisées dans des domaines très variés est à l'origine d'une forte augmentation de la pollution associée. Lorsque ces particules entrent dans un milieu biologique, elles s'entourent d'une corona dont l'impact sur les organismes peut être complexe. Elle donne à la particule une "identité biologique" influençant ses interactions dans le milieu vivant.

Cette thèse étudie les interactions de microparticules (MP) de polyéthylène et de polypropylène, et de filtres microstructurés en polypropylène avec des protéines et des peptides modèles. Nous avons caractérisés les MP par différentes méthodes spectroscopiques.

Des MP non-vieillies et vieilles par différentes méthodes ont été mises en contact avec des protéines et peptides modèles. Nous avons mesuré les isothermes d'adsorption des protéines sur les MP vieillis et non vieillis. Des mesures d'imagerie Raman et de fluorescence nous ont permis de visualiser directement la corona de l'hémoglobine et de l'albumine du sérum bovin sur les MP. La fonction de l'hémoglobine, en solution et adsorbée, a été évaluée par tonométrie.

Pour comprendre les interactions entre peptides et nanoparticules de polyéthylène à l'échelle atomique, nous avons utilisé une approche *in silico* de dynamique moléculaire. En parallèle, nous avons mesuré les isothermes d'adsorption de peptides fluorescents pour valider les résultats de simulation.

Title : Physico-chemistry of interactions between microstructured plastics and proteins or model peptides by experimental and *in silico* approaches.

Keywords : Plastics, Micro-nanoparticles ; Proteins ; Peptides ; Adsorption ; Corona

Abstract : Micro- and nanoparticles, and especially plastic particles, are an important current topic. The ever-growing increase of the amount of plastic used in a wide variety of fields causes a sharp increase in the associated pollution. When these particles enter a biological medium they surround themselves with a corona, which can have a complex impact on organisms. It can give the particle a "biological identity" influencing its interactions in the living medium.

This thesis studies the interactions of polyethylene and polypropylene microparticles (MP) and microstructured polypropylene filters with proteins and model peptides. We characterized the MPs with several spectroscopic methods.

Unaged and aged MPs were brought into contact with proteins and model peptides.

We measured protein adsorption isotherms on aged and unaged MPs. Raman imaging and fluorescence measurements allowed us to directly visualize the hemoglobin and bovine serum albumin corona on the MPs. The hemoglobin function, in solution and adsorbed, was assessed by tonometry.

To understand the interactions between peptides and nanoparticles at the atomic scale, we used an *in silico* molecular dynamics approach. Meanwhile, we have measured adsorption isotherms of fluorescent peptides to validate the simulation results.