



HAL
open science

Protéines en contact avec des macro et microplastiques : devenir en solution et aux interfaces

Marion Schwartz

► **To cite this version:**

Marion Schwartz. Protéines en contact avec des macro et microplastiques : devenir en solution et aux interfaces. Chimie organique. Le Mans Université, 2023. Français. NNT : 2023LEMA1006 . tel-04138011

HAL Id: tel-04138011

<https://theses.hal.science/tel-04138011>

Submitted on 22 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.



THESE DE DOCTORAT DE PHYSICO-CHEMIE BIOLOGIQUE

DE
LE MANS UNIVERSITE
SOUS LE SCEAU DE
LA COMUE ANGERS – LE MANS

ECOLE DOCTORALE N° 596
Matière, Molécules, Matériaux et Géosciences
Spécialité : *Physique : Environnement et biologie*

Par

Marion SCHVARTZ

**Protéines en contact avec des macro et microplastiques :
devenir en solution et aux interfaces**

Thèse présentée et soutenue à Saclay, le 27 mars 2023
Unité de recherche : Institut des Molécules et Matériaux du Mans, UMR 6283
Thèse N° : 2023LEMA1006

Rapporteurs avant soutenance :

Véronique COMA Maître de conférences HDR, Université de Bordeaux
Guillaume DUFLOS Directeur de recherche, ANSES

Composition du Jury :

Présidente :	Camille LOUPIAC	Professeure des universités, AgroSup Dijon
Examineurs :	Valérie ALARD Florence GAZEAU	Responsable de département, LVMH Recherche Directrice de recherche CNRS, Université Paris Cité
Dir. de thèse :	Jean-Philippe RENAULT	Directeur de recherche CEA, CEA Saclay
Co-dir. de thèse :	Guillaume BROTONS	Professeur des universités, Le Mans Université

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un projet financé par le CEA, la région Pays de la Loire, l'ANSES et le CNRS.

Merci tout d'abord aux membres de mon jury de thèse Véronique Coma, Guillaume Duflos, Valérie Alard, Florence Gazeau et Camille Loupiac d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci pour la lecture du manuscrit ainsi que pour les échanges très enrichissants que nous avons eus suite à la soutenance.

Je remercie tout particulièrement mes encadrants de thèse :

Jean-Philippe Renault, mon directeur de thèse. Je t'adresse un immense merci pour ton accompagnement, toujours bienveillant, ta confiance qui m'a permis d'avoir moi-même confiance en mes capacités. Merci pour tous tes conseils, en termes de démarche scientifique mais également en gestion de projet. Et surtout, merci pour tes idées de génie !

Guillaume Brotons, mon co-directeur de thèse. Je te remercie très sincèrement pour ton encadrement et pour le temps que tu as pris pour m'expliquer certaines notions et pour m'apprendre à traiter des données de SAXS et de DLS avec beaucoup de rigueur.

J'ai eu la chance d'être également encadrée par Serge Pin et Yves Boulard qui, par leur présence au quotidien, ont apporté leur expertise à ce projet. Merci à tous les deux d'avoir veillé avec beaucoup de bienveillance au bon déroulement de ma thèse et merci pour vos nombreux conseils.

Je vous remercie tous les quatre très sincèrement pour ces trois années qui m'ont énormément apportée. Grâce à la place que vous m'avez faite dans l'équipe et en me laissant progressivement prendre les rênes de ce projet, je suis plus confiante et je me sens capable de relever de nouveaux défis.

Je tiens à remercier Florent Saudrais avec qui j'ai travaillé pendant la réalisation de nos thèses respectives. Je pense que nous avons été complémentaires sur un certain nombre de points et j'ai beaucoup apprécié travailler avec toi. Et merci encore pour tes cookies !

Je remercie également l'ensemble des personnes de notre équipe plastique. Merci à Stéphane Chédin pour toutes les journées que tu m'as accordées pour la préparation des extraits protéiques, j'ai beaucoup aimé travailler avec toi. Merci à Jean-Christophe Aude pour l'analyse des données de protéomique qui ont nécessité une véritable expertise et beaucoup de travail. Merci à Stéphanie Devineau pour les analyses Raman et pour ton aide précieuse lors des runs sur DISCO. Merci à Karol Rakotozandriny pour le développement des puces microfluidiques qui ont permis de réaliser de premières observations sous flux de l'adsorption de protéines sur des fibres de polyéthylène sous faisceau synchrotron.

Je souhaite ensuite remercier l'ensemble des personnes qui sont intervenues dans l'acquisition ou le traitement de mes données. Merci à l'équipe IMAPP (I2BC) pour leur accueil lors de mes passages et pour m'avoir permis d'utiliser à de très nombreuses reprises leur Nanodrop. Merci au LEDNA et en particulier à Vincent Mertens de m'avoir permis d'accéder à leur Turbiscan. Merci à Olivier Taché pour son aide dans la réalisation et dans l'analyse des expériences de SAXS. Merci à Jocelyne Leroy pour la réalisation et le traitement des données d'XPS. Merci à Céline Henry et Aaron Millan-Oropeza de la plateforme PAPPSO (INRAE) pour la réalisation des expériences de protéomique. Merci à Frédéric Jamme de nous avoir formés à l'utilisation des microscopes de la ligne DISCO Imaging (synchrotron SOLEIL) et pour son aide au cours des runs. Merci également Yassine Mahieddine et Elodie Vallon qui ont participé à ce projet dans le cadre de leur stage de 2^{ème} année d'IUT.

Merci à tous les permanents du LIONS que je n'ai pas encore cités : Antoine Thill, Valérie Geertsen, Patrick Guenoun, Christophe Fajolles, Luc Belloni, Corinne Chevillard, David Carrière, Sophie Le Caer, Mark Levenstein, Elodie Collard, Fabienne Testard, Florent Maloggi, Frédéric Gobeaux et Emeline Cournède. Je reconnais la chance que j'ai eue d'évoluer dans un cadre comme celui que vous avez créé : une équipe pluridisciplinaire, passionnée par la science et dotée d'une grande bienveillance, permettant à tous de trouver sa place.

Merci à tous ceux qui sont passés par le Thésarium : Marie-Claire Pignié, Clémentine Colas, Lucie Huart, Gaël Giraudon, Antonin Bouland, Maxime Durelle, Florent Saudrais, Estelle Puel, Yanis Levieux, Thibaut Hérin, Karol Rakotozandriny et Jade Raimbault. Certaines étapes de la thèse ne sont pas évidentes et votre présence au quotidien m'a énormément aidée. J'ai beaucoup rit grâce à vous et vous allez me manquer.

Merci à ma famille : mon frère, ma sœur et mes parents, qui m'ont toujours laissée libre de suivre ma voie, tout en m'accompagnant et me soutenant à chaque étape.

Enfin, merci Edouard pour ta patience lorsque je te demandais d'admirer mes magnifiques figures faites sur R et mes schémas. Merci également pour ta présence et ton soutien dans les moments plus difficiles.

Table des matières

<u>LISTE DES ABREVIATIONS</u>	<u>7</u>
<u>INTRODUCTION GENERALE.....</u>	<u>9</u>
<u>CHAPITRE 1. LE PLASTIQUE EN INTERACTION AVEC LES BIOMOLECULES.....</u>	<u>11</u>
1.1. LE PLASTIQUE, UN MATERIAU PRATIQUE MAIS PROBLEMATIQUE	15
1.1.1. GENERALITES.....	15
1.1.2. EXPOSITIONS VOLONTAIRES	18
1.1.3. EXPOSITIONS INVOLONTAIRES	24
1.2. MECANISMES D'INTERACTIONS.....	26
1.2.1. FOCUS SUR UNE FAMILLE DE BIOMOLECULES : LES PROTEINES	26
1.2.2. EFFETS DES PLASTIQUES SUR LES PROTEINES.....	27
1.2.3. EFFET DES PROTEINES SUR LES PLASTIQUES	35
1.3. OBJECTIFS DE LA THESE	38
1.4. BIBLIOGRAPHIE	40
<u>CHAPITRE 2. MATERIELS ET METHODES.....</u>	<u>49</u>
2.1. LES PROTEINES	53
2.1.2. PROPRIETES DES SOLUTIONS DE PROTEINES.....	58
2.1.3. COMPOSITION DES SOLUTIONS DE PROTEINES.....	62
2.1.4. ÉVALUATION DES PERTES DE PROTEINES	66
2.1.5. DESORPTION DES PROTEINES.....	68
2.2. LES MICROPLASTIQUES	70
2.2.1. DISTRIBUTION EN TAILLES PAR MICROSCOPIE	70
2.2.2. SURFACE SPECIFIQUE PAR DIFFUSION DES RAYONS X AUX PETITS ANGLES	70
2.2.3. CHIMIE DE SURFACE PAR SPECTROSCOPIE DE PHOTOELECTRONS INDUITS PAR RAYONS X.....	71
2.2.4. COMPOSITION	72
2.3. LES PARTICULES DE PLASTIQUES RECOUVERTES DE PROTEINES	74
2.3.1. MICROPLASTIQUES	74
2.3.2. PREMIERES EXPERIENCES SUR DES NANOPLASTIQUES.....	81
2.4. BIBLIOGRAPHIE	82
<u>CHAPITRE 3. EFFETS DES SURFACES PLASTIQUES SUR LES PROTEINES EN SOLUTION ET SOUS AGITATION.....</u>	<u>85</u>
3.1. OBSERVATION DES PERTES DE PROTEINES.....	89
3.1.1. STRATEGIE EXPERIMENTALE	89

3.1.2.	EFFET DES TUBES.....	92
3.1.3.	EFFET DE L'ENERGIE ET DE LA PUISSANCE D'AGITATION	95
3.1.4.	EFFET DE LA SOLUTION	96
3.1.5.	EFFET DES INTERFACES	99
3.2.	DEVENIR DES PROTEINES PERDUES	105
3.2.1.	ADSORPTION SUR LES PAROIS DES TUBES	105
3.2.2.	AGREGATION EN SOLUTION	106
3.3.	PROPOSITION D'UN MECANISME DE DESTABILISATION.....	112
3.4.	IDENTIFICATION DES PROTEINES PERDUES PAR ANALYSE PROTEOMIQUE	114
3.4.1.	STRATEGIE EXPERIMENTALE	114
3.4.2.	EFFET DE LA NATURE DU TUBE	115
3.5.	VERS UN SUIVI DYNAMIQUE	120
3.5.1.	PREMIERS RESULTATS	120
3.5.2.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	123
3.6.	POINTS CLEFS ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE	124
3.7.	BIBLIOGRAPHIE	125
CHAPITRE 4. FORMATION D'UNE CORONA SUR DES MICROPLASTIQUES		131
4.1.	CARACTERISATION DES MICROPLASTIQUES NATIFS ET VIEILLIS	135
4.1.1.	DONNEES FOURNISSEUR ET PROCEDES D'OBTENTION	135
4.1.2.	DISTRIBUTION EN TAILLES	136
4.1.3.	PROPRIETES DE SURFACE	138
4.1.4.	COMPOSITION ET STRUCTURE	144
4.1.5.	RECAPITULATIF DES INFORMATIONS OBTENUES	151
4.2.	QUANTIFICATION DES PROTEINES ADSORBEES.....	152
4.2.1.	STRATEGIE EXPERIMENTALE	152
4.2.2.	EFFET DE LA SURFACE	155
4.2.3.	EFFET DU CHANGEMENT DE PH ET DE L'EAU DE MER.....	159
4.3.	IMAGERIE DE LA COURONNE DE PROTEINES.....	162
4.3.1.	CONDITIONS EXPERIMENTALES	162
4.3.2.	DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'ANALYSE AUTOMATISEE	165
4.3.3.	DETERMINATION DES PARAMETRES IMPACTANT LA CORONA	170
4.3.4.	ÉTUDE DES AGREGATS PROTEIQUES.....	174
4.4.	IDENTIFICATION DES PROTEINES IMPACTEES PAR LES MICROPLASTIQUES	176
4.4.1.	APPROCHE EXPERIMENTALE.....	176
4.4.2.	RESULTATS	178
4.5.	POINTS CLEFS ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE	187
4.6.	BIBLIOGRAPHIE	189

<u>CHAPITRE 5. LE ROLE DE LA CORONA PROTEIQUE SUR LE COMPORTEMENT COLLOIDAL DE MICROPLASTIQUES NATIFS ET VIEILLIS</u>	193
5.1. STABILITE DES DISPERSIONS DE MP	197
5.1.1. EFFET DE LA NATURE DU PLASTIQUE ET DE SON ETAT DE VIEILLISSEMENT	197
5.1.2. COMPARAISON AVEC L'ALBUMINE DE SERUM BOVIN (BSA)	205
5.2. INSTABILITES DES DISPERSIONS DE MP	207
5.2.1. CAS DES PARTICULES INSTABLES.....	207
5.2.2. DESTABILISATION DES PARTICULES DISPERSEES – APPLICATION A LA DEPOLLUTION.....	211
5.3. ROLE DE LA CORONA DANS LA STABILITE COLLOIDALE DES MICROPLASTIQUES..	213
5.3.1. NATURE DU PLASTIQUE	213
5.3.2. CORONA PROTEIQUE	213
5.3.3. SURFACE DU PLASTIQUE	216
5.4. VERS DES ETUDES <i>IN VIVO</i>	217
5.4.1. OBJECTIFS ET METHODOLOGIE	217
5.4.2. PREMIERS RESULTATS	218
5.4.3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	222
5.5. POINTS CLEFS ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE	223
5.6. BIBLIOGRAPHIE	224
<u>CHAPITRE 6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	227
<u>ANNEXES</u>	243
A.1. COMPORTEMENT COLLOÏDAL	244
A.1.1. ASPECTS THEORIQUES	244
A.1.2. LE CAS DES MICROPLASTIQUES	247
A.2. ANNEXES DU CHAPITRE 3	249
A.3. ANNEXES DU CHAPITRE 4	251
A.3.1. ISOTHERMES D'ADSORPTION DE LA BSA SUR LES MP NATIFS	251
A.3.2. MACROS DEVELOPPEES SUR FIJI POUR LE TRAITEMENT DES IMAGES DE FLUORESCENCE	252
A.3.3. PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES ET STRUCTURELS DE L'ANALYSE PROTEOMIQUE.....	256
A.3.4. PROTEINES D'EPL DELETEES APRES CONTACT AVEC DES MP	258
A.3.5. PROTEINES D'EPL DELETEES SPECIFIQUEMENT	260
A.3.6. PARAMETRES DETERMINANTS DANS L'ADSORPTION DES PROTEINES D'EPL SUR DES MP	262
BIBLIOGRAPHIE	265
<u>RESUMES</u>	268

Liste des abréviations

Abréviation	Signification	Abréviation	Signification
A/L	Air/liquide	PEBD	Polyéthylène basse densité
A/L/S	Air/liquide/solide	PEHD	Polyéthylène haute densité
AA	Acide aminé	PET	Polyéthylène téréphtalate
ABS	Acrylonitrile butadiène styrène	PETG	Polyéthylène téréphtalate glycolisé
ADN	Acide désoxyribonucléique	PEV	Polyéthylène vieilli
ARN	Acide ribonucléique	PFA	Perfluoroalkoxy
BSA	Albumine de Sérum Bovin	PGI	Phosphoglucose isomérase
CCC	Concentration de coagulation critique	pl	Point isoléctrique
CI	Couche incomplète	PLA	Acide polylactique
CMC	Concentration micellaire critique	PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
CS	Couche saturée	PP	Polypropylène
DLS	Diffusion dynamique de la lumière	PPV	Polypropylène vieilli
DRX	Diffraction des rayons X	PS	Polystyrène
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage	PSE	Polystyrène expansé
EPL	Extrait Protéique de Levure	PTFE	Polytétrafluoroéthylène
FEP	Ethylène propylène fluoré	PU	Polyuréthane
HI	Heures d'incubation	PVC	Polychlorure de Vinyle
HPF	Heures post fertilisation	PVDF	Fluorure de polyvinylidène
IDP	Protéines intrinsèquement désordonnées	R	Arginine
L/S	Liquide/solide	S/L	Solide/liquide
MP	Microplastique	SAXS	Diffusion des rayons X aux petits angles
NPE	Nanoparticule de polyéthylène	SDS	Sodium dodécyl sulfate
PAN	Polyacrylonitrile	UV	Ultraviolet
PC	Polycarbonate	XPS	Spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X
PE	Polyéthylène		

INTRODUCTION GENERALE

La pollution plastique est un problème environnemental, sociétal, économique et toxicologique. Le contact de ces matériaux avec le vivant pose de plus en plus de questions puisqu'ils sont présents massivement en environnement aquatique et chez l'Homme sous forme de particules (dans le sang¹ et le placenta² par exemple). La recherche s'accélère donc pour comprendre les mécanismes et les conséquences de ces interactions.



Figure 1.1. Illustration d'une bouteille en plastique se fractionnant en particules au cours de sa dégradation dans un environnement aquatique.³

Ce travail a été mené dans le cadre d'un projet co-financé par le CEA, la région Pays de la Loire et l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), via le projet PROMPT (2018/1/194) dont l'objectif global était de comprendre comment une famille de biomolécules, les protéines, s'adsorbent sur des particules de plastique et en quoi cela modifie leur fin de vie dans l'environnement. Deux autres doctorants ont réalisé leur thèse dans le cadre de ce projet :

- Florent Saudrais (CEA) a étudié les interactions entre des microplastiques et des protéines modèles (travail expérimental et simulations). Les particules utilisées sont les mêmes que dans mon travail de thèse, nous avons donc mutualisé leur caractérisation. Les expériences présentées ici et exécutées par F. Saudrais seront explicitement indiquées.
- Thomas Perrault (Université du Mans) a mis au point un système permettant le suivi dynamique et individuel de nanoplastiques.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Leslie, H. A.; J. M. van Velzen, M.; Brandsma, S. H.; Vethaak, D.; Garcia-Vallejo, J. J.; Lamoree, M. H. Discovery and Quantification of Plastic Particle Pollution in Human Blood. *Environ. Int.* 2022, 107199. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199>.
- (2) Ragusa, A.; Svelato, A.; Santacroce, C.; Catalano, P.; Notarstefano, V.; Carnevali, O.; Papa, F.; Rongioletti, M. C. A.; Baiocco, F.; Draghi, S.; D'Amore, E.; Rinaldo, D.; Matta, M.; Giorgini, E. Plasticenta: First Evidence of Microplastics in Human Placenta. *Environ. Int.* 2021, 146, 106274. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106274>.
- (3) *Faire connaître la pollution plastique et mobiliser le grand nombre*. Fondation Veolia. <https://www.fondation.veolia.com/fr/faire-connaître-la-pollution-plastique-et-mobiliser-le-grand-nombre> (accessed 2022-12-06).

CHAPITRE 1. LE PLASTIQUE EN INTERACTION AVEC LES BIOMOLECULES

Ce chapitre présente le rôle ambivalent du plastique dans son contact avec les biomolécules : ses aspects pratiques, permettant de comprendre pourquoi la plupart des objets de notre quotidien en sont constitués et pourquoi il nous semble impossible de nous en affranchir totalement ; et ses aspects problématiques, principalement dus à une production excessive et à une faible biodégradabilité. Un état de l'art portant sur les interactions entre des matériaux plastiques et des biomolécules est exposé afin de mettre en lumière des points encore mal compris.

CHAPITRE 1. LE PLASTIQUE EN INTERACTION AVEC LES BIOMOLECULES	11
1.1. LE PLASTIQUE, UN MATERIAU PRATIQUE MAIS PROBLEMATIQUE.....	15
1.1.1. GENERALITES	15
1.1.1.1. Définitions et structures.....	15
1.1.1.2. Histoire du plastique	16
1.1.2. EXPOSITIONS VOLONTAIRES	18
1.1.2.1. En agroalimentaire	18
1.1.2.2. En médecine.....	19
1.1.2.3. Au laboratoire.....	22
1.1.3. EXPOSITIONS INVOLONTAIRES	24
1.2. MECANISMES D'INTERACTIONS	26
1.2.1. FOCUS SUR UNE FAMILLE DE BIOMOLECULES : LES PROTEINES	26
1.2.2. EFFETS DES PLASTIQUES SUR LES PROTEINES	27
1.2.2.1. Effets des interfaces sur l'agrégation des protéines.....	27
1.2.2.2. Effets des interfaces et de l'adsorption des protéines	31
1.2.3. EFFET DES PROTEINES SUR LES PLASTIQUES	35
1.2.3.1. Vieillessement des plastiques	35
1.2.3.2. Transport des microplastiques (MP)	36
1.3. OBJECTIFS DE LA THESE	38
1.4. BIBLIOGRAPHIE.....	40

1.1. LE PLASTIQUE, UN MATERIAU PRATIQUE MAIS PROBLEMATIQUE

1.1.1. Généralités

1.1.1.1. Définitions et structures

La matière plastique peut être définie comme « un polymère auquel des additifs ou d'autres substances ont pu être ajoutés, capable de servir de principal composant structurel de matériaux et d'objets finaux ». ¹ Cette définition rend compte de la diversité chimique de ces matériaux. Les possibilités de formulations sont infinies et les propriétés physiques (optiques, mécaniques...) le sont tout autant. Les polymères sont des macromolécules pouvant se structurer et être décrits à cinq échelles de tailles (Figure 1.2). ²

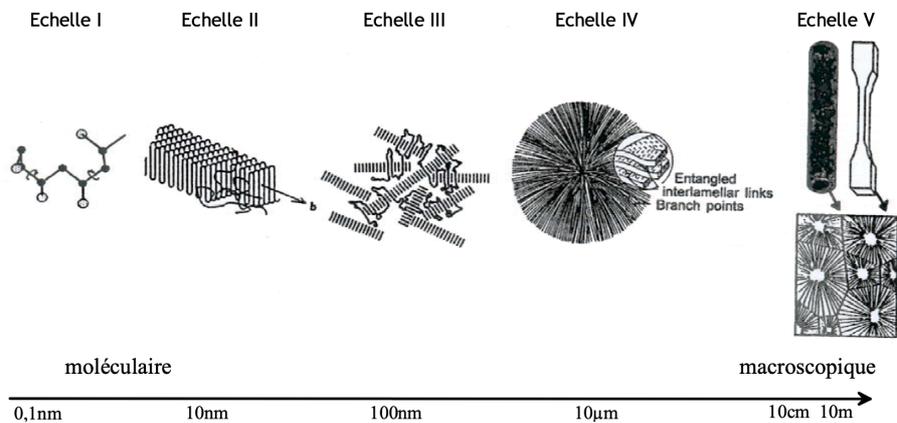


Figure 1.2. Représentation des différentes échelles structurelles d'un matériau polymère. ²

- **Échelle I.** Un polymère est une macromolécule constituée d'unités répétitives appelées monomères.
- **Échelle II.** L'orientation des groupes latéraux de la chaîne du polymère a un impact sur la conformation globale de la molécule, tenant compte des interactions entre atomes et de l'encombrement stérique.
- **Échelle III.** Lorsque les chaînes sont organisées de manière périodique, la phase est cristalline ; lorsque les chaînes ne sont pas organisées, la phase est amorphe. Souvent les polymères sont semi-cristallins, c'est-à-dire qu'ils sont constitués à la fois de phases amorphes et de phases cristallines.
- **Échelle IV.** Les arrangements des phases amorphes et cristallines peuvent donner lieu à des structures particulières. La plus couramment observée est la sphérulite, constituée d'une alternance de phases amorphes et cristallines croissant de manière sphérique.
- **Échelle V.** A l'échelle macroscopique, les plastiques tels que nous les utilisons au quotidien peuvent prendre des formes très variées.

1.1.1.2. Histoire du plastique

Historiquement, les premiers matériaux plastiques étaient constitués de polymères naturels tels que la cellulose ou encore du latex issu de la sève d'hévéa. C'est au cours du XIX^{ème} siècle qu'ont été développés les premiers polymères synthétiques. L'un des objectifs était de remplacer des matières naturelles qui étaient jusqu'alors très coûteuses. La possibilité de production à grande échelle et le faible coût ont joué un rôle majeur dans le développement de ces matériaux.³ Le celluloïd,⁴ la viscosé⁵ et le caoutchouc synthétique⁶ ont par exemple été développés pour remplacer respectivement l'ivoire, la soie et le latex naturel.

Peu à peu, ces matériaux synthétiques, à l'origine imitateurs, sont devenus source d'innovation. De nombreux polymères ont été développés par les industriels, permettant la création d'objets ayant des propriétés jusqu'alors inaccessibles. Au cours du XX^{ème} siècle, ils ont été introduits dans la plupart des objets du quotidien en raison de leur prix attractif et de la simplicité de production (Figure 1.3).

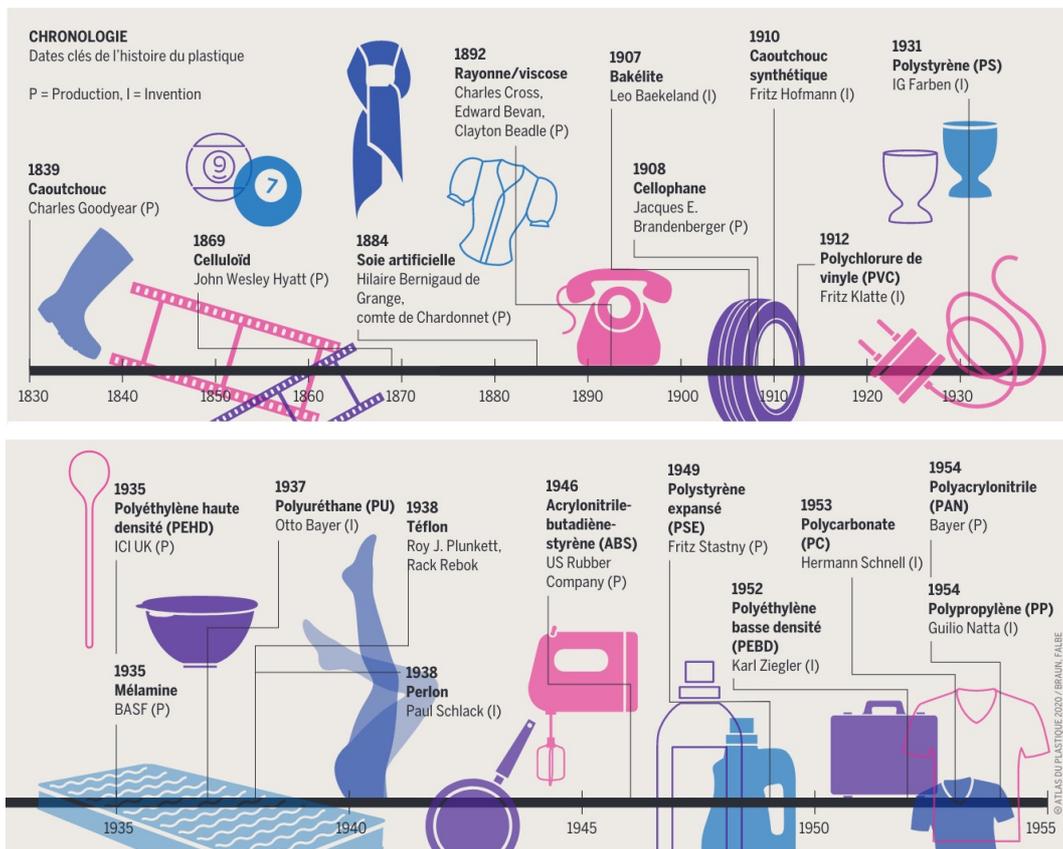


Figure 1.3. Chronologie (de 1830 à 1955) du développement des matériaux plastiques et illustrations de leurs utilisations.⁴

Aujourd'hui, la nature des polymères constituant les plastiques est variée afin de répondre aux exigences des diverses applications pour lesquelles ils sont destinés. Ils peuvent être classés en deux catégories⁷ :

- Les thermoplastiques (tableau 1.1) : la chaleur permet de les ramollir, voir les fondre, pour les mettre en forme, une fois refroidis ils vont conserver cette forme. Cette opération est réversible.
- Les plastiques thermodurcissables (tableau 1.2) : à l'inverse, ils ne peuvent pas être fondus pour modifier leur forme.

Famille	Exemple de polymères	Exemples d'application
Polyoléfines	-Polyéthylène basse densité (PEBD)	-Emballages, jouets, sacs
	-Polyéthylène haute densité (PEHD)	-Emballages, isolation électrique
	-Polypropylène (PP)	-Automobile, films alimentaires
Polyesters linéaires	-Polyéthylène téréphtalate (PET)	-Bouteilles, composants électroniques
Styréniques	-Polystyrène (PS)	-Emballages, isolation
	-Polystyrène expansé (PSE)	-Emballages, isolation
Vinylques	-Polychlorure de Vinyle (PVC)	-Maroquinerie, gouttières
Polyamides (PA)	-Nylon	-Textile, prises électriques
Polyacryliques et polyméthacryliques	-Polyméthacrylate de méthyle (PMMA)	-Fibres textiles, verres de lunettes
	-Polyacrylonitrile (PAN)	-Fibres textiles
Polycarbonates (PC)		-Casque protection, vitrages sécurisé

Tableau 1.1. Principales familles de thermoplastiques, exemples de polymères et d'applications.^{7,8}

Famille	Exemples d'application
Polyuréthanes (PU)	Mousses, peintures, cuirs synthétiques
Phénoplastes	Encres, peintures, abrasifs
Polyépoxydes	Revêtements, peintures, adhésifs
Élastomères	Caoutchouc, néoprènes, silicones

Tableau 1.2. Principales familles de plastiques thermodurcissables et exemples d'applications.^{7,8}

1.1.2. Expositions volontaires

Les plastiques sont fabriqués pour être utilisés dans de nombreux secteurs, notamment pour des applications où ils sont en contact avec des biomolécules. Celles-ci se classent en différentes catégories : acides nucléiques, acides aminés (AA), peptides (quelques AA), protéines (macromolécules d'AA), lipides et glucides (monosaccharides, oligosaccharides et polysaccharides).⁹

1.1.2.1. En agroalimentaire

Les emballages alimentaires industriels sont généralement constitués de plastique. Ils assurent une protection physique des denrées contre les contaminations tout en préservant leurs qualités gustatives et nutritionnelles.¹⁰ Ils permettent, entre autres, d'accéder à une alimentation variée dans des régions non productrices et de lutter contre le gaspillage alimentaire. Des matériaux composites à base de résines et de bois ont été très largement utilisés dès la première moitié du XX^{ème} siècle pour leurs propriétés isolantes, protégeant le contenu des variations brutales de température (Figure 1.4). Cependant, ils ont été abandonnés rapidement et remplacés par des matériaux permettant de fabriquer des contenants plus légers.



Figure 1.4. Affiche publicitaire pour des fûts de bière constitués d'un matériau composite de bois et de résines.¹¹

Bien que de nouveaux matériaux biosourcés, biodégradables ou comestibles arrivent sur le marché,^{12,13} les plus couramment utilisés pour les emballages alimentaires restent des polyoléfinés et plus particulièrement le polyéthylène (haute et basse densité : PEHD et PEBD) et le polypropylène (PP).^{13,14} D'autres plastiques synthétiques sont également utilisés, en fonction des besoins spécifiques : le polyéthylène téréphtalate (PET), le polychlorure de vinyle (PVC), et le polystyrène (PS).

L'utilisation domestique du plastique pour les aliments concerne principalement la conservation avec, entre autres le PVC (film étirable¹⁵), le polycarbonate (boîtes de marque Tupperware®¹⁶), le PE ou le PP (sacs congélation). C'est grâce à leur praticité qu'ils sont entrés dans les cuisines. En effet, ces matériaux peuvent parfois être chauffés au micro-ondes (température inférieure à 100°C) ou stockés au réfrigérateur (4°C), voire au congélateur (-20°C).

Les tétines et les biberons pour les nouveaux nés constituent une autre utilisation fréquente du plastique alimentaire en usage domestique. Au cours de l'histoire, différents matériaux ont été utilisés pour les tétines (corne, buis, liège, ivoire enveloppés dans un linge) et ont été remplacés dès 1845 par du caoutchouc, plus hygiénique et pratique.¹⁷ Aujourd'hui, elles sont majoritairement en silicone et les biberons sont généralement en polyéthylsulfone, polyphénylsulfone, PE ou PP.¹⁸

Le principal problème lié à l'utilisation des plastiques dans le domaine de l'agroalimentaire ne vient pas des matériaux en eux-mêmes mais des additifs qu'ils contiennent, notamment lorsqu'ils migrent dans les aliments et sont ingérés. Les additifs sont de nature chimique variée et sont incorporés en tant que plastifiants, charges, colorants/pigments, catalyseurs, solvants ou pour des besoins plus spécifiques.¹⁹ Des études ont montré que des additifs tels que les polybromodiphényléthers, le bisphenol A, les phtalates ou les nonylphénols sont toxiques.²⁰⁻²³

1.1.2.2. En médecine

Dans le domaine médical, de nombreux progrès, en termes de confort, de rapidité de diagnostique ou d'efficacité thérapeutique, ont pu être réalisés grâce à l'utilisation du plastique.

Élaboration des biothérapies

Les biothérapies sont définies comme l'utilisation de produits issus d'organismes vivants dans le cadre d'un diagnostic ou d'un traitement thérapeutique.²⁴ Il peut s'agir de cellules, de tissus ou de biomolécules.²⁵ Les médicaments à base de protéines ou de peptides sont d'un intérêt croissant pour leur forte activité à faible concentration en tant que substances régulatrices, inhibiteurs enzymatiques ou anticorps.²⁶ La plupart des biothérapies immunomodulatrices (régulation du système immunitaire en bloquant certaines fonctions) sont réalisées à partir d'anticorps monoclonaux ou de protéines de fusion.²⁷ L'intérêt pour les anticorps monoclonaux est croissant puisqu'ils se sont révélés efficaces pour de nombreuses pathologies (Figure 1.5).^{28,29}

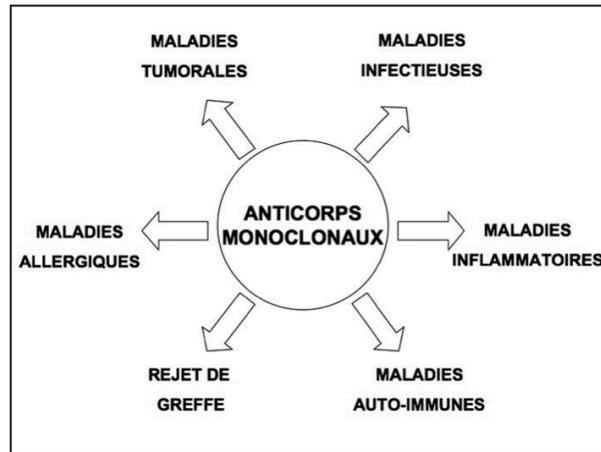


Figure 1.5. Illustration des différentes pathologies dans lesquelles les anticorps monoclonaux se sont révélés efficaces thérapeutiquement.²⁹

Les procédés de production, de purification puis de mise en œuvre de ces anticorps nécessitent de nombreuses étapes, pouvant inclure le contact avec des surfaces plastiques comme celles des contenant pour l'agitation ou la centrifugation, des systèmes de filtration, de prélèvement ou encore de stockage des solutions.^{30,31} L'avantage principal du matériel à usage unique est la garantie de stérilité, indispensable pour la production de biomolécules. Des technologies de purification utilisant des polymères sont également à l'étude pour la production à grande échelle.³⁰

Cependant, les anticorps et plus généralement les protéines, sont sensibles aux procédés de mélanges (agitation, pompage, congélation/décongélation ou encore lyophilisation)^{32,33} et aux surfaces polymériques.³⁴⁻³⁶ Cette sensibilité se manifeste par l'agrégation des protéines ou leur adsorption, engendrant une perte en solution. Pour limiter ces pertes, les médicaments à base de protéines sont généralement administrés par injection.²⁶ Des étapes de mélange sont néanmoins nécessaires et l'optimisation des protocoles de formulation est essentielle pour la préservation d'un maximum de protéines en solution.^{32,37-39} De nombreuses stratégies ont été développées pour éviter les agrégats protéiques dans les médicaments à base de protéines, en contrôlant l'environnement local, les procédés de production, le stockage ou encore en retirant les agrégats avant l'échantillonnage.⁴⁰ En effet, dans un état agrégé, l'activité et l'efficacité de ces protéines est réduite. Il s'agit d'un problème économique puisque les anticorps sont coûteux à produire mais il s'agit surtout d'un problème de santé publique : si les agrégats sont administrés, cela peut causer de sévères réactions secondaires telle qu'une allergie pouvant aller jusqu'à l'anaphylaxie.^{41,42}

Systèmes d'administration thérapeutique

Les solutions de médicaments à base de protéines sont généralement stockées dans des seringues pour être injectées.^{26,43} Ces dispositifs, originellement en verre, sont remplacés peu à peu par des matériaux en plastique (polymères ou copolymères d'oléfiniques cycliques, suffisamment transparents pour contrôler l'aspect visuel de la solution).⁴⁴ De la même manière, avec le développement des matériaux plastiques, les cathéters ont successivement été fabriqués en PVC puis en téflon (plus flexible, biocompatible, non toxique).⁴⁵

Les biomolécules contenues et transportées via ces dispositifs peuvent s'adsorber sur les parois en plastique. Tout comme pour les biothérapies, la perte des biomolécules est un problème économique et l'agrégation de protéines peut avoir de lourdes conséquences.

Biomatériaux

Un biomatériau peut être défini comme « un matériau non vivant d'origine naturelle ou synthétique utilisé dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques ». ⁴⁶

Les champs d'application des biomatériaux sont très larges : ophtalmologie, odontologie, stomatologie, chirurgie orthopédique, cardiovasculaire, urologie, néphrologie, endocrinologie, chronothérapie, chirurgie esthétique, chirurgie générale, etc.⁴⁷ La biocompatibilité de ces matériaux est primordiale et passe par leurs propriétés de surface : rugosité, mouillabilité, chimie de surface.⁴⁸ Les matériaux plastiques, par leurs propriétés modulables répondent au cahier des charges strict du secteur médical. Nous pouvons citer quelques exemples concrets :

- Les biomatériaux **cutanés** sont destinés à couvrir une plaie, la protégeant et aidant la cicatrisation. Des matrices à base de copolymères sont parfois utilisées pour remplacer les matrices naturelles d'origine cadavérique ou le collagène. Il peut s'agir de mélanges d'acide polyglycolique/acide polylactique ou d'oxyde de polyéthylène/téréphtalate de polybutylène. D'autres voies biosourcées sont à l'étude.⁴⁹
- Les biomatériaux utilisés dans le secteur **odontologique** étaient initialement constitués de métal. Aujourd'hui, ils sont le plus souvent fabriqués en céramique ou en composites synthétiques (généralement à base de diméthacrylates),^{50,51} photopolymérisables dans l'UV pour un durcissement rapide. Ces matériaux doivent répondre à des exigences strictes : conservation de leur aspect visuel et de leurs propriétés physiques alors qu'ils sont soumis à un environnement défavorable (milieu humide, contraintes mécaniques).
- Les polymères synthétiques peuvent être utilisés pour la fabrication de **prothèses osseuses** grâce à leurs propriétés biomécaniques contrôlables.^{52,53} Avec le développement de l'impression 3D, l'accessibilité à ce type de traitement augmente grâce au faible coût et à la facilité de fabrication.⁵⁴ Les plastiques les plus couramment utilisés en impression 3D sont les suivants : acide polylactique (PLA), acrylonitrile butadiène styrène (ABS), polyméthacrylate de méthyle (PMMA).⁵⁵

Les prothèses de genoux, d'épaules et de hanches sont le plus souvent à base de polyéthylène ultra haute densité (propriétés mécaniques similaires aux os naturels, faible coefficient de friction, biocompatibilité).^{52,56,57} Une recherche importante a été effectuée pour le développement de ces prothèses à base de polyéthylène. La réticulation des chaînes ou la formulation de matériaux composites a permis d'augmenter leur résistance à l'usure et ainsi de minimiser le relargage de débris plastiques dans le corps. Cependant, l'un des problèmes majeurs est le fait que ces matériaux interagissent avec des biomolécules du corps humain. Des protéines présentes dans le sang peuvent ainsi s'adsorber sur des prothèses en polyéthylène et former une couche protéique. Une fois adsorbées, cela va initier l'agrégation des protéines, pouvant mener à leur coagulation et éventuellement déclencher une thrombose.⁵⁸ La couche de protéines adsorbée sur les biomatériaux polymériques peut également être à l'origine d'une réponse inflammatoire qui, si elle perdure, va engendrer la formation d'un tissu de granulation. A terme, les fibroblastes peuvent former une matrice, entraînant une fibrose.^{59,60} Pour diminuer les phénomènes d'adsorption des protéines sur les plastiques, une voie est d'hydrophiliser les surfaces, par exemple par greffage de polymères hydrophiles.⁶¹

1.1.2.3. Au laboratoire

Quel que soit le sujet d'étude, nous sommes amenés, en laboratoire, à travailler avec du plastique. Les principaux avantages sont le gain de temps de l'utilisation d'objets à usage unique, évitant les étapes de nettoyage et garantissant la propreté voire la stérilité des consommables. L'absence de contamination est essentielle pour la manipulation de biomolécules puisque des bactéries peuvent très rapidement se développer. L'utilisation du plastique est donc généralisée lors d'expériences impliquant des biomolécules, qui vont alors se trouver en contact avec ces matériaux.

Les solutions sont placées dans des tubes qui peuvent être constitués de différents matériaux : PP, PS, PEBD, PEHD, PC, Téflon (PTFE), PET, FEP, PFA, PETG, polyméthylpentène, PETG.⁶² Ces mêmes solutions seront prélevées à l'aide de consommables en plastique (cônes, pipettes, seringues), pouvant également être constitués de différents matériaux : PP, PS, PEBD, PEHD, PC.⁶² Elles peuvent être dialysées (membrane en cellulose) ou filtrées (membranes en PTFE, nylon, PC, PVDF, PP, PES, PET).

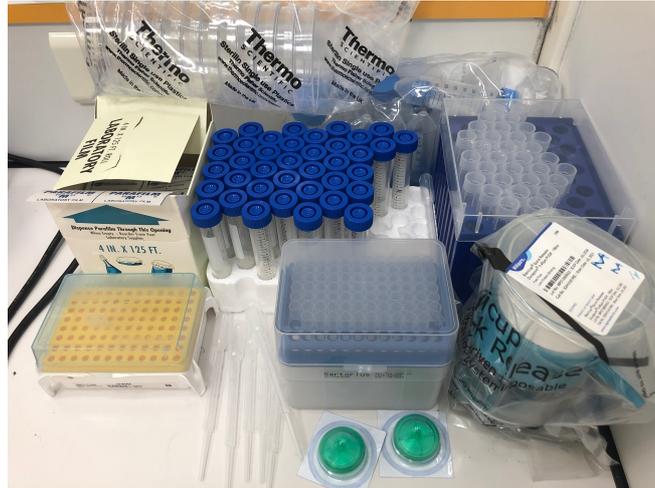


Figure 1.6. Photographie de consommables en plastique souvent utilisés au laboratoire.

Au-delà de la praticité de ces contenants, des problèmes sont également associés à leur utilisation. En effet, lors de la manipulation de biomolécules dans des tubes en plastique ou simplement au cours de leur stockage, des pertes sont couramment observées, qu'il s'agisse de protéines, de lipides ou d'ADN. ⁶³⁻⁶⁵ En revanche, il n'y a pas de données dans la littérature concernant les pertes de sucres dans des tubes. Pour diminuer l'adsorption des biomolécules sur les parois des tubes (ADN et protéines), des matériaux ont été développés (gamme LoBind, Eppendorf).

1.1.3. Expositions involontaires

Dans la partie précédente, certains avantages liés à l'utilisation de matériaux plastiques ont été exposés ainsi que des exemples concrets d'amélioration de la qualité ou de l'espérance de vie. Cette liste n'est pas exhaustive et de nombreux autres aspects bénéfiques n'ont pas été abordés. Cependant, le plastique est principalement produit pour la fabrication d'objets à usage unique : plus de 80% des plastiques mis en circulation deviennent des déchets à l'issue d'une année.⁷ Cela s'explique par une production à grande échelle simple et peu coûteuse. La conséquence directe est une production de plastique qui ne cesse d'augmenter (Figure 1.7).

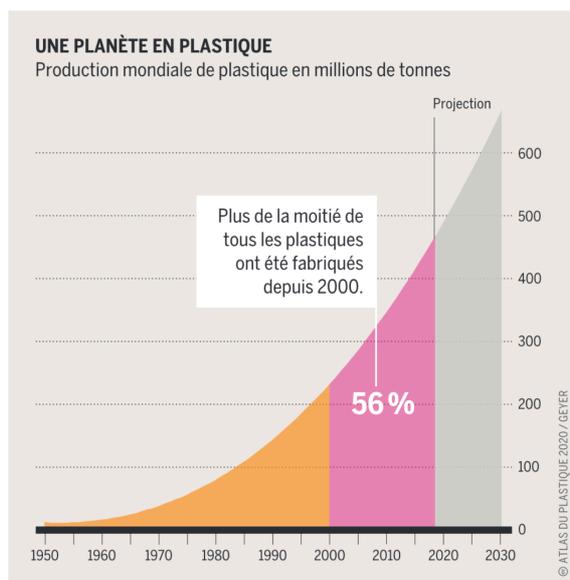


Figure 1.7. Production mondiale de matière plastique de 1950 à 2018, avec une projection jusqu'à 2030 (en millions de tonnes).⁴

Leur mauvaise gestion en tant que déchets et le fait qu'ils soient peu biodégradables font qu'ils s'accumulent dans les écosystèmes, principalement sous forme de microparticules.^{66,67} Bien qu'il y ait des systèmes de collecte et de filtration, de grandes quantités de plastiques se trouvent actuellement dans les océans. La notion de microplastique est basée sur la taille des particules : selon les études la taille limite est de 20 μm (petits microplastiques) ou 5 mm (grands microplastiques).

D'après de récentes considérations, il y aurait au moins vingt-cinq mille milliards de microplastiques dans les océans.⁶⁸ Ils sont divisés en deux catégories selon leur taille initiale.

- **Les microplastiques primaires** correspondent aux plastiques produits volontairement sous forme micronique. Il peut s'agir, par exemple, de billes de gommage dans des produits cosmétiques⁶⁹ (aujourd'hui interdits) ou de charges dans des peintures.
- **Les microplastiques secondaires**, quant à eux, correspondent au fractionnement d'objets en plastique initialement de taille macroscopique. Par exemple, jusqu'à 1 500 000 particules peuvent être formées par kilogramme de linge au cours d'un cycle de lavage.⁷⁰ Les microfibrilles plastiques vont alors être évacuées et rejoindre le réseau des eaux usées. Celles de petites tailles

ne seront pas collectées par les différents systèmes de filtration et se trouveront alors dans les boues d'épuration, épandues dans les champs.⁴ Les pluies les entraîneront alors dans les mers et les océans. Par leur érosion les pneus sont également une source importante de microplastiques secondaires. Un pneu usé peut peser deux kilogrammes de moins qu'un pneu neuf.⁷

Enfin, des macroplastiques peuvent rejoindre les océans et devenir des microplastiques en réponse aux contraintes qu'ils subissent : réactions de photodégradation induites par les UV (Figure 1.8), réactions thermiques, hydrolyse des polymères ou encore dégradation par des microorganismes.⁷¹ Ces altérations chimiques fragilisent les matériaux et peuvent mener à des modifications physiques comme la fissuration puis la fragmentation.⁷² Les macroplastiques deviennent alors des microplastiques voire des nanoplastiques.

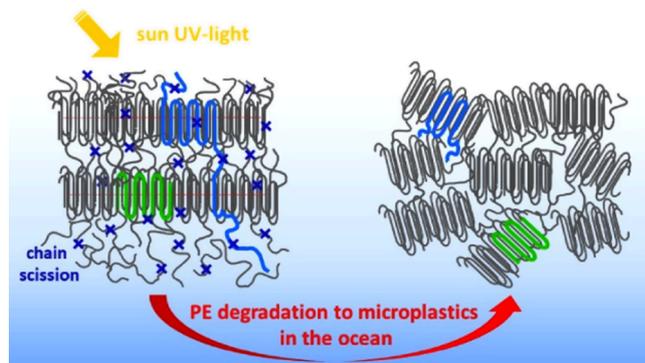


Figure 1.8. Exemple de mécanisme de fragmentation de polyéthylène (PE) semi-cristallin en microplastique par ruptures de chaînes (croix bleues) suite à une exposition à des conditions environnementales.⁷³

Généralement, les problèmes toxicologiques sont accrus lorsque la taille des objets décroît. C'est le cas de nombreux matériaux qui sont inertes à l'état macroscopique et toxiques sous forme de solides divisés, notamment certaines nanoparticules.^{74,75} Cela est dû au fait que plus les objets sont petits, plus leur surface spécifique et donc leur réactivité augmentent. Par ailleurs, ils peuvent être transportés dans les organismes, traverser les membranes et s'accumuler. Des études toxicologiques ont montré tout le potentiel de risques que constituent les microplastiques.^{76,77}

1.2. MECANISMES D'INTERACTIONS

1.2.1. Focus sur une famille de biomolécules : les protéines

Nous avons observé dans la première partie de ce chapitre que les applications des matériaux plastiques dans le domaine du vivant sont nombreuses et que toutes les familles de biomolécules sont amenées à les rencontrer. Les systèmes biologiques sont très complexes, nous avons donc choisi de nous concentrer sur une famille de biomolécules afin de comprendre la nature et les impacts de leurs interactions avec des matériaux plastiques.

Depuis le début du XXème siècle, il est connu que les protéines interagissent avec des surfaces.⁷⁸ Les nanosciences ont complètement renouvelé notre vision puisqu'il a été identifié que, lorsque des nanoparticules entrent dans un milieu biologique, elles sont rapidement recouvertes de biomolécules, formant la corona.⁷⁹ Il est communément admis que les composants majoritaires de cette couronne sont des protéines adsorbées à la surface des particules.⁸⁰⁻⁸² La notion de corona protéique est récente mais la recherche est conséquente dans ce domaine, notamment pour des applications médicales ou des études toxicologiques.⁸³

D'autre part, les protéines sont des molécules dont l'activité dépend de la structure. Certaines sont fragiles et le fait qu'elles soient dans un état adsorbé ou agrégé peut avoir des conséquences importantes pour l'organisme.^{42,84,85} Les conséquences peuvent également être économiques pour les biothérapies.

La propension des protéines à l'adsorption, leur fragilité et leur utilisation de plus en plus importante dans le domaine médical nous ont conduit à les sélectionner comme famille de biomolécules d'intérêt dans le cadre de ce travail.

Les matériaux plastiques et les protéines peuvent avoir des effets réciproques suite à leurs interactions. Nous considérerons tout d'abord les effets que les plastiques peuvent avoir sur les protéines. Dans un second temps, nous présenterons les effets, souvent moins pris en compte, des protéines sur les plastiques,

1.2.2. Effets des plastiques sur les protéines

Pour la fabrication de biothérapies à base de protéines ou au laboratoire, nous avons montré que les matériaux plastiques sont couramment utilisés et qu'ils peuvent mener à des pertes de biomolécules en solution et notamment de protéines. Cette partie présente un état de l'art des mécanismes liés à la perte des protéines suite à un contact avec des surfaces plastiques.

1.2.2.1. Effets des interfaces sur l'agrégation des protéines

Les facteurs physiques et chimiques déterminant la stabilité des protéines en solution ou déclenchant leur agrégation ont longtemps été le sujet de recherches dans les domaines pharmaceutique et biochimique.

Les agrégats peuvent résulter de l'association physique de protéines, principalement par interactions électrostatiques. Dans ce cas, elles conservent leur état natif, sans modification de structure et donc sans conséquence majeure sur leur activité.⁸⁶ Par ailleurs, ces agrégats physiques peuvent être dissociés dans certaines conditions. Il a été montré que la formation de gels de protéines turbides peut s'initier en variant la force ionique (écranage des interactions électrostatiques) ou le pH (changements des densités de charges des protéines et écranage) avec des structures de gels différentes et contrôlables allant de particules de protéines agrégées (particulate gels) à des gels de protéines débobinées et enchevêtrées (finely stranded gels).⁸⁷ Dans ce dernier cas, les modifications sont chimiques et les protéines sont agrégées de manière irréversible, dans un état dénaturé. La dénaturation consiste en une perte de structure des protéines, qui passent d'un état natif et ordonné à un état dénaturé et désordonné. Il s'agit d'un réarrangement des liaisons hydrogènes, sans modifications des liaisons covalentes.⁸⁸ Les clusters hydrophobes des protéines, initialement dans leur structure interne, sont davantage exposés à la solution aqueuse. Elles sont alors plus sujettes à s'assembler, par interactions hydrophobes, pour former des agrégats.^{89,90} Les acides aminés ayant une chaîne hydrophobe sont les suivants : alanine, valine, isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine, tyrosine, tryptophane. Les protéines peuvent se dénaturer une fois qu'elles sont associées mais la dénaturation est également une étape pouvant mener à l'agrégation (Figure 1.9).

Les agrégats physiques sont généralement solubles, tout comme les agrégats de protéines partiellement dénaturées. En revanche, des agrégats insolubles sont formés lorsque les protéines ont un fort degré d'agrégation, associé à une perte de structure. Ces agrégats sont compacts par l'action de nombreuses interactions hydrophobes, excluant l'eau de leur structure, une séparation de phase est observée.^{91,92}

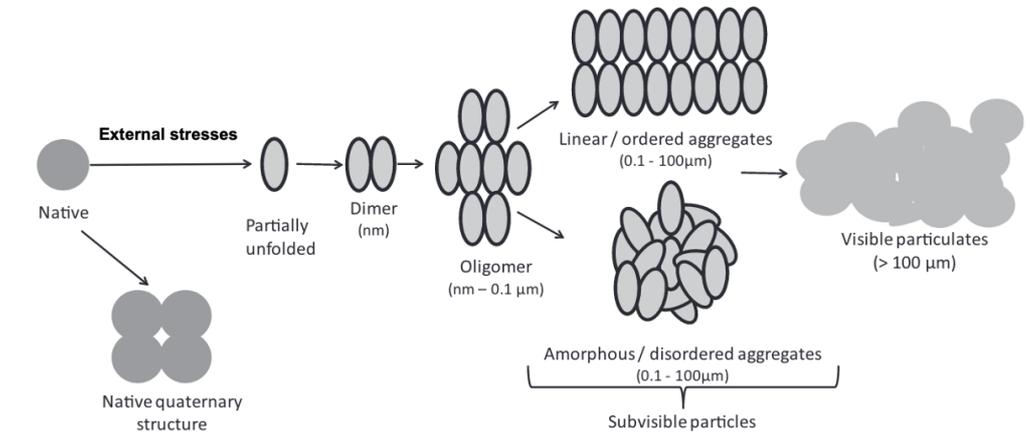


Figure 1.9. Représentation schématique des étapes menant à l'agrégation de protéines (adapté de ⁹³)

Les stress externes, identifiés comme à l'origine de l'agrégation des protéines (en les dénaturant ou en modifiant les interactions protéine/protéine), peuvent être les suivants :^{41,42,86,94,95}

- **La température.** D'un point de vue thermodynamique, la dénaturation peut être considérée comme le résultat d'un transfert suffisant d'énergie à une protéine native. La barrière énergétique à franchir détermine la température de dénaturation des protéines, elle dépend de leur stabilité conformationnelle.⁸⁸
- **La composition de la solution.**^{96,97} Le pH de la solution régit la distribution des charges au sein d'une protéine. Par exemple, si le pH correspond au point isoélectrique (pI) d'une protéine, sa charge globale est nulle. En fonction de la répartition des charges, les interactions protéine/protéine sont différentes. Par ailleurs, selon la force ionique de la solution, des ions peuvent venir écranter les charges des protéines, modifiant ici encore les interactions possibles entre protéines. D'autres composés peuvent également être présents dans la solution et avoir une action sur les protéines.
- **La concentration en protéines.** Différents comportements ont été observés quant à l'effet d'une augmentation de concentration :⁸⁶ i) cela peut mener à une augmentation de l'agrégation causée par une probabilité de rencontre plus élevée ; ii) cela peut mener à des conformations protéiques plus denses et donc plus stables, ayant pour conséquence la diminution de l'agrégation.
- **Les forces.** Lors du mélange des solutions, des contraintes peuvent être appliquées sur les protéines. Le cisaillement induit des déformations menant à la dénaturation.⁴² Les protéines sont généralement résistantes à la pression mais finissent par être dénaturées à des pressions de l'ordre de la centaine de MPa.⁸⁶

La résistance des protéines à ces stress dépend très fortement de leur nature. Leur point isoélectrique et leur structure ont des rôles prédominants dans leur stabilité, donc dans leur réponse aux stress.³³ Par ailleurs, ces stress sont rarement isolés mais plus souvent combinés et leurs effets sont synergiques. Par exemple, des variations de pH peuvent modifier la température de dénaturation d'une protéine.⁹⁵ Des méthodes prédictives sont à l'étude dans le but d'anticiper

l'agrégation des protéines mais le nombre de paramètres à contrôler ainsi que leur synergie rend l'analyse des mécanismes très complexe.⁹⁸ La figure 1.10 résume les principaux éléments impactant l'état d'agrégation des protéines en solution.

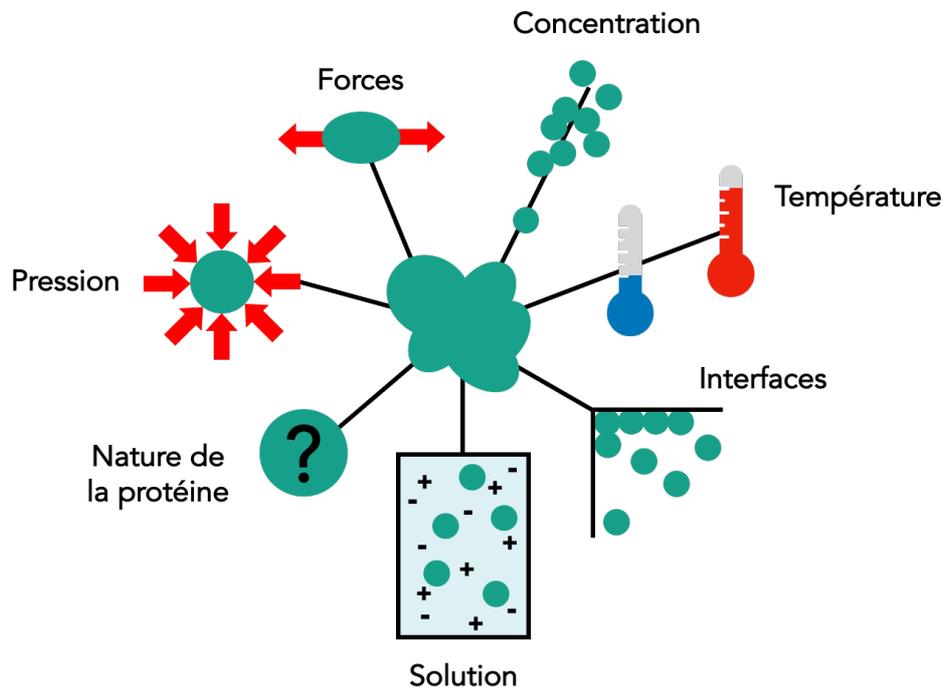


Figure 1.10. Schéma représentatif des principaux éléments ayant un impact sur l'agrégation des protéines en solution.

Si de nombreux mécanismes sont maintenant compris, l'effet des **interfaces** et plus particulièrement des **matériaux** sur la stabilité des protéines au cours des procédés biothérapeutiques a été beaucoup moins étudié. Cela s'explique par le fait qu'il a longtemps été considéré que les interactions entre les protéines et le matériau résultait uniquement en la passivation des surfaces, n'affectant pas les protéines en solution. Dans les années 1970, Léo Vroman a démontré l'existence d'effets dynamiques des protéines aux interfaces liquide/solide, dépendant de la concentration et de l'affinité pour la surface.^{99,100} Ce modèle peut maintenant être complété par une dénaturation partielle de protéines après une interaction faible avec la surface et une libération en solution.¹⁰¹ Aux interfaces, les protéines exposent leurs parties hydrophobes pour maximiser le contact avec la surface, induisant une modification de leur structure. Puisque la dénaturation est une étape vers l'agrégation, il s'agit d'un premier pas vers la compréhension des effets des interfaces sur l'agrégation des protéines.

De récentes études ont démontré que les effets déstabilisants des interfaces sur les protéines sont plus complexes qu'il n'y paraît et qu'ils peuvent être accrus lors du mélange des échantillons car ces **interfaces** sont **dynamiques**. Des effets synergiques du flux et des surfaces solides sur l'agrégation de protéines ont par exemple été décrits.^{36,102} Il a été mis en avant que des surfaces polymériques hydrophobes (nanoparticules de PMMA en présence de tensioactif) sont particulièrement efficaces pour initier l'agrégation de l'insuline et la formation de nombreuses

fibres amyloïdes par rapport à des particules hydrophiles. Cependant, il n'existe pas d'étude comparant les effets de différentes surfaces plastiques hydrophobes.

D'autres études ont souligné le rôle déstabilisant d'une interface air/liquide mobile par des expériences avec des bulles d'air menant à des agrégats de protéines dénaturées¹⁰³ ou conservant leur structure.¹⁰⁴ Certaines études ont également soulevé le rôle majeur de la ligne triple de contact (interface air/liquide/solide) en mouvement.^{65,105,106}

Ces observations suggèrent que les **interfaces air/liquide et solide/liquide** ainsi que **l'agitation** sont des paramètres à considérer et à contrôler lors de la production d'une biothérapie avec une nouvelle protéine, un changement de procédé ou de matériau. Cependant, il n'existe pas à ce jour de description mécanistique pouvant expliquer les processus impliqués ni les liens entre les différentes interfaces et l'agitation. Par ailleurs, la plupart des études expérimentales ont été conduites avec des protéines purifiées. Elles ne peuvent donc pas prendre en compte le rôle des interactions entre protéines de nature différente ni la possibilité d'association et de dissociation de complexes protéiques aux interfaces¹⁰⁷ ou encore, les différences de sensibilité aux stress imposés.

1.2.2.2. Effets des interfaces et de l'adsorption des protéines

L'adsorption de protéines à l'interface liquide/solide a été largement étudiée puisqu'elle intervient spontanément dans la plupart des situations où des protéines sont en solution, à proximité de surfaces solides.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Les phénomènes biologiques et physico-chimiques intervenant dans les mécanismes d'adsorption sont complexes et dépendent de la nature des protéines, de la surface et de la solution.¹⁰⁹

Les protéines sont des polymères biologiques (constitués d'acides aminés). Leur adsorption sur des surfaces peut donc être comparée à celle des polymères classiques. En effet, il s'agit d'interactions entre une surface et différents points d'ancrage sur une macromolécule (Figure 1.11). Le phénomène de désorption est alors complexe et rarement observé puisqu'il nécessite que toutes les interactions soient rompues.¹¹¹



Figure 1.11. Représentation schématique d'un polymère adsorbé sur une surface par différents points d'ancrage.¹¹⁰

Une technique courante pour quantifier l'adsorption de protéines est la méthode par déplétion.^{112,113} La concentration est mesurée avant et après contact avec une surface et la différence est attribuée à la quantité adsorbée. Connaissant la surface solide disponible, il est possible de déterminer la quantité de protéines adsorbées par unité de surface. Cette grandeur peut être tracée en fonction de la concentration en protéines libres : il s'agit d'un isotherme d'adsorption. Bien qu'initialement développé pour l'adsorption de gaz, le modèle de Langmuir¹¹⁴ est rapidement adopté pour caractériser l'adsorption de protéines.^{78,115}

Différents paramètres sont connus pour agir sur l'adsorption des protéines aux interfaces liquide/solide :

- **La concentration en protéines.** La figure 1.12 représente un isotherme d'adsorption pour une protéine purifiée (et non pour un mélange de protéines), avec l'atteinte d'un plateau aux fortes concentrations, indiquant une saturation de la surface. Les protéines ont un comportement différent selon la position sur l'isotherme : elles s'étalent aux faibles concentrations puisqu'il y a davantage d'espace disponible alors qu'elles conservent leur structure, voire se compriment, aux fortes concentrations.

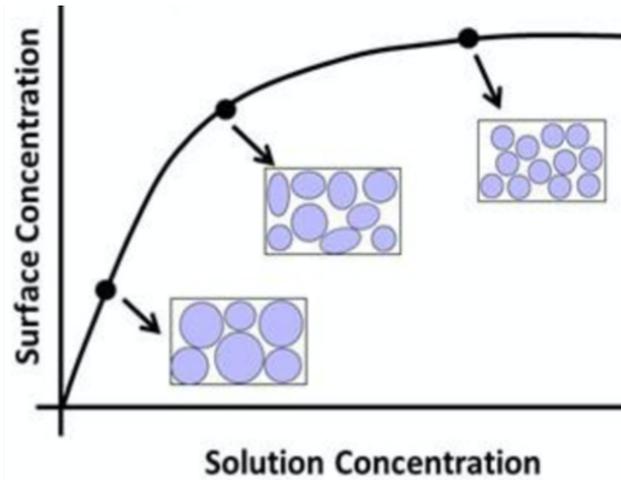


Figure 1.12. Représentation schématique d'un isotherme d'adsorption. La quantité de protéines adsorbée par unité de surface solide est représentée en fonction de la concentration en protéines en solution. Les protéines constituant une monocouche s'organisent en fonction de la quantité adsorbée.¹⁰⁹

- **La nature de la protéine**, selon la classification de Norde, est déterminante dans les phénomènes d'adsorption.¹¹⁰ Les protéines « molles » subissent une perte de leur structure secondaire lors de l'adsorption. Ce réarrangement est favorable thermodynamiquement, ce qui explique qu'elles s'adsorbent sur la quasi-totalité des surfaces. Les protéines « dures » au contraire, n'ont pas cette capacité à se déstructurer, elles vont donc « rebondir » au contact de surfaces avec lesquelles elles n'ont pas d'interactions fortes (Figure 1.13).

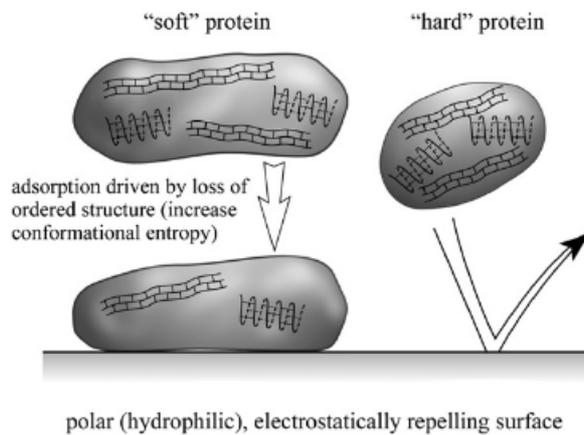


Figure 1.13. La perte de leur structure secondaires (hélice α ou feuillets β) peut conduire les protéines à s'adsorber sur des surfaces hydrophiles et électrostatiquement repoussantes.¹¹⁰

- **L'état de la protéine.** Comme expliqué précédemment, lorsque les protéines sont dénaturées, leurs parties hydrophobes sont plus exposées au solvant.^{116,117} De nouvelles interactions deviennent alors possibles : interactions protéine/protéine mais également interactions protéine/surface.

- **La nature de la surface.** La plupart des protéines s'adsorbent sur des surfaces, qu'elles soient hydrophiles ou hydrophobes.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Toutefois, encore d'après Norde, une surface hydrophobe serait plus favorable à l'adsorption car mène à un état plus stable thermodynamiquement. Tout comme lors de leur dénaturation, à proximité d'une surface apolaire, les protéines remplacent des molécules d'eau et se réarrangent pour favoriser les interactions entre leurs groupements hydrophobes et la surface (Figure 1.14). Pour ces raisons, l'étalement des protéines sur des surfaces hydrophobes est nettement plus efficace et rapide que sur des surfaces hydrophiles. Par microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRFM), il a été montré que le fibrogène s'étale sur une surface trois fois plus importante lorsque celle-ci est hydrophobe et que l'équilibre est atteint presque quatre fois plus rapidement.¹¹⁸

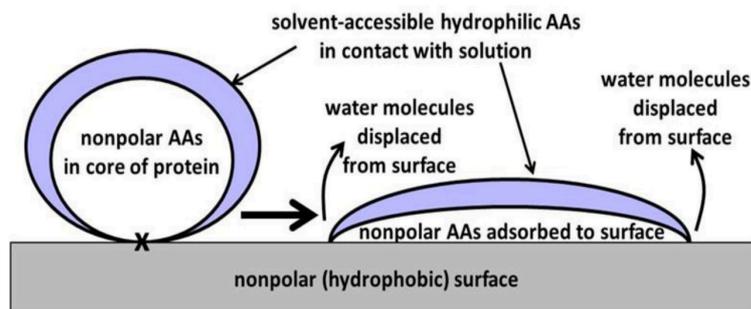


Figure 1.14. Représentation schématique de l'adsorption d'une protéine sur une surface hydrophobe dans un milieu aqueux.¹⁰⁹

Une spécificité des matériaux plastiques est liée à leurs propriétés de surface car beaucoup d'entre eux sont fortement hydrophobes. Il est donc attendu qu'ils soient particulièrement favorables à l'adsorption. Expérimentalement, les tendances observées correspondent bien à celles attendues puisque les quantités de protéines adsorbées augmentent généralement avec l'hydrophobie du matériau analysé.^{58,119,120} Au sein d'une série de matériaux plastiques, les plus hydrophobes peuvent fixer jusqu'à six fois plus de protéines.¹²⁰ Ainsi, sur du Téflon, l'immunoglobuline G peut être adsorbée à hauteur de 6 mg.m^{-2} alors que sur du Nylon-6,6, moins hydrophobe, il ne peut se fixer qu'environ 1 mg.m^{-2} . Par ailleurs, les protéines se fixant préférentiellement sur ces matériaux hydrophobes sont elles-mêmes les plus hydrophobes : sur le Téflon, le fibrogène peut atteindre 12 mg.m^{-2} . Sur des particules de silice hydrophiles les quantités de protéines adsorbées sont généralement inférieures. Elles sont par exemple comprises entre $0,5$ et 4 mg.m^{-2} pour le lysozyme¹²¹ ou un extrait protéique de levure.¹²² Il s'agit également d'une conclusion obtenue par Andrade et al., indiquant que l'adsorption la plus forte a lieu lorsque les protéines s'adsorbent sur des polymères hydrophobes via leur parties hydrophobes, plutôt que via des acides aminés hydrophiles ou chargés.¹²³ Au-delà des quantités de protéines adsorbées, les constantes d'affinité évoluent également avec l'hydrophobie des matériaux polymériques : l'immunoglobuline G a une constante d'affinité qui est multipliée par 5 pour un matériau dont la tension de surface est divisée par 1,5.⁵⁸

Cependant, tout comme pour l'agrégation, les études d'adsorption de protéines sur des plastiques portent généralement sur des protéines purifiées. Elles présentent l'avantage de permettre un suivi avec précision et la compréhension des mécanismes. En milieu biologique, les protéines sont rarement isolées mais plutôt dans un mélange complexe. Des phénomènes de compétition interviennent alors, se caractérisant par une dynamique dans l'adsorption : des protéines sont adsorbées, puis remplacées par d'autres (effet Vroman décrit dans le paragraphe précédent).⁹⁹ Sur des nanoparticules, la « hard corona » est caractérisée par des temps d'échange longs : les protéines restent adsorbées sur les nanoparticules car les interactions sont fortes. A l'inverse, la « soft corona » est caractérisée par des temps d'échange courts : les protéines s'adsorbent et se désorbent rapidement car les interactions sont plus faibles (Figure 1.15).^{124,125} Un équilibre est atteint lorsque les protéines les plus affines recouvrent la surface. La corona protéique a été étudiée dans le cas de protéines modèles, de mélanges de protéines issues du plasma sanguin et dans le cas de mélanges plus complexes.^{79,126-128} Les nanoparticules les plus étudiées sont celles de silice mais les polymères et plus particulièrement le polystyrène sont également fréquemment considérés.¹²⁹

Les extraits protéiques complexes permettent la mise en compétition des protéines et ainsi l'identification, par analyse protéomique, des déterminants structuraux et physico-chimiques à l'origine de l'adsorption.¹²² Cela n'a pas encore été effectué dans le cas microplastiques.

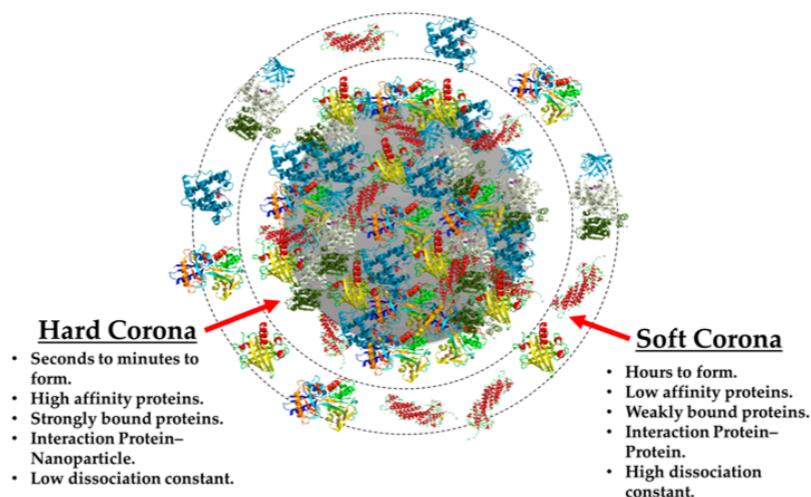


Figure 1.15. Comparaison schématique des principales différences entre la « hard » et la « soft » corona.¹²⁵

1.2.3. Effet des protéines sur les plastiques

Une fois entrés dans un milieu aqueux, les microplastiques, qu'ils soient d'origine primaire ou secondaire, vont subir de multiples agressions pouvant modifier leur chimie et leurs propriétés physiques. Leur devenir dans l'environnement est conditionné par leur vieillissement mais également par leur comportement colloïdal, c'est-à-dire, leur tendance à crêmer, sédimenter, s'agréger ou au contraire se disperser dans le milieu. Les biomolécules et en particulier les protéines jouent un rôle à la fois dans leur processus de vieillissement et dans la modification de leur comportement colloïdal.

1.2.3.1. Vieillissement des plastiques

De nombreux microorganismes ont été identifiés comme dégradant les matériaux plastiques suite à leur adsorption et à leur colonisation.¹³⁰⁻¹³³ La dégradation se fait généralement par hydrolyse, opérée par des enzymes produites par les microorganismes au contact des particules. Les principales enzymes identifiées comme efficaces sont les estérases, cutinases, lipases et PETases.^{132,134} Certaines enzymes sont particulièrement efficaces dans le processus de conversion des plastiques et peuvent, en quelques heures ou quelques jours, initier une dégradation importante.¹³⁴ Pour augmenter encore l'efficacité, différentes voies sont considérées, dont l'augmentation de l'hydrophobie à proximité du site actif de l'enzyme pour améliorer l'ancrage sur les plastiques hydrophobes¹³⁵ (Figure 1.16).

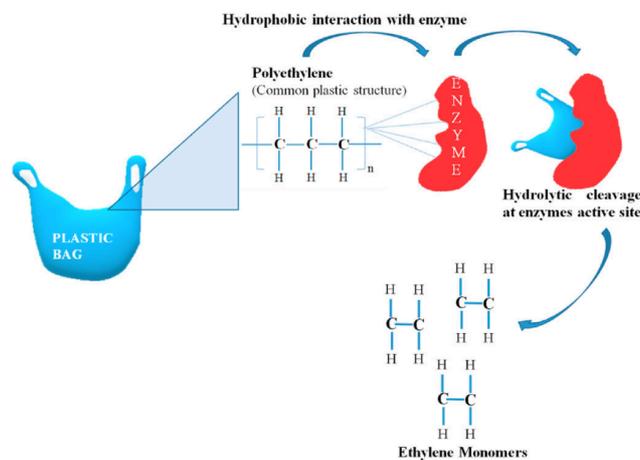


Figure 1.16. Mécanisme de dégradation enzymatique des plastiques.¹³⁴

La recherche est de plus en plus active dans ce domaine et les industriels misent également sur cette technologie pour le traitement des déchets. L'entreprise Carbios a lancé en 2021 une usine pilote pour traiter jusqu'à 40 000 tonnes de PET par an.¹³⁶ Une autre voie, également exploitée par l'entreprise est l'introduction d'enzymes lors du procédé de production de matériaux en PLA, les rendant biodégradable et compostable en compost domestique.

En milieu naturel cependant, les conditions sont généralement moins favorables et les plastiques peuvent alors rester des décennies dans l'environnement malgré une colonisation par des microorganismes.¹³⁷ Sur ces surfaces, les biomolécules sont en compétition, il est possible que les

enzymes efficaces pour la biodégradation ne soient pas les molécules les plus affines pour les plastiques ou encore que leur adsorption engendre une modification structurale les rendant inefficaces. Ces questions ne sont pas abordées dans la littérature. Les polyoléfines telles que le polyéthylène (PE) et le polypropylène (PP), ne se dégradent que très peu dans l'environnement.^{138,139} Ce sont également les plastiques les plus produits, ils constituent donc la principale source de pollution des océans.^{4,140}

1.2.3.2. Transport des microplastiques (MP)

L'éco-corona

D'après de récentes études, plus de 90% des MP en environnement aquatique seraient localisés dans les sédiments.^{141,142} Cela est contre intuitif au vu de la nature hydrophobe et peu dense des microplastiques de PE et PP, constituants majoritaires de la pollution des microplastiques. Cela peut s'expliquer par la formation d'une éco-corona à la surface des microplastiques. Il s'agit d'un biofilm formé par des microorganismes, ou par des biomolécules si les plastiques ont été ingérés ou en contact avec des organismes vivants. La création d'une biointerface sur une particule va lui apporter une identité biologique, modifiant alors son devenir dans l'environnement mais également au sein des organismes vivants.^{81,143} Ainsi, les propriétés de mouillage des particules sont modifiées, en général suite à une diminution des énergies interfaciales (Figure 1.17, paragraphe A.1.2.1). Cela permet alors aux microplastiques hydrophobes de passer en solution plutôt que de rester en surface, à l'interface air/liquide.^{144,145}

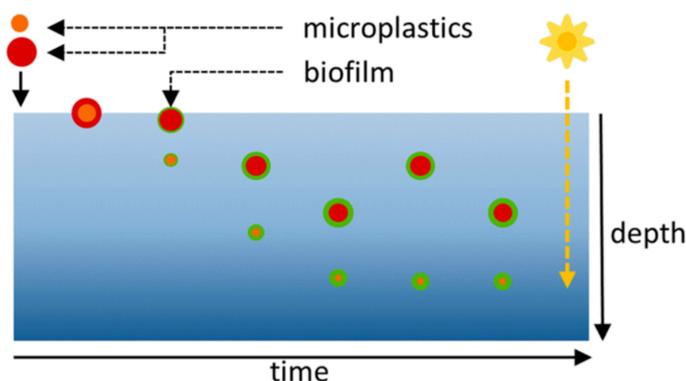


Figure 1.17. Représentation schématique de l'effet d'un biofilm sur le transport vertical des microplastiques.¹⁴⁴

Cependant, il a été observé que la présence d'une éco-corona ne permet pas toujours le passage en solution et que sa composition joue un rôle prédominant dans le comportement colloïdal des MP. La production de biosurfactants est nécessaire pour diminuer les énergies de surface et permettre l'entrée des particules dans la solution (Figure 1.18).¹⁴⁶

La densité des MP est également clef dans leur transport vertical. Il est souvent observé que le biofilm, en apportant de la matière, augmente la densité des objets en solution.^{146,147} L'effet dépend également de la taille des particules : lorsque celles-ci sont de taille importante (de l'ordre du millimètre), un biofilm microscopique ne suffit pas à modifier significativement la densité des

MP. Pour ce type de particules, il est nécessaire que des macro-organismes s'attachent pour observer un passage en solution.¹⁴⁷

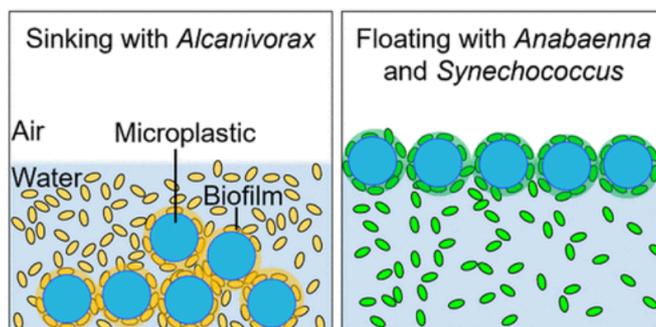


Figure 1.18. Représentation schématique du comportement de microplastiques en fonction de la nature du biofilm.¹⁴⁶

Les effets de biofilms sur le comportement colloïdal de différents types de particules de plastique ont été étudiés (polystyrène, polyoléfines, dont du PE et du PP), à la fois expérimentalement et par simulation. L'impact de certaines caractéristiques des particules a été mis en lumière, par exemple leur morphologie,¹⁴⁵ leurs fonctions de surface,¹⁴⁸ ou encore leur densité.¹⁴⁷ Ces études apportent une base de connaissances mais elles portent généralement soit sur des nanoplastiques, soit sur de grands microplastiques (diamètre supérieur à 20 μm). Peu d'études portent sur des plastiques de taille intermédiaire (entre 1 et 20 μm).

Un cas particulier de l'éco-corona : la corona protéique

La corona protéique est un cas particulier de l'éco-corona. Les concepts connus portant sur la corona dans le domaine des nanosciences peuvent être appliqués dans le cas des microplastiques en milieu biologique afin de mieux comprendre les phénomènes d'adsorption, de transport et de toxicité de ces particules.¹⁴⁹

Des recherches récentes rapportent des effets de l'adsorption de protéines sur le comportement colloïdal de nanoplastique.¹⁵⁰⁻¹⁵³ Quelques protéines purifiées ont été étudiées : albumine de sérum (bovin et humain), lysozyme et papain. Deux cas distincts ont été observés : les protéines peuvent assurer la stabilité de particules en suspension ou au contraire, initier leur agrégation par l'apport de charges, écrantant celles des particules. Différentes tailles de particules ont été comparées, toutefois, le cas des nanoplastiques de polystyrène est exclusivement traité. Cela s'explique par le fait que ces particules peuvent être fonctionnalisées en surface, ce qui permet de les disperser et de les étudier en solution aqueuse. Malgré leur présence majoritaire dans l'environnement, le comportement colloïdal des MP de PE et de PP, en présence de protéines, n'a pas été étudié principalement parce que ces MP hydrophobes se dispersent mal dans l'eau.

La non maîtrise du comportement colloïdal de ces MP explique également pourquoi ils sont exclus des études de toxicité *in vivo*. Ces études se concentrent sur du polystyrène fonctionnalisé¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ ou introduisent des tensioactifs pour permettre leur passage en solution aqueuse.¹⁵⁷ Cependant, les tensioactifs modifient la chimie de surface des particules et peuvent biaiser les résultats.

1.3. OBJECTIFS DE LA THESE

Devant le problème écologique majeur relevant de la pollution plastique, de plus en plus d'études se focalisent sur leurs effets au cours d'une utilisation « normale » et sur leur devenir en environnement biologique. Cependant, de nombreuses inconnues persistent.

Nous avons souhaité, à travers ce travail de thèse, répondre aux questions suivantes :

- Quelles protéines interagissent avec les plastiques ? Quelle est leur nature ? Quelles sont leurs propriétés physico-chimiques ? Interagissent-elles toutes de la même façon ou y a-t-il différents types d'interactions ?

A l'issue de ces interactions :

- Quels sont les effets des plastiques sur les protéines ? Est-ce que ces surfaces sont particulièrement déstabilisantes ? Les protéines sont-elles dans un état agrégé ? Dans un état adsorbé ? Le cas échéant, sont-elles réparties de manière homogène sur les surfaces ?
- Quels sont les effets des protéines sur le comportement colloïdal de microplastiques ?

Si certains de ces éléments sont connus, ils le sont généralement pour des protéines purifiées et non pour des systèmes plus complexes. Cela ne permet donc pas d'identifier les paramètres physico-chimiques des protéines intervenant dans les interactions ni de considérer les phénomènes de compétition. Pour cette raison, nous avons choisi de travailler avec un extrait protéique de levure (*Saccharomyces cerevisiae*), contenant un grand nombre de protéines, environ 6000, et constituant un système de référence bien connu dans l'équipe.

Pour répondre à la première série de questions, et partant du constat que peu d'éléments sont compris sur les MP de PE et de PP ayant des tailles inférieures à 20 μm , nous nous sommes en premier lieu focalisés sur leur étude. Au cours de ces expériences, les MP ont été introduits dans des solutions de protéines dans des tubes en plastique et ont été agités. Une référence sans particules a systématiquement été réalisée. Cela nous a permis d'observer que, dans nos conditions d'études, une partie importante des protéines étaient perdues lors de l'agitation, avant même l'introduction des particules. Cette observation a donné lieu à une étude systématique, présentée dans le **chapitre 3**, visant à comprendre les mécanismes de déstabilisation des protéines en solution, au contact de surfaces plastiques et sous agitation. Un article relatif à ce travail a été publié dans la revue Scientific Reports en janvier 2023 (« A proteome scale study reveals how plastic surfaces and agitation promote protein aggregation »).¹⁵⁸ L'étude des MP est exposée dans le **chapitre 4**. Les analyses des interactions des protéines avec les MP ont été réalisées de manière systématique à partir de PE et de PP, dans leur état natif mais également

dans un état vieilli pour rendre compte des effets des modifications chimiques et structurelles des plastiques.

Pour répondre à la dernière question, le **chapitre 5** présente une étude du comportement colloïdal des MP avec une corona protéique en solution aqueuse. A partir du comportement des MP de PE et PP natifs et vieillis, des paramètres physico-chimiques régissant le transport des particules ont été identifiés. Un article relatif à ces travaux est en cours de révision pour publication dans la revue Langmuir (« The role of the protein corona in the colloidal behavior of microplastics »). Nous avons alors pu mettre à profit les propriétés interfaciales de la corona protéique pour disperser et étudier ces particules fortement hydrophobes en solution aqueuse. Quelques applications envisageables grâce au contrôle des particules en solution ou en dehors sont également présentées à la fin du chapitre 5.

1.4. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Règlement (UE) no 10/2011 de la Commission du 14 janvier 2011 concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires, 2011.
- (2) Douminge, L. Etude du comportement du polyéthylène haute densité sous irradiation ultraviolette ou sollicitation mécanique par spectroscopie de fluorescence, Université de La Rochelle, 2010.
- (3) Meikle, J. L. *American Plastic: A Cultural History*; Rutgers University Press, 1997.
- (4) Fuhr, L.; Franklin, M. *Atlas Du Plastique. Faits et Chiffres Sur Le Monde Des Polymères Synthétiques.*; La Heinrich-Böll-Stiftung, La Fabrique Écologique, Break Free From Plastic, 2020.
- (5) Luft, M. G. Artificial Silk - With Special Reference to the Viscose Process. *Ind. Eng. Chem.* 1925, 17 (10), 1037–1042. <https://doi.org/10.1021/ie50190a016>.
- (6) Brosse, J.-C.; Campistron, I.; Derouet, D.; Reyx, D. Le caoutchouc naturel : Chimie d'un hydrocarbure polymère. *Actual. Chim.* 2002, 45–51.
- (7) Bolo, P.; Prévile, A. *Pollution Plastique : Une Bombe à Retardement ?*; 3654 (Assemblée Nationale) et 217 (Sénat); Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. <https://www.senat.fr/rap/r20-217/r20-2171.pdf>.
- (8) Guillemot, M.; Patrascu, C. *Classification Des Matières Plastiques*; Plastiques, risque et analyse thermique; INRS, 2019.
- (9) Voet, D.; Voet, J. *Biochemistry*, 4th edition.; John Wiley & Sons, 2011.
- (10) Gontard, N.; Guillard, V.; Gaucel, S.; Guillaume, C. L'emballage alimentaire et l'innovation écologique dans toutes leurs dimensions. *Innov. Agron.* 2017, No. 58, 1–9. <https://doi.org/10.15454/1.5137830815050605E12>.
- (11) Affiche Publicitaire. Archive de La Société Permalin. (Années 1950).
- (12) Hong, L. G.; Yuhana, N. Y.; Zawawi, E. Z. E. Review of Bioplastics as Food Packaging Materials. *AIMS Mater. Sci.* 2021, 8 (2), 166–184. <https://doi.org/10.3934/matensci.2021012>.
- (13) Han, J. H. *Innovations in Food Packaging*, Elsevier Academic Press.; 2005.
- (14) Marsh, K.; Bugusu, B. Food Packaging: Roles, Materials, and Environmental Issues. *J. Food Sci.* 2007, 72 (3), R39–R55. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x>.
- (15) López-Cervantes, J.; Paseiro-Losada, P. Determination of Bisphenol A in, and Its Migration from, PVC Stretch Film Used for Food Packaging. *Food Addit. Contam.* 2003, 20 (6), 596–606. <https://doi.org/10.1080/0265203031000109495>.
- (16) *Matières*. Tupperware. <https://www.tupperware.fr/fr/matieres/> (accessed 2022-12-06).
- (17) Labeÿ, R. Christophe Colomb, le caoutchouc et les tétines. *Rev. Hist. Pharm.* 1994, 82 (300), 55–63. <https://doi.org/10.3406/pharm.1994.3819>.
- (18) Simonnet, J. L'allaitement artificiel: situation actuelle, mécanismes et conséquences, Université de Lorraine, Faculté d'odontologie de Nancy, 2014.
- (19) *Les Additifs*; Plastiques, risque et analyse thermique; INRS, 2019.
- (20) Hermabessiere, L.; Dehaut, A.; Paul-Pont, I.; Lacroix, C.; Jezequel, R.; Soudant, P.; Duflos, G. Occurrence and Effects of Plastic Additives on Marine Environments and Organisms: A Review. *Chemosphere* 2017, 182. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.096>.
- (21) Koelmans, A. A.; Besseling, E.; Foekema, E. M. Leaching of Plastic Additives to Marine Organisms. *Environ. Pollut.* 2014, 187, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.12.013>.
- (22) Rochester, J. R. Bisphenol A and Human Health: A Review of the Literature. *Reprod. Toxicol.* 2013, 42, 132–155. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.008>.

- (23) Ross, P. S.; Couillard, C. M.; Ikonou, M.; Johannessen, S.; Macdonald, R.; Tomy, G. *Les Polybromodiphényléthers (PBDE) Dans Le Milieu Marin Canadien : Un Risque Émergent Pour La Santé Des Poissons, Des Mammifères Marins et Pour Leur Habitat*; 2008/036; Secrétariat canadien de consultation scientifique, 2008. <http://www.dfo-mpo.gc.ca/csas/2008>.
- (24) Grassberger, M.; Sherman, R. A.; Gileva, O. S.; Kim, C. M. H.; Mumcuoglu, K. Y. *Biotherapy: History, Principles and Practice - A Practical Guide to the Diagnosis and Treatment of Disease Using Living Organisms*, Springer.; 2013.
- (25) Teillaud, J.-L. Qu'est-ce qu'une biothérapie ? L'exemple des anticorps monoclonaux. *Presse Médicale* 2009, 38 (5), 825–831. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2008.12.025>.
- (26) Wang, W. Oral Protein Drug Delivery. *J. Drug Target.* 1996, 4 (4), 195–232. <https://doi.org/10.3109/10611869608995624>.
- (27) Arnaud, L.; Haroche, J.; Piette, J.-C.; Amoura, Z. Les biothérapies immunomodulatrices du futur : quelles perspectives ? *Presse Médicale* 2009, 38 (5), 749–760. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2008.12.023>.
- (28) Ecker, D. M.; Jones, S. D.; Levine, H. L. The Therapeutic Monoclonal Antibody Market. *mAbs* 2015, 7 (1), 9–14. <https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989042>.
- (29) Scheen, A. J.; Moutschen, M. Les anticorps monoclonaux en thérapeutique. *Rev Med Liège* 2009, 64.
- (30) Shukla, A. A.; Thömmes, J. Recent Advances in Large-Scale Production of Monoclonal Antibodies and Related Proteins. *Trends Biotechnol.* 2010, 28 (5), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.02.001>.
- (31) Shukla, A. A.; Gottschalk, U. Single-Use Disposable Technologies for Biopharmaceutical Manufacturing. *Trends Biotechnol.* 2013, 31 (3), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.10.004>.
- (32) Wang, W.; Ohtake, S. Science and Art of Protein Formulation Development. *Int. J. Pharm.* 2019, 568, 118505. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118505>.
- (33) Duerkop, M.; Berger, E.; Dürauer, A.; Jungbauer, A. Impact of Cavitation, High Shear Stress and Air/Liquid Interfaces on Protein Aggregation. *Biotechnol. J.* 2018, 13 (7), 1800062. <https://doi.org/10.1002/biot.201800062>.
- (34) Kopp, M. R. G.; Wolf Pérez, A.-M.; Zucca, M. V.; Capasso Palmiero, U.; Friedrichsen, B.; Lorenzen, N.; Arosio, P. An Accelerated Surface-Mediated Stress Assay of Antibody Instability for Developability Studies. *mAbs* 2020, 12 (1), 1815995. <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1815995>.
- (35) Sieberz, J.; Wohlgemuth, K.; Schembecker, G. The Influence of Impurity Proteins on the Precipitation of a Monoclonal Antibody with an Anionic Polyelectrolyte. *Sep. Purif. Technol.* 2015, 146, 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.03.055>.
- (36) Grigolato, F.; Arosio, P. Synergistic Effects of Flow and Interfaces on Antibody Aggregation. *Biotechnol. Bioeng.* 2020, 117 (2), 417–428. <https://doi.org/10.1002/bit.27212>.
- (37) Bai, G.; Bee, J. S.; Biddlecombe, J. G.; Chen, Q.; Leach, W. T. Computational Fluid Dynamics (CFD) Insights into Agitation Stress Methods in Biopharmaceutical Development. *Int. J. Pharm.* 2012, 423 (2), 264–280. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.11.044>.
- (38) Wang, W. Advanced Protein Formulations: Protein Formulations. *Protein Sci.* 2015, 24 (7), 1031–1039. <https://doi.org/10.1002/pro.2684>.
- (39) Frokjaer, S.; Otzen, D. E. Protein Drug Stability: A Formulation Challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005, 4 (4), 298–306. <https://doi.org/10.1038/nrd1695>.
- (40) den Engelsman, J.; Garidel, P.; Smulders, R.; Koll, H.; Smith, B.; Bassarab, S.; Seidl, A.; Hainzl, O.; Jiskoot, W. Strategies for the Assessment of Protein Aggregates in Pharmaceutical Biotech Product Development. *Pharm. Res.* 2011, 28 (4), 920–933. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0297-1>.
- (41) Lundahl, M. L. E.; Fogli, S.; Colavita, P. E.; Scanlan, E. M. Aggregation of Protein Therapeutics Enhances Their Immunogenicity: Causes and Mitigation Strategies. *RSC Chem. Biol.* 2021, 2 (4), 1004–1020. <https://doi.org/10.1039/D1CB00067E>

- (42) Rajan, R.; Ahmed, S.; Sharma, N.; Kumar, N.; Debas, A.; Matsumura, K. Review of the Current State of Protein Aggregation Inhibition from a Materials Chemistry Perspective: Special Focus on Polymeric Materials. 2021, 39.
- (43) Wen, Y.; Jawa, V. The Impact of Product and Process Related Critical Quality Attributes on Immunogenicity and Adverse Immunological Effects of Biotherapeutics. *J. Pharm. Sci.* 2021, 110 (3), 1025–1041. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.12.003>.
- (44) Jezek, J.; Darton, N. J.; Derham, B. K.; Royle, N.; Simpson, I. Biopharmaceutical Formulations for Pre-Filled Delivery Devices. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2013, 10.
- (45) Rivera, A. M.; Strauss, K. W.; Zundert, A. V.; Mortier, E. The History of Peripheral Intravenous Catheters: How Little Plastic Tubes Revolutionized Medicine. 2005, 13.
- (46) *Conférence de Concensus; Société Européenne des Biomatériaux*: Chester (GB), 1986.
- (47) Richard, C. Corrosion et traitements de surface des biomatériaux. *Tech. Ing.* 2010, 24.
- (48) Shah, R.; Gashi, B.; Hoque, S.; Marian, M.; Rosenkranz, A. Enhancing Mechanical and Biomedical Properties of Protheses - Surface and Material Design. *Surf. Interfaces* 2021, 27, 101498. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2021.101498>.
- (49) Warren, S. M.; Fong, K. D.; Nacamuli, R. P.; Song, H. M.; Fang, T. D.; Longaker, M. T. Biomatériaux de réparation de la peau et de l'os en chirurgie plastique. *EMC - Chir.* 2004, 1 (6), 583–591. <https://doi.org/10.1016/j.emcchi.2004.10.001>.
- (50) *Polymers for Dental and Orthopedic Applications*; Shalaby, S. W., Salz, U., Eds.; Advances in polymeric biomaterials; CRC Press: Boca Raton, 2007.
- (51) Peutzfeldt, A. Resin Composites in Dentistry: The Monomer Systems. *Eur. J. Oral Sci.* 1997, 105 (2), 97–116. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1997.tb00188.x>.
- (52) Senra, M. R.; Marques, M. de F. V. Synthetic Polymeric Materials for Bone Replacement. *J. Compos. Sci.* 2020, 4 (4), 191. <https://doi.org/10.3390/jcs4040191>.
- (53) Chaput, F.; Faure, A.-C. Composites dentaires. *Tech. Ing. - Biomatériaux* 2021. <https://doi.org/10.51257/a-v2-med7500>.
- (54) van der Stelt, M.; Verhulst, A. C.; Vas Nunes, J. H.; Koroma, T. A. R.; Nolet, W. W. E.; Slump, C. H.; Grobusch, M. P.; Maal, T. J. J.; Brouwers, L. Improving Lives in Three Dimensions: The Feasibility of 3D Printing for Creating Personalized Medical Aids in a Rural Area of Sierra Leone. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2020, 102 (4), 905–909. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0359>.
- (55) Spencer, S. R.; Kay Watts, L. Three-Dimensional Printing in Medical and Allied Health Practice: A Literature Review. *J. Med. Imaging Radiat. Sci.* 2020, 51 (3), 489–500. <https://doi.org/10.1016/j.jmir.2020.06.003>.
- (56) Mirsalehi, S. A.; Sattari, M.; Naimi-Jamal, M. R. Tensile and Biocompatibility Properties of Synthesized Nano-Hydroxyapatite Reinforced Ultrahigh Molecular Weight Polyethylene Nanocomposite. *J. Compos. Mater.* 2015, 50 (13). <https://doi.org/10.1177/0021998315595711>.
- (57) Sattari, M.; Naimi-Jamal, M. R.; Khavandi, A. Interphase Evaluation and Nano-Mechanical Responses of UHMWPE/SCF/Nano-SiO₂ Hybrid Composites. *Polym. Test.* 2014, 38, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2014.06.006>.
- (58) Young, B. R.; Pitt, W. G.; Cooper, S. L. Protein Adsorption on Polymeric Biomaterials I. Adsorption Isotherms. *J. Colloid Interface Sci.* 1988, 124 (1), 28–43. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(88\)90321-9](https://doi.org/10.1016/0021-9797(88)90321-9).
- (59) Anderson, J. M.; Rodriguez, A.; Chang, D. T. Foreign Body Reaction to Biomaterials. *Semin. Immunol.* 2008, 20 (2), 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.004>.
- (60) Vozenin-Brottons, M.-C.; Mauviel, A. Comment modéliser les événements de la fibrose cutanée? *médecine/sciences* 2006, 22 (2), 172–177. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006222172>.
- (61) Rabinow, B. E.; Ding, Y. S.; Qin, C.; McHalsky, M. L.; Schneider, J. H.; Ashline, K. A.; Shelbourn, T. L.; Albrecht, R. M. Biomaterials with Permanent Hydrophilic Surfaces and Low Protein Adsorption Properties. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1995, 6 (1), 91–109. <https://doi.org/10.1163/156856295X00788>.

- (62) *Matériel de laboratoire*. Merck. <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr> (accessed 2022-12-07).
- (63) Gaillard, C.; Strauss, F. Eliminating DNA Loss and Denaturation during Storage in Plastic Microtubes. *Am. Biotechnol. Lab.* 2000, 18 (13), 24.
- (64) Lee, K. Y. Loss of Lipid to Plastic Tubing. *J. Lipid Res.* 1971, 12 (5), 635–636. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)39484-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)39484-0).
- (65) Chouchane, K.; Frachon, T.; Marichal, L.; Nault, L.; Vendrely, C.; Maze, A.; Bruckert, F.; Weidenhaupt, M. Insulin Aggregation Starts at Dynamic Triple Interfaces, Originating from Solution Agitation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2022, 214, 112451. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112451>.
- (66) Andrady, A. L. Microplastics in the Marine Environment. *Mar. Pollut. Bull.* 2011, 62 (8), 1596–1605. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>.
- (67) Derraik, J. G. B. The Pollution of the Marine Environment by Plastic Debris: A Review. *Mar. Pollut. Bull.* 2002, 44 (9), 842–852. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00220-5).
- (68) Isobe, A.; Azuma, T.; Cordova, M. R.; Cózar, A.; Galgani, F.; Hagita, R.; Kanhai, L. D.; Imai, K.; Iwasaki, S.; Kako, S.; Kozlovskii, N.; Lusher, A. L.; Mason, S. A.; Michida, Y.; Mituhasi, T.; Morii, Y.; Mukai, T.; Popova, A.; Shimizu, K.; Tokai, T.; Uchida, K.; Yagi, M.; Zhang, W. A Multilevel Dataset of Microplastic Abundance in the World's Upper Ocean and the Laurentian Great Lakes. *Microplastics Nanoplastics* 2021, 1 (1), 16. <https://doi.org/10.1186/s43591-021-00013-z>.
- (69) Gregory, M. R. Plastic 'Scrubbers' in Hand Cleansers: A Further (and Minor) Source for Marine Pollution Identified. *Mar. Pollut. Bull.* 1996, 32 (12), 867–871. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(96\)00047-1](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(96)00047-1).
- (70) De Falco, F.; Di Pace, E.; Cocca, M.; Avella, M. The Contribution of Washing Processes of Synthetic Clothes to Microplastic Pollution. *Sci. Rep.* 2019, 9 (1), 6633. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43023-x>.
- (71) *Marine Anthropogenic Litter*; Bergmann, M., Ed.; Springer: Cham, 2015.
- (72) Julienne, F. Fragmentation des plastiques: effet de l'environnement et de la nature du polymère sur la taille et la forme des fragments générés, Le Mans Université, Le Mans, 2019.
- (73) Garvey, C. J.; Impéror-Clerc, M.; Rouzière, S.; Gouadec, G.; Boyron, O.; Roweczyk, L.; Mingotaud, A. F.; ter Halle, A. Molecular-Scale Understanding of the Embrittlement in Polyethylene Ocean Debris. *Environ. Sci. Technol.* 2020, 54 (18), 11173–11181. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02095>.
- (74) Buzea, C.; Pacheco, I. I.; Robbie, K. Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. *Biointerphases* 2007, 2 (4), MR17–MR71. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>.
- (75) Sukhanova, A.; Bozrova, S.; Sokolov, P.; Berestovoy, M.; Karaulov, A.; Nabiev, I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Res. Lett.* 2018, 13 (1), 44. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2457-x>.
- (76) Besseling, E.; Wang, B.; Lürling, M.; Koelmans, A. A. Nanoplastic Affects Growth of *S. Obliquus* and Reproduction of *D. Magna*. *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48 (20), 12336–12343. <https://doi.org/10.1021/es503001d>.
- (77) Hwang, J.; Choi, D.; Han, S.; Jung, S. Y.; Choi, J.; Hong, J. Potential Toxicity of Polystyrene Microplastic Particles. *Sci. Rep.* 2020, 10 (1), 7391. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64464-9>.
- (78) Hitchcock, D. I. Protein Films on Colloidon Membranes. *J. Gen. Physiol.* 1925, 8 (2), 61–74. <https://doi.org/10.1085/jgp.8.2.61>.
- (79) 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>.
- (80) Abarca-Cabrera, L.; Fraga-García, P.; Berensmeier, S. Bio-Nano Interactions: Binding Proteins, Polysaccharides, Lipids and Nucleic Acids onto Magnetic Nanoparticles. *Biomater. Res.* 2021, 25 (1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40824-021-00212-y>.

- (81) Walczyk, D.; Bombelli, F. B.; Monopoli, M. P.; Lynch, I.; Dawson, K. A. What the Cell “Sees” in Bionanoscience. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132 (16), 5761–5768. <https://doi.org/10.1021/ja910675v>.
- (82) 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>.
- (83) Ke, P. C.; Lin, S.; Parak, W. J.; Davis, T. P.; Caruso, F. A Decade of the Protein Corona. *ACS Nano* 2017, 11 (12), 11773–11776. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08008>.
- (84) Mandelkow, E. Tau in Alzheimer’s Disease. *Trends Cell Biol.* 1998, 8 (11), 425–427. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(98\)01368-3](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)01368-3).
- (85) Stefanis, L. A-Synuclein in Parkinson’s Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012, 2 (2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>.
- (86) Wang, W.; Nema, S.; Teagarden, D. Protein Aggregation—Pathways and Influencing Factors. *Int. J. Pharm.* 2010, 390 (2), 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.02.025>.
- (87) Ako, K.; Nicolai, T.; Durand, D.; Brotons, G. Micro-Phase Separation Explains the Abrupt Structural Change of Denatured Globular Protein Gels on Varying the Ionic Strength or the PH. *Soft Matter* 2009, 5 (20), 4033. <https://doi.org/10.1039/b906860k>.
- (88) Bischof, J. C. Thermal Stability of Proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005, 1066 (1), 12–33. <https://doi.org/10.1196/annals.1363.003>.
- (89) Fink, A. L. Protein Aggregation: Folding Aggregates, Inclusion Bodies and Amyloid. *Fold. Des.* 1998, 3 (1), R9–R23. [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(98\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(98)00002-9).
- (90) Uversky, V. N. Natively Unfolded Proteins: A Point Where Biology Waits for Physics. *Protein Sci.* 2002, 11 (4), 739–756. <https://doi.org/10.1110/ps.4210102>.
- (91) Guo, J.; Yang, X.-Q.; He, X.-T.; Wu, N.-N.; Wang, J.-M.; Gu, W.; Zhang, Y.-Y. Limited Aggregation Behavior of β -Conglycinin and Its Terminating Effect on Glycinin Aggregation during Heating at PH 7.0. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60 (14), 3782–3791. <https://doi.org/10.1021/jf300409y>.
- (92) Klost, M.; Brzeski, C.; Drusch, S. Effect of Protein Aggregation on Rheological Properties of Pea Protein Gels. *Food Hydrocoll.* 2020, 108, 106036. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106036>.
- (93) Ratanji, K. D.; Derrick, J. P.; Dearman, R. J.; Kimber, I. Immunogenicity of Therapeutic Proteins: Influence of Aggregation. *J. Immunotoxicol.* 2014, 11 (2), 99–109. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2013.821564>.
- (94) Thomas, C. R.; Geer, D. Effects of Shear on Proteins in Solution. *Biotechnol. Lett.* 2011, 33 (3), 443–456. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0469-4>.
- (95) Bernal, V.; Jelen, P. Thermal Stability of Whey Proteins – A Calorimetric Study. *J. Dairy Sci.* 1985, 68 (11), 2847–2852. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)81177-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)81177-2).
- (96) Arakawa, T.; Timasheff, S. N. Mechanism of Protein Salting in and Salting out by Divalent Cation Salts: Balance between Hydration and Salt Binding. *Biochemistry* 1984, 23 (25), 5912–5923. <https://doi.org/10.1021/bi00320a004>.
- (97) Ince-Coskun, A. E.; Ozdestan-Ocak, O. Effects of Salt Ions and Heating on the Behaviour of Whey Protein Particle Dispersions. *Food Hydrocoll.* 2020, 101, 105433. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105433>.
- (98) Navarro, S.; Ventura, S. Computational Methods to Predict Protein Aggregation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2022, 73, 102343. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102343>.
- (99) Vroman, L.; Adams, A. L. Findings with the Recording Ellipsometer Suggesting Rapid Exchange of Specific Plasma Proteins at Liquid/Solid Interfaces. *Surf. Sci.* 1969, 16, 438–446. [https://doi.org/10.1016/0039-6028\(69\)90037-5](https://doi.org/10.1016/0039-6028(69)90037-5).
- (100) Angioletti-Uberti, S.; Ballauff, M.; Dzubiella, J. Competitive Adsorption of Multiple Proteins to Nanoparticles: The Vroman Effect Revisited. *Mol. Phys.* 2018, 116 (21–22), 3154–3163. <https://doi.org/10.1080/00268976.2018.1467056>.

- (101) 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>.
- (102) Grigolato, F.; Colombo, C.; Ferrari, R.; Rezabkova, L.; Arosio, P. Mechanistic Origin of the Combined Effect of Surfaces and Mechanical Agitation on Amyloid Formation. *ACS Nano* 2017, 11 (11), 11358–11367. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b05895>.
- (103) Sreenivasan, S.; Jiskoot, W.; Rathore, A. S. Rapid Aggregation of Therapeutic Monoclonal Antibodies by Bubbling Induced Air/Liquid Interfacial and Agitation Stress at Different Conditions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2021, 168, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.08.010>.
- (104) Koepf, E.; Eisele, S.; Schroeder, R.; Brezesinski, G.; Friess, W. Notorious but Not Understood: How Liquid-Air Interfacial Stress Triggers Protein Aggregation. *Int. J. Pharm.* 2018, 537 (1–2), 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.043>.
- (105) Gerhardt, A.; Mcgraw, N. R.; Schwartz, D. K.; Bee, J. S.; Carpenter, J. F.; Randolph, T. W. Protein Aggregation and Particle Formation in Prefilled Glass Syringes. *J. Pharm. Sci.* 2014, 103 (6), 1601–1612. <https://doi.org/10.1002/jps.23973>.
- (106) Frachon, T. Therapeutic Protein Aggregation at the Triple Interface Air-Liquid-Solid: Relevance to Medical Devices for Drug Delivery, Communauté Université Grenoble Alpes, 2016.
- (107) Xia, K.; Manning, M.; Hesham, H.; Lin, Q.; Bystrhoff, C.; Colón, W. Identifying the Subproteome of Kinetically Stable Proteins via Diagonal 2D SDS/PAGE. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007, 104 (44), 17329–17334. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705417104>.
- (108) Czeslik, C. Factors Ruling Protein Adsorption. *Z Phys Chem* 2004, 218, 771–801. <https://doi.org/10.1524/zpch.218.7.771.35722>.
- (109) Latour, R. A. Fundamental Principles of the Thermodynamics and Kinetics of Protein Adsorption to Material Surfaces. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2020, 191, 110992. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110992>.
- (110) 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>.
- (111) Flier, G. Polymer Adsorption and Its Effect on Colloidal Stability. A Theoretical and Experimental Study on the Polyvinyl Alcohol-Silver Iodide System, Université d’agriculture de Wafeningen, 1971.
- (112) Dejardin, P. Volume Effect of the Adsorbed Layer on the Determination of Adsorption Isotherms of Macromolecules by the Depletion Method. *J. Phys. Chem.* 1982, 86, 2800–2801.
- (113) Hlady, V.; Buijs, J.; Jennissen, H. P. Methods for Studying Protein Adsorption. *Methods Enzymol.* 1999, 309, 402–429. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)09028-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)09028-X).
- (114) 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>.
- (115) Peterson, C.; Kwei, T. K. The Kinetics of Polymer Adsorption onto Solid Surfaces. *J. Phys. Chem.* 1961, 65 (8), 1330–1333. <https://doi.org/10.1021/j100826a013>.
- (116) Dill, K. A.; Shortle, D. Denaturated States of Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 1991, 60 (1), 795–825. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.004051>.
- (117) Bolen, D. W.; Baskakov, I. V. The Osmophobic Effect: Natural Selection of a Thermodynamic Force in Protein Folding 1 Edited by D. Draper. *J. Mol. Biol.* 2001, 310 (5), 955–963. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4819>.
- (118) Santore, M. M.; Wertz, C. F. Protein Spreading Kinetics at Liquid–Solid Interfaces via an Adsorption Probe Method. *Langmuir* 2005, 21 (22), 10172–10178. <https://doi.org/10.1021/la051059s>.
- (119) Horbett, T. A.; Weathersbp, P. K.; Boffman, A. S. Hemoglobin Adsorption to Three Polymer Surfaces. 1978, 12 (2), 319–329. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(78\)90302-X](https://doi.org/10.1016/0049-3848(78)90302-X).
- (120) Absolom, D. R.; Zingg, W.; Neumann, A. W. Protein Adsorption to Polymer Particles: Role of Surface Properties. *J. Biomed. Mater. Res.* 1987, 21 (2), 161–171. <https://doi.org/10.1002/jbm.820210202>.

- (121) Meissner, J.; Prause, A.; Bharti, B.; Findenegg, G. H. Characterization of Protein Adsorption onto Silica Nanoparticles: Influence of PH and Ionic Strength. *Colloid Polym. Sci.* 2015, 293 (11), 3381–3391. <https://doi.org/10.1007/s00396-015-3754-x>.
- (122) Mathé, C.; Devineau, S.; Aude, J.-C.; Lagniel, G.; Chédin, S.; Legros, V.; Mathon, M.-H.; Renault, J.-P.; Pin, S.; Boulard, Y.; Labarre, J. Structural Determinants for Protein Adsorption/Non-Adsorption to Silica Surface. *PLoS ONE* 2013, 8 (11), e81346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081346>.
- (123) Andrade, J. D.; Hlady, V.; Wei, A. P. Adsorption of Complex Proteins at Interfaces. *Pure Appl. Chem.* 1992, 64 (11), 1777–1781. <https://doi.org/10.1351/pac199264111777>.
- (124) Milani, S.; Baldelli Bombelli, F.; Pitek, A. S.; Dawson, K. A.; Rädler, J. Reversible versus Irreversible Binding of Transferrin to Polystyrene Nanoparticles: Soft and Hard Corona. *ACS Nano* 2012, 6 (3), 2532–2541. <https://doi.org/10.1021/nn204951s>.
- (125) 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>.
- (126) 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>.
- (127) Marichal, L.; Klein, G.; Armengaud, J.; Boulard, Y.; Chédin, S.; Labarre, J.; Pin, S.; Renault, J.-P.; Aude, J.-C. Protein Corona Composition of Silica Nanoparticles in Complex Media: Nanoparticle Size Does Not Matter. *Nanomaterials* 2020, 10 (2), 240. <https://doi.org/10.3390/nano10020240>.
- (128) 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>.
- (129) Böhmert, L.; Voß, L.; Stock, V.; Braeuning, A.; Lampen, A.; Sieg, H. Isolation Methods for Particle Protein Corona Complexes from Protein-Rich Matrices. *Nanoscale Adv.* 2020, 2 (2), 563–582. <https://doi.org/10.1039/C9NA00537D>.
- (130) Oliveira, J.; Belchior, A.; da Silva, V. D.; Rotter, A.; Petrovski, Ž.; Almeida, P. L.; Lourenço, N. D.; Gaudêncio, S. P. Marine Environmental Plastic Pollution: Mitigation by Microorganism Degradation and Recycling Valorization. *Front. Mar. Sci.* 2020, 7, 567126. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.567126>.
- (131) Debroy, A.; George, N.; Mukherjee, G. Role of Biofilms in the Degradation of Microplastics in Aquatic Environments. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2022, 97 (12), 3271–3282. <https://doi.org/10.1002/jctb.6978>.
- (132) Othman, A. R.; Hasan, H. A.; Muhamad, M. H.; Ismail, N. 'Izzati; Abdullah, S. R. S. Microbial Degradation of Microplastics by Enzymatic Processes: A Review. *Environ. Chem. Lett.* 2021, 19 (4), 3057–3073. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01197-9>.
- (133) Herrero Acero, E.; Ribitsch, D.; Steinkellner, G.; Gruber, K.; Greimel, K.; Eiteljoerg, I.; Trotscha, E.; Wei, R.; Zimmermann, W.; Zinn, M.; Cavaco-Paulo, A.; Freddi, G.; Schwab, H.; Guebitz, G. Enzymatic Surface Hydrolysis of PET: Effect of Structural Diversity on Kinetic Properties of Cutinases from Thermobifida. *Macromolecules* 2011, 44 (12), 4632–4640. <https://doi.org/10.1021/ma200949p>.
- (134) Kaushal, J.; Khatri, M.; Arya, S. K. Recent Insight into Enzymatic Degradation of Plastics Prevalent in the Environment: A Mini - Review. *Clean. Eng. Technol.* 2021, 2. <https://doi.org/10.1016/j.clet.2021.100083>.
- (135) Zhu, B.; Wang, D.; Wei, N. Enzyme Discovery and Engineering for Sustainable Plastic Recycling. *Trends Biotechnol.* 2022, 40 (1), 22–37. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.02.008>.
- (136) *Carbios - Innover pour une véritable économie circulaire des plastiques.* <https://www.carbios.com/fr/> (accessed 2023-01-23).
- (137) Krause, S.; Molari, M.; Gorb, E. V.; Gorb, S. N.; Kossel, E.; Haeckel, M. Persistence of Plastic Debris and Its Colonization by Bacterial Communities after Two Decades on the Abyssal Seafloor. *Sci. Rep.* 2020, 10 (1), 9484. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66361-7>.

- (138) Zhang, Y.; Pedersen, J. N.; Eser, B. E.; Guo, Z. Biodegradation of Polyethylene and Polystyrene: From Microbial Deterioration to Enzyme Discovery. *Biotechnol. Adv.* 2022, 60, 107991. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107991>.
- (139) Arutchelvi, J.; Sudhakar, M.; Arkatkar, A.; Doble, M.; Bhaduri, S.; Uppara, P. V. Biodegradation of Polyethylene and Polypropylene. *Indian J. Biotechnol.* 2008, 7.
- (140) *Les Plastiques Dans l'environnement*; Académie des sciences: France, 2021.
- (141) Koelmans, A. A.; Kooi, M.; Law, K. L.; van Sebille, E. All Is Not Lost: Deriving a Top-down Mass Budget of Plastic at Sea. *Environ. Res. Lett.* 2017, 12 (11), 114028. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa9500>.
- (142) *Plastics in the Marine Environment*. *Eunomia* 2016.
- (143) 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>.
- (144) Kooi, M.; Nes, E. H. van; Scheffer, M.; Koelmans, A. A. Ups and Downs in the Ocean: Effects of Biofouling on Vertical Transport of Microplastics. *Environ. Sci. Technol.* 2017, 51 (14), 7963–7971. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04702>.
- (145) Van Melkebeke, M.; Janssen, C.; De Meester, S. Characteristics and Sinking Behavior of Typical Microplastics Including the Potential Effect of Biofouling: Implications for Remediation. *Environ. Sci. Technol.* 2020, 54 (14), 8668–8680. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07378>.
- (146) Pete, A. J.; Brahana, P. J.; Bello, M.; Benton, M. G.; Bharti, B. Biofilm Formation Influences the Wettability and Settling of Microplastics. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2022, acs.estlett.2c00728. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.2c00728>.
- (147) Kaiser, D.; Kowalski, N.; Waniek, J. J. Effects of Biofouling on the Sinking Behavior of Microplastics. *Environ. Res. Lett.* 2017, 12 (12), 124003. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa8e8b>.
- (148) Zhu, M.; Zhang, Z.; Zhang, T.; Hofmann, T.; Chen, W. Eco-Corona Dictates Mobility of Nanoplastics in Saturated Porous Media: The Critical Role of Preferential Binding of Macromolecules. *Environ. Sci. Technol.* 2023, 57 (1), 331–339. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c07376>.
- (149) Galloway, T. S. Interactions of Microplastic Debris throughout the Marine Ecosystem. *Nat. Ecol. Evol.* 2017, 1 (116). <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0116>.
- (150) 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>.
- (151) Gebauer, J. S.; Malissek, M.; Simon, S.; Knauer, S. K.; Maskos, M.; Stauber, R. H.; Peukert, W.; Treuel, L. Impact of the Nanoparticle–Protein Corona on Colloidal Stability and Protein Structure. *Langmuir* 2012, 28 (25), 9673–9679. <https://doi.org/10.1021/la301104a>.
- (152) Li, X.; He, E.; Jiang, K.; Peijnenburg, W. J. G. M.; Qiu, H. The Crucial Role of a Protein Corona in Determining the Aggregation Kinetics and Colloidal Stability of Polystyrene Nanoplastics. *Water Res.* 2021, 190, 116742. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116742>.
- (153) Sáringer, S.; Akula, R. A.; Szerlauth, A.; Szilagyi, I. Papain Adsorption on Latex Particles: Charging, Aggregation, and Enzymatic Activity. *J. Phys. Chem. B* 2019, 123 (46), 9984–9991. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b08799>.
- (154) Liu, G.; Jiang, R.; You, J.; Muir, D. C. G.; Zeng, E. Y. Microplastic Impacts on Microalgae Growth: Effects of Size and Humic Acid. *Environ. Sci. Technol.* 2020, 54 (3), 1782–1789. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b06187>.
- (155) Mueller, M.-T.; Fueser, H.; Trac, L. N.; Mayer, P.; Traunspurger, W.; Höss, S. Surface-Related Toxicity of Polystyrene Beads to Nematodes and the Role of Food Availability. *Environ. Sci. Technol.* 2020, 54 (3), 1790–1798. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b06583>.

- (156) Paul-Pont, I.; Lacroix, C.; González Fernández, C.; Hégaret, H.; Lambert, C.; Le Goïc, N.; Frère, L.; Cassone, A.-L.; Sussarellu, R.; Fabioux, C.; Guyomarch, J.; Albentosa, M.; Huvet, A.; Soudant, P. Exposure of Marine Mussels *Mytilus* Spp. to Polystyrene Microplastics: Toxicity and Influence on Fluoranthene Bioaccumulation. *Environ. Pollut.* 2016, 216, 724–737. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.039>.
- (157) Beiras, R.; Bellas, J.; Cachot, J.; Cormier, B.; Cousin, X.; Engwall, M.; Gambardella, C.; Garaventa, F.; Keiter, S.; Le Bihanic, F.; López-Ibáñez, S.; Piazza, V.; Rial, D.; Tato, T.; Vidal-Liñán, L. Ingestion and Contact with Polyethylene Microplastics Does Not Cause Acute Toxicity on Marine Zooplankton. *J. Hazard. Mater.* 2018, 360, 452–460. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.101>.
- (158) Schvartz, M.; Saudrais, F.; Stéphanie, D.; Jean-Christophe, A.; Stéphane, C.; Henry, C.; Millán-Oropeza, A.; Perrault, T.; Pieri, L.; Serge, P.; Boulard, Y.; Brotons, G.; Jean-Philippe, R. A Proteome Scale Study Reveals How Plastic Surfaces and Agitation Promote Protein Aggregation. *Sci. Rep.* 2023.

CHAPITRE 2. MATERIELS ET METHODES

Ce chapitre est dédié à la description des protocoles techniques et conditions d'analyses.

Dans le cas des méthodes classiques, uniquement les détails techniques et une brève explication du traitement des données permettant l'obtention des informations souhaitées sont exposés.

Les techniques moins classiques sont expliquées plus en détails.

Les stratégies expérimentales ou analytiques ayant été développées dans le cadre de ce travail sont détaillées dans les chapitres de résultats.

CHAPITRE 2. MATERIELS ET METHODES	49
2.1. LES PROTEINES	53
2.1.1. PREPARATION DES SOLUTIONS DE PROTEINES	53
2.1.1.1. Eaux et tampons.....	53
2.1.1.2. Albumine de sérum bovin	53
2.1.1.3. Extrait protéique de levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
2.1.1.4. Phosphoglucose isomérase	57
2.1.2. PROPRIETES DES SOLUTIONS DE PROTEINES	58
2.1.2.1. Mesures de tension superficielles et d'angles de contact.....	58
2.1.2.2. Diffusion dynamique de la lumière.....	60
2.1.2.3. Spectroscopie de fluorescence	61
2.1.3. COMPOSITION DES SOLUTIONS DE PROTEINES	62
2.1.3.1. Imagerie Raman.....	62
2.1.3.2. Protéomique.....	63
2.1.3.3. Gels de polyacrylamide dénaturants	64
2.1.4. ÉVALUATION DES PERTES DE PROTEINES	66
2.1.5. DESORPTION DES PROTEINES	68
2.2. LES MICROPLASTIQUES.....	70
2.2.1. DISTRIBUTION EN TAILLES PAR MICROSCOPIE.....	70
2.2.2. SURFACE SPECIFIQUE PAR DIFFUSION DES RAYONS X AUX PETITS ANGLES.....	70
2.2.3. CHIMIE DE SURFACE PAR SPECTROSCOPIE DE PHOTOELECTRONS INDUITS PAR RAYONS X.....	71
2.2.4. COMPOSITION.....	72
2.2.4.1. Spectroscopie infrarouge	72
2.2.4.2. Calorimétrie différentielle à balayage	72
2.2.4.3. Imagerie Raman multispectrale	72
2.2.4.4. Diffraction des rayons X.....	73
2.2.4.5. Spectroscopie de fluorescence	73
2.3. LES PARTICULES DE PLASTIQUES RECOUVERTES DE PROTEINES	74
2.3.1. MICROPLASTIQUES	74
2.3.1.1. Isothermes d'adsorption.....	74
2.3.1.2. Charges de surface.....	76
2.3.1.3. Cinétique de crémage.....	77
2.3.1.4. Comptage de particules.....	79
2.3.1.5. Imagerie de fluorescence	80
2.3.1.6. Spectres de fluorescence	80
2.3.2. PREMIERES EXPERIENCES SUR DES NANOPLASTIQUES	81
2.4. BIBLIOGRAPHIE.....	82

2.1. LES PROTEINES

2.1.1. Préparation des solutions de protéines

2.1.1.1. Eaux et tampons

Une eau purifiée ayant une résistivité de 18,2 M Ω .cm à 25 °C, a été utilisée (purification par système Milli-Q, Millipore). Le pH et la force ionique ont été contrôlés à l'aide d'un tampon phosphate (pH7 à 100 mM) ayant été obtenu par dissolution de NaH₂PO₄ (VWR Chemicals, référence 28015.294) et de Na₂HPO₄ (VWR Chemicals, référence 28029.292) dans de l'eau pure et ajustement du pH par ajout d'HCl.

Une eau de mer a également été utilisée dans le cadre de ce travail. Elle a été prélevée dans la rade de Brest, stérilisée par autoclave et filtrée à 0,2 μ m par le Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR). Un tampon Tris à un pH de 8 à 6°C et 50 mM a aussi été utilisé pour assurer un pouvoir tampon dans la gamme de concentration protéique étudiée (paragraphe 3.1.4.2). Ce tampon a été réalisé par dissolution de Trizma Base (Sigma-Aldrich, référence T6066) et ajouts progressifs de HCl.

2.1.1.2. Albumine de sérum bovin

L'Albumine de Sérum Bovin (BSA) a été préparée à partir de la protéine lyophilisée provenant de Sigma-Aldrich (référence A7030). Elle a été dissoute dans l'eau sous agitation douce jusqu'à une concentration d'environ 30 g.L⁻¹. Après dialyse avec un seuil de 3,5 kDa et centrifugation (15 000 g, 5 min), la solution est stockée à 4°C. Le coefficient d'extinction molaire de la BSA à 278 nm est connu ($\epsilon_{\lambda 278 \text{ nm}} = 43\,824 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$).¹ La loi de Beer-Lambert permet donc de calculer directement la concentration à partir de l'absorbance déterminée en spectroscopie UV. La masse molaire est utilisée pour déterminer la concentration en g.L⁻¹ ($M_{\text{BSA}} = 69\,324 \text{ g.mol}^{-1}$). Un spectre d'absorbance de la BSA est présenté sur la figure 2.1.

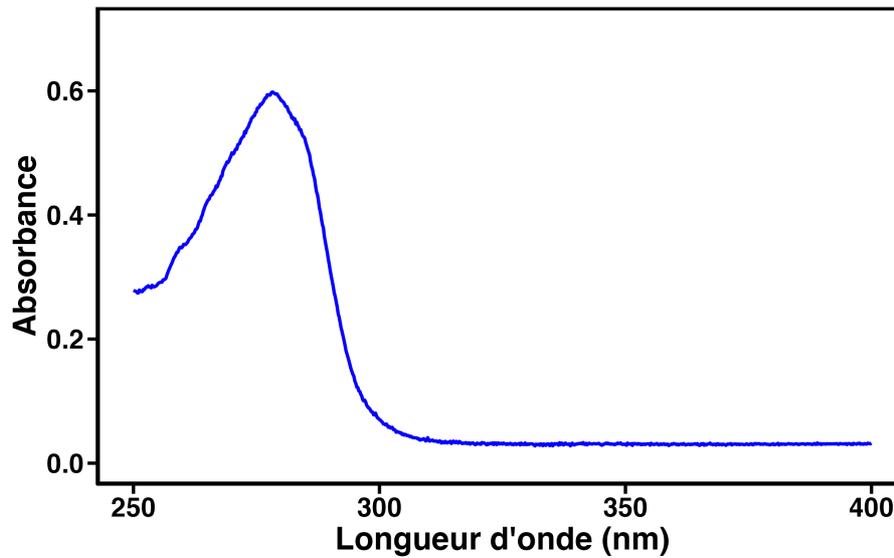


Figure 2.1. Spectre d'absorbance d'une solution de BSA à $0,9 \text{ g.L}^{-1}$ (concentration déterminée à partir de l'absorbance à 278 nm), diluée dans un tampon phosphate pH7, 100 mM.

2.1.1.3. Extrait protéique de levure *Saccharomyces cerevisiae*

Un Extrait Protéique de Levure (EPL) a été préparé à partir de la souche *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (Euroscarf). Les cellules ont été incubées sous agitation à 30°C dans un milieu synthétique contenant 10 g.L^{-1} de Bacto™ Yeast Extract, 20 g.L^{-1} de Bacto™ Peptone (Gibco™) et 20 g.L^{-1} de glucose. Elles ont ensuite été recueillies en phase stationnaire afin d'obtenir des quantités importantes. Elles sont stockées à -80°C dans différents tubes pour réaliser les cassages au fur et à mesure des besoins. Les cellules sont alors décongelées et suspendues dans un tampon de cassage contenant du PBS 1X (Phosphate Buffer Saline, Sigma-Aldrich, référence D1408), 5% de glycérol (VWR Chemical, référence 24388.320) et un cocktail d'inhibiteur de protéases (ThermoFischer Scientific, référence 78429). Elles sont ensuite cassées à l'aide d'une presse de French. Les protéines hydrosolubles de l'extrait sont obtenues après centrifugations ($4\ 000 \text{ trs.min}^{-1}$, 15 min, 4°C puis $14\ 000 \text{ trs.min}^{-1}$, 40 min, 4°C) puis aliquotées et stockées à -80°C .

La quantification d'un extrait protéique est complexe car la nature des protéines est variée et l'extrait peut contenir des traces d'autres biomolécules telles que des lipides, des polysaccharides ou encore des acides nucléiques, impactant la signature spectrale. Plusieurs méthodes de quantification de protéines nécessitent la valeur de l'absorbance à 280 nm (absorbance des cycles aromatiques).²⁻⁴ Dans le cas de l'EPL, ces méthodes ne peuvent pas être appliquées du fait de la forte quantité d'acides nucléiques absorbant à 260 nm,⁵ masquant la contribution des protéines (Figure 2.2). Deux méthodes de quantification ont été appliquées : une méthode classique (Bradford) et une méthode par mesure d'absorbance à 205 nm.

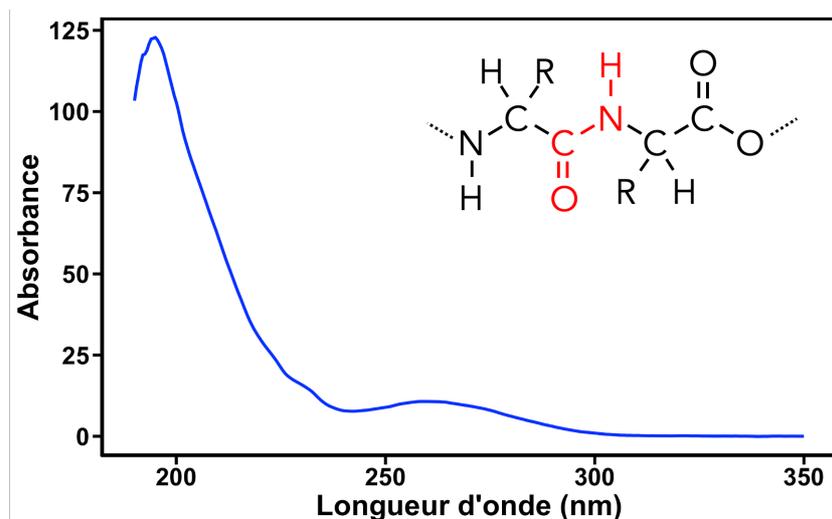


Figure 2.2. Spectre d'absorbance de l'EPL à 2,5 g.L⁻¹ (concentration déterminée à partir de l'absorbance à 205 nm) dilué dans un tampon phosphate pH7, 100 mM. Le spectre a été mesuré à l'aide d'un NanoDrop. Ce sont les liaisons peptidiques qui absorbent à 205 nm.

- **La méthode de Bradford.**⁶ Le réactif (Sigma-Aldrich, référence C6916) contient du bleu de Coomassie qui complexe les acides aminés aromatiques et basiques. L'absorbance est relevée à 595 nm entre 5 et 10 min après l'ajout du réactif. Une gamme d'étalonnage est réalisée au préalable (Figure 2.3), avec une solution de BSA de concentration connue (concentration déterminée en spectroscopie UV-Visible, voir paragraphe 2.1.1.2). Il s'agit d'une estimation, en « équivalents BSA » car toutes les protéines ne complexent pas le réactif de Bradford de la même manière. La gamme est réalisée pour chaque série de mesures car la solution de Bradford évolue dans le temps.

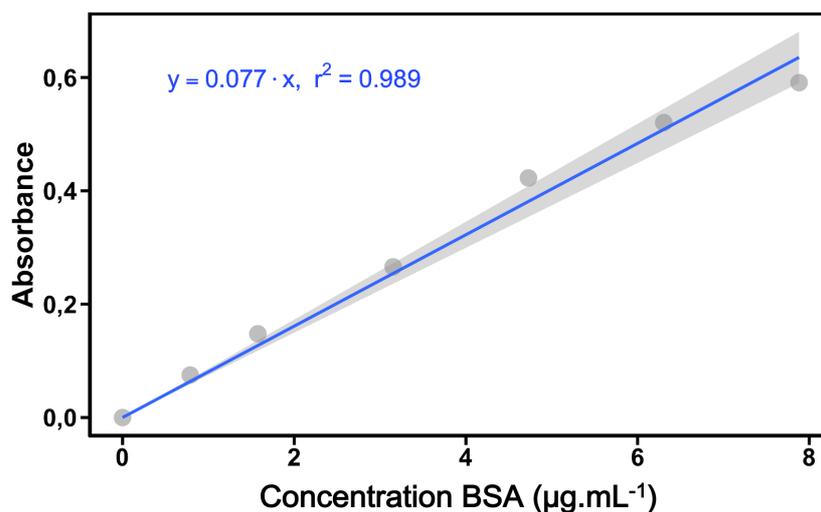


Figure 2.3. Exemple d'une gamme d'étalonnage réalisée par la méthode de Bradford à partir de BSA de concentration connue. L'absorbance à 595 nm est représentée en fonction de la concentration de BSA en µg.mL⁻¹ et permet d'estimer la concentration de solutions d'EPL. La zone grisée correspond à l'intervalle de confiance à 95%.

- **La mesure de l'absorbance à 205 nm.** Cette longueur d'onde correspond à l'absorbance de la liaison peptidique (figure 2.2). Le maximum d'absorption des protéines est situé vers 190 nm mais l'absorbance à 205 nm est préférentiellement utilisée car permet de s'affranchir d'une partie des contributions du solvant.⁷ A 205 nm, un coefficient d'extinction molaire est approximé dans la littérature à $31 \text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.^{7,8} La concentration peut alors être déterminée à partir de la loi de Beer-Lambert. Un NanoDrop One (Thermo Scientific™) a été utilisé car présente l'avantage d'être linéaire sur une gamme d'absorbance nettement plus importante qu'un spectromètre UV-visible classique. Cela permet d'analyser des concentrations importantes sans avoir recours à une dilution préalable. Par ailleurs, seulement quelques microlitres de solution sont nécessaires à la mesure. La méthode de quantification par l'absorbance à 205 nm à l'aide de cet appareil a été éprouvée par Thermo Scientific™ et a montré des valeurs cohérentes ainsi qu'une bonne reproductibilité.⁹

Puisque cette méthode n'est pas couramment utilisée, nous avons tout de même contrôlé la reproductibilité des mesures ainsi que la linéarité dans nos gammes de concentration pour l'extrait protéique de levure. La figure 2.4 indique que la réponse de l'appareil est bien linéaire à la dilution et que la variabilité des mesures (trois mesures par concentration) est au maximum de 10%. Nous considérons donc que cette méthode est fiable et nous l'avons appliquée avec le protocole suivant : une goutte de $5 \mu\text{L}$ est déposée sur le support, trois répliquas techniques sont systématiquement réalisés.

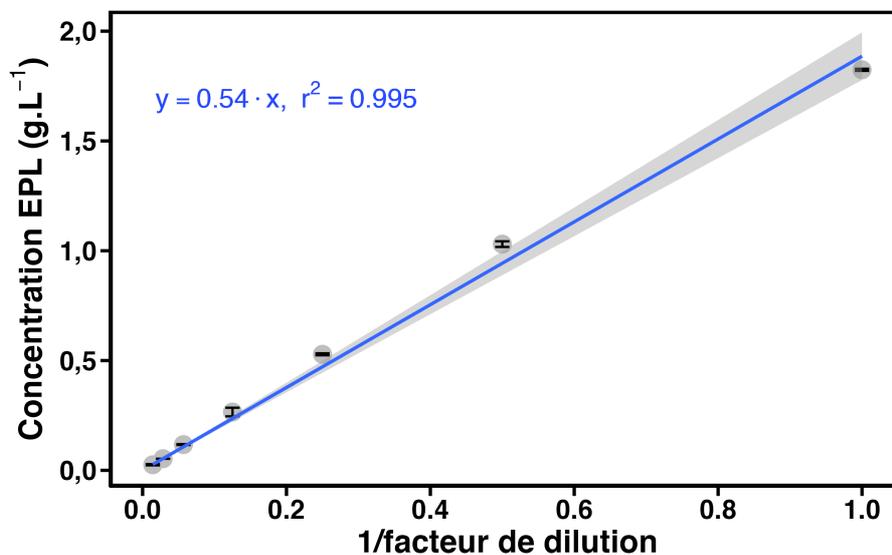


Figure 2.4. Concentration en extrait protéique de levure, déterminée à partir de l'absorbance à 205 nm, en fonction de l'inverse du facteur de dilution. La zone grisée correspond à l'intervalle de confiance à 95%.

2.1.1.4. Phosphoglucose isomérase

La Phosphoglucose Isomérase (PGI) est une protéine présente dans l'extrait protéique de levure étudié. Il s'agit d'une enzyme dont le rôle est de catalyser la réaction de transformation du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate.¹⁰ La PGI est conditionnée sous forme liquide, à une concentration de 10 mg.mL⁻¹ d'après le fournisseur (Roche, référence 10128139001). Le spectre UV-visible de la protéine est représenté sur la figure 2.5.

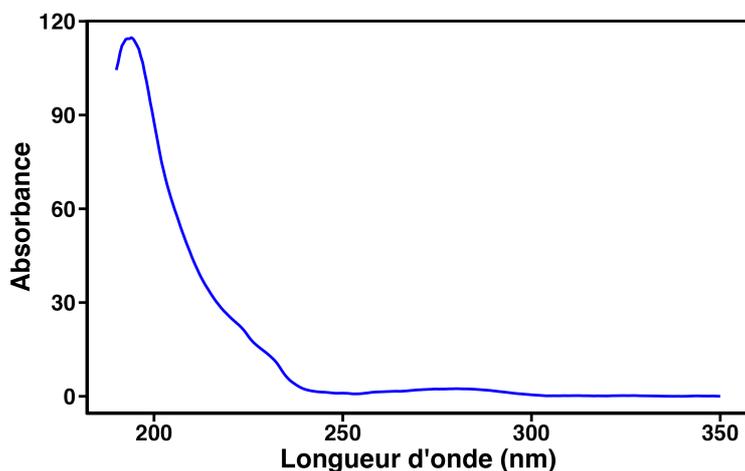


Figure 2.5. Spectre d'absorbance de la phosphoglucose isomérase.

La concentration a été contrôlée à différents taux de dilution à partir des deux méthodes de dosage (Bradford Figure 2.6-A et absorbance à 205 nm Figure 2.6-B). Dans les deux cas, les valeurs de concentrations évoluent linéairement au taux de dilution et correspondent aux données indiquées par le fournisseur à 10% près, ce qui est tout à fait acceptable pour un dosage protéique. Dans un souci d'homogénéité, la méthode de Bradford a été sélectionnée pour doser la PGI.

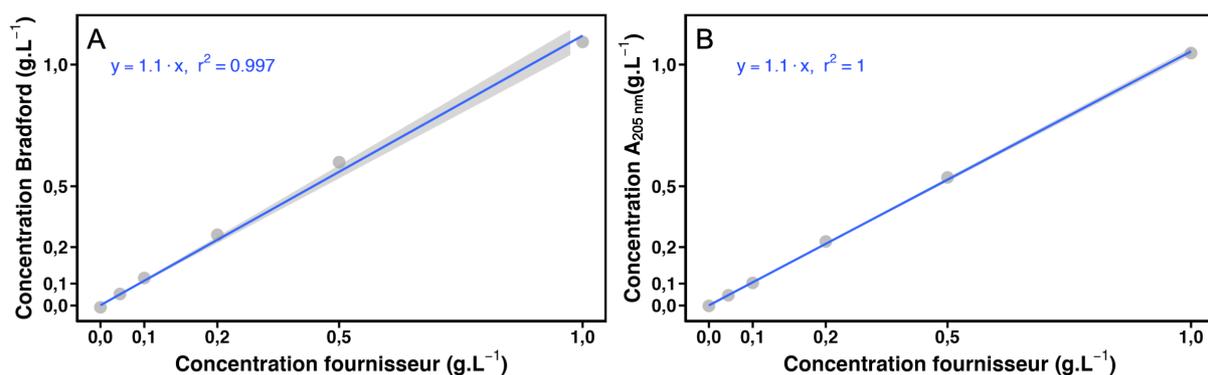


Figure 2.6. Concentration en PGI déterminée par la méthode de Bradford (A) ou à partir de l'absorbance de la liaison peptidique à 205 nm (B), représentée en fonction de la concentration attendue d'après les informations du fournisseur. Les dilutions ont été réalisées en tampon phosphate 100 mM, pH 7. Les points correspondent aux données expérimentales, le trait continu à un ajustement linéaire et la zone grisée à l'intervalle de confiance à 95%.

2.1.2. Propriétés des solutions de protéines

2.1.2.1. Mesures de tension superficielles et d'angles de contact

Les expériences ont été réalisées à l'aide d'un analyseur de forme de goutte (KRÜSS, DSA 25) utilisant le logiciel Advance Surface.

Tensions superficielles

La tension superficielle, généralement exprimée en $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, est une force à l'interface air/liquide causée par l'attraction des molécules à l'intérieur du liquide.¹¹ Une faible tension superficielle est favorable à l'étalement de gouttes (phénomène de mouillage) ou à leur dispersion dans un liquide (émulsion).

Les tensions superficielles des solutions d'extrait protéique de levure à 0,1 et à 25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ont été mesurées sur des gouttes pendantes (Figure 2.7) de 20 μL à l'aide d'une aiguille en téflon de 2 mm et après 180 s d'équilibre dans l'air à humidité et température ambiantes. Les résultats correspondent à une moyenne de trois mesures, obtenues sur des gouttes différentes, suivant un modèle d'Young-Laplace, généralement utilisé pour des analyses de gouttes.¹²



Figure 2.7. Image d'une goutte pendante permettant la détermination de la tension superficielle d'un liquide dans l'air (adapté de ¹³).

Angles de contact

La technique de la goutte sessile permet d'apporter des informations sur l'affinité d'une solution pour un substrat.^{14,15} Une goutte, posée sur une surface solide, est à l'équilibre dans un milieu gazeux. La loi d'Young fait le lien entre les tensions superficielles et l'angle de contact de la goutte sur le solide (équation 2.1).¹⁴

$$\cos(\theta) = \frac{\gamma_{sv} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lv}} \quad \text{Eq. 2.1}$$

Avec θ l'angle de contact et γ_{sv} , γ_{sl} et γ_{lv} respectivement les tensions superficielles des interfaces solide/vapeur, solide/liquide et liquide/vapeur.

A partir de l'angle de contact entre le liquide et le solide (dans une phase vapeur, dans notre cas, l'air), le liquide peut être considéré comme mouillant ou non (Figure 2.8). Un faible angle de contact signifie que les énergies sont minimisées et donc que le liquide a une certaine affinité pour le solide. Ainsi, à partir des angles de contact, il est possible d'établir des classements relatifs à l'affinité liquide/solide.

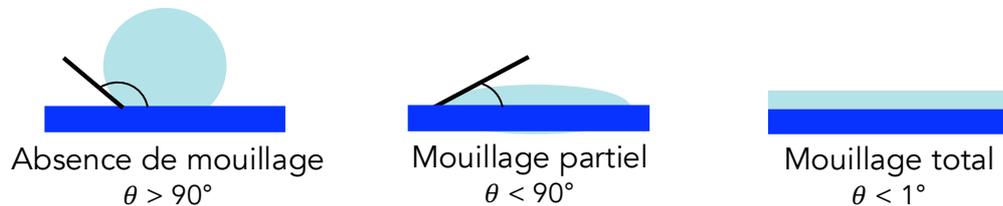


Figure 2.8. Représentations schématiques de gouttes posées sur des substrats solides en fonction du mouillage. Dans le cas d'un mouillage partiel ou total, la solution est affine pour le substrat.

- Pour caractériser **l'affinité des solutions de protéines pour les matériaux constituant les tubes**, des gouttes de 5 μL ont été déposées sur des substrats constitués des différents matériaux (polypropylène, verre, Téflon et matériau LoBind). Les données ont été traitées après 60 s d'équilibre dans l'air à humidité et température ambiantes. Les angles de contact de solutions d'extrait protéique de levure à 0,1 et 25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ainsi que du tampon phosphate à 100 mM, pH7 ont été comparés.

- **La caractérisation de l'hydrophobie des microplastiques** est nettement plus complexe puisqu'il s'agit de poudres. Pour accéder à l'information de l'hydrophobie de particules, une méthode originale est basée sur la mesure d'angles de contact directement sur les lits de poudres.^{16,17} Des difficultés sont à noter pour ce type d'expériences :

- La reproductibilité du tassage des poudres,

- Les irrégularités de la surface,

- Une diminution du volume de la goutte dans le temps par entrée dans le lit de poudres et/ou par évaporation,

- La présence de charges électrostatiques rendant le dépôt de goutte complexe,

- La très forte hydrophobie de certaines poudres : au contact, les gouttes peuvent rouler sur la poudre jusqu'à trouver une surface pour laquelle elles ont davantage d'affinité.

Au-delà de ces difficultés, il s'agit d'une méthode permettant d'accéder rapidement à des informations qualitatives. Cette technique est adaptée dans notre cas puisque nous souhaitons simplement comparer les microplastiques entre eux.

Les poudres ont été déposées dans une rondelle en métal et légèrement pressées. Des gouttes d'eau purifiée de 7,5 μL ont été déposées et les angles de contact ont été mesurés après 30 min d'équilibre. Ce temps d'équilibre est plus long à atteindre sur des surfaces irrégulières, comme des poudres, que pour des surfaces planes.

2.1.2.2. Diffusion dynamique de la lumière

Les expériences de diffusion de la lumière (DLS) ont été réalisées à 173° avec un Zetasizer Nano ZS (Malvern) pour estimer la taille des objets en solution.

Les corrélogrammes (Figure 2.9-A) peuvent être analysés à l'aide d'un algorithme REPES fourni par le logiciel GENDIST¹⁸ (discuté dans la thèse de Thomas Perrault¹⁹) pour obtenir les distributions en intensité en fonction des temps caractéristiques (Figure 2.9-B). Les rayons hydrodynamiques peuvent alors être calculés à partir de la loi de Stokes-Einstein (équation 2.2),²⁰ permettant la représentation des distributions en tailles (Figure 2.9-C).

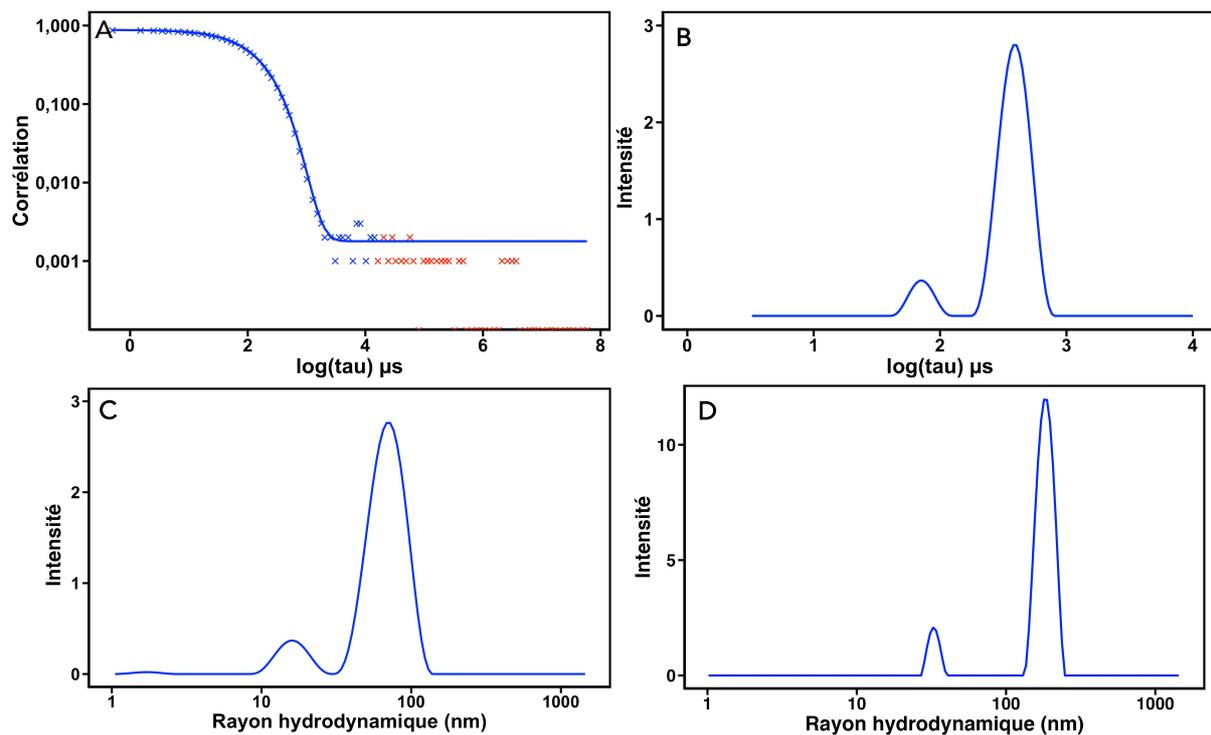


Figure 2.9. Étapes réalisées au cours du traitement des données de DLS et comparaison avec le traitement automatique de l'appareil. Exemple sur un échantillon d'extrait protéique de levure à 0,1 g.L⁻¹ dans un tampon phosphate 100 mM, pH7.

(A) Données brutes (croix) et corrélogramme (trait continu) ajusté par la distribution des temps caractéristiques présentée en (B). (C) distribution en intensité tracée en fonction du rayon hydrodynamique, calculé à partir de la loi de Stokes Einstein. (D) Distribution obtenue par la méthode des cumulants (analyse réalisée par le logiciel de l'appareil).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad \text{Eq. 2.2}$$

Avec R_H le rayon hydrodynamique (m), k_B la constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23}$ J.K⁻¹), T la température (298 K), η la viscosité dynamique (eau à 298 K = $8,9 \cdot 10^{-4}$ Pa.s) et D le coefficient de diffusion (en m².s⁻¹), déterminé à partir des équations 2.3 et 2.4.

$$D = \frac{1}{q^2 \tau} \quad \text{Eq. 2.3}$$

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad \text{Eq. 2.4}$$

Avec τ le temps de relaxation (s), q le vecteur de diffusion (m^{-1}), n l'indice de réfraction (eau = 1,33), λ la longueur d'onde du laser ($633 \cdot 10^{-9}$ m) et θ l'angle de diffusion (173°).

Les distributions obtenues par la méthode utilisant l'algorithme REPES sont plus larges que celles obtenues par la méthode des cumulants²¹ (Figure 2.9-D), réalisée directement par le logiciel de l'appareil. Ce résultat semble plus probable dans le cas de l'échantillon analysé (solution contenant plusieurs milliers de protéines différentes). Par ailleurs, la méthode REPES présente l'avantage d'être adaptée pour des échantillons polydispersés et permet de caractériser des distributions asymétriques.²² Pour ces raisons, nous l'avons choisie pour l'analyse des données de DLS des solutions de protéines.

Le protocole expérimental est le suivant : après une filtration à $1,2 \mu m$, $400 \mu L$ sont introduits dans une cellule et, suite à un équilibre de 200 s à $25^\circ C$, trois mesures sont réalisées sur trois répliquas biologiques.

2.1.2.3. Spectroscopie de fluorescence

Un fluorimètre (Horiba, Fluoromax-4) a été utilisé dans le but de connaître la gamme de fluorescence des extraits protéiques de levure. Pour cela, des spectres de fluorescence 3D ont été réalisés. 1 mL de solution à $25 g \cdot L^{-1}$ a été introduit dans une cuve en quartz ayant un trajet optique de 1 cm. En excitation, une gamme de 225 à 325 nm a été balayée. En émission, une gamme de 250 à 450 nm avec un pas de 2 nm. Les spectres 3D représentent l'intensité émise en fonction des longueurs d'onde d'émission et d'excitation.

2.1.3. Composition des solutions de protéines

2.1.3.1. Imagerie Raman

L'imagerie Raman a été réalisée dans le but de comparer des solutions d'EPL avant et après agitation ainsi que d'observer les agrégats formés au cours de l'agitation. Cela permet d'identifier, à l'échelle globale de l'échantillon, si la représentation d'une population est modifiée dans les conditions expérimentales.

Les agrégats de protéines ont été imagés en solution par microscopie confocale Raman à l'aide d'un appareil WITec alpha300 RA instrument (Oxford Instruments). Une solution d'EPL à $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ a été agitée durant 24 h à 30 trs.min^{-1} , condition ayant été identifiée comme favorable à l'agrégation (voir paragraphe 3.1.3). L'analyse a été effectuée sur deux répliquas biologiques et sur au moins deux agrégats de chaque répliqua. $10 \mu\text{L}$ de solution ont été déposés entre deux fenêtres de silice fondue (Esco Optics) en utilisant un espaceur en Parafilm. Le système est placé dans une chambre cellulaire Attofluor (ThermoFisher). Les images Raman ($30 \times 30 \mu\text{m}$) centrées sur les agrégats ont été acquises avec une excitation à 532 nm, un objectif à immersion d'huile 100x (NA 1,3), une grille de $600 \text{ lignes.mm}^{-1}$, une puissance du laser de 10 mW, un temps d'exposition de 0,2 s et un pas de $0,3 \mu\text{m}$. Les images en champ clair correspondantes ont été prises en mode réflexion avec le même objectif.

Les spectres Raman des solutions d'EPL à $0,1$ et 25 g.L^{-1} ont été mesurés avant et après agitation avec un laser de 10 mW, 5 s d'exposition et 10 accumulations. Au minimum, 5 spectres ont été mesurés et moyennés pour chaque échantillon. Il n'a pas été observé de modification spectrale suite à l'accumulation de mesures sur une même zone, il n'y a donc pas de dégradation de l'échantillon sous faisceau dans nos conditions d'analyse.

Les données ont été traitées à l'aide du logiciel WITec Project Five et les rayons cosmiques ont été supprimés manuellement. Le fond a été soustrait avec la fonction Shape. Les images ont été obtenues en générant automatiquement les composantes spectrales à l'aide de la fonction True Component Analysis et la moyenne des spectres Raman de chaque composante a été extraite. Les images Raman et en champ clair ont été exportées sur le logiciel Fiji.

Les images et spectres ont été acquis par Florent Saudrais en collaboration avec Stéphanie Devineau.

2.1.3.2. Protéomique

La protéomique permet de connaître la composition protéique d'un échantillon pouvant être complexe. Les techniques récentes permettent d'identifier plusieurs milliers de protéines dans un mélange.

Deux séries d'expériences ont été réalisées avec l'extrait protéique de levure pour identifier les protéines impactées (i) par l'agitation dans différents types de tubes et, (ii) par le contact avec des microplastiques (MP). Les expériences de protéomique ont été réalisées sur la Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest (PAPPSO) à l'INRAE. Elles ont permis d'identifier les protéines en solution et d'estimer leur quantité. Les échantillons d'extraits protéiques de levure ont été déposés sur gels de polyacrylamide 1D SDS-PAGE à volume ou à masse identique selon l'expérience. Les protéines ont ensuite été séparées par migration courte. Un protocole classique de digestion a été appliqué.²³ Les échantillons ont été analysés par LC-MS/MS (chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse) avec un spectromètre de masse Orbitrap Fusion Lumos Tibrid (Thermo Scientific). L'identification des protéines a été effectuée à partir de la base de données correspondant à la souche S288c de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (6750 entrées, version 2020).²⁴

Protéines perdues sous agitation dans des tubes

Dans les différents types de tubes (présentés dans le paragraphe 2.1.4 : polypropylène, verre, Téflon et LoBind) une solution d'EPL a été introduite à 0,25 g.L⁻¹ en tampon phosphate 100 mM, pH7 avec un taux de remplissage du tube de 60%. La concentration a été choisie pour être dans des conditions optimales de détection et de quantification des protéines.²⁵ Les échantillons ont été agités durant 24 h à 3 trs.min⁻¹ et 6°C.

Pour cette série d'expériences, une quantification semi-absolue a pu être obtenue à partir d'une méthode adaptée de Millán-Oropeza *et al.*²⁵ Les quantifications en dessous de 5 fmol ne sont pas considérées comme fiables. Les variations d'abondance de protéines ont été obtenues en comparaison avec un échantillon de référence exposé à un tube en polypropylène mais non agité (perte négligeable de protéines après 24 h au repos). Les données ont été déposées sur la plateforme ProteomeXchange via le partenaire de dépôt PRIDE, sous l'identifiant PXD038266.²⁶

Protéines perdues suite au contact avec des microplastiques

Dans les tubes en polypropylène, des solutions d'EPL à 0,5 g.L⁻¹ ont été introduites en tampon phosphate 100 mM, pH7 avec quatre types différents de microplastiques à 10 g.L⁻¹ : polypropylène, polyéthylène, polypropylène vieilli et polyéthylène vieilli (protocole de vieillissement artificiel expliqué dans le paragraphe 2.2). Ces échantillons ont été agités durant 4 h sur roue à 3 trs.min⁻¹ et à 6°C (stratégie expérimentale détaillée dans le paragraphe 4.2.1). Après centrifugation, les microplastiques, moins denses que l'eau, remontent en surface et la

partie sous-nageante de l'échantillon est récoltée pour être analysée, directement via le fond du tube.

Pour cette série d'expériences, nous avons raisonné à partir de comptages de spectres : le nombre total de spectres de peptides associés à une protéine donnée est calculé.²⁷ Cette méthode ne permet pas de générer des données quantitatives mais elle est suffisante pour comparer des abondances au sein d'un échantillon.

Analyse bio-informatique

L'analyse bio-informatique a été réalisée en collaboration avec Jean-Christophe Aude. Les conditions d'analyse spécifiques sont détaillées respectivement dans les paragraphes 3.4 et 4.4.

Tests statistiques

De nombreuses protéines ont été détectées et, pour ne sélectionner que celles dont l'abondance varie de manière significative entre les échantillons et le contrôle, des filtres ont été appliqués. Parmi ces filtres, le facteur bayésien (BF) a été utilisé. Ce facteur permet d'établir une préférence, à priori, entre l'hypothèse nulle ou une alternative définie.²⁸ En fonction de la valeur du BF, la preuve est anecdotique ($BF > 1$) modérée ($BF > 3$) ou forte ($BF > 10$). Contrairement aux tests statistiques généralement appliqués, le facteur bayésien présente l'avantage de pouvoir apporter une preuve que l'hypothèse nulle est vérifiée.²⁸

Puisque les données semi-quantitatives sont plus fiables que les données utilisant les comptages de spectres, nous avons choisi d'utiliser des facteurs bayésiens différents. Pour l'étude des protéines perdues sous agitation dans des tubes, nous avons sélectionné les protéines ayant un $BF > 1$ et pour l'étude portant sur les microplastiques, celles dont le BF est supérieur à 10.

Analyse des paramètres physico-chimiques

Des analyses bio-informatiques ont également été réalisées dans le but de comprendre comment les protéines s'adsorbent sur des matériaux plastiques. Les structures secondaires et paramètres physico-chimiques associés aux protéines déplétées suite au contact avec des MP ont été déterminés à partir de la séquence primaire des protéines. La liste des paramètres est présentée en annexe A.3.3.

2.1.3.3. Gels de polyacrylamide dénaturants

Nous avons également réalisé des gels dénaturants d'acrylamide (SDS page) plus simples à mettre en œuvre et à analyser. Cette méthode a été développée par Laemmli.²⁹ Deux gels sont coulés l'un au-dessus de l'autre. Les protéines traversent d'abord un gel de concentration (« stacking gel ») ayant un maillage large permettant de les concentrer sur un front de migration, puis un gel de séparation (« running gel »), où elles sont séparées en fonction de leur taille.

La composition du gel est déterminée en fonction de l'échantillon à analyser. Les protéines de levure sont pour la majorité comprises entre 40 et 70 kDa, nous avons donc choisi de faire le gel

à 10% d'acrylamide et 0,265% de bis acrylamide (10 à 170 kDa avec une bonne résolution de 10 à 70 kDa).³⁰

Deux cultures cellulaires ont été nécessaires à la réalisation de l'ensemble des expériences. Des gels ont été effectués afin d'identifier si, globalement, la composition protéique varie de manière significative entre les deux cultures. La figure 2.10 présente ces gels à deux volumes de dépôt (10 et 20 µg). L'absence de variation en termes d'intensité ou de position des bandes indique que les protéines les plus abondantes sont représentées de manière similaire dans les deux cultures.

Les protéines issues de la seconde culture ont été utilisées pour les expériences avec les nanoparticules de polyéthylène (voir paragraphe 2.3.2). L'ensemble des autres expériences ont été menées avec les protéines de la première culture.

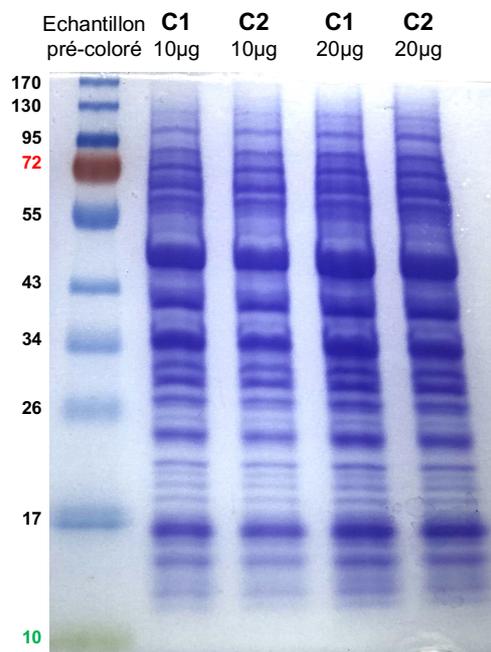


Figure 2.10. Gel de polyacrylamide dénaturant réalisé à partir de deux extraits protéiques issus de cultures différentes (C1 et C2) à deux quantités de dépôt différentes (10 et 20 µg par puits). L'échantillon pré-coloré (à gauche) est utilisé comme référence pour connaître la masse des protéines (les valeurs à gauche sont en kDa).

Une autre série de gels a été réalisée afin pour un suivi dynamique de la composition protéique d'un échantillon au cours de son agitation dans des tubes en polypropylène. Les différents échantillons et les résultats sont présentés dans le paragraphe 3.5.

2.1.4. Évaluation des pertes de protéines

Nous avons mis au point une méthode visant à évaluer les quantités de protéines impactées (adsorption/agrégation) par les matériaux étudiés. Toutes les expériences ont été réalisées en tampon phosphate (100 mM, pH7) et en chambre froide (6°C). Trois répliquas biologiques et trois répliquas techniques ont été préparés, soit un total de 9 échantillons. La concentration de chaque échantillon a été mesurée 3 fois. Au total, 27 mesures ont été effectuées par condition. Les solutions de protéines ont été agitées sur une roue ayant un diamètre de 25 cm à une vitesse contrôlée. Des échantillons de référence ont été préparés dans les mêmes conditions mais n'ont pas été soumis à l'agitation. Le pourcentage de perte de protéines est calculé à partir de la concentration avant et après agitation.

- **L'effet de la nature du tube** a été étudié à $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de protéines. Le volume de liquide correspond à 60% du volume total des tubes. Quatre matériaux ont été comparés : polypropylène (PP), verre, Téflon et LoBind (Tableau 2.1). Ils possèdent un bouchon dans le même matériau, sauf pour le verre dont le bouchon a un revêtement en Téflon. Les solutions de protéines ont été agitées à 3 trs.min^{-1} durant 24 h.

Matériau	Polypropylène	Verre	Téflon™	LoBind™
Photographie				
Marque	Fisherbrand	Pyrex	Thermo Scientific	Eppendorf
Référence	11849650	10044604	3114-0050	0030108302
Volume total (mL)	16,4	9	43	6,2
Surface interne (cm ²)	50	23	85	34

Tableau 2.1. Caractéristiques des différents types de tubes utilisés pour les expériences.

- **L'effet de la vitesse** a été étudié avec une solution d'EPL de 10 mL à 0,1 g.L⁻¹ dans des tubes en PP agités à une vitesse constante de 0, 3 et 30 trs.min⁻¹ durant 24 h.
- **L'effet de la concentration** protéique a été étudié avec une solution d'EPL de 10 mL dans des tubes en PP agités 4 h. Ces échantillons correspondent aux références sans microplastiques pour l'étude de l'adsorption des protéines sur les microplastiques avec mise en contact de 4 h (voir paragraphe 4.2.1.2). La concentration initiale varie entre 0,01 et 0,5 g.L⁻¹.
- **L'effet du volume de solution/d'air** a été étudié avec une solution d'EPL à 0,1 g.L⁻¹ dans des tubes en PP agités 24 h. Cinq volumes de solution ont été comparés : 1, 3, 10, 12,5 et 15 mL, correspondant respectivement à 6, 18, 61, 76 et 91% du volume total des tubes. Les interfaces nécessaires à l'interprétation ont été mesurées de différentes manières. Des calculs de segments circulaires ont été réalisés pour les interfaces air/liquide et solide/liquide des échantillons contenant 1 et 15 mL de solution. Des mesures, directement sur les tubes, par analyses d'images, ont été effectuées dans le cas de la triple interface air/liquide/solide et des interfaces air/liquide et solide/liquide pour les autres volumes (le ménisque peut être négligé). Les valeurs minimales et maximales ont été calculées et correspondent aux différentes positions du tube au cours du mélange (vertical ou horizontal).
- **L'effet du séchage** a été étudié par des expériences de dip-coating. Une membrane poreuse en polypropylène tissé de 1 cm x 1 cm, préparée à partir d'un filtre pour seringue (0,45 µm, Puradisc 25 PP, référence 6788-2504, Whatman), a été immergée puis retirée périodiquement d'une solution de 5 mL d'EPL à 0,1 g.L⁻¹ à l'aide d'un dip-coater (DC, KSV). Les solutions sont contenues dans des creusets en céramique. La vitesse est de 170 cm.mm⁻¹ (régime de drainage)³¹ avec une pause de 20 s entre chaque immersion et retrait pour avoir la même périodicité que pour les expériences sur roue (trois cycles par minute). La concentration de protéines en solution a été déterminée à partir de l'absorbance à 205 nm avant et après 24 h d'expérience. Ces études ont nécessité de travailler à température ambiante puisqu'il est impossible de placer le dip-coater en chambre froide.



Figure 2.11. Système de dip-coating permettant de réaliser trois expériences simultanées à fort taux d'humidité (les flacons contiennent 10 mL d'eau). Dispositif mis au point par Florent Saudrais.

De nombreux essais ont été réalisés et ont mené à une optimisation des conditions. Sur la durée de l'expérience et à température ambiante, une évaporation de la solution de protéines a été observée. Pour pallier à cela, les creusets ont été placés en atmosphère humide : dans des flacons contenant 10 mL d'eau (Figure 2.11). Malgré ces conditions, il persiste une légère évaporation. Des pesées avant et après expérience ont donc été réalisées afin de corriger la concentration.

Aucune différence n'a été observée entre ces conditions et les références sans dip-coating. Notre hypothèse a alors été la suivante : l'absence d'agitation de la solution, contrairement aux échantillons sur roue, induit une faible probabilité de rencontre avec la membrane. Nous avons alors placé les échantillons sous agitation douce à l'aide d'un barreau aimanté afin de créer un flux dans les solutions.

- **L'effet de la mobilité de la surface plastique.** Nous nous sommes demandés s'il y avait une différence entre une surface de plastique libre (mobile) dans la solution et une surface fixe. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé une membrane en polypropylène (présentée dans l'effet du séchage ci-dessus). Dans une solution d'EPL de 10 mL à $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ contenue dans un tube en polypropylène, deux conditions ont été comparées : dans un cas la membrane est laissée libre dans la solution et dans l'autre cas, elle a été fixée au niveau du bouchon. La surface en contact avec la solution protéique est de $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$.

D'autres essais ont été réalisés avec une surface plastique mobile en découpant la membrane en deux et trois morceaux (même quantité de surface au total). Ces résultats ne sont pas présentés car il n'y a pas eu de différences en termes de pertes de protéines par rapport à une surface non découpée.

2.1.5. Désorption des protéines

Un protocole de désorption a été développé pour quantifier les protéines ayant été adsorbées aux parois des tubes. Ce protocole, résumé sur la figure 2.12., consiste à immerger successivement les tubes contenant les solutions de protéines dans deux béchers contenant de grands volumes d'eau (2,5 et 1 L) durant 120 s. La dilution totale de la solution est de $4 \cdot 10^{-6}$. Les protéines sont alors désorbées dans un volume total de 1 mL à 0,1% de dodécylsulfate de sodium (SDS), sous agitation à 3 trs.min^{-1} durant 1 h à température ambiante. La détermination de la concentration est réalisée à partir de l'absorbance à 205 nm. Une correction est appliquée à partir d'une gamme de calibration car le SDS a pour effet de diminuer légèrement l'absorbance à 205 nm (Figure 2.13).

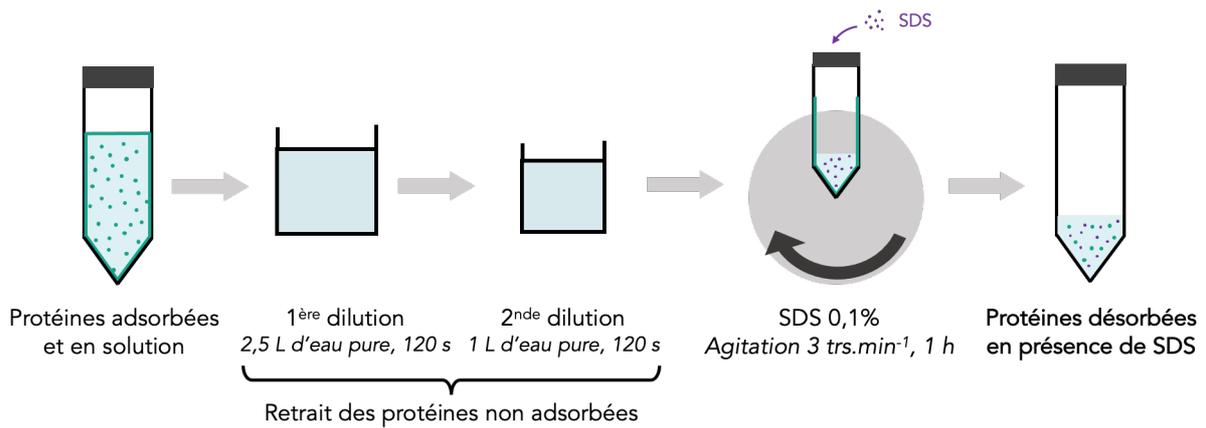


Figure 2.12. Représentation schématique des étapes du protocole de désorption des protéines aux parois des tubes à l'aide de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 0,1%.

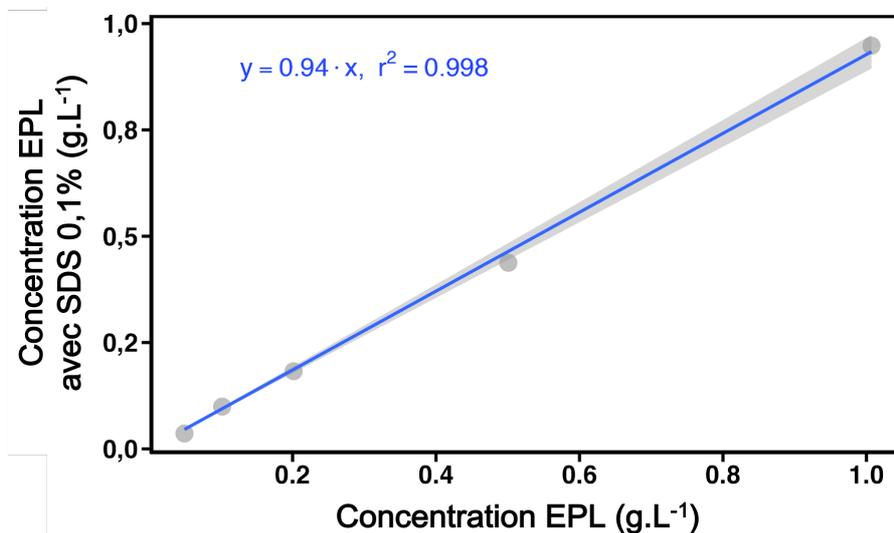


Figure 2.13. Gamme étalon de solutions d'EPL contenant 0,1% de SDS pour la détermination de l'absorbance équivalente sans SDS. Les solutions sont réalisées en tampon phosphate 100 mM, pH7.

La concentration en SDS a été choisie pour être inférieure à la concentration micellaire critique (CMC_{SDS} de l'ordre de $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ à température ambiante soit 0,2% en masse)³². De plus, l'efficacité de désorption a été contrôlée lors d'une étude dynamique de l'adsorption et de la désorption (voir Chapitre 6, figure 6.6).

Ces expériences de désorption ont été réalisées dans le cas des tubes en polypropylène contenant 10 mL d'extrait protéique à 0,1 g.L⁻¹. Trois conditions ont été comparées : i) la solution est introduite et le protocole de désorption est directement appliqué ; ii) la solution est conservée à 6°C durant 24 h au repos ; iii) la solution est agitée doucement à 3 trs.min⁻¹ durant 24 h à 6°C.

2.2. LES MICROPLASTIQUES

Les microplastiques (MP) natifs sont du polyéthylène (PE) et du polypropylène (PP) ayant été donnés par Clariant (références 3610 et 6050M). Pour tenir compte des effets du vieillissement, une étude d'oxydation accélérée a été réalisée par F. Saudrais.³³ Il a été observé que les deux types de MP ne se comportent pas de la même façon, le PE étant nettement plus robuste que le PP. La méthode de vieillissement a donc été adaptée en fonction de la nature des particules. Il s'agit, pour le PP d'un traitement thermique à 80°C durant 60 jours et pour le PE, d'une irradiation de 2 MGy avec un faisceau d'électrons. Ces procédés de vieillissement ont permis d'augmenter la quantité de fonctions carbonyle (rapport des intensités du signal des fonctions carbonyle et du signal des ponts méthylène) présentes dans les particules : PE passage de 0,00 à 0,08 ; PP passage de 0,02 à 0,12. Le suivi a été réalisé par spectroscopie infrarouge (caractérisation des MP paragraphe 4.1).

Un ensemble de caractéristiques ont un impact sur le comportement des particules. Nous avons donc caractérisé les MP natifs et vieillis par différentes techniques dans le but d'obtenir des informations sur leurs propriétés macroscopiques et microscopiques. Les méthodologies appliquées pour chaque technique sont exposées ci-dessous.

2.2.1. Distribution en tailles par microscopie

Les images de microscopie ont été obtenues sur un microscope inversé (Zeiss Observer Z1, ligne DISCO, synchrotron SOLEIL). Les poudres de microplastiques ont été déposées entre deux lamelles de quartz. Une méthode de binarisation des images a été appliquée à l'aide du logiciel Fiji³⁴ pour dissocier les particules du fond. Elle est décrite en détails dans le paragraphe 4.3.2. Les résultats représentent les distributions des diamètres de Féret de 250 particules.

2.2.2. Surface spécifique par diffusion des rayons X aux petits angles

La surface spécifique d'un matériau correspond à sa surface par rapport à une quantité de matière. Elle est généralement exprimée en $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ et indique la quantité de surface susceptible d'interagir avec le milieu. Les surfaces spécifiques de matériaux pulvérulents peuvent être déterminées à partir de la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).

L'appareil utilisé est un Xeuss 2.0 (Xenocs) dans la configuration suivante : source des rayons X en cuivre, sous vide, distance échantillon/détecteur de 2,5 m, durée d'acquisition de 3 600 s. Les données présentées correspondent à une moyenne de trois mesures sur des poudres sèches. Les poudres sont placées dans une rondelle, entre deux morceaux de scotch Kapton, sans

compression particulière. Les courbes ont été corrigées par l'épaisseur équivalente e des échantillons, calculée à partir de la transmission des rayons X vers l'avant et l'équation 2.5.

$$e = \frac{-\ln(T)}{\mu} \quad \text{Eq. 2.5}$$

Avec T la transmission (flux transmis par l'échantillon/flux transmis de la référence sans poudre, dans une cellule ayant des fenêtres en Kapton) et μ le coefficient d'absorption linéique du matériau, calculé par le logiciel PySAXS à partir de la composition chimique du monomère et de la masse volumique de la poudre (information donnée par le fournisseur). Les surfaces poreuses en polypropylène, présentées dans le paragraphe 2.1.4, ont également été étudiées. Les données des poudres de polypropylène ont été utilisées pour la détermination de la surface spécifique.

En représentant les données avec Iq^4 en fonction de q , un plateau est obtenu pour les faibles valeurs de q . Ce plateau est représentatif de l'enveloppe des grains. A partir de l'intensité au niveau du plateau (notée $\lim_{q \rightarrow 0}(Iq^4)$), la valeur de la surface spécifique (σ_m) peut être déterminée à partir de l'équation 2.6.

$$\sigma_m = \frac{\lim_{q \rightarrow 0}(Iq^4)}{2\pi \rho_m (\Delta\rho b)^2} \quad \text{Eq. 2.6}$$

Avec $\Delta\rho b$ la densité de longueur de diffusion respectivement $9,4 \cdot 10^{10}$ et $8,7 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ pour le PE et le PP, déterminés à partir de la densité et de la formule chimique du monomère par le logiciel PySAXS, calculant la densité volumique d'électrons interagissant avec les rayons X) et ρ_m la masse volumique (respectivement $0,97$ et $0,90 \text{ g.cm}^{-3}$ pour le PE et le PP)

2.2.3. Chimie de surface par spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X

La spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) donne des informations sur la composition chimique en surface des matériaux (jusqu'à 10 nm de profondeur³⁵). Les mesures d'XPS ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Kratos Axis Ultra DLD avec une excitation monochromatique Al K α (1486,7 eV) et un système de compensation de charge. Les spectres rapides ont été acquis à une énergie de passage de 160 eV et les spectres de haute résolution à une énergie de passage de 40 eV. L'échelle des énergies de liaison a été calibrée sur le carbone 1s à 284,8 eV. Les données ont été traitées avec le logiciel CasaXPS pour calculer les densités surfaciques en pourcentages atomiques. Les spectres ont été traités comme dans ³⁶. Les expériences ont été réalisées par Jocelyne Leroy.

2.2.4. Composition

2.2.4.1. Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge a permis d'obtenir des informations sur la composition des microplastiques natifs et vieillis. Ces mesures ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Bruker Tensor 27 IR et un accessoire ATR (Réflectance Totale Atténuée) Specac Golden Gate permettant de presser les poudres avec un cône diamant. 128 scans ont été mesurés de 500 à 5000 cm^{-1} avec une résolution de 1 cm^{-1} et une vitesse de balayage de 10 kHz. Une correction de la ligne de base a été effectuée (correction élastique concave du logiciel OPUS, 20 itérations, 20 points). Ces expériences ont été réalisées par Florent Saudrais.

2.2.4.2. Calorimétrie différentielle à balayage

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) apporte des informations sur la composition et la structure des polymères. L'appareil utilisé est une DSC25 (série Discovery, TA Instruments). Ces mesures ont été réalisées par Guillaume Brotons.

Les poudres de microplastiques ont été placées dans des creusets en aluminium inerte fin (fermés par une capsule), contenant une masse d'environ 8 mg (valeur précise au dixième de milligramme utilisées pour le traitement des données de chaque mesure). Deux cycles comprenant une montée et une descente en température ont été réalisés, de -50 à 180°C. Lors de la première montée, la réponse du système correspond à celle d'un état microparticulaire. A 180°C, les particules ont dépassé leur point de fusion, le second cycle correspond donc à l'étude du plastique à l'état de bulk.

Différentes vitesses de chauffe ont été comparées : 1, 5 et 20 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$. Les données présentées correspondent à la vitesse intermédiaire de 5 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$. La vitesse de refroidissement est de 20 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$.

2.2.4.3. Imagerie Raman multispectrale

L'imagerie par spectroscopie Raman permet d'obtenir des informations sur la composition et la structure de composés. A l'échelle d'une particule, il est possible de savoir s'il y a des domaines ayant des structures cristallines légèrement différentes ou ayant des orientations significativement différentes.

Les microplastiques ont été imagés par microscopie confocale Raman à l'aide d'un appareil WITec alpha300 RA instrument (Oxford Instruments). Ils ont été déposés sur des substrats en CaF_2 (ESCO Optics). Les images de 30 x 30 μm ont été acquises avec une excitation à 532 nm, un objectif à immersion d'huile 100x (NA 0,9), une grille de 600 $\text{g}.\text{mm}^{-2}$, une puissance du laser de 10 mW, un temps d'exposition de 0,2 s et un pas de 0,3 μm . Les images en champ clair correspondantes ont été prises en mode réflexion avec le même objectif. L'absence de dégradation de l'échantillon

sous faisceau a été contrôlée en accumulant des spectres sur la même zone durant 50 s à la même puissance. Les rayons cosmiques ont été retirés automatiquement et manuellement. Le fond a été soustrait avec la fonction Shape. Les images ont été obtenues en générant automatiquement les composantes spectrales à l'aide de la fonction True Component Analysis et la moyenne des spectres Raman de chaque composante a été extraite. Les images Raman et en champ clair ont été exportées sur le logiciel Fiji. Les images ont été acquises par Florent Saudrais en collaboration avec Stéphanie Devineau.

2.2.4.4. Diffraction des rayons X

Les spectres de diffraction des rayons X des poudres de microplastiques ont été réalisés à l'aide d'un diffractomètre Empyrean DY1534 (Panalytical). Cette technique permet d'obtenir des informations sur la structure cristalline et/ou amorphe des polymères.

Les mesures ont été réalisées à 40 kV et 30 mA (mode détecteur linéaire PIXcel intégrant en mouvement continu) par Guillaume Brotons sur la plateforme « Diffraction et Diffusion des Rayons X » de l'IMMM (Le Mans) suivant les protocoles de mesures classiques à la géométrie sur poudre « Bragg-Brentano » (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).

2.2.4.5. Spectroscopie de fluorescence

Le PE et le PP, constitués uniquement de liaisons C-C et C-H, n'ont théoriquement pas de propriétés de fluorescence. Lors du vieillissement et de l'oxydation, la structure chimique des polymères peut être modifiée et éventuellement induire un signal en fluorescence. Des modifications de fluorescence apportent donc des informations sur la chimie des particules.

Un fluorimètre (Horiba, Fluoromax-4) a été utilisé pour la réalisation des spectres de fluorescence 3D des microplastiques. Les poudres ont été placées dans une cuve en quartz. En excitation, une gamme de 200 à 400 nm a été balayée et en émission, une gamme de 200 à 800 nm, avec un pas de 2 nm.

2.3. LES PARTICULES DE PLASTIQUES RECOUVERTES DE PROTEINES

2.3.1. Microplastiques

2.3.1.1. Isothermes d'adsorption

L'adsorption est définie comme l'augmentation en concentration d'une substance à l'interface entre une phase condensée et une phase liquide par des forces de surface.³⁷ A l'origine, les isothermes d'adsorption ont été mis au point dans le cas de l'adsorption de gaz.³⁸ Ils permettent de représenter la quantité de molécules adsorbées par unité de surface solide disponible en fonction de la concentration en molécules libres. Ils sont maintenant couramment utilisés pour tous les types de molécules, y compris les protéines.³⁹

De nombreux modèles existent pour tenir compte de l'adsorption de composés sur des surfaces (Figure 2.14). Ajusté aux données, le modèle peut apporter des informations précises sur l'organisation des protéines (monocouche, multicouche), sur la surface (homogénéité, rugosité) et sur les paramètres de l'adsorption (pour les plus simples il s'agit de la constante d'adsorption et de la masse maximale adsorbée).⁴⁰

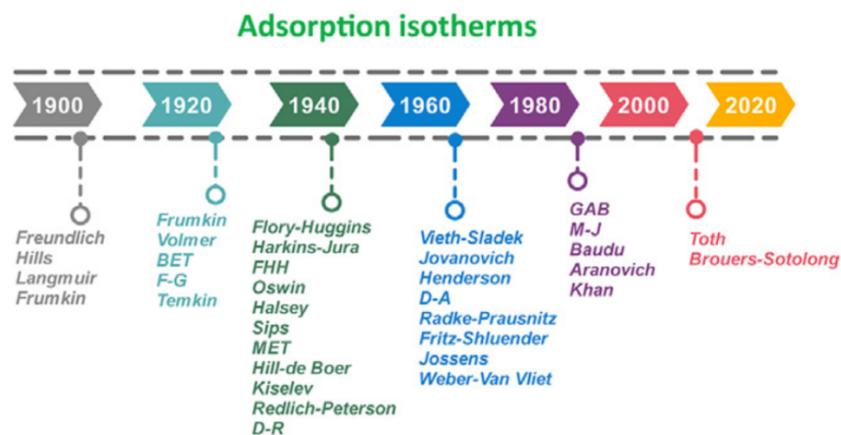


Figure 2.14. Différents modèles d'isothermes d'adsorption (Adapté de ⁴⁰).

Dans le modèle de Langmuir (équation 2.7), les hypothèses sont les suivantes : la surface est uniforme, il y a un équilibre entre les molécules adsorbées et les molécules libres (l'adsorption est réversible), il n'y a pas d'interactions latérales entre les molécules adsorbées et les protéines s'organisent en monocouche.⁴¹ Un plateau est attendu aux fortes concentrations protéiques, caractérisant la saturation de la surface. (Figure 2.15). Ce modèle est fréquemment utilisé dans le cas des protéines car il donne une bonne qualité d'ajustement et les valeurs des constantes sont réalistes.³⁹

$$m_{\text{ads}} = \frac{m_{\infty} K_{\text{ads}} C}{1 + K_{\text{ads}} C} \quad \text{Eq. 2.7}$$

Avec m_{ads} la masse de protéines adsorbée ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$) à la concentration C de protéines libres ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), m_{∞} la quantité maximale de protéines adsorbées ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$) et K_{ads} la constante d'adsorption, proportionnelle à l'affinité des protéines pour le substrat ($\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$). m_{∞} et K_{ads} sont les grandeurs obtenues suite à l'ajustement par le modèle.

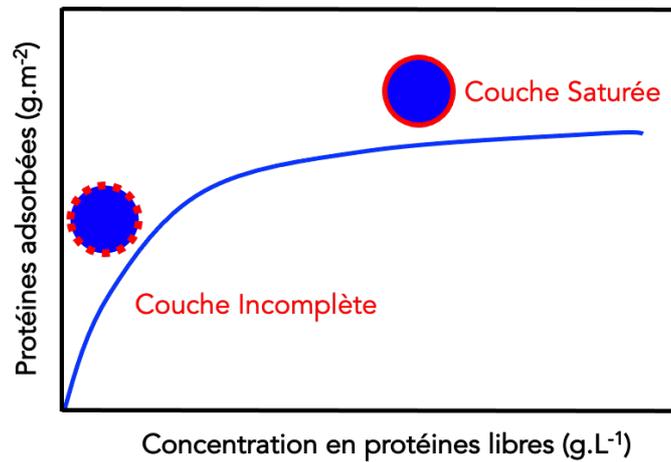


Figure 2.15. Schéma représentant l'allure d'un isotherme d'adsorption de type Langmuir.

Nous avons choisi d'utiliser le modèle de Langmuir pour comparer nos données avec la littérature et parce qu'il est relativement simple (deux paramètres). En effet, compte tenu de la variabilité biologique de l'extrait protéique étudié, nos données sont trop bruitées pour une analyse plus fine qu'apporterait un modèle d'adsorption plus complexe.

Une méthode par déplétion a été appliquée et consiste à calculer la quantité de protéines adsorbées sur les particules. Il s'agit de la différence entre la concentration de protéines en solution d'une référence sans microplastiques et d'un échantillon contenant des microplastiques. Un minimum de six points par isotherme a été réalisé avec une concentration de particules fixée à $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Les valeurs de m_{ads} et K_{ads} ont été estimées à partir du modèle, ainsi que l'écart-type et la t-value. Ce dernier paramètre correspond au rapport de la valeur estimée sur l'écart-type associé. Pour évaluer la qualité de l'ajustement, nous utiliserons la p-value qui lui est associée : au-delà de 0,05 le modèle n'est pas adapté, en dessous, le modèle est adapté, avec une qualité d'ajustement qui augmente lorsque la p-value diminue. Sur les figures, les symboles utilisés sont les suivants :

- p-value > 0,05 : X
- $0,01 < \text{p-value} < 0,05$: *
- $0,001 < \text{p-value} < 0,01$: **
- p-value < 0,001 : ***

2.3.1.2. Charges de surface

En solution, la charge des particules est un paramètre important pour la stabilité colloïdale (voir Annexe A.1). Le potentiel zêta correspond à la charge d'une particule au niveau de la double couche ionique (couche de Stern). La mobilité électrophorétique μ_e peut être calculée avec l'équation 2.8 en mesurant la vitesse de déplacement des particules \vec{v} suite à l'application d'un champ électrique \vec{E} .^{42,43} Dans le cas de particules sphériques, le potentiel zêta (ζ) peut alors être déterminé à partir de l'équation de Henry (équation 2.9).⁴⁴

$$\vec{v} = \mu_e \vec{E} \quad \text{Eq. 2.8}$$

$$\zeta = \frac{3}{2} \frac{\eta}{\epsilon f(\kappa a)} \mu_e \quad \text{Eq. 2.9}$$

Avec η la viscosité de la solution, ϵ la constante diélectrique du milieu et $f(\kappa a)$ une fonction dépendant du diamètre et de la forme de la particule ainsi que de l'épaisseur de la couche de Stern.

Les mesures de potentiel zêta n'ont pas été réalisées sur les microplastiques nus car nous n'avons pas pu les disperser et les maintenir en solution le temps de la mesure. En revanche, des essais ont été effectués sur les microplastiques ayant une corona protéique puisque les particules peuvent être dispersées en solution.

Le protocole appliqué est le suivant : Les MP natifs et vieillis (à 10 g.L⁻¹) ont été mis en contact durant 4 h avec l'extrait protéique de levure en conditions saturante et non saturante (3 trs.min⁻¹ à 6°C). Les suspensions de particules ont été diluées par 10 en tampon phosphate puis analysées à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS (Malvern) : 30 accumulations par mesure et 3 mesures par échantillon.

Les données obtenues ne respectent pas toujours les critères de qualité de l'appareil (variabilité au cours de la mesure, rapport signal sur bruit). Dans le cas du polypropylène natif et du polypropylène vieilli, aucune donnée n'est exploitable. Cela est probablement dû au manque de stabilité de ces particules en solution. Dans le cas du polyéthylène (natif et vieilli), les données semblent de meilleure qualité (deux mesures sur trois sont exploitables). Nous ne discuterons donc que des données relatives au PE et PEV.

2.3.1.3. Cinétique de crémage

Les dispersions de particules solides en solution sont métastables, donc évoluent jusqu'à atteindre un état avec énergie libre minimale.⁴⁵ Cela résulte en une séparation de phases avec, dans le cas de particules moins denses que la solution, un phénomène de crémage. Un Turbiscan LAB (Formulation) a été utilisé pour réaliser des cinétiques de crémage. Un faisceau laser scan verticalement l'échantillon et deux détecteurs positionnés à 180° et 45° mesurent respectivement la transmission et la rétrodiffusion à des intervalles de temps réguliers.⁴⁶

L'augmentation de la transmission est liée à un moins grand nombre de particules en solution (Figure 2.16). Cela permet une observation qualitative des phénomènes de déstabilisation.

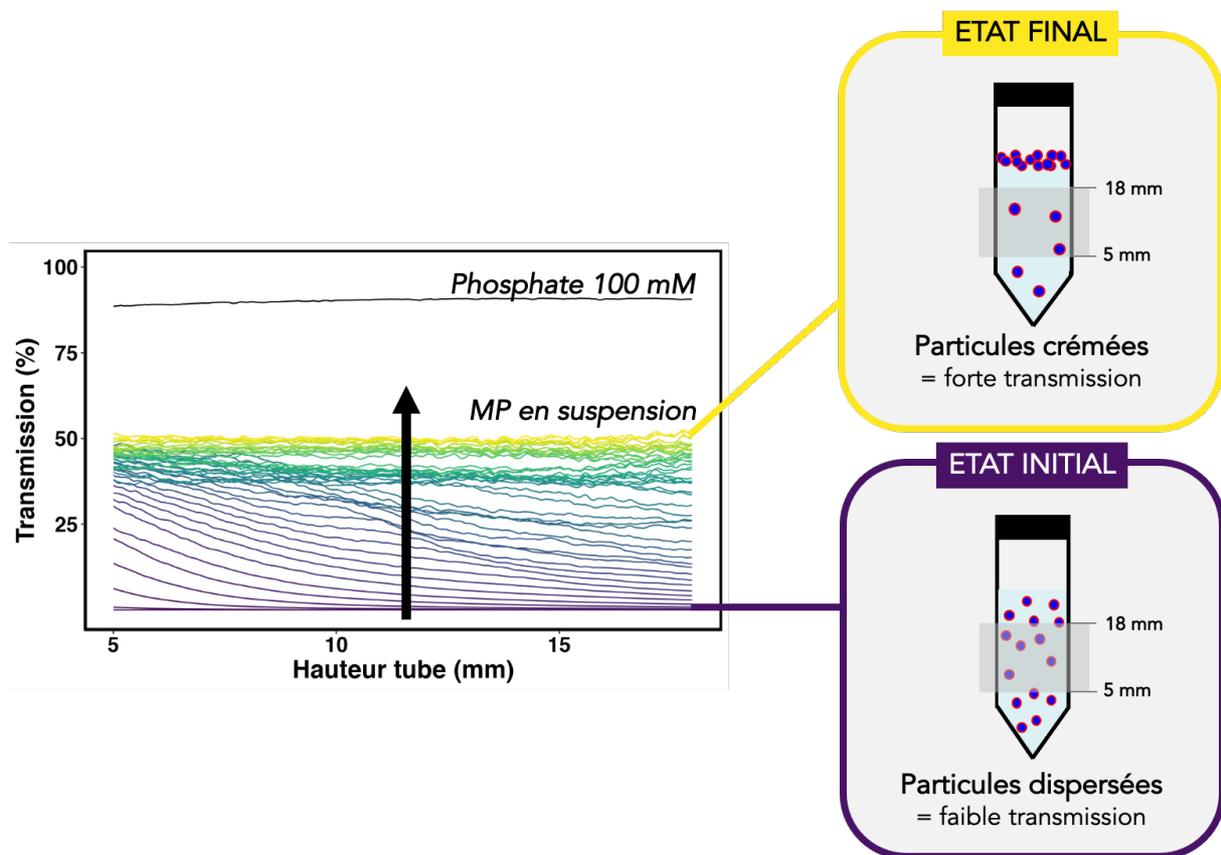


Figure 2.16. A gauche : représentation de l'évolution de la transmission d'un échantillon. Le pourcentage de lumière transmise à travers l'échantillon est représenté en fonction de la hauteur du tube à intervalle de temps réguliers (une courbe toutes les 30 min). L'augmentation de la transmission au milieu du tube est caractéristique d'une séparation de phase, correspondant ici au crémage des particules. Données obtenues à l'aide d'un analyseur de turbidité (Turbiscan, Formulation). A droite : schémas représentent l'état de dispersion du système à l'état initial et après 24 h au repos.

Les MP (à 10 g.L^{-1}) ont été introduits dans des tubes en polypropylène contenant 10 mL de solution de protéines. Après homogénéisation durant 4 h à 3 trs.min^{-1} et à 6°C , les solutions sont transvasées dans les tubes d'analyse. L'analyse est réalisée durant 24 h à raison d'une mesure toutes les 30 min. Les valeurs de transmission de la lumière ont été moyennées sur la hauteur de l'échantillon (5 à 18 mm). Les cinétiques de crémage représentent l'évolution de ces valeurs en fonction du temps.

L'analyse des données de rétrodiffusion est plus complexe. Différents comportements ont été observés dans le cadre de ces expériences. Une diminution de la rétrodiffusion au cours du temps a par exemple été observée. Il a déjà été reporté que ce phénomène peut être associé à l'agrégation de particules et/ou à la clarification de la solution (possiblement à cause du crémage des particules), comme illustré sur la Figure 2.17.^{47,48}

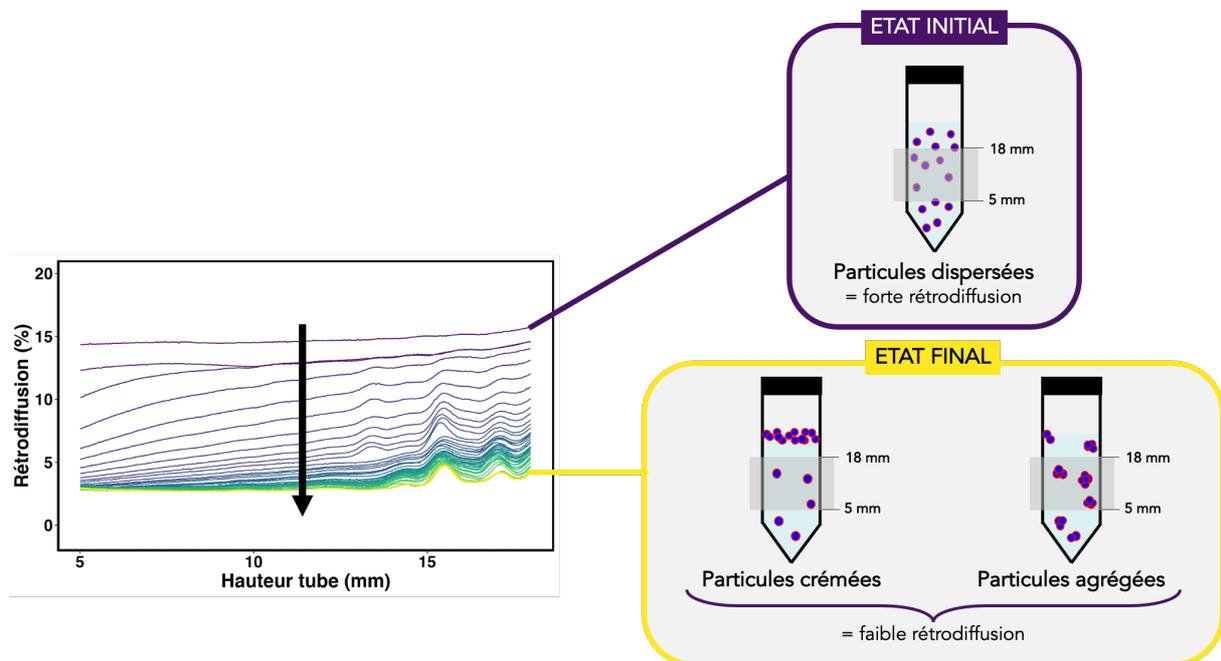


Figure 2.17. A gauche : représentation de l'évolution de la rétrodiffusion d'un échantillon. Le pourcentage de lumière rétrodiffusée par l'échantillon est représenté en fonction de la hauteur du tube à intervalle de temps réguliers (une courbe toutes les 30 min). La diminution de la rétrodiffusion est caractéristique d'un éclaircissement de la solution pouvant être due à un déphasage ou à de l'agrégation. Données obtenues à l'aide d'un analyseur de turbidité (Turbiscan, Formulacion). A droite : schémas représentent l'état de dispersion du système à l'état initial et après 24 h au repos.

2.3.1.4. Comptage de particules

Les données de turbidité sont utiles pour un suivi cinétique global des échantillons mais ne permettent pas de connaître la quantité de particules en solution à un instant donné. Pour obtenir des informations quantitatives, un protocole original a été mis au point dans le cadre de ce travail.

Pour déterminer la concentration de microplastiques en solution (nombre de particules par unité de volume), des cellules de Kova de 10 μL ont été utilisées. A l'intérieur de ces cellules, il y a 81 cases contenant chacune 0,1 μL (Figure 2.18). Les solutions de microplastiques ont été introduites puis, après stabilisation du système (au minimum 5 min), des images de 5 cases ont été acquises sur deux plans (en solution et en surface). Un microscope digital Dino-Lite à un grossissement x800 a été utilisé pour ces mesures. Le traitement d'images a été réalisé à l'aide du logiciel Fiji.³⁴ Pour être reproductible dans le prélèvement des particules dans la colonne d'eau, les tubes en PP de 15 mL ont été percés au fond, afin de les utiliser comme des ampoules à décanter : les 6 premiers mL sont évacués et le 7^{ème} mL est récupéré pour être analysé.

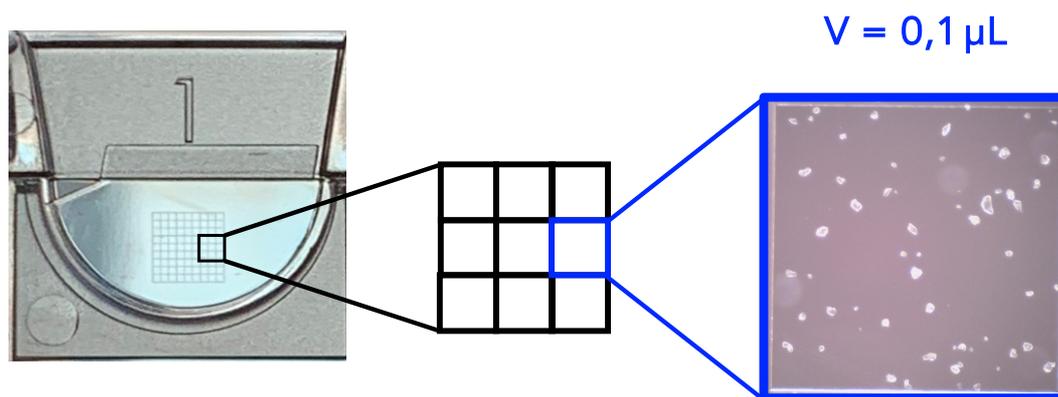


Figure 2.18. Illustration d'une cellule de Kova contenant un quadrillage. Chaque case contient un volume fixe de 0,1 μL , permettant, par comptage de particules de connaître une concentration par unité de volume.

2.3.1.5. Imagerie de fluorescence

Les images de fluorescence ont été acquises sur le microscope TELEMOS (Zeiss Observer Z1 modifié) de la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL. Elles représentent la fluorescence intrinsèque des protéines (principalement tryptophane et tyrosine présents dans l'EPL ou BSA) adsorbées sur des MP de PE et PP. 10 µL de solution sont déposés entre deux lamelles de quartz placées dans une chambre cellulaire Attolfluor (ThermoFisher). Les poudres sont disposées entre deux lamelles de quartz en étalant légèrement avec une spatule pour obtenir un maximum de particules isolées.

L'excitation est réalisée à 265 nm et un filtre dichroïque permet d'observer la fluorescence émise entre 329 à 351 nm. La durée d'excitation est de 30 s pour l'acquisition des images et jusqu'à 2220 s pour l'étude de la perte de fluorescence des protéines sous faisceau (mesure toutes les 50 s). Il s'agit du phénomène de photobleaching.

Le critère de Rayleigh permet de déterminer la résolution maximale théorique (Équation 2.10).⁴⁹

$$r = \frac{0.51 \cdot \lambda}{N.A.} \quad \text{Eq. 2.10}$$

Avec λ la longueur d'onde d'excitation (nm) et N.A. l'ouverture numérique.

L'objectif utilisé est un 100X (Zeiss, Ultrafluor) avec une ouverture numérique de 1,25. La résolution maximale théorique est donc $r = 108 \text{ nm}$.⁵⁰

Des t-test de Student ont été réalisés pour indiquer le caractère significatif ou non des résultats. Pour une p-value inférieure à 0,05, la différence est considérée comme significative.

Un protocole automatisé pour le traitement de ces images a été développé sur le logiciel Fiji³⁴, il est expliqué en détails dans le chapitre 4 (4.3) et les codes sont disponibles en Annexes A.3.2.

2.3.1.6. Spectres de fluorescence

Les spectres de fluorescence des protéines sur les MP ont été acquis sur le microscope POLYPHEME de la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL. Les échantillons sont préparés de la même façon que pour l'imagerie de fluorescence. La longueur d'onde d'excitation est précisée pour chaque spectre. Le temps d'acquisition est de 10 s. Les rayons cosmiques ont été retirés.

2.3.2. Premières expériences sur des nanoplastiques

Dans le cadre d'une collaboration entre Guillaume Brotons et Fabrice Brunel (ANR POEM), nous avons pu faire de premières expériences sur les interactions entre des nanoparticules de polyéthylène et des protéines. Les nanoplastiques utilisés ont été synthétisés par le Laboratoire de Chimie, Catalyse, Polymères et Procédés (C2P2) à l'Université Claude Bernard, Lyon 1.⁵¹ Un amorceur de polymérisation (persulfate d'ammonium, APS) et un tensioactif (dodécylsulfate de sodium, SDS) ont été nécessaires à la synthèse des particules. Les particules obtenues sont du polyéthylène de 20 nm de diamètre en majorité et la concentration massique est de 4% (données fournies par le laboratoire partenaire).

En premier lieu, les plastiques ont été dialysés avec un seuil de 3,5 kDa pour retirer le SDS en excès. Les échantillons ont alors été préparés en tampon phosphate 100 mM à pH7 dans un volume total de 1 mL et agités durant 4 h dans des microtubes de 2 mL en polypropylène à 3 trs.min⁻¹ et à 6°C. En considérant que les NP sont monodisperses, qu'ils sont sphériques et que leur densité est la même que celle des microplastiques (0,97 g.cm⁻³), la quantité introduite correspond à la même quantité de surface que pour les expériences avec les microplastiques (0,25 m²). Ce protocole de préparation d'échantillons est commun aux trois expériences décrites ci-dessous.

Pour la réalisation d'un **isotherme d'adsorption**, suite à la mise en contact, les échantillons ont été centrifugés 10 min à 15000 g. La quantification des protéines en solution a été effectuée par la méthode de Bradford (voir 2.1.1.3).

Des expériences de **diffusion des rayons X aux petits angles** (SAXS) ont été réalisées sur la ligne SWING du synchrotron SOLEIL. Le faisceau synchrotron permet d'acquérir très rapidement des données hautement résolues grâce à une énergie très importante. L'analyse des données a été réalisée par Guillaume Brotons avec Aurélien Thureau (local contact ligne SWING, juillet 2022) suivant les protocoles usuels de la ligne⁵² pour obtenir la diffusion en échelle absolue de l'intensité (cm⁻¹, soit une section efficace différentielle de l'intensité par unité de volume de l'échantillon), après regroupement radial de l'intensité mesurée sur le détecteur 2D ramené à la courbe I(q). Un échantillon de référence (capillaire rempli de tampon phosphate, 100 mM, pH7) a été soustrait aux données.

Puisque les nanoparticules sont dispersées en solution en l'absence de protéines, contrairement aux microplastiques, il est possible de mesurer leur **potentiel zêta** sur tous les points de l'isotherme d'adsorption. Cela permet alors d'identifier si les protéines ont un rôle (favorable ou défavorable) dans la stabilité des nanoplastiques en solution. Suite à la mise en contact, les échantillons ont été dilués par 10 dans le tampon phosphate (pH7, 100 mM) pour la mesure. Trois mesures ont été effectuées par échantillon (nombre d'accumulations déterminé par l'appareil en fonction de la qualité de l'échantillon). Un Zetasizer Nano ZS (Malvern) a été utilisé pour ces expériences.

2.4. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Peters, T. *All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications*, Academic Press.; 1995.
- (2) Whitaker, J. R.; Granum, P. E. An Absolute Method for Protein Determination Based on Difference in Absorbance at 235 and 280 Nm. *Anal. Biochem.* 1980, 109 (1), 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90024-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90024-X).
- (3) Kalb, V., F. Jr.; Bernlohr, R. W. A New Spectrophotometric Assay for Protein in Cell Extracts. *Anal. Biochem.* 1977, 82, 362–371.
- (4) Noble, J. E.; Bailey, M. J. A. Chapter 8 Quantitation of Protein. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2009; Vol. 463, pp 73–95. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63008-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1).
- (5) Groves, W. E.; Davis, F. C.; Sells, B. H. Spectrophotometric Determination of Microgram Quantities of Protein without Nucleic Acid Interference. *Anal. Biochem.* 1968, 195–210.
- (6) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254.
- (7) Anthis, N. J.; Clore, G. M. Sequence-Specific Determination of Protein and Peptide Concentrations by Absorbance at 205 Nm: Sequence-Specific Protein Concentration at 205 Nm. *Protein Sci.* 2013, 22 (6), 851–858. <https://doi.org/10.1002/pro.2253>.
- (8) Scopes, R. K. Measurement of Protein by Spectrophotometry at 205 Nm. *Anal. Biochem.* 1974, No. 59, 277–282.
- (9) Thermo Fisher Scientific. *Quantify Protein and Peptide Preparations at 205 Nm*; AN52774; 2019.
- (10) Parr, C. W. Inhibition of Phosphoglucose Isomerase. *Nature* 1956, 178 (4547), 1401. <https://doi.org/10.1038/1781401b0>.
- (11) Le Neindre, B. Tensions superficielles et interfaciales. *Caractér. Propr. Matière* 1993. <https://doi.org/10.51257/a-v1-k475>.
- (12) Gentes, M.; Rousseaux, G.; Coulet, P.; De Gennes, P.-G. Résolution de l'équation de Young–Laplace par une méthode géométrique utilisant la courbure. *Comptes Rendus Phys.* 2005, 6 (9), 1027–1033. <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2005.11.009>.
- (13) Gassin, P.-M. Mesure de La Tension Superficielle Par La Technique de La Goutte Pendante. *Union Profr. Phys. Chim.* 2014, 108.
- (14) Adamson, A. W.; Gast, A. *Physical Chemistry of Surfaces*, Sixth edition.; John Wiley and Sons, Inc., 1997.
- (15) Vonna, L. Mouillabilité des surfaces superhydrophobes et superoléophobes. *Trait. Métaux* 2017. <https://doi.org/10.51257/a-v1-m1690>.
- (16) Alghunaim, A.; Kirdponpattara, S.; Newby, B. Z. Techniques for Determining Contact Angle and Wettability of Powders. *Powder Technol.* 2016, 287, 201–215. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.10.002>.
- (17) Saleh, K.; Guigon, P. Caractérisation et analyse des poudres - Propriétés comportementales des solides divisés. *Formulation* 2009. <https://doi.org/10.51257/a-v1-j2252>.
- (18) Schillen, K.; Brown, W.; Johnsen, R. M. Micellar Sphere-to-Rod Transition in an Aqueous Triblock Copolymer System. A Dynamic Light Scattering Study of Translational and Rotational Diffusion. *Macromolecules* 1994, 27 (17), 4825–4832. <https://doi.org/10.1021/ma00095a025>.
- (19) Perrault, T. Devenir Des Micro-Nano-Plastiques (MNP) Au Contact Des Membranes Biomimétiques et Protéines. Suivi Par Microscopie 4D (r,t) et Diffusion Des Rayonnements, Le Mans Université, 2023.
- (20) Miller, C. C. The Stokes-Einstein Law for Diffusion in Solution. *R. Soc.* 1924, 724–749. <https://doi.org/doi.org/10.1098/rspa.1924.0100>.
- (21) *Malvern Zetasizer ZS DLS User Manual*; MAN0485 Issue 1.1; 2013.

- (22) Jakeš, J. Regularized Positive Exponential Sum (REPES) Program - A Way of Inverting Laplace Transform Data Obtained by Dynamic Light Scattering. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* 1995, 60 (11), 1781–1797. <https://doi.org/10.1135/cccc19951781>.
- (23) Henry, C.; Haller, L.; Blein-Nicolas, M.; Zivy, M.; Canette, A.; Verbrugghe, M.; Mézange, C.; Boulay, M.; Gardan, R.; Samson, S.; Martin, V.; André-Leroux, G.; Monnet, V. Identification of Hanks-Type Kinase PknB-Specific Targets in the Streptococcus Thermophilus Phosphoproteome. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 1329. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01329>.
- (24) UniProt. <https://www.uniprot.org> (accessed 2022-11-05).
- (25) Millán-Oropeza, A.; Blein-Nicolas, M.; Monnet, V.; Zivy, M.; Henry, C. Comparison of Different Label-Free Techniques for the Semi-Absolute Quantification of Protein Abundance. *Proteomes* 2022, 10 (1), 2. <https://doi.org/10.3390/proteomes10010002>.
- (26) Deutsch, E. W.; Csordas, A.; Sun, Z.; Jarnuczak, A.; Perez-Riverol, Y.; Ternent, T.; Campbell, D. S.; Bernal-Llinares, M.; Okuda, S.; Kawano, S.; Moritz, R. L.; Carver, J. J.; Wang, M.; Ishihama, Y.; Bandeira, N.; Hermjakob, H.; Vizcaíno, J. A. The ProteomeXchange Consortium in 2017: Supporting the Cultural Change in Proteomics Public Data Deposition. *Nucleic Acids Res.* 2017, 45 (D1), D1100–D1106. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw936>.
- (27) Lundgren, D. H.; Hwang, S.-I.; Wu, L.; Han, D. K. Role of Spectral Counting in Quantitative Proteomics. *Expert Rev. Proteomics* 2010, 7 (1), 39–53. <https://doi.org/10.1586/epr.09.69>.
- (28) Rouder, J. N.; Speckman, P. L.; Sun, D.; Morey, R. D.; Iverson, G. Bayesian t Tests for Accepting and Rejecting the Null Hypothesis. *Psychon. Bull. Rev.* 2009, 16 (2), 225–237. <https://doi.org/10.3758/PBR.16.2.225>.
- (29) Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227 (5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- (30) Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder, 2013. <http://www.sibenzyme.com.cn/upload/2018120415260351.pdf>.
- (31) Griffin, J.; O’Kane, M. *Dip Coating: Practical Guide to Theory and Troubleshooting*. Ossila. <https://www.ossila.com/en-eu/pages/dip-coating> (accessed 2022-11-27).
- (32) Hammouda, B. Temperature Effect on the Nanostructure of SDS Micelles in Water. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* 2013, 118, 151. <https://doi.org/10.6028/jres.118.008>.
- (33) Saudrais, F. Physico-Chimie Des Interactions de Plastiques Microstructurés Avec Des Protéines Ou Des Peptides Modèles Par Des Approches Expérimentales et in Silico, Université Paris-Saclay, 2023.
- (34) 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>.
- (35) Gilbert, J. B.; Rubner, M. F.; Cohen, R. E. Depth-Profiling X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) Analysis of Interlayer Diffusion in Polyelectrolyte Multilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013, 110 (17), 6651–6656. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222325110>.
- (36) Bouzakher-Ghomrasni, N.; Taché, O.; Leroy, J.; Feltin, N.; Testard, F.; Chivas-Joly, C. Dimensional Measurement of TiO₂ (Nano) Particles by SAXS and SEM in Powder Form. *Talanta* 2021, 234, 122619. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122619>.
- (37) Inczédy, J.; Lengyel, T.; Ure, A. M. *Compendium of Analytical Nomenclature. Definitive Rules.*, Third edition.; International Union of Pure and Applied Chemistry, 1997.
- (38) 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>.
- (39) Young, B. R.; Pitt, W. G.; Cooper, S. L. Protein Adsorption on Polymeric Biomaterials I. Adsorption Isotherms. *J. Colloid Interface Sci.* 1988, 124 (1), 28–43. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(88\)90321-9](https://doi.org/10.1016/0021-9797(88)90321-9).

- (40) Mozaffari Majd, M.; Kordzadeh-Kermani, V.; Ghalandari, V.; Askari, A.; Sillanpää, M. Adsorption Isotherm Models: A Comprehensive and Systematic Review (2010–2020). *Sci. Total Environ.* 2021, 151334. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151334>.
- (41) Langmuir, I. The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids. Part I. Solids. *J Am Chem Soc* 1916, 38 (11), 2221–2295. <https://doi.org/10.1021/ja02268a002>.
- (42) Clogston, J. D.; Patri, A. K. Chapitre 6. Zeta Potential Measurement. In *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*; Methods in Molecular Biology; 2010; Vol. 697, pp 63–70.
- (43) 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>.
- (44) Hunter, R. J. Chapitre 3. The Calculation of Zeta Potential. In *Zeta Potential in Colloid Science. Principles and Applications*; 1981.
- (45) Everett, D. H. Chapter 2. Why Are Colloidal Dispersions Stable? I Basic Principles. In *Basic Principles of Colloid Science*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1988; pp 16–29. <https://doi.org/10.1039/9781847550200-00016>.
- (46) Mengual, O.; Meunier, G.; Cayre, I.; Puech, K.; Snabre, P. Characterisation of Instability of Concentrated Dispersions by a New Optical Analyser: The TURBISCAN MA 1000. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 1999, 152 (1–2), 111–123. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00680-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00680-3).
- (47) Bongono, J. Caractérisation des suspensions par des méthodes optiques. Modélisation par réseaux de neurones, École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne, Alès, 2010.
- (48) Mengual, O. TURBISCAN MA 2000: Multiple Light Scattering Measurement for Concentrated Emulsion and Suspension Instability Analysis. *Talanta* 1999, 50 (2), 445–456. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00129-0).
- (49) Cogswell, C. J.; Larkin, K. G. *The Specimen Illumination Path and Its Effect on Image Quality*, Pawler, J.B.; Handbook of Biological Confocal Microscopy; Springer Verlag: New York, 1995.
- (50) Jamme, F.; Villette, S.; Giuliani, A.; Rouam, V.; Wien, F.; Lagarde, B.; Réfrégiers, M. Synchrotron UV Fluorescence Microscopy Uncovers New Probes in Cells and Tissues. *Microsc. Microanal.* 2010, 16 (5), 507–514. <https://doi.org/10.1017/S1431927610093852>.
- (51) Brunel, F.; Billuart, G.; Dugas, P.-Y.; Lansalot, M.; Bourgeat-Lami, E.; Monteil, V. Crystallization of Nanodomains in Polyethylene Latexes. *Macromolecules* 2017, 50 (24), 9742–9749. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.7b01930>.
- (52) Thureau, A.; Roblin, P.; Pérez, J. BioSAXS on the SWING Beamline at Synchrotron SOLEIL. *J. Appl. Crystallogr.* 2021, 54, 1698–1710. <https://doi.org/10.1107/S1600576721008736>.

CHAPITRE 3. EFFETS DES SURFACES PLASTIQUES SUR LES PROTEINES EN SOLUTION ET SOUS AGITATION

Le rôle combiné des surfaces et de l'agitation a été encore peu étudié sur le comportement des protéines en solution. Une description mécanistique expliquant les phénomènes d'agrégation est manquante. Nous avons souhaité appréhender les liens entre l'adsorption de protéines sur des surfaces et leur agrégation, ayant de nombreuses conséquences sur les applications médicales, industrielles et un fort impact économique (Figure 3.1).

Dans ce chapitre, les interactions des protéines avec le plastique sous forme macroscopique sont étudiées, dans l'objectif de rendre compte des effets des matériaux en plastique au cours de leur utilisation. La démarche a été d'identifier, pour ensuite déconvoluer les effets des différents paramètres (nature du matériau, de la solution, interface air/liquide et agitation) afin de comprendre leur rôle dans les processus de dégradation des protéines (adsorption/agrégation). Les protéines les plus sensibles aux stress générés par l'agitation et la présence d'interfaces ont été identifiées.

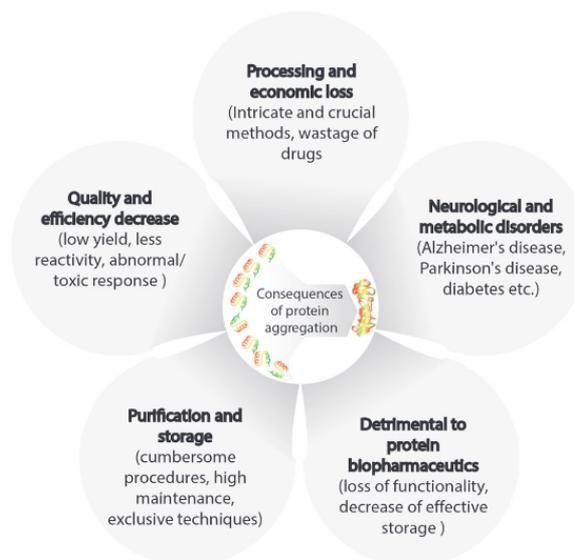


Figure 3.1. Vue d'ensemble de la diversité des conséquences associées à l'agrégation de protéines.¹

CHAPITRE 3. EFFETS DES SURFACES PLASTIQUES SUR LES PROTEINES EN SOLUTION ET SOUS AGITATION.....	85
3.1. OBSERVATION DES PERTES DE PROTEINES.....	89
3.1.1. STRATEGIE EXPERIMENTALE	89
3.1.2. EFFET DES TUBES.....	92
3.1.3. EFFET DE L'ENERGIE ET DE LA PUISSANCE D'AGITATION	95
3.1.4. EFFET DE LA SOLUTION	96
3.1.4.1. Concentration en protéines	96
3.1.4.2. Salinité et pH.....	97
3.1.5. EFFET DES INTERFACES	99
3.2. DEVENIR DES PROTEINES PERDUES	105
3.2.1. ADSORPTION SUR LES PAROIS DES TUBES	105
3.2.2. AGREGATION EN SOLUTION	106
3.3. PROPOSITION D'UN MECANISME DE DESTABILISATION.....	112
3.4. IDENTIFICATION DES PROTEINES PERDUES PAR ANALYSE PROTEOMIQUE	114
3.4.1. STRATEGIE EXPERIMENTALE	114
3.4.2. EFFET DE LA NATURE DU TUBE	115
3.5. VERS UN SUIVI DYNAMIQUE	120
3.5.1. PREMIERS RESULTATS	120
3.5.2. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	123
3.6. POINTS CLEFS ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE.....	124
3.7. BIBLIOGRAPHIE	125

3.1. OBSERVATION DES PERTES DE PROTEINES

3.1.1. Stratégie expérimentale

Des étapes de mélange sont nécessaires pour la mise en œuvre des solutions de protéines, que ce soit pour le développement de biothérapies ou au laboratoire. L'optimisation des protocoles de formulation est essentielle pour la préservation d'un maximum de protéines en solution.²⁻⁵ Les procédés de mélange de solutions de protéines les plus courants sont les suivants :

- Agitateur orbital ou vortex : le mouvement est sur un plan horizontal. La différence entre les deux méthodes vient du diamètre et de la fréquence d'agitation, les forces sont plus importantes dans le cas du vortex.
- Barreau aimanté : l'écoulement du liquide est également sur un axe horizontal. Cette méthode nécessite l'introduction d'une nouvelle surface.
- Agitation sur roue : le mouvement du liquide est sur un axe vertical avec renversement de la solution.

Une étude comparative de ces différentes méthodes d'agitation² a montré, qu'aux maximums d'agitation des appareils étudiés, les taux de cisaillements observés en simulation près des interfaces sont les plus faibles et les plus homogènes dans le cas d'une agitation sur roue (Figure 3.2).

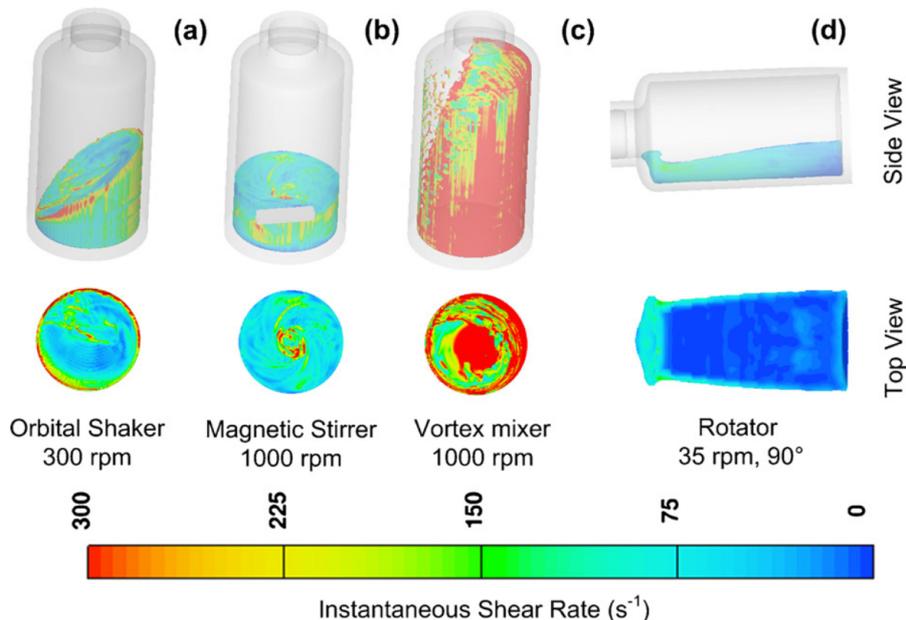


Figure 3.2. Taux de cisaillement instantanés à proximité des interfaces observés dans le cas d'une agitation (a) orbitale à 300 trs.min⁻¹, (b) au barreau aimanté à 1000 trs.min⁻¹, au vortex à trs.min⁻¹ et sur roue à 35 trs.min⁻¹.²

L'interface air/liquide a été identifiée comme ayant un effet important dans la perte des protéines en solution.⁶ L'agitation sur roue, permettant d'homogénéiser les échantillons tout en ayant un effet limité sur les cisaillements aux interfaces, semble être la moins défavorable à la stabilité des protéines. Cependant, la vitesse du flux n'est pas homogène dans l'échantillon, ce qui peut créer des turbulences (Figure 3.3).

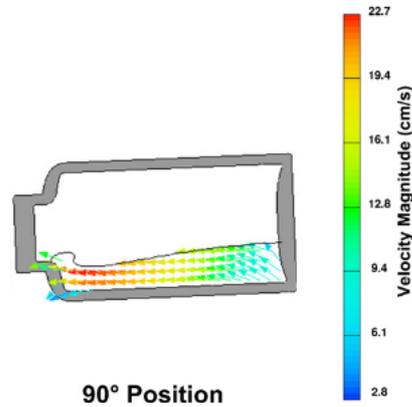


Figure 3.3. Modélisation de l'écoulement d'une solution au cours de son agitation sur roue à 35 trs.min⁻¹.²

Pour comprendre les effets synergiques de l'agitation et des interfaces sur le comportement des protéines, nous avons choisi la méthode d'agitation sur roue (Figure 3.4). Outre le fait qu'elle induise le moins de cisaillements à l'interface air/liquide, elle permet d'estimer ainsi que de contrôler la puissance P en $W.kg^{-1}$ (Équation 3.1) et l'énergie E en $J.kg^{-1}$ (Équation 3.2) apportées au système, des grandeurs souvent complexes à déterminer pour d'autres méthodes. $W_{gravité}$ correspond au travail de la force de gravité (Équation 3.3), exprimé en $kg.m^2.s^{-2}$ (soit en J).

$$P = \frac{W_{gravité} V}{m} \quad \text{Eq. 3.1}$$

$$E = P t \quad \text{Eq. 3.2}$$

$$W_{gravité} = d g m \quad \text{Eq. 3.3}$$

Avec V la vitesse de rotation (nombre de tours de roue par seconde), m la masse en kg, t la durée d'agitation (s), et g la constance d'accélération de la pesanteur ($9,81 m.s^{-2}$) et pour d , nous utilisons le diamètre de la roue (0,25 m).

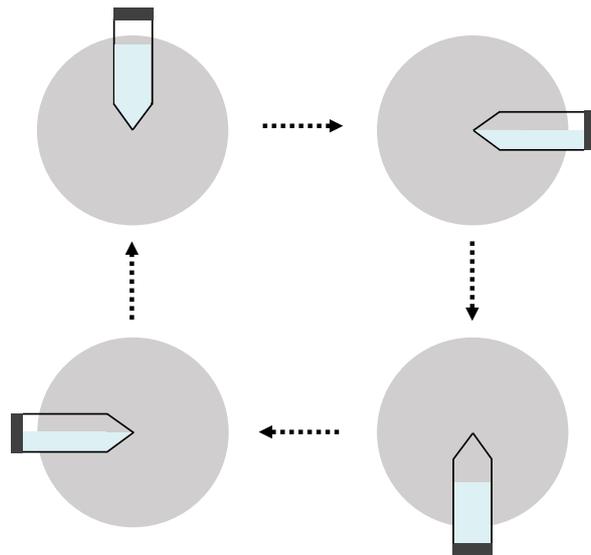


Figure 3.4. Représentation schématique du mouvement du tube contenant une solution de protéines au cours de l'agitation.

Des travaux visant à comprendre les mécanismes de dégradation des protéines au cours de leur mise en œuvre ont été réalisés pour quelques protéines purifiées, mais jamais sur des systèmes plus complexes (paragraphe 1.2.2.1). Pour identifier les protéines les plus sensibles aux stress imposés et tenir compte des effets de compétition, un extrait protéique de levure (EPL) contenant plus de six mille protéines a été utilisé. Cette identification est rendue possible par l'avènement des techniques de protéomique analytique et quantitative.^{7,8}

La stratégie expérimentale que nous avons suivie ici s'appuie sur la décomposition des paramètres du mélange permettant d'identifier ceux étant déterminants dans le devenir des protéines. Nous avons successivement étudié les effets de la nature du tube, de la vitesse d'agitation, de la composition de la solution (concentration protéique, salinité) et des interfaces. D'autres paramètres sont restés fixes car déjà connus pour déstabiliser les protéines (température) ou étant difficile à contrôler (luminosité, gaz en solution). Les expériences ont été réalisées à pH7 (mise à part pour les expériences en eau de mer) à 6 °C et dans le noir. En l'absence de précision, les données sont relatives à 3 répliquas biologiques réalisés indépendamment. Chaque répliqua est constitué de 3 échantillons mesurés 3 fois, soit un total de 27 mesures par condition.

La quantité d'extrait protéique de levure en solution a été déterminée à l'aide d'un NanoDrop One (Thermo Scientific™) à partir de l'absorbance à 205 nm correspondant à l'absorbance de la liaison peptidique (paragraphe 2.1.1.3). La spectroscopie de fluorescence a été utilisée pour mesurer les concentrations d'albumine de sérum bovin (BSA, voir thèse de F. Saudrais⁹).

3.1.2. Effet des tubes

Les protéines sont connues pour s'adsorber rapidement sur des surfaces solides.¹⁰⁻¹² Lorsqu'elles sont dans des tubes, une partie d'entre elles va venir former une couche à l'interface liquide/solide. L'affinité des protéines pour la surface du tube les contenant peut donc être un facteur induisant leur déstabilisation. Les effets de tubes en polypropylène (PP), en verre, en Téflon (polytétrafluoroéthylène, PTFE) et dans un matériau développé pour limiter les interactions avec les protéines (LoBind, fabriqués par Eppendorf) ont été comparés. La concentration d'une solution d'EPL à 0,1 g.L⁻¹ a été mesurée avant et après 24 heures d'agitation à 3 trs.min⁻¹, les résultats sont reportés sur la figure 3.5.

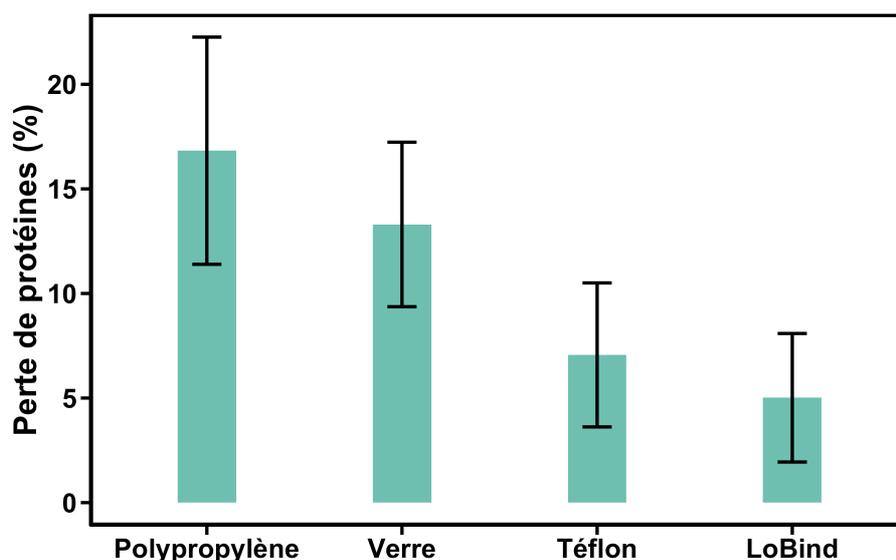


Figure 3.5. Pertes de protéines en % observées après 24 h d'agitation à 3 trs.min⁻¹ à 6 °C d'une solution d'EPL à 0,1 g.L⁻¹ en tampon phosphate 100 mM, pH7. Les tubes sont remplis à 60% de leur capacité volumique.

Des pertes significatives de protéines ont été observées dans toutes les conditions. Elles peuvent difficilement être reliées à l'adsorption des protéines sur les matériaux. Par exemple, dans le cas où le tube est en verre, la quantité de protéines perdues par unité de surface correspond à dix fois la couverture maximale mesurée sur des particules de silice avec le même extrait protéique.¹³ De plus, les pertes sont comparables entre le plastique LoBind (7 ± 3 %), connu et développé pour être défavorable à l'adsorption¹⁴, et le PTFE (5 ± 3 %), attendu pour être très favorable à l'adsorption.^{15,16}

Par ailleurs, il n'a pas été observé de lien direct entre les quantités de protéines perdues et les propriétés interfaciales des solutions de protéines sur les matériaux. En effet, la figure 3.6 présente les angles de contact de gouttes posées sur les différents matériaux et la tendance observée ne suit pas celle des pertes.

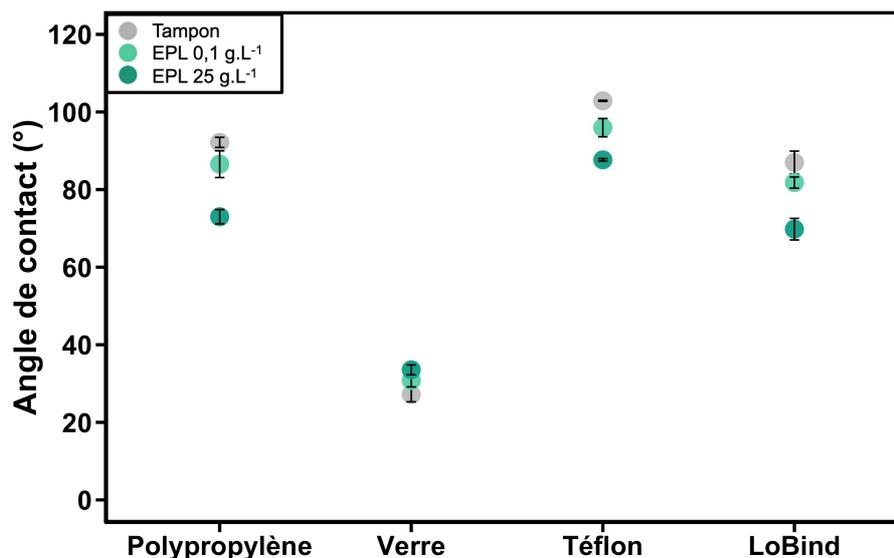


Figure 3.6. Angles de contact du tampon phosphate 100 mM, pH7 (gris) et de solutions d'EPL à 0,1 g.L⁻¹ (vert clair), 25 g.L⁻¹ (vert foncé) sur quatre substrats : polypropylène, verre, Téflon et matériau LoBind.

Nature tube	Perte de protéines (%)
Polypropylène	0-0.5
Verre	0-0.5
Téflon	0-2
LoBind	0-0.5

Tableau 3.1. Pertes d'EPL (%) d'une solution contenant initialement 0,1 g.L⁻¹, pour les quatre matériaux, après 24 h au repos à 6 °C.

Ces observations, associées à l'absence de perte de protéines d'EPL lorsque la solution est au repos (Tableau 3.1), suggèrent que les pertes sont liées à l'interface solide/liquide mais les mécanismes semblent être plus complexes qu'une simple adsorption.

Pour mieux comprendre les stress que les protéines subissent dans nos conditions de mélanges et confronter les résultats obtenus aux données de la littérature, des expériences ont été réalisées avec une protéine modèle très bien connue : l'Albumine de Sérum Bovin (BSA). Il s'agit d'une protéine monomérique transportant différents types de biomolécules et de principes actifs dans le sang. Par sa capacité à se réarranger suite à l'adsorption, elle peut être classée dans la catégorie des « protéines molles ». ¹⁷ Elle forme des agrégats à des taux de cisaillement de l'ordre de 10000 s⁻¹ ¹⁸ et présente une enthalpie de dénaturation de 90 kJ.mol⁻¹. ¹⁹

Les propriétés d'adsorption de la BSA ont été largement étudiées. Puisqu'elle s'adsorbe rapidement et sur de nombreuses surfaces, elle est couramment utilisée dans le cadre de tests

ELISA où elle bloque les sites de liaison résiduels après immobilisation d'antigènes ou d'anticorps, évitant l'adsorption d'autres composés.²⁰⁻²² Elle sert également d'agent de passivation dans des microsystèmes, afin d'éviter l'adsorption, et donc la perte, des composés d'intérêt.²³⁻²⁵

Les pertes de BSA ont été mesurées à l'issue de 24 h en chambre froide, au repos et sous agitation à 3 trs.min⁻¹ (Figure 3.7). Une tendance différente est observée par rapport aux solutions d'EPL : les pertes de protéines sont du même ordre de grandeur avec et sans agitation pour les tubes en PP (3%), Téflon (1%) et LoBind (1-2%). En revanche, un effet très important de l'agitation est observé lorsque la BSA est contenue dans des tubes en verre (surface la plus hydrophile et de charge négative dans certaines conditions), avec une augmentation de 6 à 17% sous agitation.

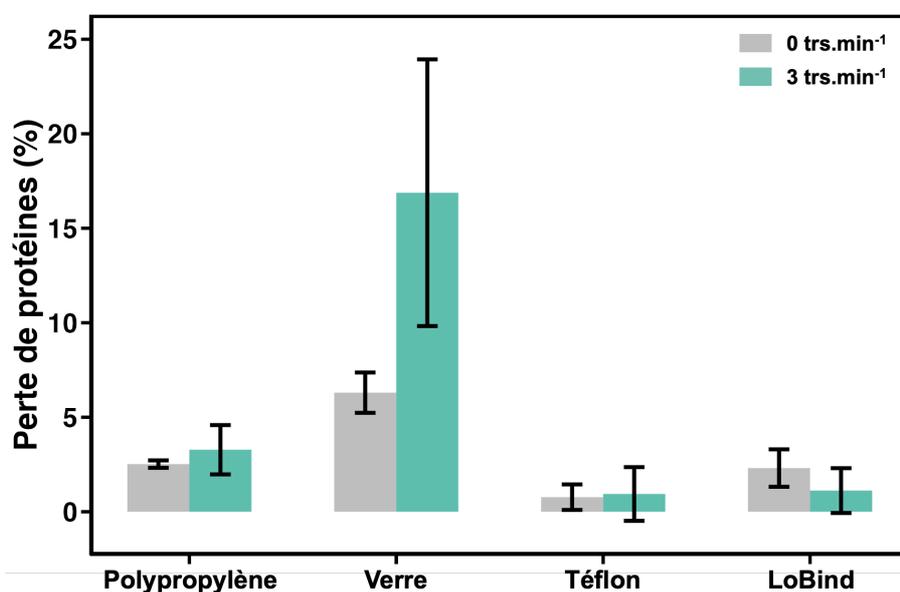


Figure 3.7. Pertes de protéines en % observées après 24 h au repos (gris) ou sous agitation à 3 trs.min⁻¹ (vert) à 6 °C d'une solution de BSA à 0,05 g.L⁻¹ en tampon phosphate 100 mM, pH7. Les tubes sont remplis à 60% de leur capacité volumique.

Dans le cas du PP, les pertes sont plus importantes pour l'EPL que pour la BSA, indiquant qu'il y a dans l'extrait des protéines très sensibles aux stress imposés ici. Puisque les tubes en PP ont un impact très important sur l'EPL, nous avons choisi de les utiliser dans le cadre d'une étude systématique sur les effets de l'agitation. Par ailleurs, il s'agit d'un matériau largement utilisé en laboratoire et pour le conditionnement de médicaments. C'est aussi, pour la suite de notre étude, l'un des plastiques les plus retrouvés dans l'environnement comme polluant.

3.1.3. Effet de l'énergie et de la puissance d'agitation

Dans un premier temps, la variation de la vitesse d'agitation sur une durée fixe de 24 h nous a permis d'étudier les effets de l'énergie appliquée au système. La figure 3.8-A, représentant la proportion de protéines perdues en fonction de l'énergie, montre que la perte peut atteindre 45% pour une énergie de 106 kJ.kg⁻¹. Cela correspond à une puissance de 1,2 W.kg⁻¹ ou encore à une vitesse de 30 trs.min⁻¹.

Nous avons ensuite fait varier la puissance à une énergie fixe de 1,8 kJ.kg⁻¹ (Figure 3.8-B) en modifiant à la fois la vitesse et la durée d'agitation. La quantité de protéines perdues a doublé en passant d'une solution agitée durant 4 h à 3 trs.min⁻¹ (0,12 W.kg⁻¹), à une solution agitée 1 h à 12 trs.min⁻¹ (0,49 W.kg⁻¹).

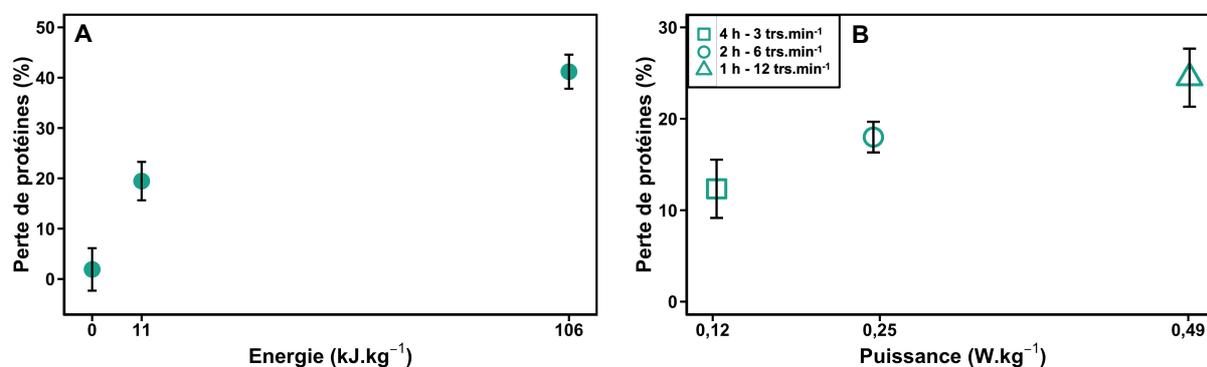


Figure 3.8. Pertes de protéines sous agitation : (A) en fonction de l'énergie appliquée au système pour une durée fixe de 24 h et 1,2 kW.kg⁻¹ ; (B) en fonction de la puissance appliquée à une énergie fixe de 1,8 kJ.kg⁻¹. Quantification de la concentration après agitation d'une solution d'EPL à 0,1 g.L⁻¹ (tampon phosphate 100 mM, pH7, 6°C) dans un tube en PP contenant 10 mL.

La perte de protéines augmente avec l'énergie apportée au système, indiquant un effet synergique de la surface en PP et de l'agitation sur l'agrégation des protéines. Cette observation a déjà été reportée pour d'autres types de matériaux.¹ La perte dépend également de la puissance apportée au système à énergie constante, cela suggère fortement que les turbulences peuvent avoir un rôle dans le comportement des protéines.

3.1.4. Effet de la solution

3.1.4.1. Concentration en protéines

La perte de protéines en fonction de la concentration initialement introduite a été étudiée (Figure 3.9). A faible concentration le pourcentage de perte est supérieur à 30% et tend vers 0 à mesure que la concentration augmente. En quantité absolue, la perte est multipliée par 3,5 en augmentant la concentration initiale par 10 de 0,01 à 0,1 g/L⁻¹ et atteint ensuite un plateau à environ 0,15 mg. Cette allure de courbe ressemble à celle caractéristique d'un isotherme d'adsorption, avec une saturation de la surface aux fortes concentrations. Ces résultats indiquent que les interfaces jouent un rôle important dans ce système.

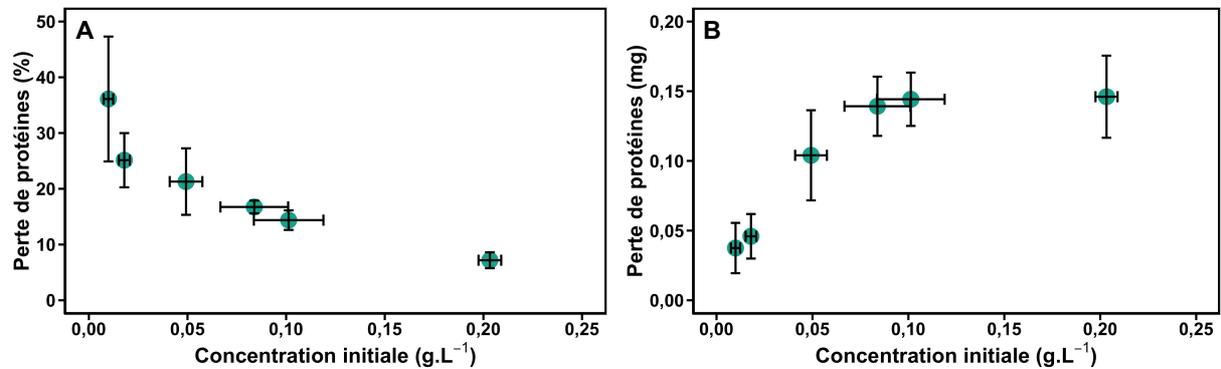


Figure 3.9. Perte de protéines en fonction de la concentration introduite, représentée en pourcentage par rapport à la concentration initiale (A) et en quantité absolue (B). Quantifications après 24 h d'agitation à 3 trs.min⁻¹ à 6 °C d'une solution d'EPL dans un tube en PP contenant 10 mL en tampon phosphate 100 mM, pH7.

3.1.4.2. Salinité et pH

Nous avons souhaité identifier si la composition d'un milieu naturel était favorable ou non à la stabilité des protéines en solution puisque la présence de sels et le pH modifient les interactions possibles (interactions protéine/protéine ou interaction protéine/surface).^{5,26}

Pour cela, nous avons étudié le comportement de l'EPL dans une eau de mer provenant de la rade de Brest, contenant naturellement une grande diversité de sels. L'évolution du pH a été suivie lors de l'ajout d'EPL (Figure 3.10). Initialement, l'eau de mer utilisée a un pH de 8,3 et la solution de protéines 5,9. Par ajout de protéines, une chute du pH est observée, atteignant 6,9 à 0,85 g.L⁻¹. Pour pouvoir étudier les phénomènes de variations de pH et de salinité, les mêmes expériences ont été réalisées en eau de mer tamponnée à un pH de 8 à l'aide d'un tampon Tris. Les modifications de pH à l'ajout de protéines sont alors négligeables.

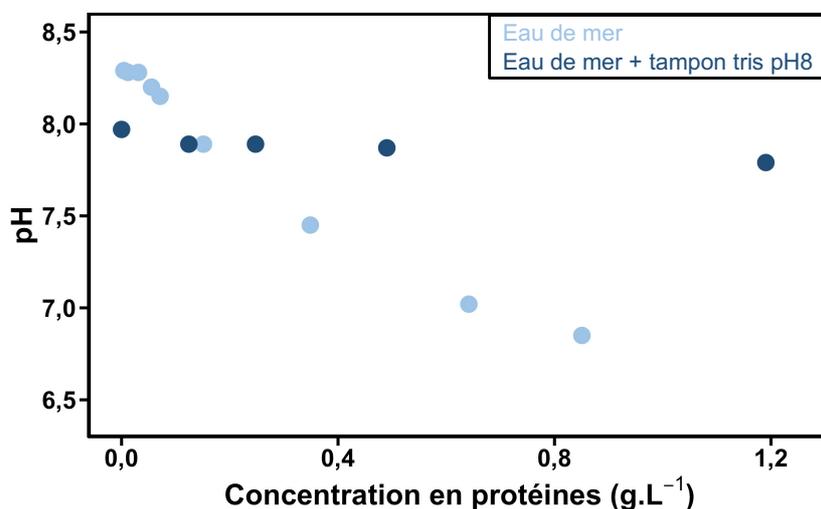


Figure 3.10. Variations de pH en fonction de la quantité d'EPL introduite dans de l'eau de mer non tamponnée (bleu clair) et dans de l'eau de mer en tampon Tris 50mM, pH8 (bleu foncé).

La perte de protéines en fonction de la concentration initiale a été suivie dans trois milieux différents : tampon phosphate (100 mM, pH7), eau de mer et eau de mer avec tampon Tris (50 mM, pH8) (Figure 3.11). Aux faibles concentrations protéiques, les pertes sont importantes pour les trois milieux : les sels ont un effet extrêmement fort lorsqu'il y a peu de protéines en solution. Aux concentrations protéiques plus élevées, la proportion de perte est plus faible et semble atteindre un plateau dans les trois conditions. Le taux de perte tend vers 10% en eau de mer et vers 0 en tampon phosphate 100 mM. Il n'y a pas de différence significative entre les solutions d'eau de mer tamponnées et non tamponnées, l'effet prédominant ici semble donc être lié à la salinité et non au pH.

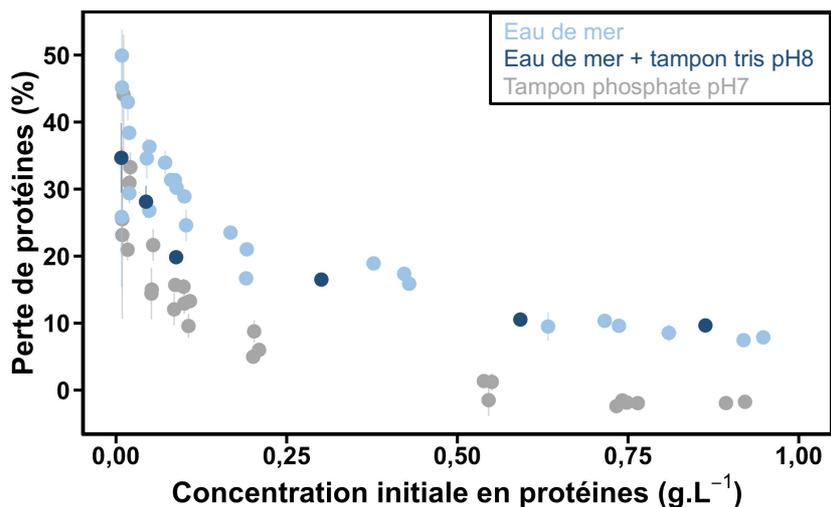


Figure 3.11. Perte de protéines (%) en fonction de la concentration initiale dans un tampon phosphate 100mM, pH7 (gris), dans de l'eau de mer non tamponnée (bleu clair) et dans de l'eau de mer en tampon Tris 50 mM, pH8 (bleu foncé). Observations après 24 h d'agitation à 3 trs.min⁻¹ d'une solution d'EPL dans un tube en PP contenant 10mL. Chaque point correspond à un échantillon mesuré 3 fois.

Ces observations peuvent être expliquées par les effets non spécifiques que les sels ont sur les protéines. Ils sont causés uniquement par les propriétés ioniques des sels. D'après la théorie DLVO, si les charges sont suffisantes, une répulsion électrostatique permet d'éviter l'agrégation.^{27,28} Une quantité trop importante de sels a pour effet d'écranter les charges et donc d'induire l'agrégation. La Concentration de Coagulation Critique (CCC) est définie comme la concentration en sels à partir de laquelle la répulsion électrostatique n'est plus suffisante pour maintenir deux objets à distance.²⁹ En considérant les protéines comme des sphères dures, la conséquence directe est l'agrégation. Cependant, les protéines ne peuvent pas toutes être considérées comme des sphères dures. En effet, suite à l'agrégation, beaucoup d'entre elles se déstructurent, exposant ainsi leurs parties hydrophobes. Elles sont alors plus enclines à s'adsorber sur les parois hydrophobes des tubes en polypropylène.

En tampon phosphate 100 mM, la CCC n'est visiblement pas atteinte, il en résulte un faible effet de la solution saline sur les protéines aux fortes concentrations protéiques. En revanche, pour l'eau de mer, l'atteinte d'un plateau à 10% de perte de protéines indique des conditions défavorables. Des extraits secs ont été réalisés pour estimer la concentration saline ($43 \pm 6 \text{ g.L}^{-1}$). Pour une eau de mer à 35 g.L^{-1} de sels, la concentration molaire est de plus ou moins 1 mol.L^{-1} , en fonction de la composition exacte.³⁰ La CCC des protéines est de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de mM.^{31,32} Ici, les sels sont donc très probablement à une concentration supérieure à la CCC et l'ajout de 50 mM de tampon Tris ne modifie pas significativement la force ionique, expliquant qu'il n'y ait pas d'effet marqué. Les protéines sont déstabilisées par la forte quantité de sels présents dans l'eau de mer : elles s'agrègent et s'adsorbent aux parois.

3.1.5. Effet des interfaces

Le système est composé de trois types d'interfaces au niveau desquelles les protéines peuvent s'adsorber : l'interface solide/liquide (S/L) sur les parois des tubes, l'interface air/liquide (A/L) au-dessus de la solution et la triple interface air/liquide/solide (A/L/S) au niveau du ménisque (Figure 3.12). Durant l'opération de mélange, ces interfaces sont continuellement renouvelées et à des vitesses non linéaires dans le temps de l'évolution du front de l'interface (paragraphe 3.1.1). En fonction du volume de solution et de l'orientation du tube (vertical ou horizontal), les quantités de surface sont différentes : de 5 à 45 cm² pour l'interface S/L, de 1 à 14 cm² pour l'interface A/L et 4 à 23 cm² pour la triple interface A/L/S (Tableau 3.2). Les interfaces sont dynamiques au cours du mélange, cependant, le temps de résidence des protéines aux interfaces peut être plus long si elles se collent aux parois des tubes ou à l'interface A/L durant les cycles de séchage/submersion. Le matériau peut avoir un impact sur les protéines directement par l'adsorption de protéines natives à sa surface, menant à la formation de sites de nucléation pour l'agrégation. L'impact peut également être indirect, par des interactions entre des protéines en solution et des protéines dénaturées ou déstabilisées par les interfaces.^{33,34}

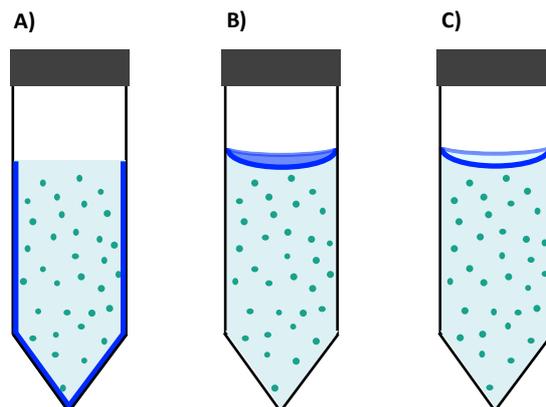


Figure 3.12. Représentation des trois types d'interfaces composant le système : solide/liquide (A), air/liquide (B) et air/liquide/solide (C). Les protéines, représentées avec des points verts, peuvent s'adsorber au niveau de ces interfaces au cours du mélange.

Pour identifier laquelle de ces trois interfaces a l'impact le plus important sur l'agrégation des protéines durant l'agitation, nous avons fait varier le rapport entre le volume du tube occupé par la solution et le volume d'air (Tableau 3.2 et Figure 3.13). La diminution du volume d'air mène à l'absence de dégradation des protéines. Cela suggère que l'interface S/L n'a qu'un faible effet, c'est-à-dire que les protéines restant sur des zones toujours immergées n'induisent pas de pertes de protéines en solution par la suite.

V_{solution} (mL)	V_{air} (mL)	Perte de protéines (%)	A/L (cm ²)	S/L (cm ²)	A/L/S (cm)
1	15	14,9 ± 2,5	1 ↔ 4	~ 5	~ 4
3	13	13,5 ± 2,4	2 ↔ 12	~ 11	5 ↔ 20
10	6	14,7 ± 3,8	2 ↔ 14	~ 31	5 ↔ 23
12,5	3,5	0	2 ↔ 13	~ 39	5 ↔ 23
15	1	0	2 ↔ 5	~ 45	5 ↔ 8

Tableau 3.2. Perte de protéines en fonction du volume d'une solution d'EPL à 0,1 g.L⁻¹ après 24 h d'agitation à 3 trs.min⁻¹ et quantité minimales et maximales des trois types d'interfaces au cours du cycle d'agitation.

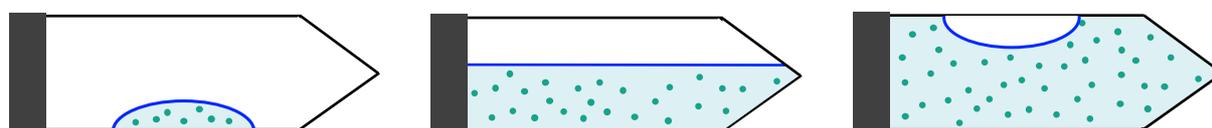


Figure 3.13. Représentation schématique d'échantillons contenant différents volumes de solution de protéines. Le trait bleu correspond à l'interface air/liquide.

Différentes études³⁵ suggèrent que la ligne mobile A/L/S est à l'origine de phénomènes de séchage pouvant induire d'importantes forces latérales³⁶ et la dégradation des protéines par cisaillement.⁶ Pour vérifier cette hypothèse, nous avons changé la géométrie de notre système et avons utilisé un « dip-coater ». Un suivi de la perte de protéines est réalisé au cours de l'immersion et du retrait périodique d'un substrat en PP visant à déplacer la ligne de séchage (Figure 3.14). Le mouvement périodique a été choisi de sorte à reproduire les conditions des expériences d'agitation. Nous avons négligé les différences de courbure de l'interface entre les deux géométries. De même nous ne reproduisons pas ici le même cycle d'accélération et décélération des fronts des interfaces qui ont lieu dans l'expérience sur roue. Il n'a pas été observé de pertes significatives de protéines en appliquant ce procédé (Tableau 3.3), contrairement à des expériences menées sur l'insuline.³⁵ Le séchage pouvant avoir lieu au niveau de la triple interface A/L/S n'est donc pas la cause principale de la perte de protéines en solution constatée sur des surfaces de contenants en PP sous agitation.

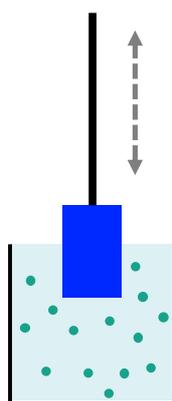


Figure 3.14. Représentation schématique des expériences de dip-coating. Une surface poreuse en polypropylène est immergée et retirée par cycles sur une surface de 1 cm par 1 cm dans une solution sous agitation contenant 0,1 g.L⁻¹ d'EPL.

	Pertes de protéines (%)
Sans dip coating	0-4
Avec dip coating	0-4

Tableau 3.3. Pertes de protéines (%) à l'issue de 24 h d'expérience avec et sans dip coating.

Les interfaces S/L et A/L/S ne peuvent pas expliquer à elles seules les pertes observées. Il semblerait donc que ce soit l'interface A/L qui soit critique pour le devenir des protéines en solution. Cependant, les interfaces A/L ne semblent pas toutes générer un stress suffisant. Celle présente dans le cas des expériences de dip-coating aurait également dû engendrer de l'agrégation.

Par ailleurs, très peu de pertes ont été observées au-delà d'un certain volume (taux de remplissage d'environ 75% du tube) (Tableau 3.2). A l'inverse, une perte très importante a été observée dans les conditions où le volume est inférieur (taux de remplissage inférieur à 60%). Par conséquent, la transition de l'agrégation des protéines à leur stabilisation en solution, c'est-à-dire, d'une condition stressante à une condition non stressante, semble brutale et dépend du ratio entre le volume occupé par le liquide et le volume d'air. D'après l'observation des solutions de protéines sous agitation dans les tubes (Figure 3.15), il est possible de décrire cette frontière qualitative comme le passage « d'un gaz bougeant dans un liquide » à « un liquide en chute dans un gaz ». Ce phénomène est parfois décrit comme la transition entre un écoulement piston (ou écoulement à poche) et un écoulement stratifié ondulé (Figure 3.16).^{37,38} Dans le premier type d'écoulement, des bulles allongées sont formées au niveau de la surface supérieure du tube. Dans le second type, l'interface A/L est ondulée mais continue car le liquide n'atteint pas la surface supérieure du tube. Le changement de modèle d'écoulement est associé à des variations de quantité d'interface A/L par la formation de vagues ou de bulles. Cela correspond à des cycles de compression-

décompression aux interfaces, connus pour causer des dommages importants aux protéines.^{1,39} C'est probablement par ce mécanisme que nous pouvons expliquer la majeure partie des pertes de protéines observées.

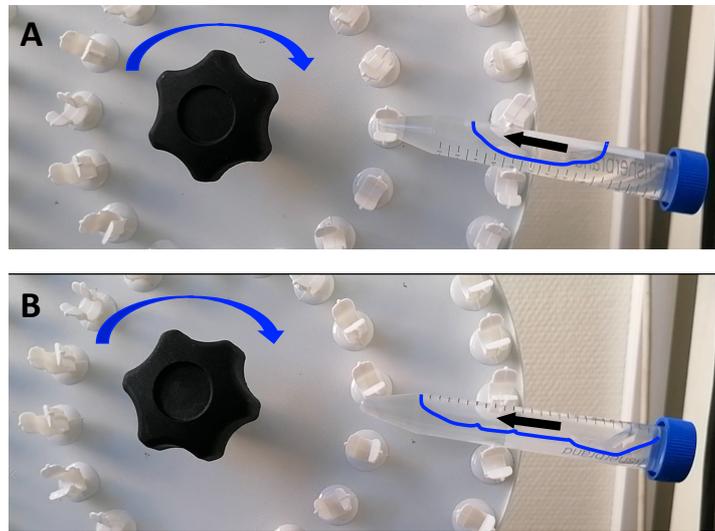


Figure 3.15. Photographies de solutions durant le mélange pour représenter les modèles d'écoulement. Écoulement piston (A) : seule une ondulation est visible dans le mouvement de la bulle. Écoulement stratifié ondulé (B) : de multiples ondulations sont observées et l'arrière de la bulle (à droite) est nettement plus turbulent.

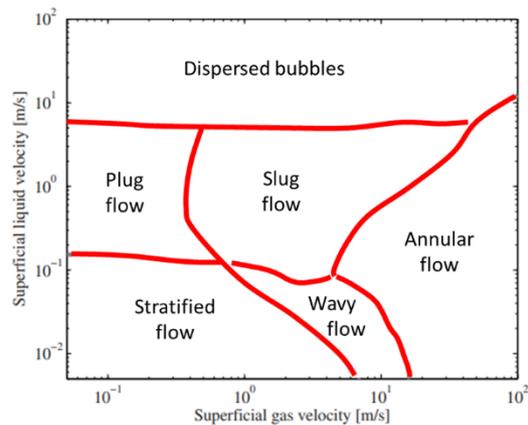


Figure 3.16. Cartographie des régimes d'écoulement en fonction des vitesses des fluides dans un conduit horizontal (adapté de ³⁸).

Pour compléter le mécanisme de déstabilisation, nous devons encore expliquer le rôle des turbulences ainsi que du matériau constituant le tube. Les forces de cisaillement dues aux turbulences ont été calculées (Tableau 3.4). L'échelle de Kolmogorov correspond à une dimension de turbulences en dessous de laquelle l'énergie est dissipée par la viscosité du système. Il ne peut pas exister de turbulence en deçà de cette valeur limite.^{40,41} Il est possible de déterminer les forces associées aux turbulences et de relier l'échelle de longueur de Kolmogorov au nombre de Reynolds, donnant des informations sur le régime d'écoulement.⁴²

Paramètres	Équation	Valeur numérique
Échelle de longueur de Kolmogorov η (m)	$\cong (\nu^3/\epsilon)^{0.25}$	50 μm ($\epsilon = 0,5 \text{ W.kg}^{-1}$)
Taux de déformation de Kolmogorov (s^{-1})	$\cong (\epsilon/\nu)^{0.5}$	600 s^{-1} ($\epsilon = 0,5 \text{ W.kg}^{-1}$)
Force de cisaillement attendue sur une particule de rayon R (N)	$\cong \rho (\epsilon.\nu)^{0.5}.R^2$	5.10 ⁻¹⁶ N (R = 25 nm) 5.10 ⁻¹⁸ N (R = 2,5 nm)

Tableau 3.4. Échelle de longueur de Kolmogorov et taux de déformation associés aux turbulences survenant au cours des expériences. ϵ est le taux moyen de dissipation de l'énergie cinétique de turbulence par unité de masse ($\text{m}^2.\text{s}^{-3}$), ν la viscosité cinématique du fluide ($\nu = 1,5.10^{-6} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ pour l'eau à 6°C), ρ la masse volumique du fluide ($\rho = 1000 \text{ kg.m}^{-3}$) et D la dimension caractéristique de l'écoulement (ici le diamètre du tube, soit 1,45 cm).

Pour dénaturer des protéines diluées en solution, des forces de l'ordre d'une dizaine de pN sont nécessaires. Ici, les forces sont nettement plus faibles, l'agitation est donc considérée comme douce. Cependant, le cisaillement, bien que ne dégradant pas les protéines directement, peut avoir deux effets :

- L'augmentation et la diminution transitoires de la quantité d'interface A/L (phénomène de vagues⁴³), favorisant l'agrégation au niveau de cette interface.
- La désorption de protéines natives ou dégradées par leur adsorption aux interfaces S/L ou A/L.^{35,44}

A partir de ces données, il n'est pas possible de savoir si l'effet des turbulences précède, succède ou est simultané aux effets de l'interface S/L. Pour clarifier ce point, nous avons réalisé une expérience en ajoutant un excès de surface plastique (filtre en polypropylène poreux). Cela permet d'exposer les protéines à une quantité plus importante de surface plastique, sans l'ajout de turbulences a priori. L'ajout de ce matériau ayant une surface spécifique importante (0.7 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$, figure 3.17), permet de passer d'une interface S/L de 50 à 120 cm^2 durant l'agitation (comparé à 30 cm^2 au repos). Cela a pour effet de doubler la perte de protéines qui atteint plus de 40% (Figure 3.18).

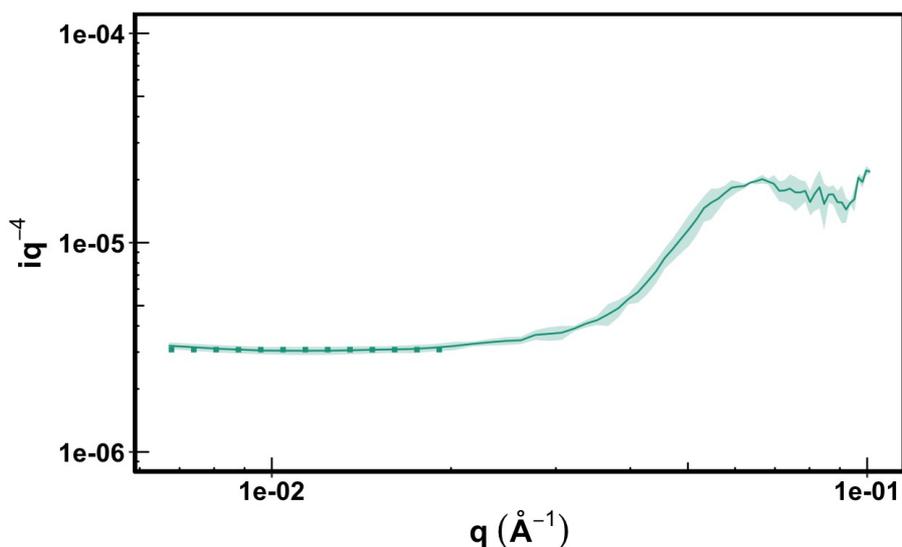


Figure 3.17. Diffusion des rayons X aux petits angles d'un filtre poreux en polypropylène sous vide en représentation $\log(I/q^4)$ vs q pour visualiser le régime de Porod provenant de la diffusion X par la surface spécifique du filtre. La courbe correspond aux données expérimentales et les carrés correspondent à l'ajustement par un modèle linéaire dit « de Porod » pour la détermination de la surface spécifique.

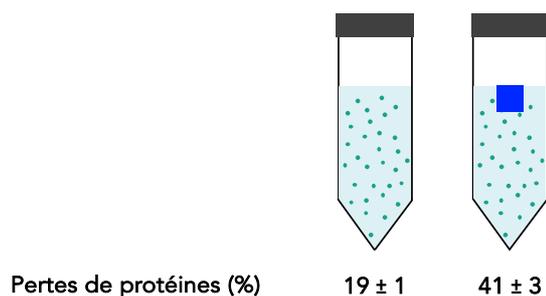


Figure 3.18. Représentation schématique d'une expérience permettant d'augmenter la quantité d'interface S/L par l'ajout d'un morceau de filtre poreux en polypropylène et pertes de protéines associées aux deux conditions.

A partir de ces nouvelles données, nous suggérons que la nature de la surface du matériau initie une déstabilisation pour certaines protéines, qui serait accentuée par la combinaison de l'interface A/L et des turbulences liées à l'agitation. Les protéines dénaturées ou déstabilisées ont des interactions plus fortes avec les matériaux et modifient les équilibres conformationnels des protéines.³⁴ Ce phénomène est similaire à certains stress, tels que la pression ou la congélation, ayant déjà été identifiés pour induire des modifications conformationnelles⁴⁵ par des cycles d'associations/dissociations. Cela peut expliquer que des surfaces avec des cavités ou des fibres (concave/convexe), comme les filtres en PP utilisés ici, ou étant développées pour avoir peu d'interactions avec les protéines natives, comme les plastiques LoBind, peuvent également avoir un effet déstabilisant sur les protéines en solution.

3.2. DEVENIR DES PROTEINES PERDUES

Nous avons observé que, sous agitation et en présence de matière plastique, les protéines peuvent être perdues en quantité très importante, se pose alors la question de leur devenir. Deux hypothèses peuvent alors être émises : les protéines sont adsorbées aux parois ; les protéines sont en solution sous forme d'agrégats.

3.2.1. Adsorption sur les parois des tubes

Des expériences de désorption ont été réalisées afin d'identifier si des protéines ont été adsorbées sur les parois. Dans ce cas, la quantité de protéines adsorbées devrait augmenter lors du mélange pour concorder avec les pertes observées précédemment.

Il pourrait être envisagé de diluer les solutions pour induire la désorption puisque l'adsorption repose sur un équilibre entre les protéines en solution et les protéines adsorbées. Cependant, les interactions sont trop fortes pour que l'adsorption soit réversible par simple dilution.⁴⁶ Le protocole de désorption que nous avons appliqué est basé sur l'échange des protéines fixées sur les parois par des tensioactifs (voir paragraphe 2.1.5). Nous avons utilisé une solution de Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS) car il s'agit d'un produit couramment utilisé pour ce type de manipulation.⁴⁷

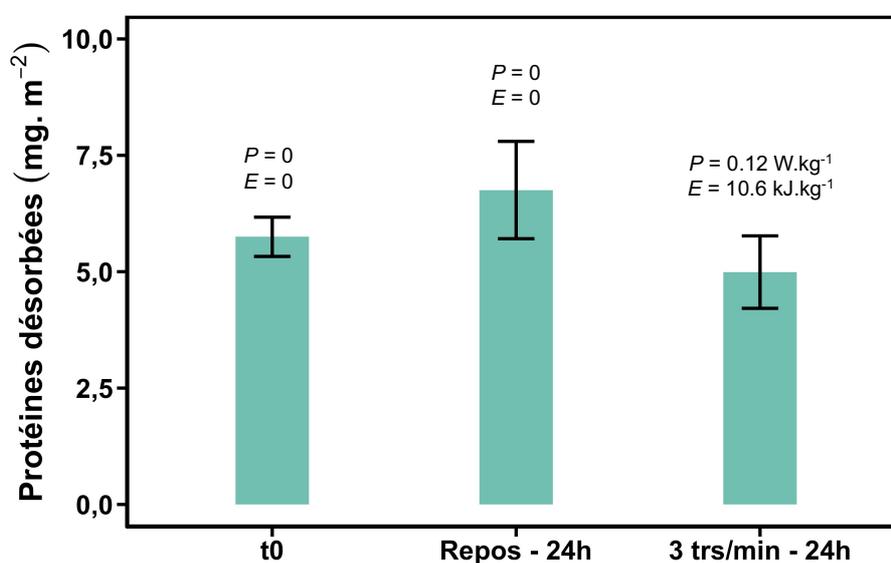


Figure 3.19. Quantité de protéines désorbées de tubes en PP dans trois conditions à l'aide de SDS 0,1% : la solution d'EPL à 0,1 g.L⁻¹ est placée dans le tube et le protocole de désorption aussitôt appliqué (voir paragraphe 2.1.5) ; la solution est laissée au repos durant 24 h ; la solution est agitée durant 24 h.

La quantification des protéines adsorbées en fonction de la vitesse de rotation ne montre pas d'augmentation significative suite au mélange (Figure 3.19). Ces valeurs correspondent aux gammes de masses de protéines adsorbées sur des surfaces plastiques dans la littérature.^{11,48} En

revanche, cela représente une proportion faible par rapport à la perte totale (moins de 20%) et par rapport à la quantité totale de protéines introduites (environ 2%). Il est donc peu probable que l'ensemble des protéines considérées comme perdues soient fixées aux parois des tubes. Pour comprendre le devenir des protéines, nous nous sommes donc focalisés sur la seconde hypothèse : la formation d'agrégats de protéines.

3.2.2. Agrégation en solution

Des particules de taille importante ($d > 1 \mu\text{m}$) ont été identifiées dans les solutions de protéines suite au procédé de mélange dans des tubes en PP. Des observations de microscopie optique en réflexion et une reconstruction des contours à l'aide du logiciel Fiji⁴⁹ ont été réalisées pour mieux visualiser leur forme et leur structure (Figure 3.20-A). La gamme de taille des objets va de quelques micromètres à quelques dizaines de micromètres. Les analyses présentées ici sont à force ionique et pH constants (pH 7, phosphate 100 mM).

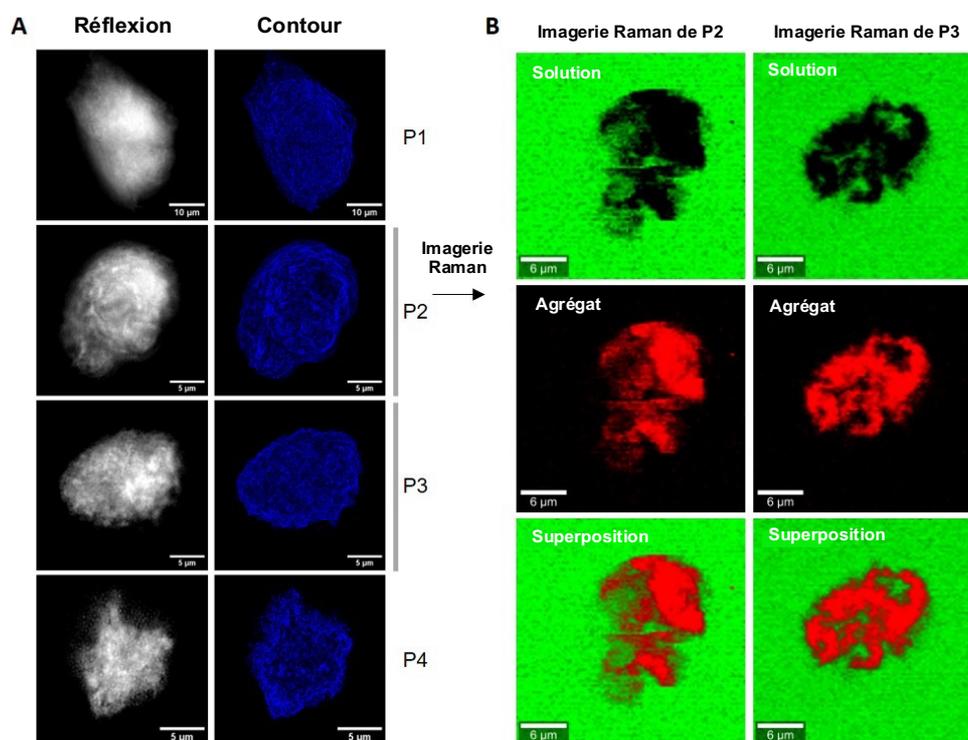


Figure 3.20. Imagerie *in situ* et analyse biochimique des agrégats de protéines en solution. (A) Images de microscopie optique obtenues en réflexion et reconstruction des contours. (B) Images Raman de deux particules P1 et P2. Les images correspondent aux spectres Raman des agrégats de protéines et de la solution sont montrés respectivement en rouge et vert. La superposition est montrée en bas. Deux réplicats biologiques ont été réalisés pour chaque analyse.

La composition biochimique des agrégats a été analysée par microscopie confocale Raman (Figure 3.20-B). Cette technique a apporté des informations sur la structure interne des objets, avec l'identification de noyaux protéiques denses et des zones d'infiltration de solution au sein

des particules. Ces premiers résultats suggèrent que l'agrégation des protéines est responsable des pertes de protéines observées. Cela a déjà été reporté dans le cas d'immunoglobulines purifiées soumises à des cycles de compression/décompression.^{39,50,51}

Les spectres Raman des agrégats (Figure 3.21) montrent les bandes vibrationnelles typiques des protéines⁵² :

- des amides I (1665 cm^{-1}) ;
- des élongations C-C et des déformations C=C des cycles aromatiques des phénylalanines (1002 et 1603 cm^{-1}) ;
- des déformations C-H des tyrosines (1170 cm^{-1}) ;
- des rotations et des déformations des protéines (883 et 1450 cm^{-1}) ;
- d'élongation asymétriques des CH_2 des protéines et lipides (2935 cm^{-1}) ;
- des rotations CH_3 et déformations CCH (1124 cm^{-1}).

La bande Raman à 726 cm^{-1} peut être attribuée au mode de respiration de l'adénine présent dans l'ADN ou l'ARN, suggérant que des nucléoprotéines telles que des ribosomes peuvent être inclus dans les particules.⁵³

En accord avec les pertes observées, l'analyse Raman des particules confirme qu'il s'agit d'agrégats protéiques. Comme décrit dans le paragraphe 1.2.2.1, en termes de changements structurels, les particules protéiques peuvent être considérées comme l'agglomération physique de protéines en solution avec un minimum de perte de structure jusqu'à l'agrégation irréversible de protéines complètement dénaturées. Pour définir s'il s'agit de gels de protéines ou d'agrégats déshydratés, nous avons déterminé le niveau d'hydratation des particules de protéines par microscopie confocale Raman. Les spectres Raman des particules et des protéines en solution après mélange sont comparés sur la figure 3.21. La bande de vibration à 3400 cm^{-1} est caractéristique de l'élongation des OH de l'eau. A partir des intensités, il est possible d'obtenir des informations sur la quantité. Il est généralement difficile de comparer des intensités de bandes Raman mais ici les spectres ont été réalisés dans les mêmes conditions expérimentales et sur le même échantillon. L'intensité moyenne de la bande de vibration des OH des particules de protéines est 30% plus faible que celle de la solution d'EPL. Par conséquent, les objets formés au cours du mélange se comportent davantage comme des particules de protéines gélifiées que comme des agrégats complètement déshydratés et dénaturés.

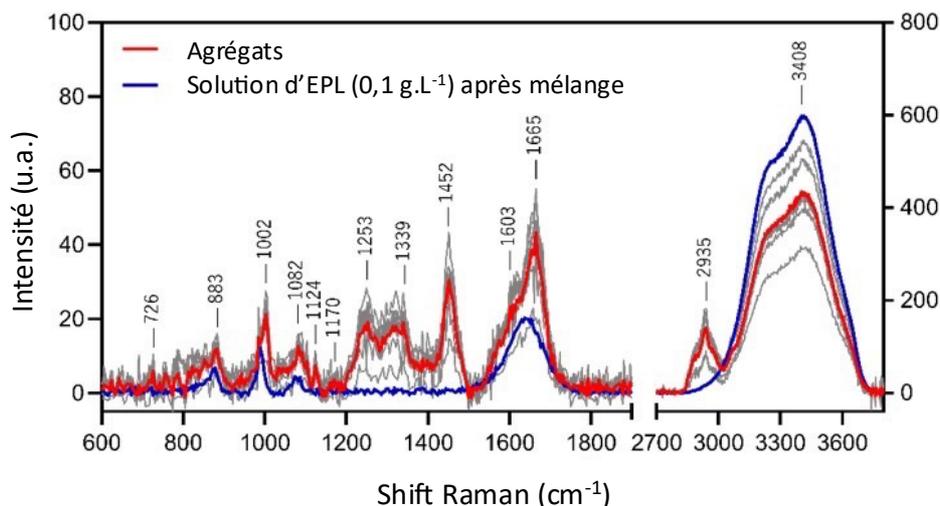


Figure 3.21. Spectres Raman moyens des agrégats protéiques (rouge) et de l'EPL en solution à 0,1 g.L⁻¹ après mélange (bleu). Les spectres individuels des agrégats sont montrés en gris.

Les spectres Raman des solutions d'EPL avant, après mélange et du tampon phosphate (100 mM, pH7) sont identiques (Figure 3.22-A) car la concentration en protéines est très faible (0,1 g.L⁻¹). Pour comparer les spectres Raman des particules protéiques et des protéines en solution, nous avons donc analysé la solution stock d'EPL à 25 g.L⁻¹ (Figure 3.22-B). Les spectres présentent des différences majeures, indiquées en fond gris sur la figure. Certaines bandes, bien visibles dans la solution stock, sont manquantes du spectre des particules, mettant en évidence que certaines biomolécules sont exclues du procédé d'agrégation. Cela correspond aux modes de vibrations moléculaires à 678, 713, 853, 926, 1058, 1091 et 1416 cm⁻¹.

La bande intense à 678 cm⁻¹ est attribuée à une vibration d'élongation ν_7 des porphyrines. Cela pourrait correspondre à la flavohémoprotéine YHB1 identifiée dans l'extrait protéique par analyse protéomique (voir paragraphe 3.4).⁵⁴ La bande à 713 cm⁻¹ peut également être attribuée aux porphyrines dans les complexes du cytochrome.⁵⁵ La bande à 853 cm⁻¹ est attribuée aux polysaccharides ou aux phospholipides.⁵⁶ La bande à 1417 cm⁻¹ est attribuée à l'élongation des C=C des cycles quinoïdes, probablement des quinones.⁵² Différents cofacteurs peuvent donc être exclus des particules protéiques, cela peut engendrer des modifications structurelles des protéines.

L'agrégation des protéines peut mener à des changements subtils dans les régions amide des spectres Raman. Cela a été observé en spectroscopie UV Raman pour des fibres amyloïdes.⁵⁷ Cependant, de tels effets sont difficiles à analyser dans le cas d'un mélange contenant plus de 5000 protéines car certaines peuvent être enrichies ou déplétées dans les agrégats par rapport à la solution.

Au contraire, peu de différences ont été observées entre les spectres Raman des différents agrégats analysés, mise à part dans la quantité d'eau contenue (Figure 3.21). Cela suggère que

les particules formées dans cette gamme de tailles sont relativement homogènes en composition. Ces résultats démontrent que l'agrégation induite par le mélange a pour effet de dépler certaines protéines de la solution. Au contraire, d'autres biomolécules sont exclues des particules et ne semblent pas participer à la formation de ces objets, potentiellement en restant solubilisées dans le tampon.

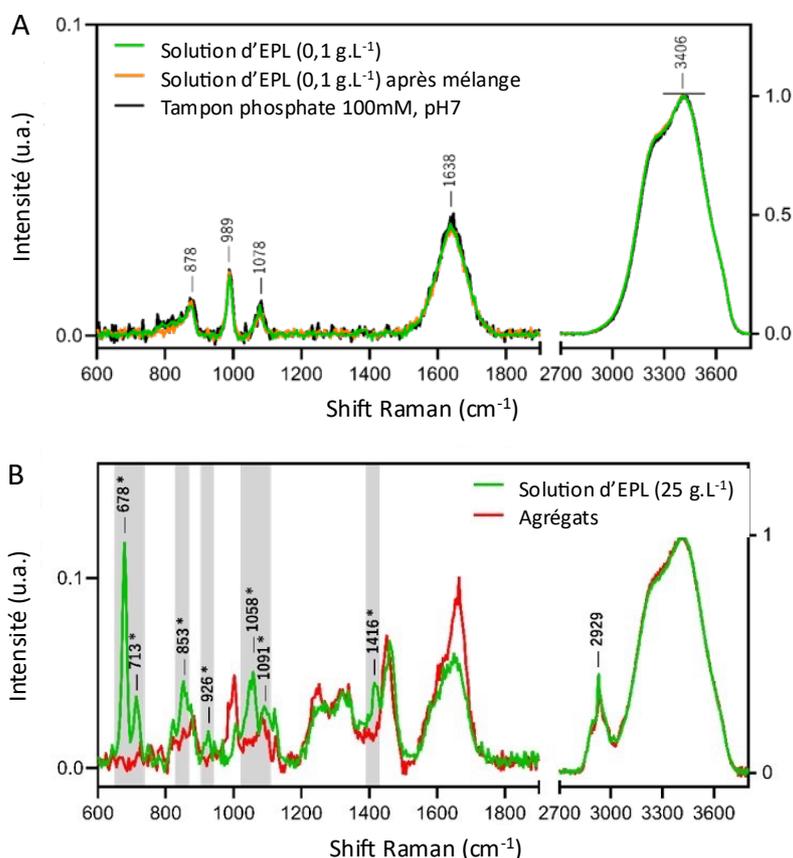


Figure 3.22. Spectres Raman normalisés sur la bande des OH de l'eau à 3406 cm^{-1} . (A) Spectres de solutions d'EPL à 0,1 g.L^{-1} avant (vert) et après mélange (jaune) et de tampon phosphate 100 mM pH7. (B) Spectres de la solution stock d'EPL (sans agitation) à 25 g.L^{-1} (vert) et des agrégats de protéines (rouge). * Les bandes Raman présentes dans la solution d'EPL mais absentes dans les agrégats sont indiquées en gris.

Dans un second temps, nous avons recherché de potentiels intermédiaires de nucléation, plus petits que les particules identifiées précédemment. Ils auraient été formés au cours du mélange et participeraient au processus d'agrégation. Les solutions ont été filtrées à 1,2 μm pour retirer les agrégats microniques. L'analyse a été réalisée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) après 24 h avec et sans agitation. Le rayon hydrodynamique des objets en solution en fonction de la vitesse d'agitation est présenté en figure 3.23. Pour l'échantillon n'ayant pas été agité, deux populations distinctes ont été identifiées, avec des diamètres respectifs de 10 et 130 nm. Puisque l'extrait protéique est composé de plusieurs milliers de protéines, nous pouvons supposer que ces deux populations correspondent à des protéines libres et à des complexes de protéines. A 3 trs.min^{-1} , il y a une légère augmentation du rayon hydrodynamique des gros objets, représentant

93% des particules en intensité et donc un pourcentage bien plus faible une fois exprimé en concentration en raison du pouvoir diffusant bien plus grand pour les grosses particules que pour les petites. A 30 trs.min⁻¹, à la fois la taille et la quantité de cette population diminuent. En revanche, la taille des petits objets n'est pas impactée significativement malgré la présence des gros diffuseurs. Il semble donc que les petits diffuseurs sont toujours en bien plus grand nombre que les gros une fois l'intensité diffusée ramenée au nombre de diffuseurs par unité de volume. Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas d'intermédiaire de nucléation ayant un diamètre inférieur à 1 µm qui seraient formés au cours du mélange.

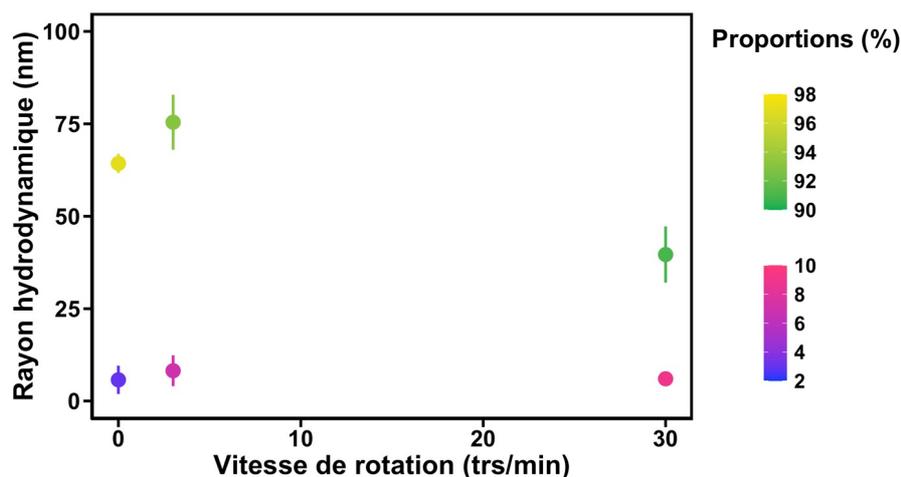


Figure 3.23. Rayon hydrodynamique d'EPL en solution après 24 h de mélange à différentes vitesses de rotation. Les solutions ont été filtrées à 1,2 µm pour retirer les agrégats de taille importante. Le pourcentage de chaque population (en intensité) est indiqué à l'aide des gradients de couleurs.

Le manque d'intermédiaires de nucléation pour l'ensemble des conditions analysées (variations du volume de solution et du temps de mélange, figure 3.24) est surprenant. Cela suggère que l'agrégation n'a pas lieu à partir d'intermédiaires de nucléation libres en solution et suffisamment stables dans le temps pour être détectés en DLS après filtration, mais que de larges agrégats se forment directement au cours du mélange. Nous suggérons qu'ils se forment lors d'une étape de repliement d'une couche de protéines hydratées à l'interface A/L se comportant comme un gel interfacial. Ce processus d'agglomération mène à des particules de taille micronique en solution, probablement à cause du cisaillement puisque le diamètre maximal des agrégats est comparable aux longueurs de Kolmogorov (tableau 3.4 et ⁴¹).

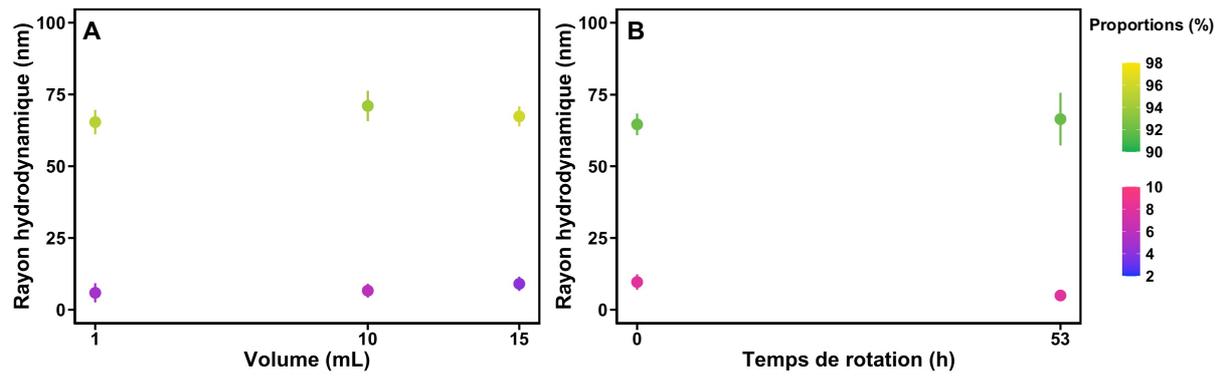


Figure 3.24. Rayon hydrodynamique d'EPL en solution après mélange à 3 trs.min^{-1} : (A) 24 h, variations du volume de solution et (B) 10 mL, variation du temps de mélange. Les solutions ont été filtrées à $1,2 \mu\text{m}$ pour retirer les agrégats de taille importante. Le pourcentage de chaque population (en intensité) est indiqué à l'aide des gradients de couleurs.

3.3. PROPOSITION D'UN MECANISME DE DESTABILISATION

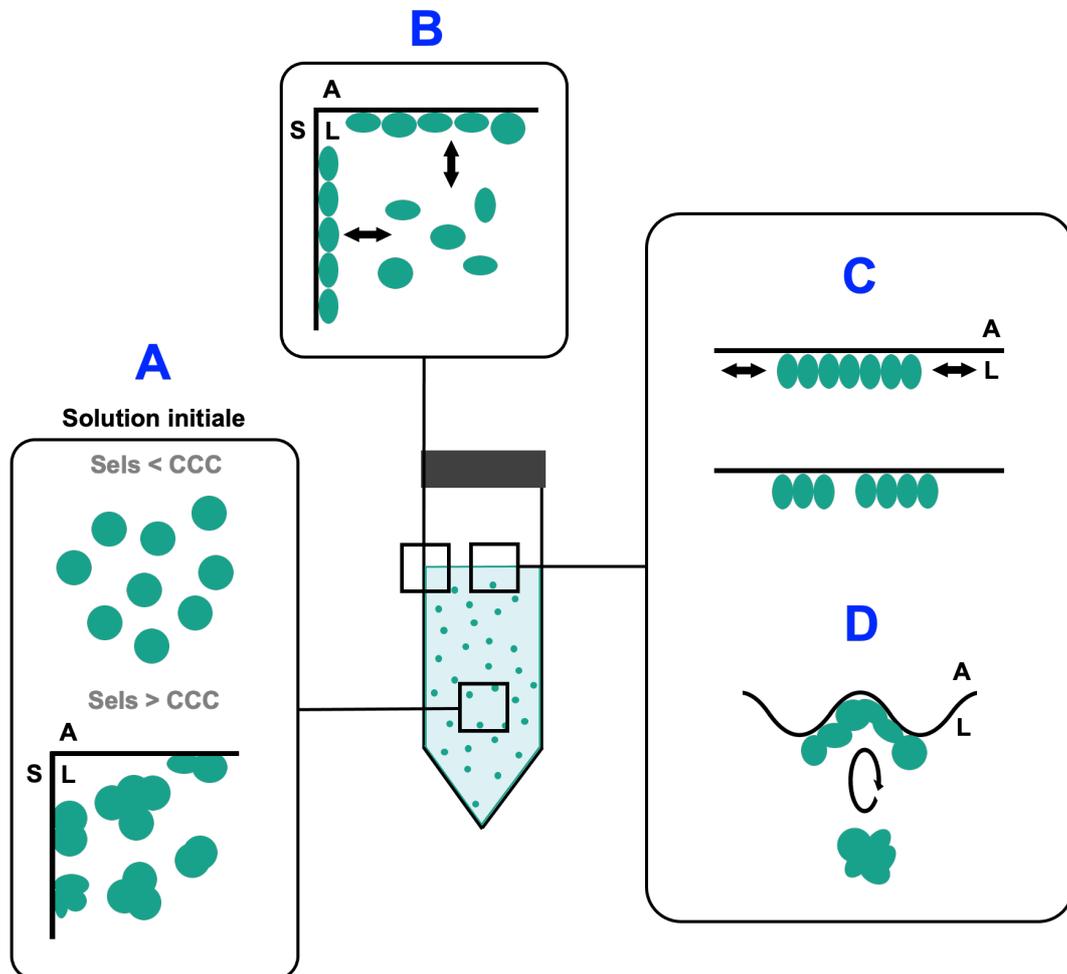


Figure 3.25. Proposition mécanistique de la déstabilisation des protéines en contact avec des surfaces plastiques et sous agitation. (A) Une concentration en sels supérieure à la CCC (Concentration de Coagulation Critique) mène à l'agrégation des protéines dans la solution au repos. Les protéines sont alors plus enclines à l'adsorption aux interfaces A/L ou S/L. (B) L'affinité des protéines dénaturées pour la surface déstabilise les protéines en solution par des modifications conformationnelles. (C) Les protéines déstabilisées s'adsorbent à l'interface A/L. Des variations de quantité d'interface induisent des forces de compression et décompression favorisant l'agrégation. (D) Le cisaillement peut faciliter les transferts vers la solution ou vers les interfaces de l'étape B et casser les films formés à l'étape C. Adapté de ⁵⁸.

Le modèle global que nous proposons (Figure 3.25) résulte de l'action concomitante de l'adsorption sur la matière plastique et à l'interface A/L. Ce modèle est adapté de Sluzky et al.⁵⁸ Les matériaux fortement ou faiblement enclins à interagir avec les protéines devraient avoir le même effet par diminution de la sélectivité entre le matériau et les protéines. C'est effectivement ce qui a été observé dans le cas des tubes en Téflon ou LoBind pour les protéines purifiées (Figure 3.7) et l'EPL (Figure 3.5).

Les pertes limitées de la BSA (Figure 3.7), peuvent être reliées à son utilisation très commune pour passiver des surfaces plastiques par adsorption. L'effet passivant de la BSA peut protéger le reste de la solution des effets déstabilisants du matériau.

La vulnérabilité spécifique de la BSA en présence de verre (Figure 3.7), possédant des groupes silanols hydrophiles et des charges de surface négatives, peut être liée à son point isoélectrique faible ($pI_{BSA} = 4.7^{59}$) pouvant promouvoir des interactions électrostatiques avec les tubes.

3.4. IDENTIFICATION DES PROTEINES PERDUES PAR ANALYSE PROTEOMIQUE

3.4.1. Stratégie expérimentale

Dans le but d'identifier les protéines les plus sensibles aux stress imposés (agitation associée à la présence d'interfaces liquide/solide et air/liquide), nous avons conduit une analyse protéomique après agitation dans les différents types de tubes. Un échantillon n'ayant pas subi d'agitation a été utilisé comme référence, permettant d'identifier les protéines déplétées en solution dans les échantillons agités. Pour ne pas perturber le système, les échantillons n'ont été ni filtrés (introduction d'une nouvelle surface), ni centrifugés (introduction d'une nouvelle surface lors du changement de tube et stress supplémentaire pour les protéines). Nous avons fait l'hypothèse que les agrégats protéiques ont sédimenté et n'ont pas été prélevés lors de l'analyse.

La sensibilité de l'analyse dépend de la concentration en protéines, or nous savons que la quantité globale de protéines après agitation varie selon la nature du tube. Pour conserver une sensibilité optimale et identique pour chaque échantillon, la même masse de protéines a été injectée (Figure 3.26). Pour cela, un coefficient de normalisation a été appliqué, correspondant à la perte en molalité (Figure 3.5).

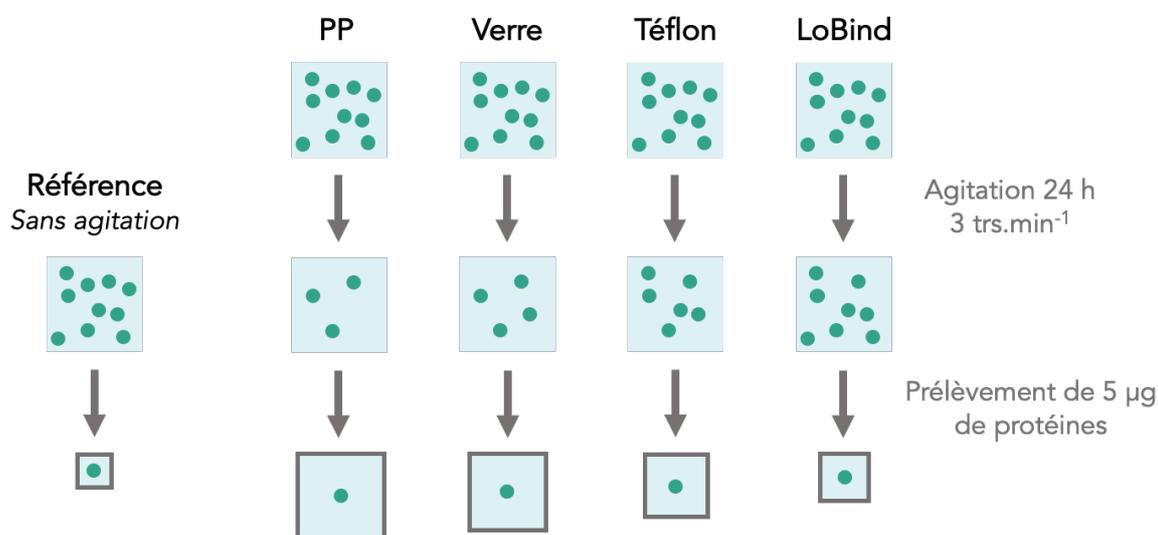


Figure 3.26. Schéma expérimental des solutions analysées en protéomique. Les injections sont équivalentes en masse pour une problématique de sensibilité des analyses. Les volumes injectés sont donc fonction des pertes de protéines.

La méthode suivie a été adaptée de Millán-Oropeza A. et al. ⁶⁰ pour obtenir une quantification semi-absolue. Les quantités de protéines déterminées sont en molarité (mol.L^{-1}). Une conversion molarité/molalité (mol.kg^{-1}) devrait être possible en connaissant la distribution exacte des protéines. Cela permettrait d'appliquer une correction correspondant aux volumes prélevés.

Cependant, une proportion significative des protéines identifiées a une molarité comprise entre la limite de détection et la limite de quantification (5 fmol ici). Ces protéines peuvent être observées mais ne sont pas quantifiables à cause de leur trop faible abondance. La conversion en molalité n'est donc pas envisageable. Ce type de problème est également retrouvé dans l'étude de polymères, pour la conversion des quantités en masse ou en nombre.^{61,62}

Des simulations ont été réalisées afin d'étudier le caractère spécifique des pertes de protéines d'EPL suite à un contact dans des tubes en PP. Ces simulations ont été générées de façon à obtenir une perte de masse uniforme sur l'ensemble des protéines. Les résultats obtenus sont détaillés dans l'article « A proteome scale study reveals how plastic surfaces and agitation promote protein aggregation », publié dans le journal Scientific Reports.⁶³ Ils montrent des différences significatives par rapport aux observations expérimentales et indiquent donc que les pertes sont dues à des phénomènes spécifiques. Une normalisation globale par rapport au volume prélevé a été réalisée et, par mesure de précaution, seules les protéines dont la déplétion est supérieure au facteur de normalisation (15% pour le PP) ont été considérées dans cette étude.

La limite de quantification à 5 fmol engendre un second problème majeur : des protéines devenant faiblement abondantes suite à l'exposition ne vont pas ressortir de l'analyse alors qu'elles sont fortement impactées par les conditions d'agitation. Cela constitue une limite de cette technique d'analyse.

Les données ont été déposées auprès du consortium ProteomeXchange via le partenaire de dépôt PRIDE sous l'identifiant PXD038266. Les listes des protéines présentant une différence significative en termes de concentration avant et après agitation sont également disponibles en annexe A.2.

3.4.2. Effet de la nature du tube

Suite à la mise en contact d'EPL dans des tubes de différentes natures (Figure 3.5), 112 protéines ont été identifiées comme ayant une différence significative de concentration par rapport à la quantité initiale (facteur bayésien > 1). Parmi ces protéines, 58 sont fortement déplétées et 31 fortement enrichies en se basant sur un seuil de variation de concentration de 15% suite à l'agitation. Il n'a pas été observé de différence significative entre les différents matériaux. Les protéines affectées par les conditions d'agitation peuvent être classées en différentes catégories : complexes, oligomères, chaperonnes, protéines partiellement dépliées ou intrinsèquement désordonnées (IDP) et autres.

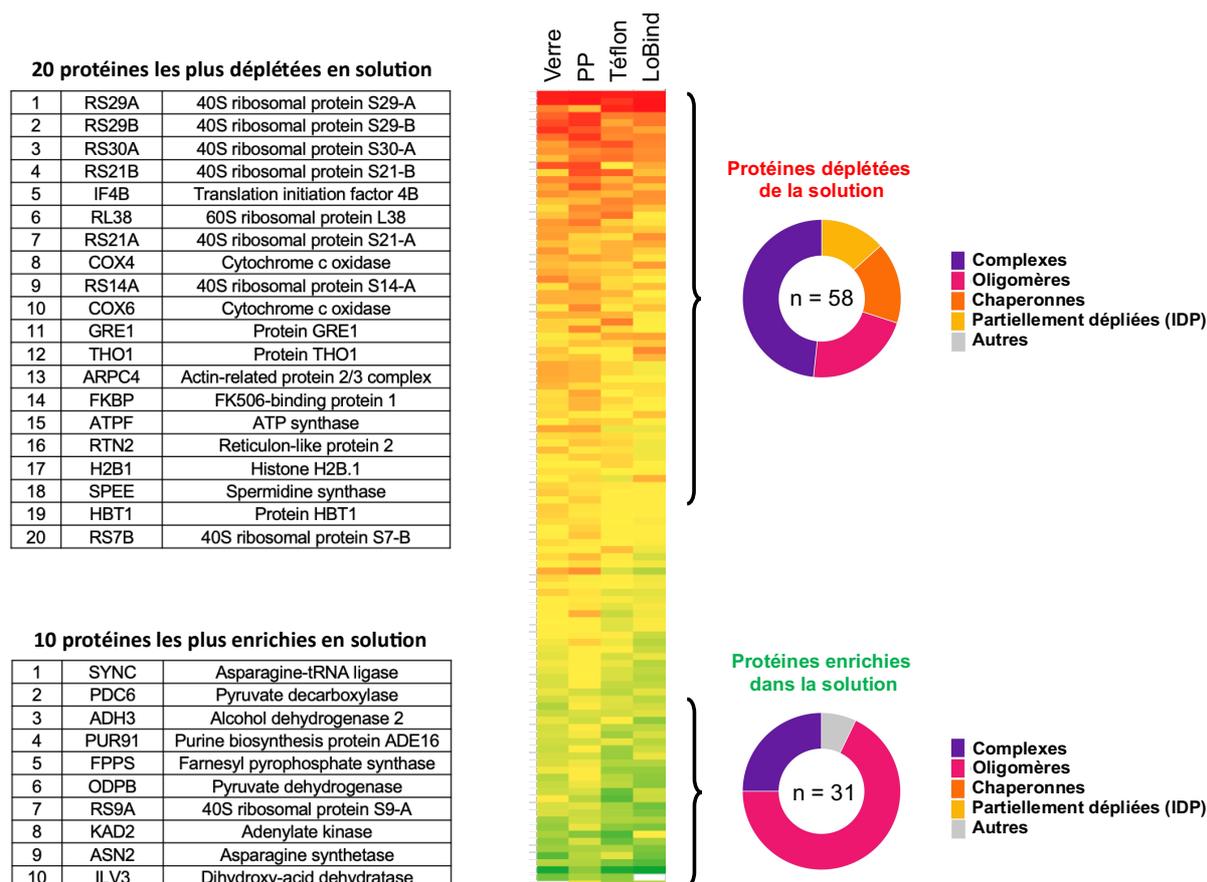


Figure 3.27. Liste des protéines identifiées comme déplétées suite à l'agitation de l'EPL dans des tubes en verre, PP, téflon et LoBind. Du rouge au vert : protéines déplétées à protéines protégées. Les protéines sont classées en différentes catégories selon leur nature, les proportions sont indiquées à droite.

L'abondance relative des protéines en solution après agitation comparée à une référence sans agitation est montrée sur la figure 3.27. Les protéines fortement déplétées (n = 58) ou enrichies (n = 31) ont été classées en différentes catégories comme indiqué sur les diagrammes. Les listes des vingt protéines les plus déplétées et des dix les plus enrichies sont indiquées dans les tableaux.

La sensibilité des protéines partiellement dépliées et des protéines chaperonnes peut être expliquée par le mécanisme d'adsorption des protéines aux interfaces. En effet, l'adsorption est un procédé impliquant généralement un dépliement partiel des protéines, entraînant une pénalité d'enthalpie. Les protéines étant déjà partiellement dépliées dans leur état natif, elles ne souffrent pas de cette pénalité due à un changement de conformation. Il est donc attendu qu'elles s'adsorbent plus facilement.^{33,34} Il est également attendu que les protéines chaperonnes soient impactées, pas directement par leur adsorption mais de manière indirecte, par leurs interactions avec des protéines dépliées, pour lesquelles elles ont une forte affinité. De tels mécanismes ont déjà été démontrés dans le cas de l'adsorption directe de protéines dépliées et de l'adsorption indirecte de protéines chaperonnes sur des nanoparticules de silice.³³

La détection de larges complexes (10-100 nm), comme les ribonucléoprotéines, est plus surprenante, bien que l'hypothèse aurait pu être émise à partir des analyses Raman (Figure 3.19-B). En effet, ils ne sont généralement pas particulièrement représentés dans l'adsorption de protéines sur des surfaces inorganiques.¹³ Par ailleurs, il n'est pas attendu que le coefficient de partage entre l'interface A/L et le bulk soit plus important pour de grands complexes.⁶⁴ Certaines indications expérimentales suggèrent même qu'il soit plus faible.⁶⁵

Cependant et d'un point de vue physique, si les protéines sont considérées comme des sphères dures, alors leur comportement colloïdal en solution dépend aussi de leur polydispersité, de leur concentration en solution et de leur confinement. Il a été montré expérimentalement et par modélisation que la diffusion de larges protéines aux interfaces est plus faible par rapport à de petites protéines. Ce mécanisme pourrait justifier un temps de résidence plus long et une dynamique Brownienne (effets de l'agitation thermique) plus lente. Ceci favoriserait la déstabilisation et l'agrégation d'un nombre important de complexes protéiques à l'interface A/L où ils sont sujets à des forces de compression.⁶⁶

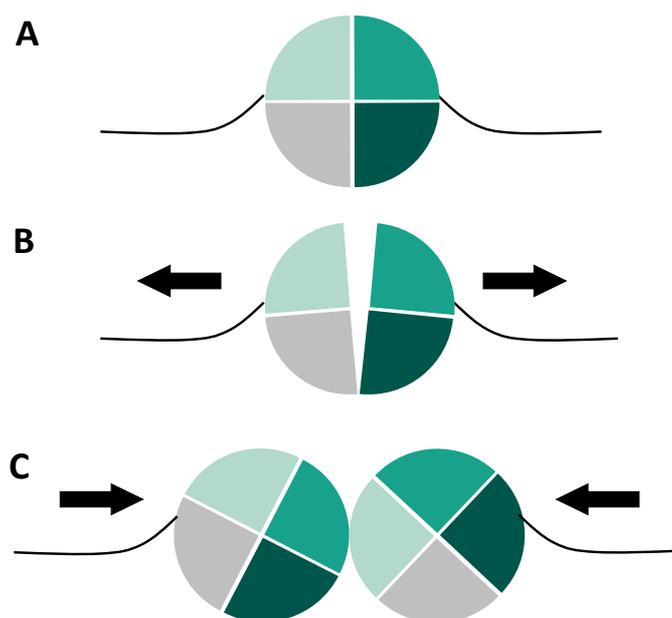


Figure 3.28. (A) Etat initial. (B) Les forces élastocapillaires tendent à dissocier les complexes. (C) Une diminution de l'interface conduit à l'association de protéines lorsque les forces sont plus importantes que les répulsions électrostatiques.

Cependant, des images récentes de cryoEM de solutions de protéines de taille importante (25 nm, comparable à la taille des complexes identifiés ici) montrent une adsorption rapide et quasi-totale à l'interface A/L. Cela résulte de dénaturations locales⁶⁷ et de dissociation des complexes.⁶⁸ Les résultats suggèrent un phénomène de distorsion/élongation des protéines à l'interface, induit par des forces capillaires (appelé effet élastocapillaire⁶⁹, figure 3.28). Il est attendu que ces forces capillaires fixent les particules à l'interface A/L⁷⁰ et favorisent leur coagulation.⁷¹ Elles peuvent également induire une contrainte notée Δ sur les protéines, le long de la ligne de contact. Un

ordre de grandeur des contraintes verticale et horizontale peut être approximé à l'aide des équation 3.4 et 3.5 (Figure 1 dans ⁶⁹).

$$\Delta_{\text{horizontale}} = \gamma \cos(\Theta) \quad (3.4)$$

$$\Delta_{\text{verticale}} = \gamma \sin(\Theta) \quad (3.5)$$

Avec γ la tension superficielle de la solution et Θ l'angle de contact entre l'eau et les protéines. Θ est une grandeur macroscopique mais qui dépend dans ce modèle des résidus et donc est hétérogène sur l'ensemble d'une protéine ou d'un mélange de protéines.⁷² En revanche, la norme du vecteur associé à la contrainte est indépendante de l'angle de contact. La tension de surface de la solution de protéines (55 mN.m⁻¹ pour l'EPL à 0,1 g.L⁻¹) peut donc être utilisée comme approximation de la contrainte Δ sur la ligne de contact entre la solution et l'air.

Le module d'Young, également appelé module d'élasticité, permet de relier une contrainte mécanique à la déformation résultante du matériau. Pour les protéines monomériques, le module d'Young est dans la gamme du GPa et les déformations associées sont à un niveau subangströmique. En revanche, pour des complexes protéiques, les modules d'Young nécessaires peuvent être dix fois plus faibles à cause de fragilités aux interfaces monomère-monomère au sein du complexe protéique.⁷³ Les tailles des objets sont quant à elles plus importantes, impliquant des forces totales plus élevées. Dans ces conditions, la déformation subie à l'interface A/L peut atteindre un nanomètre : les interactions entre les composants du complexe protéique sont rompues, révélant des surfaces hydrophobes, propices à l'agrégation.

Une explication complémentaire réside dans les compressions et décompressions périodiques induites par les fluctuations à la surface (Figure 3.25 et ^{39,74}), apportant des contraintes capillaires. Chaque diminution de surface de l'interface A/L pourrait induire une augmentation de la pression de surface ressentie par les protéines qui y sont adsorbées, de manière similaire aux compressions sur une cuve de Langmuir (bien que les vitesses de compression et dilatation sont plus importantes dans le cas des tubes agités). D'après Ramos et al.⁷⁵, la pression de surface P au repos peut être évaluée à partir du caractère tensioactif des protéines (Équation 3.6).

$$P = \gamma_{\text{eau}} - \gamma_{\text{prot}} \quad (3.6)$$

Avec γ_{eau} la tension superficielle de l'eau (72 mN.m⁻¹) et γ_{prot} la tension superficielle des solutions de protéines (55 mN.m⁻¹ pour l'extrait protéique à 0,1 g.L⁻¹).

L'augmentation de la pression est inversement proportionnelle à la diminution de la surface durant l'étape de compression. Au cours du cycle de rotation, la surface de l'interface A/L subit des variations d'un facteur 7 (Tableau 3.2), la pression peut donc atteindre 120 mN.m⁻² si on considère qu'elle s'exerce à une vitesse où les protéines à l'interface n'ont pas toutes le temps de repasser en solution (compression) ou de rejoindre l'interface (dilatation). Les forces correspondantes qui, comme les forces capillaires, dépendent de la taille des protéines (surface

occupée à l'interface), sont capables d'amener de larges complexes à la surface et donc de favoriser la formation des particules protéiques.

Les fluctuations de pression sont plus fréquentes dans des conditions turbulentes où les quantités de surfaces varient plus rapidement et de façon non linéaire. Dans ces conditions, l'énergie dissipée dans les structures protéiques (complexes, gels...) sera plus importante à cause de la viscosité intrinsèque des protéines^{76,77} et des assemblages protéiques.⁷⁸ De ce fait, les fluctuations amplifieront probablement les processus de déstructuration/restructuration survenant à la surface, menant à l'altération des protéines.

Outre les protéines qui sont sensibles aux stress, certaines sont significativement protégées par les effets d'agitation. La plupart d'entre elles sont de petits homo-oligomères métaboliques (Figure 3.27, en bas et Annexe A.2). Ces assemblages sont connus pour être plus stables et donc moins sujets à l'agrégation.⁷⁹ Il est tout de même difficile de comprendre comment le cisaillement peut les stabiliser. Une explication peut être liée au fait que de tels complexes oligomériques sont cinétiquement stables,⁸⁰ c'est-à-dire qu'ils s'assemblent plus vite qu'ils ne se dissocient. Cependant, en conditions diluées, leur assemblage cinétique, qui est contrôlé par la rencontre des composants des complexes, devient le facteur limitant de leur stabilité. Tout phénomène pouvant accélérer la rencontre, comme l'agitation, peut favoriser leur stabilité. Une autre explication peut être que ces complexes sont préférentiellement désorbés des surfaces par l'effet de cisaillement des turbulences. Dans certains cas, le cisaillement a été décrit comme diminuant la quantité de protéines adsorbées, particulièrement sur des surfaces hydrophobes.^{44,81} Dans le cas de protéines résistant à la désorption induite par le cisaillement, un réarrangement en îlots peut être observé. Cela montre que les interactions latérales entre les protéines sur une surface sont un paramètre important de l'adsorption sous cisaillement. Les homo-oligomères, par leur stabilité et le fait qu'ils soient peu exposés aux surfaces,⁸² sont moins sujets à de telles interactions, ils seront donc désorbés rapidement par les mouvements du liquide. Une explication serait donc que leur adsorption limitée sur les surfaces sous cisaillement les stabiliserait lors de l'exposition aux stress combinés décrits ici. Ces protéines sont donc, par leur nature, moins sujettes aux stress imposés ici mais il peut être envisagé de protéger des protéines étant sensibles, par exemple en passivant les surfaces. Un coating avec de la BSA est envisageable au vu de des propriétés d'adsorption bien connues de cette protéine.

3.5. VERS UN SUIVI DYNAMIQUE

Les observations précédentes ont été réalisées à l'issue d'une durée fixe d'agitation mais nous n'avons pas évoqué les effets liés au temps d'agitation. La réalisation d'une étude dynamique permettrait d'introduire des constantes apportant des informations complémentaires sur les mécanismes de dégradation. Un suivi cinétique de la perte de protéines a permis d'observer, qu'au-delà d'une dizaine d'heures de mélange, la quantité de protéines perdues n'évolue plus significativement. Un plateau semble être atteint à environ 14% (Figure 3.29).

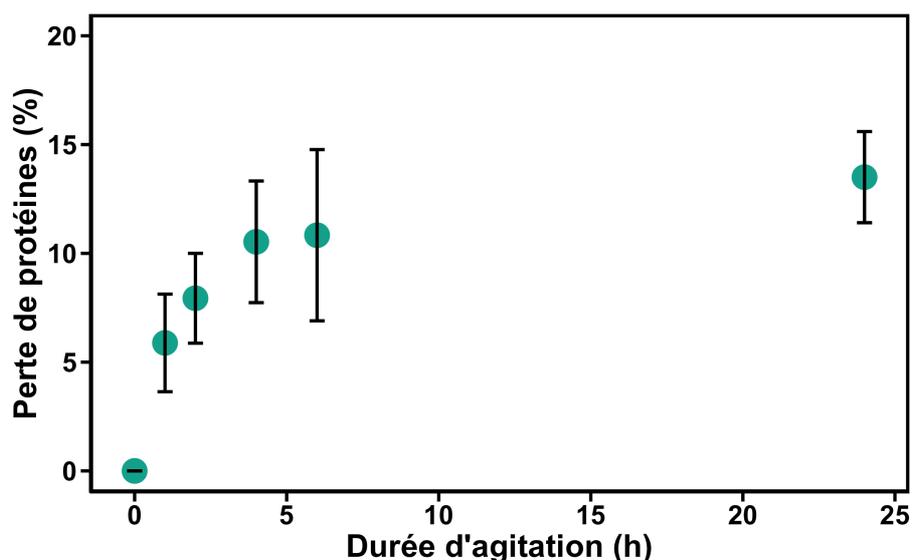


Figure 3.29. Perte de protéines en fonction de la durée d'agitation. Observations après agitation à 3 trs.min⁻¹ d'une solution d'EPL à 0,1 g.L⁻¹ dans un tube en PP contenant 10 mL.

Deux hypothèses peuvent être émises suite à l'observation de ce plateau :

- Il ne reste en solution que les protéines résistantes aux stress imposés, les protéines sensibles étant déjà déstabilisées ;
- Les interfaces A/L et L/S sont saturées en protéines (stables ou dénaturées), ce qui assure une protection pour les protéines restées en solution.

3.5.1. Premiers résultats

Pour identifier quelle hypothèse est la plus plausible, un suivi dynamique a été réalisé. Le tube en PP contenant la solution de protéines a été changé régulièrement (toutes les 30 min d'agitation) de sorte à renouveler les interfaces A/L et S/L. Si la première hypothèse est juste, un plateau sera également atteint vers 14% de perte, tandis que si la seconde hypothèse est correcte, une perte plus importante devrait être observée. Les résultats sont présentés en vert sur la figure 3.30, le point bleu correspond à un échantillon agité durant 6 h sans changement de tube.

Les pertes de protéines sont bien plus élevées lorsque le tube est changé régulièrement. Un plateau semble toutefois être atteint pour environ 45% de pertes après 6 changements de tube (7 tubes au total, 98 cm² d'interface A/L et 350 cm² d'interface S/L). Cette expérience montre qu'en renouvelant les interfaces, de nouvelles protéines sont exposées aux stress. La couche protéique à l'interface S/L semble donc avoir une action protectrice pour les protéines en solution. Il semblerait toutefois que plus de 50% des protéines soient résistantes à ces stress et restent en solution.

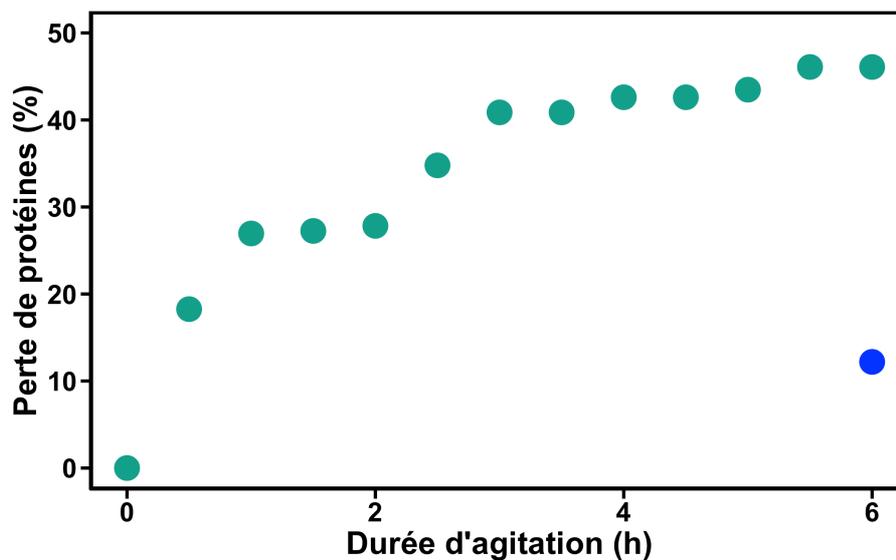


Figure 3.30. Perte de protéines en fonction de la durée d'agitation d'une solution d'EPL à 0,1 g.L⁻¹ à 3 trs.min⁻¹ dans un tube en PP contenant 10 mL. La concentration est mesurée à chaque changement de tube, soit toutes les 30 min. Le point bleu correspond à un échantillon agité 6 h sans changement de tube.

Pour aller plus loin dans cette analyse dynamique, il serait intéressant de faire un suivi en protéomique afin d'identifier, à chaque étape, les protéines déplétées. Pour des raisons de temps d'analyse et de coût cette étude n'a pas été réalisée par protéomique mais des gels d'acrylamides ont été effectués. Cette méthode permet de séparer les protéines en fonction de leur masse : les petites protéines migrent vite et seront donc dans la fraction inférieure du gel tandis que les plus grosses ont une vitesse de migration limitée et resteront dans la partie supérieure. L'intensité des bandes est dépendante de la concentration en protéine, ce sont donc uniquement les protéines les plus abondantes qui pourront être identifiées.

Huit échantillons ont été analysés sur gel (Figure 3.31) et correspondent à différentes durées de mélange (0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 et 6 h) avec un changement de tube toutes les 30 min. Les solutions de protéines ont donc respectivement été en contact avec 0 ; 1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10 et 12 tubes. Puisque pour un tube, l'interface A/L est de 14 cm² et l'interface S/L est de 50 cm², pour 13 tubes elles sont respectivement de 168 cm² et 600 cm². Il a été montré que la concentration en protéines évolue au cours de cette expérience (Figure 3.30). De la même façon que pour les

expériences de protéomique décrites dans la partie 3.4, une normalisation par la masse de protéines a été effectuée dans le but d'avoir la même sensibilité pour l'ensemble des échantillons.

L'évolution des gels après changement de tubes durant l'agitation montre des comportements différents en fonction des bandes de protéines. Pour certaines, une diminution progressive de l'intensité est observée, dépassant 20% de perte d'intensité (Figure 3.31-1 et 3), alors que d'autres conservent une intensité similaire tout au long de l'analyse (Figure 3.31-2). Cela semble confirmer que certaines protéines sont résistantes aux stress imposés.

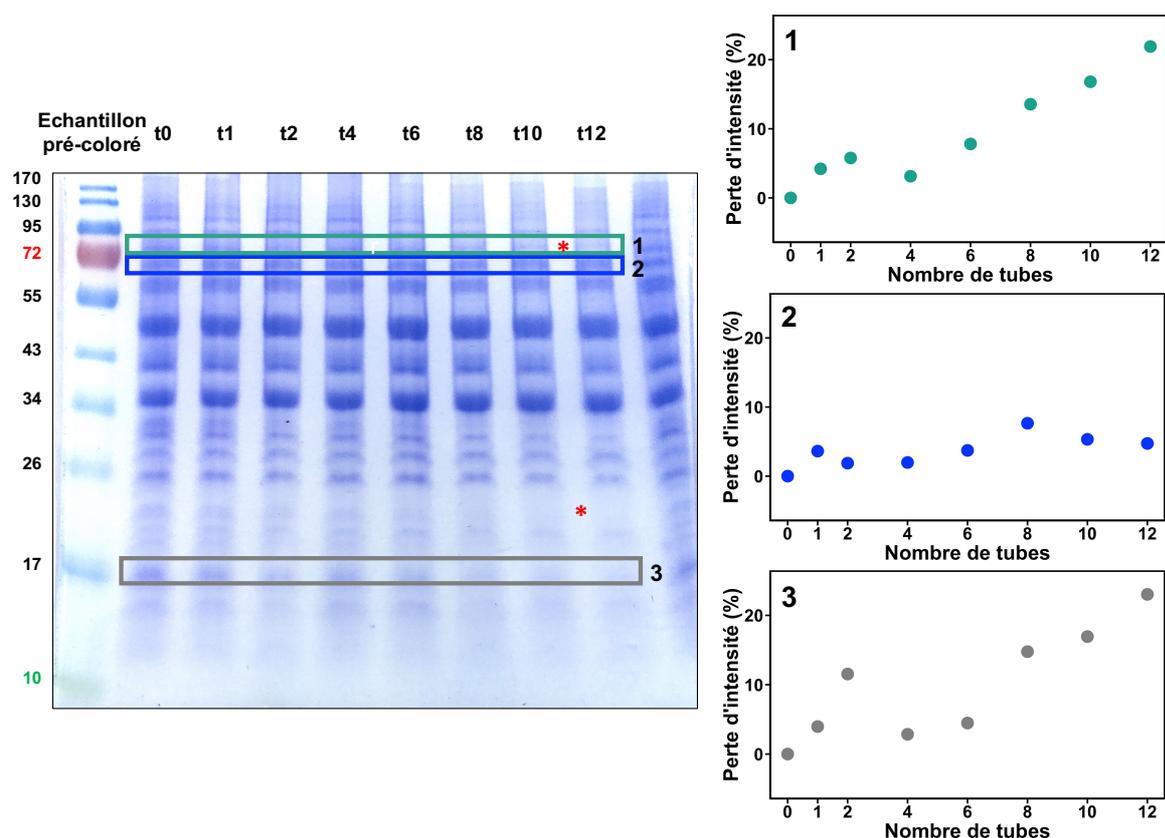


Figure 3.31. A gauche : Suivi des protéines sur gel suite à l'agitation d'une solution d'EPL à 0,1 g.L⁻¹ à 3 trs.min⁻¹ dans un tube en PP contenant 10 mL. Le tube est changé toutes les 30 min pour renouveler les interfaces A/L et L/S. Les gels correspondent à la solution initiale (t0) et aux échantillons contenus dans les 1^{er}, 2^{ème}, 4^{ème}, 6^{ème}, 8^{ème}, 10^{ème} et 12^{ème} tubes. L'échantillon pré-coloré est utilisé comme référence pour connaître les masses des protéines. A droite : évolution de l'intensité de trois bandes de protéines, déterminées à partir du gel par le logiciel Fiji.

La liste des 50 protéines les plus abondantes dans l'EPL^{83,84} a été confrontée avec celle des protéines identifiées comme déplétées après 24 h de mélange dans un tube (partie 3.4). Les listes complètes sont en Annexes A.2. Deux protéines ont été identifiées comme très abondantes et significativement déplétées d'après les expériences de protéomique : HSP72 (Heat shock protein) et TSA1 (Peroxisredoxin) de masses respectives 69 et 22 kDa. Bien qu'il soit difficile d'être plus précis, ces protéines pourraient correspondre aux bandes marquées d'un astérisque sur la figure 3.31 et seraient donc déplétées, de manière progressive, au cours de cette expérience. Le

renouvellement des interfaces A/L et L/S accélérerait leur déstabilisation. Ces attributions pourraient être vérifiées par analyse protéomique des bandes ou par électrophorèse couplée avec une reconnaissance par anticorps (attributions non réalisées par manque de temps).

3.5.2. Conclusions et perspectives

Ces expériences préliminaires vers un suivi dynamique des pertes de protéines au cours du mélange nous ont permis d'observer l'effet passivant de certaines protéines contenues dans l'EPL. Tout comme la BSA, en s'adsorbant aux interfaces elles protègent, en partie, les protéines en solution des stress générés par l'agitation. Nous avons également pu remarquer que plus de la moitié des protéines de l'EPL ne sont pas enclines à l'adsorption sur des tubes en PP et restent préférentiellement en solution. Des hypothèses ont pu être émises quant à la nature des protéines adsorbées ou protégées. Pour aller plus loin dans la compréhension des phénomènes, il serait nécessaire de réaliser un suivi par protéomique, permettant d'analyser précisément la composition protéique du système.

3.6. POINTS CLEFS ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE

Dans ce chapitre, nous avons montré que les protéines sont sensibles aux interfaces air/liquide fluctuantes. Cette sensibilité est renforcée par la présence d'une interface solide/liquide dynamique et d'un cisaillement d'interface. Bien qu'existants pour de petites protéines, ces effets sont plus importants pour les complexes protéiques larges. Ils sont suffisamment forts pour parvenir à perturber des protéines telles que l'hémoglobine et mènent à la formation d'agrégats de taille micronique (types gels de protéines contenant de forte quantité d'eau, diminution d'environ 30% dans nos expériences). Une fois des protéines adsorbées et les interfaces saturées, celles restant en solution seront moins sensibles aux stress.

Puisqu'autant de phénomènes antagonistes ou concurrents sont impliqués, il peut sembler étonnant que la déstabilisation des protéines soit observée si souvent. En réalité, une telle combinaison est très commune dans la mise en œuvre des protéines dans les activités de laboratoire ou d'industrie. Tous les échantillons protéiques sont stockés ou analysés dans des tubes durant leur production ou leur purification et, des interfaces fluctuantes sont formées dès lors que le tube est déplacé ou que la solution est agitée.

Les résultats ont permis d'identifier des leviers pour minimiser la dégradation des solutions de protéines. Cette étape était essentielle et préliminaire à toute expérience visant la compréhension du devenir des solutions de protéines en contact avec des microplastiques et leurs contenants au laboratoire.

Plus généralement, pour conserver un maximum de protéines en solution, différentes solutions peuvent être envisagées :

- Retirer l'air (même partiellement)
- Choisir le tube contenant en fonction de l'affinité du système protéique pour le matériau (expériences préliminaires à effectuer)
- Réaliser un coating avec une protéine ou un autre agent passivant
- Minimiser la quantité de sels dans la solution
- Réduire l'agitation

Ces informations peuvent être utiles aux industriels mettant en œuvre des protéines pour limiter leurs pertes.

3.7. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Rajan, R.; Ahmed, S.; Sharma, N.; Kumar, N.; Debas, A.; Matsumura, K. Review of the Current State of Protein Aggregation Inhibition from a Materials Chemistry Perspective: Special Focus on Polymeric Materials. *Mater. Adv.* 2021, 2 (4), 1139–1176. <https://doi.org/10.1039/d0ma00760a>.
- (2) Bai, G.; Bee, J. S.; Biddlecombe, J. G.; Chen, Q.; Leach, W. T. Computational Fluid Dynamics (CFD) Insights into Agitation Stress Methods in Biopharmaceutical Development. *Int. J. Pharm.* 2012, 423 (2), 264–280. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.11.044>.
- (3) Wang, W.; Ohtake, S. Science and Art of Protein Formulation Development. *Int. J. Pharm.* 2019, 568, 118505. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118505>.
- (4) Wang, W. Advanced Protein Formulations: Protein Formulations. *Protein Sci.* 2015, 24 (7), 1031–1039. <https://doi.org/10.1002/pro.2684>.
- (5) Frokjaer, S.; Otzen, D. E. Protein Drug Stability: A Formulation Challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005, 4 (4), 298–306. <https://doi.org/10.1038/nrd1695>.
- (6) Thomas, C. R.; Geer, D. Effects of Shear on Proteins in Solution. *Biotechnol. Lett.* 2011, 33 (3), 443–456. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0469-4>.
- (7) Aude, J. C. Habilitation à Diriger Des Recherches, 2022.
- (8) Mathé, C.; Devineau, S.; Aude, J.-C.; Lagniel, G.; Chédin, S.; Legros, V.; Mathon, M.-H.; Renault, J.-P.; Pin, S.; Boulard, Y.; Labarre, J. Structural Determinants for Protein Adsorption/Non-Adsorption to Silica Surface. *PLoS ONE* 2013, 8 (11), e81346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081346>.
- (9) Saudrais, F. Physico-Chimie Des Interactions de Plastiques Microstructurés Avec Des Protéines Ou Des Peptides Modèles Par Des Approches Expérimentales et in Silico, Université Paris-Saclay, 2023.
- (10) Dee, K. C.; Puleo, D. A.; Bizios, R. *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions*, Wiley-Liss.; 2002.
- (11) Young, B. R.; Pitt, W. G.; Cooper, S. L. Protein Adsorption on Polymeric Biomaterials I. Adsorption Isotherms. *J. Colloid Interface Sci.* 1988, 124 (1), 28–43. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(88\)90321-9](https://doi.org/10.1016/0021-9797(88)90321-9).
- (12) Hlady, V.; Buijs, J.; Jennissen, H. P. Methods for Studying Protein Adsorption. *Methods Enzymol.* 1999, 309, 402–429. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)09028-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)09028-X).
- (13) Marichal, L.; Klein, G.; Armengaud, J.; Boulard, Y.; Chédin, S.; Labarre, J.; Pin, S.; Renault, J.-P.; Aude, J.-C. Protein Corona Composition of Silica Nanoparticles in Complex Media: Nanoparticle Size Does Not Matter. *Nanomaterials* 2020, 10 (2), 240. <https://doi.org/10.3390/nano10020240>.
- (14) Trilisky, E. I.; Lenhoff, A. M. Sorption Processes in Ion-Exchange Chromatography of Viruses. *J Chromatogr A* 1142, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.094>.
- (15) Absolom, D. R.; Zingg, W.; Neumann, A. W. Protein Adsorption to Polymer Particles: Role of Surface Properties. *J. Biomed. Mater. Res.* 1987, 21 (2), 161–171. <https://doi.org/10.1002/jbm.820210202>.
- (16) Attwood, S. J.; Kershaw, R.; Uddin, S.; Bishop, S. M.; Welland, M. E. Understanding How Charge and Hydrophobicity Influence Globular Protein Adsorption to Alkanethiol and Material Surfaces. *J. Mater. Chem. B* 2019, 7 (14), 2349–2361. <https://doi.org/10.1039/C9TB00168A>.
- (17) Benavidez, T. E.; Torrente, D.; Marucho, M.; Garcia, C. D. Adsorption of Soft and Hard Proteins onto OTCEs under the Influence of an External Electric Field. *Langmuir* 2015, 31 (8), 2455–2462. <https://doi.org/10.1021/la504890v>.
- (18) Dobson, J.; Kumar, A.; Willis, L. F.; Tuma, R.; Higazi, D. R.; Turner, R.; Lowe, D. C.; Ashcroft, A. E.; Radford, S. E.; Kapur, N.; Brockwell, D. J. Inducing Protein Aggregation by Extensional Flow. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017, 114 (18), 4673–4678. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702724114>.
- (19) Yang, X.; Bolsa-Ferruz, M.; Marichal, L.; Porcel, E.; Salado-Leza, D.; Lux, F.; Tillement, O.; Renault, J.-P.; Pin, S.; Wien, F.; Lacombe, S. Human Serum Albumin in the Presence of AGuIX Nanoagents: Structure Stabilisation without Direct Interaction. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21 (13), 4673. <https://doi.org/10.3390/ijms21134673>.

- (20) Ruitenbergh, E. J.; Steerenberg, P. A.; Bros, B. J. M.; Buys, J. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) as Preventive and Repressive Control Method for the Detection of *Trichinella Spiralis* Infections in Slaughter Pigs. *Wiad. Parazytol.* 1975.
- (21) Engvall, E.; Perlmann, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G. *Immunochem. Pergamon Press* 1971, 8, 871–874.
- (22) Vogt, R. V.; Phillips, D. L.; Omar Henderson, L.; Whitfield, W.; Spierto, F. W. Quantitative Differences among Various Proteins as Blocking Agents for ELISA Microtiter Plates. *J. Immunol. Methods* 1987, 101 (1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(87\)90214-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(87)90214-6).
- (23) Erill, I.; Campoy, S.; Erill, N.; Barbé, J.; Aguiló, J. Biochemical Analysis and Optimization of Inhibition and Adsorption Phenomena in Glass–Silicon PCR-Chips. *Sens. Actuators B Chem.* 2003, 96 (3), 685–692. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(03\)00522-7](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00522-7).
- (24) Convert, L.; Chabot, V.; Zermatten, P.-J.; Hamel, R.; Cloarec, J.-P.; Lecomte, R.; Aimez, V.; Charette, P. G. Passivation of KMPR Microfluidic Channels with Bovine Serum Albumin (BSA) for Improved Hemocompatibility Characterized with Metal-Clad Waveguides. *Sens. Actuators B Chem.* 2012, 173, 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.07.061>.
- (25) Sweryda-Krawiec, B.; Devaraj, H.; Jacob, G.; Hickman, J. J. A New Interpretation of Serum Albumin Surface Passivation. *Langmuir* 2004, 20 (6), 2054–2056. <https://doi.org/10.1021/la034870g>.
- (26) Andrade, J. D.; Hlady, V.; Wei, A. P. Adsorption of Complex Proteins at Interfaces. *Pure Appl. Chem.* 1992, 64 (11), 1777–1781. <https://doi.org/10.1351/pac199264111777>.
- (27) Derjaguin, B.; Landau, L. Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged Particles in Solutions of Electrolytes. *Prog. Surf. Sci.* 1993, 43 (1–4), 30–59. [https://doi.org/10.1016/0079-6816\(93\)90013-L](https://doi.org/10.1016/0079-6816(93)90013-L).
- (28) Verwey, E.; Overbeek, T. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids: The Interaction of Sol Particles Having an Electric Double Layer*, Elsevier Publishing Company, New York, 1948.
- (29) Grolimund, D.; Elimelech, M.; Borkovec, M. Aggregation and Deposition Kinetics of Mobile Colloidal Particles in Natural Porous Media. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 2001, 191 (1–2), 179–188. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)00773-7](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)00773-7).
- (30) Dickson, A. G.; Goyet, C. *Handbook of Methods for the Analysis of the Various Parameters of the Carbon Dioxide System in Sea Water.*; U.S. Department of Energy, 1994.
- (31) Sáringer, S.; Akula, R. A.; Szerlauth, A.; Szilagyi, I. Papain Adsorption on Latex Particles: Charging, Aggregation, and Enzymatic Activity. *J. Phys. Chem. B* 2019, 123 (46), 9984–9991. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b08799>.
- (32) Ince-Coskun, A. E.; Ozdestan-Ocak, O. Effects of Salt Ions and Heating on the Behaviour of Whey Protein Particle Dispersions. *Food Hydrocoll.* 2020, 101, 105433. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105433>.
- (33) Klein, G.; Devineau, S.; Aude, J. C.; Boulard, Y.; Pasquier, H.; Labarre, J.; Pin, S.; Renault, J. P. Interferences of Silica Nanoparticles in Green Fluorescent Protein Folding Processes. *Langmuir* 2016, 32 (1), 195–202. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03890>.
- (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) Chouchane, K.; Frachon, T.; Marichal, L.; Nault, L.; Vendrely, C.; Maze, A.; Bruckert, F.; Weidenhaupt, M. Insulin Aggregation Starts at Dynamic Triple Interfaces, Originating from Solution Agitation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2022, 214, 112451. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112451>.
- (36) Thill, A.; Spalla, O. Aggregation Due to Capillary Forces during Drying of Particle Submonolayers. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 2003, 217 (1–3), 143–151. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00569-1](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00569-1).
- (37) Thaker, J.; Banerjee, J. Transition of Plug to Slug Flow and Associated Fluid Dynamics. *Int. J. Multiph. Flow* 2017, No. 91, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijmultiphaseflow.2017.01.014>.

- (38) Kadri, U. Long Liquid Slugs in Stratified Gas/Liquid Flow in Horizontal and Slightly Inclined Pipes, Institut israélien de technologie, 2009.
- (39) Bee, J. S.; Schwartz, D. K.; Trabelsi, S.; Freund, E.; Stevenson, J. L.; Carpenter, J. F.; Randolph, T. W. Production of Particles of Therapeutic Proteins at the Air–Water Interface during Compression/Dilation Cycles. *Soft Matter* 2012, 8 (40), 10329. <https://doi.org/10.1039/c2sm26184g>.
- (40) Murzyn, F. Etude de l'influence d'une onde sur les échelles de turbulence: Application à la houle. 201.
- (41) Takeuchi, M.; Doubell, M. J.; Jackson, G. A.; Yukawa, M.; Sagara, Y.; Yamazaki, H. Turbulence Mediates Marine Aggregate Formation and Destruction in the Upper Ocean. *Sci. Rep.* 2019, 9 (1), 16280. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52470-5>.
- (42) Vanapalli, S. A.; Ceccio, S. L.; Solomon, M. J. Universal Scaling for Polymer Chain Scission in Turbulence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006, 103 (45), 16660–16665. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607933103>.
- (43) Brauner, N. Modelling of Wavy Flow in Turbulent Free Falling Films. *Int. J. Multiph. Flow* 1989, 15 (4), 505–520. [https://doi.org/10.1016/0301-9322\(89\)90050-5](https://doi.org/10.1016/0301-9322(89)90050-5).
- (44) Uyen, H. M. W.; Schakenraad, J. M.; Sjollem, J.; Noordmans, J.; Jongebloed, W. L.; Stokroos, I.; Busscher, H. J. Amount and Surface Structure of Albumin Adsorbed to Solid Substrata with Different Wettabilities in a Parallel Plate Flow Cell. *J. Biomed. Mater. Res.* 1990, 24 (12), 1599–1614. <https://doi.org/10.1002/jbm.820241205>.
- (45) King, L.; Weber, G. Conformational Drift of Lactate Dehydrogenase. *Biophys. J.* 1986, 49, 72–73. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(86\)83597-4](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(86)83597-4) (1986).
- (46) Norde, W.; Anusiem, A. C. I. Adsorption, Desorption and Re-Adsorption of Proteins on Solid Surfaces. *Colloids Surf.* 1992, 66 (1), 73–80. [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(92\)80122-1](https://doi.org/10.1016/0166-6622(92)80122-1).
- (47) Valenti, L. E.; Fiorito, P. A.; García, C. D.; Giacomelli, C. E. The Adsorption–Desorption Process of Bovine Serum Albumin on Carbon Nanotubes. *J. Colloid Interface Sci.* 2007, 307 (2), 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.11.046>.
- (48) Jung-Hyun; Jeong-Yeol, Y. Protein Adsorption on Polymer Particles. *Encycl. Surf. Colloid Sci.* 2002.
- (49) 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>.
- (50) Lin, G. L.; Pathak, J. A.; Kim, D. H.; Carlson, M.; Rigüero, V.; Kim, Y. J.; Buff, J. S.; Fuller, G. G. Interfacial Dilatational Deformation Accelerates Particle Formation in Monoclonal Antibody Solutions. *Soft Matter* 2016, 12 (14), 3293–3302. <https://doi.org/10.1039/C5SM02830B>.
- (51) Rudiuk, S.; Cohen-Tannoudji, L.; Huille, S.; Tribet, C. Importance of the Dynamics of Adsorption and of a Transient Interfacial Stress on the Formation of Aggregates of IgG Antibodies. *Soft Matter* 2012, 8 (9), 2651. <https://doi.org/10.1039/c2sm07017k>.
- (52) Movasaghi, Z.; Rehman, S.; Rehman, I. U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.* 2007, 42 (5), 493–541. <https://doi.org/10.1080/05704920701551530>.
- (53) Leulliot, N. Unusual Nucleotide Conformations in GNRA and UNCG Type Tetraloop Hairpins: Evidence from Raman Markers Assignments. *Nucleic Acids Res.* 1999, 27 (5), 1398–1404. <https://doi.org/10.1093/nar/27.5.1398>.
- (54) Labesse, G.; Craescu, C. T.; Mispelter, J.; Chottard, G.; Marden, M. C.; Pin, S.; Forest, E.; Mornon, J.-P.; Boccardo, M. Engineering, Expression and Biochemical Characterization of the Hemoglobin Domain of a *Erwinia Chrysanthemi* Flavohemoprotein. *Eur. J. Biochem.* 1998, 253 (3), 751–759. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2530751.x>.
- (55) Champion, P. M.; Gunsalus, I. C.; Wagner, G. C. Resonance Raman Investigations of Cytochrome P450CAM from *Pseudomonas Putida*. *J. Am. Chem. Soc.* 1978, 100 (12), 3743–3751. <https://doi.org/10.1021/ja00480a015>.

- (56) Mołoń, M.; Molestak, E.; Kula-Maximenko, M.; Grela, P.; Tchórzewski, M. Ribosomal Protein UL11 as a Regulator of Metabolic Circuits Related to Aging and Cell Cycle. *Cells* 2020, 9 (7), 1745. <https://doi.org/10.3390/cells9071745>.
- (57) Talaikis, M.; Strazdaitė, S.; Žiaunys, M.; Niaura, G. Far-Off Resonance: Multiwavelength Raman Spectroscopy Probing Amide Bands of Amyloid- β -(37–42) Peptide. *Molecules* 2020, 25 (15), 3556. <https://doi.org/10.3390/molecules25153556>.
- (58) Sluzky, V.; Klibanov, A. M.; Langer, R. Mechanism of Insulin Aggregation and Stabilization in Agitated Aqueous Solutions. *Biotechnol. Bioeng.* 1992, 40 (8), 895–903. <https://doi.org/10.1002/bit.260400805>.
- (59) Salis, A.; Bostr, M.; Ninham, B. W.; Monduzzi, M. Measurements and Theoretical Interpretation of Points of Zero Charge/Potential of BSA Protein. 2011, 8.
- (60) Millán-Oropeza, A.; Blein-Nicolas, M.; Monnet, V.; Zivy, M.; Henry, C. Comparison of Different Label-Free Techniques for the Semi-Absolute Quantification of Protein Abundance. *Proteomes* 2022, 10 (1), 2. <https://doi.org/10.3390/proteomes10010002>.
- (61) Polymer Molecular Weight Distribution and Definitions of MW Averages. Technical Overview. *Agil. Technol.* 2015.
- (62) Lescq, J. Masses molaires moyennes. *Tech. Ing.* 1996, Ref. A3060 V2.
- (63) Schvartz, M.; Saudrais, F.; Stéphanie, D.; Jean-Christophe, A.; Stéphane, C.; Henry, C.; Millán-Oropeza, A.; Perrault, T.; Pieri, L.; Serge, P.; Boulard, Y.; Brotons, G.; Jean-Philippe, R. A Proteome Scale Study Reveals How Plastic Surfaces and Agitation Promote Protein Aggregation. *Sci. Rep.* 2023.
- (64) Krishnan, A.; Siedlecki, C. A.; Vogler, E. A. Traube-Rule Interpretation of Protein Adsorption at the Liquid–Vapor Interface. *Langmuir* 2003, 19 (24), 10342–10352. <https://doi.org/10.1021/la035308t>.
- (65) Damodaran, S.; Razumovsky, L. Role of Surface Area-to-Volume Ratio in Protein Adsorption at the Air–Water Interface. *Surf. Sci.* 2008, 602 (1), 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.susc.2007.10.018>.
- (66) Beck, C.; Grimaldo, M.; Lopez, H.; Da Vela, S.; Sohmen, B.; Zhang, F.; Oettel, M.; Barrat, J.-L.; Roosen-Runge, F.; Schreiber, F.; Seydel, T. Short-Time Transport Properties of Bidisperse Suspensions of Immunoglobulins and Serum Albumins Consistent with a Colloid Physics Picture. *J. Phys. Chem. B* 2022, 126 (38), 7400–7408. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c02380>.
- (67) D’Imprima, E.; Floris, D.; Joppe, M.; Grininger, M. Protein Denaturation at the Air-Water Interface and How to Prevent It. *eLife* 2019, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.42747>.
- (68) Klebl, D. P. Need for Speed: Examining Protein Behavior during CryoEM Grid Preparation at Different Timescales. *CellPress* 2020, 28 (11), 1238–1248. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.07.018>.
- (69) Hui, C.-Y.; Jagota, A. Deformation near a Liquid Contact Line on an Elastic Substrate. *Proc. R. Soc. A* 2014, 470 (2167), 13. <https://doi.org/10.1098/rspa.2014.0085>.
- (70) Kralchevsky, P. A.; Nagayama, K. Capillary Forces between Colloidal Particles. *Langmuir* 1994, 10 (1), 23–36. <https://doi.org/10.1021/la00013a004>.
- (71) Lehle, H.; Oettel, M.; Dietrich, S. Effective Forces between Colloids at Interfaces Induced by Capillary Wavelike Fluctuations. *Europhys. Lett. EPL* 2006, 75 (1), 174–180. <https://doi.org/10.1209/epl/i2006-10065-1>.
- (72) Zhu, C.; Gao, Y.; Li, H.; Meng, S.; Li, L.; Francisco, J. S.; Zeng, X. C. Characterizing Hydrophobicity of Amino Acid Side Chains in a Protein Environment via Measuring Contact Angle of a Water Nanodroplet on Planar Peptide Network. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016, 113 (46), 12946–12951. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616138113>.
- (73) Song, G. Bridging between Material Properties of Proteins and the Underlying Molecular Interactions. *PLOS ONE* 2021, 16 (5), e0247147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247147>.
- (74) van Aken, G. A.; Merks, M. T. E. Adsorption of Soluble Proteins to Dilating Surfaces. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 1996, 114, 221–226. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(96\)03526-1](https://doi.org/10.1016/0927-7757(96)03526-1).

- (75) Poirier, A.; Banc, A.; Stocco, A.; In, M.; Ramos, L. Multistep Building of a Soft Plant Protein Film at the Air-Water Interface. *J. Colloid Interface Sci.* 2018, 526, 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.04.087>.
- (76) Wang, Y.; Zocchi, G. Viscoelastic Transition and Yield Strain of the Folded Protein. *PLoS ONE* 2011, 6 (12), e28097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028097>.
- (77) Ariyaratne, A.; Wu, C.; Tseng, C.-Y.; Zocchi, G. Dissipative Dynamics of Enzymes. *Phys. Rev. Lett.* 2014, 113 (19), 198101. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.113.198101>.
- (78) Drozdov, A. D.; deClaville Christiansen, J. Thermo-Viscoelastic Response of Protein-Based Hydrogels. *Bioengineering* 2021, 8 (6), 73. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8060073>.
- (79) André, I.; Strauss, C. E. M.; Kaplan, D. B.; Bradley, P.; Baker, D. Emergence of Symmetry in Homooligomeric Biological Assemblies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008, 105 (42), 16148–16152. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807576105>.
- (80) Xia, K.; Manning, M.; Hesham, H.; Lin, Q.; Bystroff, C.; Colón, W. Identifying the Subproteome of Kinetically Stable Proteins via Diagonal 2D SDS/PAGE. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007, 104 (44), 17329–17334. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705417104>.
- (81) Szymanski, W.; Szymanski, J.; Walczynska, M.; Magdalena; Komorowski, P.; Okroj, W.; Jakubowski, W.; Kaminska, M.; Walkowiak, B. SPR Biosensor Technique Supports Development in Biomaterials Engineering. In *New Perspectives in Biosensors Technology and Applications*; Serra, P. A., Ed.; InTech, 2011. <https://doi.org/10.5772/16874>.
- (82) Gaber, A.; Pavšič, M. Modeling and Structure Determination of Homo-Oligomeric Proteins: An Overview of Challenges and Current Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22 (16), 9081. <https://doi.org/10.3390/ijms22169081>.
- (83) *Protein Abundance Database*. <https://pax-db.org/species/4932> (accessed 2022-11-01).
- (84) *Saccharomyces Genome Database*. <https://www.yeastgenome.org> (accessed 2022-11-01).

CHAPITRE 4. FORMATION D'UNE CORONA SUR DES MICROPLASTIQUES

Le chapitre précédent nous a permis de mieux comprendre l'impact de la nature des tubes et des paramètres d'agitation sur le comportement des protéines en solution. Dans ce chapitre, portant sur les interactions entre un Extrait Protéique de Levure (EPL) et des microplastiques (MP), nous utiliserons systématiquement un échantillon sans MP comme référence afin de dissocier les effets des particules des autres facteurs expérimentaux.

Ce chapitre a pour objectif de caractériser la corona protéique formée sur des MP. Le polyéthylène et le polypropylène ont été sélectionnés car ce sont les matériaux plastiques les plus produits et les plus persistants.¹ Ils sont donc retrouvés en majorité dans l'environnement où ils peuvent interagir avec le vivant. Ils y sont peu à peu dégradés à cause des contraintes mécaniques, des variations de température ou des UV,²⁻⁴ c'est pourquoi nous avons étudié l'effet de leur vieillissement sur les interactions avec les protéines. Dans la nature, il existe des gradients de pH et de salinité, nous avons également étudié l'impact de ces paramètres.

A partir de la quantification des protéines adsorbées, de l'imagerie de la corona par microscopie de fluorescence utilisant les radiations synchrotron et de l'identification des protéines adsorbées par protéomique, nous avons obtenu une caractérisation globale de la corona, permettant une meilleure compréhension des interactions.

CHAPITRE 4. FORMATION D'UNE CORONA SUR DES MICROPLASTIQUES.....	131
4.1. CARACTERISATION DES MICROPLASTIQUES NATIFS ET VIEILLIS.....	135
4.1.1. DONNEES FOURNISSEUR ET PROCEDES D'OBTENTION.....	135
4.1.2. DISTRIBUTION EN TAILLES.....	136
4.1.3. PROPRIETES DE SURFACE.....	138
4.1.3.1. Surface spécifique.....	138
4.1.3.2. Angles de contact.....	140
4.1.3.3. Chimie de surface.....	141
4.1.4. COMPOSITION ET STRUCTURE.....	144
4.1.4.1. Spectres infrarouges.....	144
4.1.4.2. Calorimétrie.....	145
4.1.4.3. Imagerie Raman.....	146
4.1.4.4. Diffraction des rayons X.....	148
4.1.4.5. Fluorescence.....	149
4.1.5. RECAPITULATIF DES INFORMATIONS OBTENUES.....	151
4.2. QUANTIFICATION DES PROTEINES ADSORBEES.....	152
4.2.1. STRATEGIE EXPERIMENTALE.....	152
4.2.1.1. Quantification des protéines.....	152
4.2.1.2. Mise en contact.....	153
4.2.1.3. Séparation des protéines libres et des microplastiques.....	154
4.2.2. EFFET DE LA SURFACE.....	155
4.2.2.1. Nature du polymère.....	155
4.2.2.2. État de vieillissement.....	157
4.2.3. EFFET DU CHANGEMENT DE PH ET DE L'EAU DE MER.....	159
4.3. IMAGERIE DE LA COURONNE DE PROTEINES.....	162
4.3.1. CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	162
4.3.1.1. Obtention des particules dispersées.....	162
4.3.1.2. Conditions d'analyse.....	162
4.3.2. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'ANALYSE AUTOMATISEE.....	165
4.3.2.1. Correction des images et sélection des zones d'intérêt.....	165
4.3.2.2. Extraction des données d'intérêt.....	168
4.3.2.3. Limites.....	169
4.3.3. DETERMINATION DES PARAMETRES IMPACTANT LA CORONA.....	170
4.3.3.1. Paramètres étudiés.....	170
4.3.3.2. Résultats.....	171
4.3.3.3. Bilan.....	173
4.3.4. ÉTUDE DES AGREGATS PROTEIQUES.....	174
4.4. IDENTIFICATION DES PROTEINES IMPACTEES PAR LES MICROPLASTIQUES.....	176
4.4.1. APPROCHE EXPERIMENTALE.....	176

4.4.2. RESULTATS	178
4.4.2.1. Analyse quantitative	178
4.4.2.2. Analyse des paramètres physico-chimiques.....	181
4.4.2.3. Apport des données de protéomique à la compréhension des interactions.....	185
4.5. POINTS CLEFS ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE.....	187
4.6. BIBLIOGRAPHIE.....	189

4.1. CARACTERISATION DES MICROPLASTIQUES NATIFS ET VIEILLIS

Cette première partie vise à recenser l'ensemble des informations obtenues sur les microplastiques étudiés. Ils ont été caractérisés par différentes techniques afin de déterminer leur distribution en tailles, leur surface spécifique, leur chimie de surface, leur composition, leur structure ainsi que leurs propriétés de fluorescence. Ces données sont essentielles pour comprendre les phénomènes d'adsorption des protéines étudiés par la suite.

4.1.1. Données fournisseur et procédés d'obtention

Les microplastiques utilisés au cours de cette étude sont des particules commerciales données par l'entreprise Clariant. Du polyéthylène (référence : Ceridust 3610) et du polypropylène (référence Ceridust 6050M) ont été sélectionnés puisque ces matériaux sont les plus produits et les plus persistants. Certaines informations ont été communiquées par le fournisseur, elles sont répertoriées dans le tableau 4.1, ainsi que l'aspect des poudres et la structure chimique des polymères constituant ces plastiques.

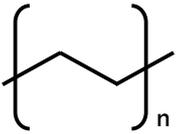
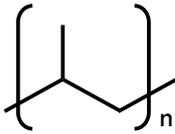
	Polyéthylène (PE)	Polypropylène (PP)
Masse volumique (g.cm ⁻³ à 23°C)	~ 0.97	~ 0.90
Diamètre D ₅₀ (µm)	~ 5	~ 9,5
Structure chimique		
Aspect		
	Poudre blanche	Poudre blanche

Tableau 4.1. Données techniques des microplastiques communiquées par le fournisseur, structure chimique et aspect macroscopique.

Dans l'environnement, les matériaux plastiques subissent des contraintes mécaniques et sont exposés aux UV, modifiant leur chimie, leur structure et donc les interactions qu'ils peuvent avoir avec des biomolécules. Pour prendre en compte ces phénomènes, nous avons étudié les microplastiques commerciaux dans leur état natif et après un vieillissement artificiel. Il a été

observé que le PP se dégrade plus rapidement que le PE, les méthodes de vieillissement appliquées ont donc été différentes pour les deux types de microplastiques (tableau 4.2). Nous appellerons le polyéthylène PE, le polypropylène PP, le polyéthylène vieilli PEV et le polypropylène vieilli PPV.

	Polyéthylène vieilli (PEV)	Polypropylène vieilli (PPV)
Méthode de vieillissement	Thermique	Irradiation
Protocole	80°C, 2 mois	2 MGy
Aspect		
	Poudre légèrement jaune	Poudre légèrement jaune

Tableau 4.2. Méthode de vieillissement appliquée pour les deux types de MP et aspect macroscopique.

D'un point de vue macroscopique, les plastiques natifs sont des poudres blanches et n'ont pas d'odeur particulière. Suite au vieillissement, ils ont une couleur légèrement jaune et dégagent une odeur. Ces observations sont plus marquées pour le PPV que pour le PEV. La coloration jaune est couramment observée sur des plastiques ayant subi une photo-oxydation.¹ Elle peut également être associée à une fragilisation du matériau.² L'odeur quant à elle provient du relargage de molécules, par exemple de monomères ou bien d'additifs présents dans les MP.^{3,4} Pour identifier ces molécules, il serait possible de réaliser une chromatographie en phase gazeuse. Cela n'a pas été effectué par manque de temps.

4.1.2. Distribution en tailles

Les particules étudiées sont polydisperses et de morphologies différentes comme le montrent les images obtenues (Figure 4.1). Pour obtenir les distributions en tailles, le diamètre de Féret de 250 particules a été déterminé à l'aide du logiciel Fiji (Figure 4.2). Les résultats montrent que les particules de PP sont de tailles plus importantes que les particules de PE et que le vieillissement n'a pas d'impact sur la taille des particules de PP. En revanche, il apparaît que les particules de PE ont une taille plus importante après vieillissement (p -value = $5,8 \cdot 10^{-11}$), passant d'un diamètre de Féret médian de 4,2 à 5,8 μm après irradiation.

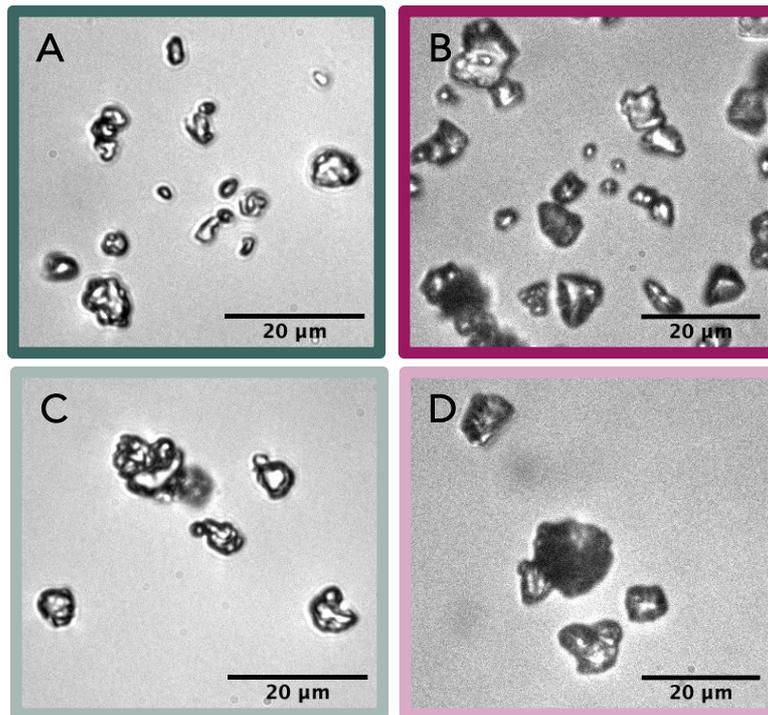


Figure 4.1. Images en microscopie inversée (Zeiss Observer Z1, ligne DISCO, synchrotron SOLEIL) des particules de polyéthylène (A), polypropylène (B), polyéthylène vieilli (C) et polypropylène vieilli (D). Le traitement des images est détaillé dans la partie 4.3.2.1.

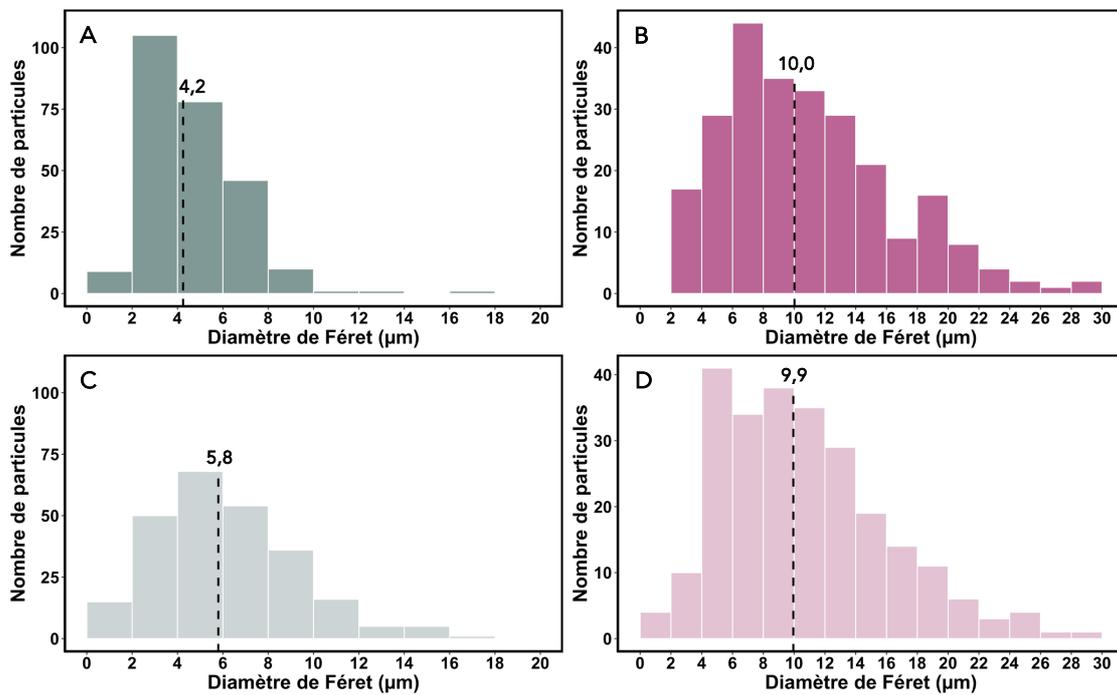


Figure 4.2. Distributions des diamètres de Féret pour 250 particules de polyéthylène (A), polypropylène (B), polyéthylène vieilli (C) et polypropylène vieilli (D). Les valeurs situées au-dessus des traits discontinus correspondent à la médiane en µm.

4.1.3. Propriétés de surface

4.1.3.1. Surface spécifique

Des mesures de diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS) ont été réalisées afin de déterminer la surface spécifique des microplastiques. Cette information permet de connaître la surface de plastique disponible pour les interactions avec les protéines.

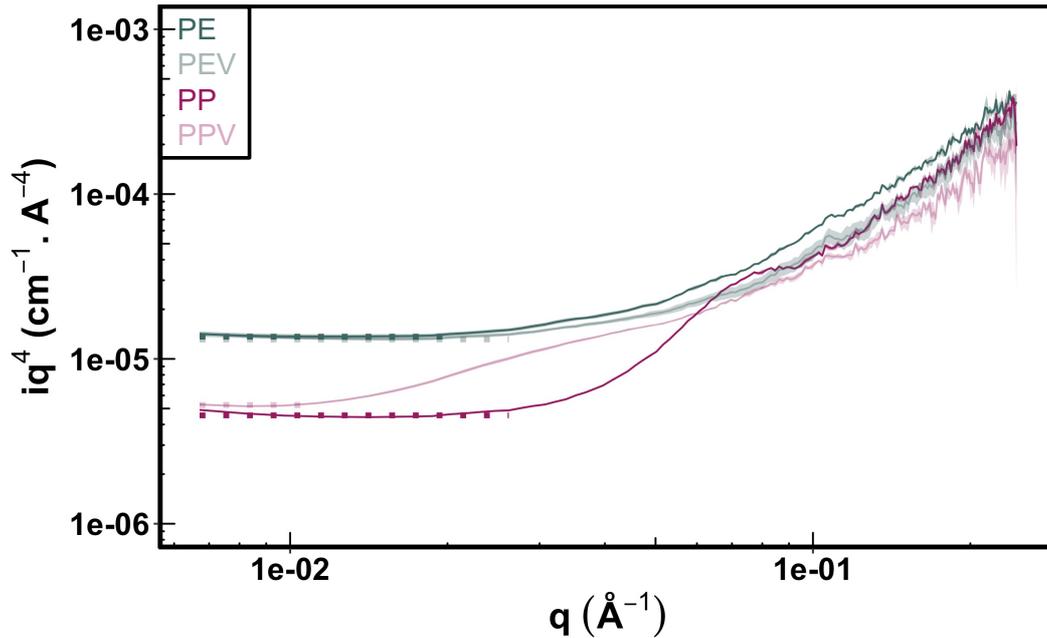


Figure 4.3. Diffraction des rayons X aux petits angles des microplastiques sous forme de poudre. Les courbes correspondent aux données expérimentales et les carrés correspondent aux points utilisés pour déterminer la surface spécifique.

La figure 4.3 présente les données de SAXS des poudres de PE, PP natifs et vieillis en représentation de Porod avec Iq^4 en fonction de q . I correspond à l'intensité de diffusion et q au vecteur de diffusion. Pour l'ensemble des MP, un plateau apparaît clairement pour les faibles valeurs de q (en dessous de $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$ pour PE, PEV et PP et en dessous de $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$ pour PPV) et correspond à une dépendance en q^{-4} de l'intensité apparente, résultant de la diffusion de l'interface entre les particules et l'air. A partir de l'intensité au niveau du plateau $\lim_{q \rightarrow 0} (Iq^4)$, la valeur de la surface spécifique peut être déterminée (voir paragraphe 2.2.2).

σ_m (m ² .g ⁻¹)	PE	PEV	PP	PPV
Expérimental	2,5	2,4	1,1	1,2
Calculé	1,5	1,1	0,7	0,7

Tableau 4.3. Valeurs des surfaces spécifiques des poudres de MP de PE, PEV, PP et PPV déterminées à partir des courbes de SAXS (figure 4.3) et de l'équation 2.6 (paragraphe 2.2.2) ou calculées à partir des diamètres de Féret médians (figure 4.2) en considérant que les particules sont des sphères parfaites.

Les valeurs obtenues (tableau 4.3, première ligne) sont mesurées indépendamment de la compacité de la poudre. La comparaison de ces valeurs avec celles calculées à partir des diamètres de Féret dans le cas de sphères parfaites (tableau 4.3, seconde ligne), montre que la surface des particules est plutôt lisse avec une faible rugosité.

Les MP natifs ont des allures différentes : le PE a une surface spécifique plus importante que le PP. Nous pouvons corrélérer cette observation à la taille des particules : les particules de PE sont plus petites, elles ont donc une surface disponible par unité de masse plus importante que les particules de PP.

Le PE et le PEV sont très proches aux petits angles, ce qui correspond à une surface spécifique quasiment identique (PE : 2,5 et PEV : 2,4 m².g⁻¹). Il semble que le traitement par irradiation n'ait pas d'effet significatif sur la surface spécifique des particules. Or, les distributions de tailles présentées précédemment ont montré une différence de taille significative suite à l'irradiation. Il est possible qu'il y ait eu à la fois de l'agglomération et que la rugosité ait augmenté suite à l'irradiation. Une autre explication peut être liée à un problème d'échantillonnage, potentiellement causé par une hétérogénéité des effets de l'irradiation.

Le PP présente un pic de corrélation à $q=8.10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$. D'après le modèle d'Hosmann, cela traduit une organisation interne en couches lamellaires séparées par des domaines amorphes (qui peuvent ne représenter qu'une faible fraction volumique de la particule).⁵ Cette organisation lamellaire des chaînes de polymères est courante pour les matériaux plastiques.^{6,7}

Suite au vieillissement ce pic est décalé vers les plus petits angles et s'étale sur une gamme plus importante. Le traitement thermique opéré sur le polypropylène semble avoir modifié l'organisation des chaînes dans les particules puisque la surface spécifique du PPV n'est pas significativement différente par rapport à celle du PP natif.

4.1.3.2. Angles de contact

Pour obtenir des informations sur le caractère hydrophile ou hydrophobe des MP étudiés, des mesures d'angle de contact de gouttes d'eau pure ont été réalisées sur des lits de poudre de MP. Ces mesures ont été effectuées après un équilibre de 30 min, une entrée dans le lit de poudre est observée dans tous les cas mais est particulièrement marquée dans le cas du PPV (Figure 4.4).

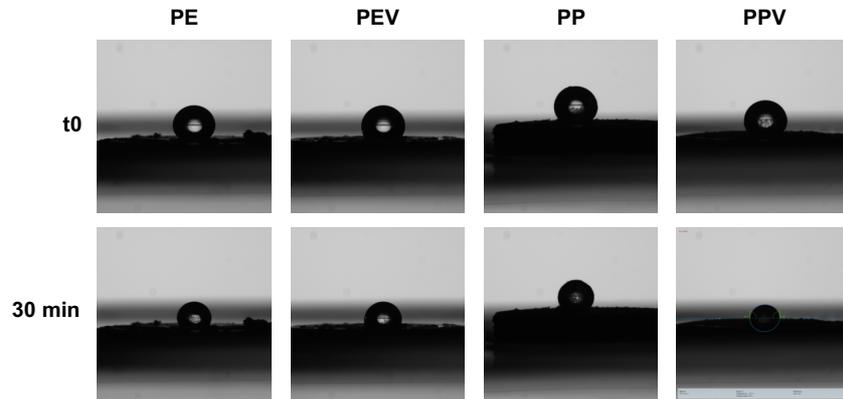


Figure 4.4. Images de gouttes d'eau pure (7,5 µL) posées sur des lits de poudres de PE, PEV, PP et PPV à l'instant initial et après 30 minutes d'équilibre à température ambiante.

La figure 4.5 présente ces résultats et montre que toutes les surfaces sont hydrophobes (angles supérieurs à 90°). Il n'y a pas de différence significative entre le PE et le PP dans leur état natif. En revanche, après vieillissement des MP, une diminution de l'angle de contact est à noter, à la fois pour le PE et pour le PP mais avec un effet plus prononcé pour le PP (32° de différence entre le PP et le PPV ; 16° de différence entre le PE et le PEV). Une oxydation des particules suite au vieillissement est probablement à l'origine de ces phénomènes puisque l'introduction d'atomes d'oxygène rend les surfaces moins hydrophobes.

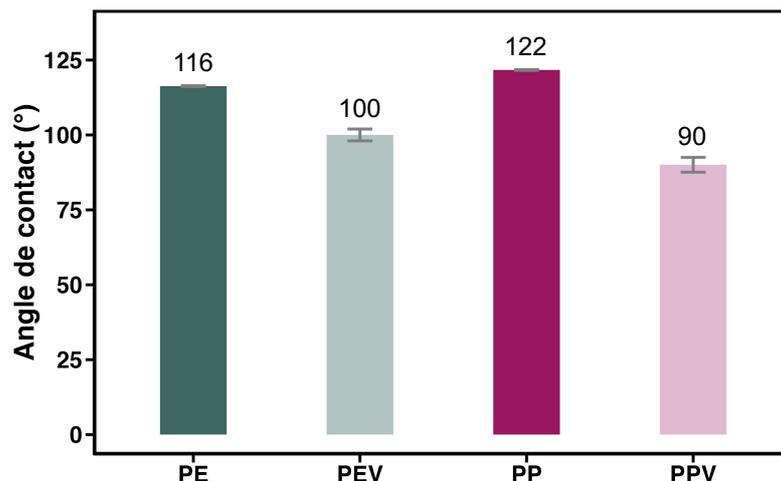


Figure 4.5. Angles de contact d'une goutte d'eau pure de 7,5 µL sur les MP de PE, PEV, PP et PPV sous forme de poudre. Les données sont obtenues par la moyenne des angles droit et gauche après 30 min d'équilibre à température et humidité ambiantes.

4.1.3.3. Chimie de surface

Des expériences de spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) ont été menées afin de connaître la composition chimique de la surface des particules. Cela permet de caractériser l'état d'oxydation des particules natives et vieilles et également de savoir si des polluants sont présents à leur surface et risqueraient de modifier les interactions avec les protéines.

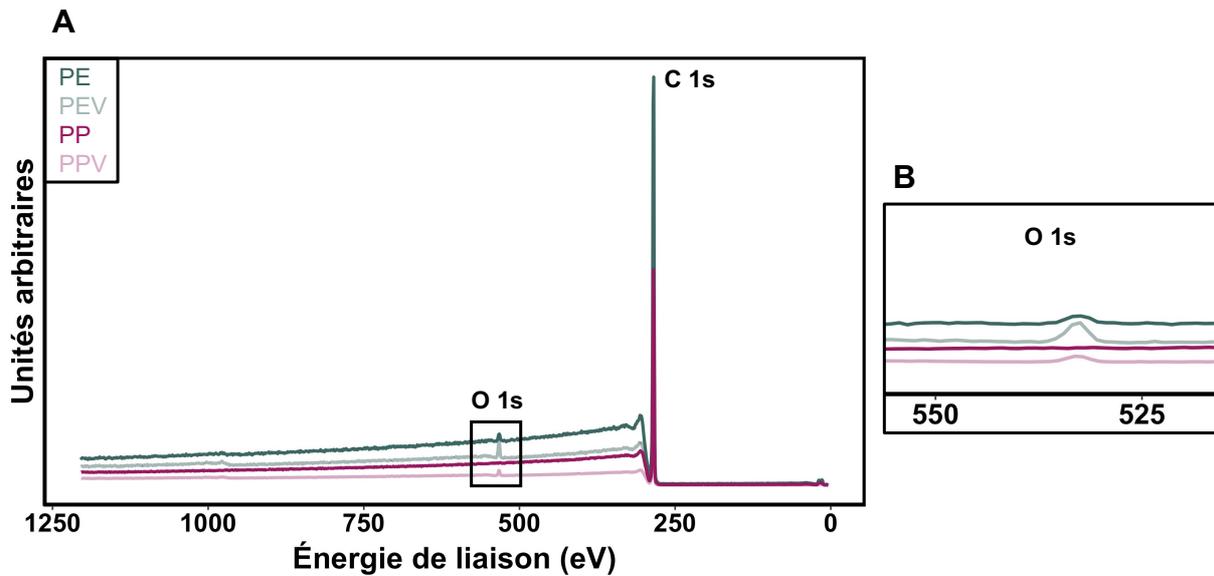


Figure 4.6. Spectres XPS des microplastiques natifs et vieillis (PE et PP) et 1250 à 0 eV (A) et zoom sur la zone de l'oxygène 1s (B). Uniquement du carbone et de l'oxygène sont présents en surface des particules. Le PP ne contient pas d'oxygène en surface dans son état natif.

La figure 4.6 représente les spectres XPS des quatre échantillons. Seuls les pics correspondant à du carbone et à de l'oxygène sont présents. Dans le cas du PP, les spectres XPS n'ont pas mis en évidence la présence d'oxygène, la surface du matériau correspond bien à du polypropylène sans polluant ni oxydation.⁸ Pour observer plus précisément l'environnement des atomes de carbone et d'oxygène, des spectres de plus haute résolution ont été enregistrés sur des gammes d'énergie de liaison plus faibles.

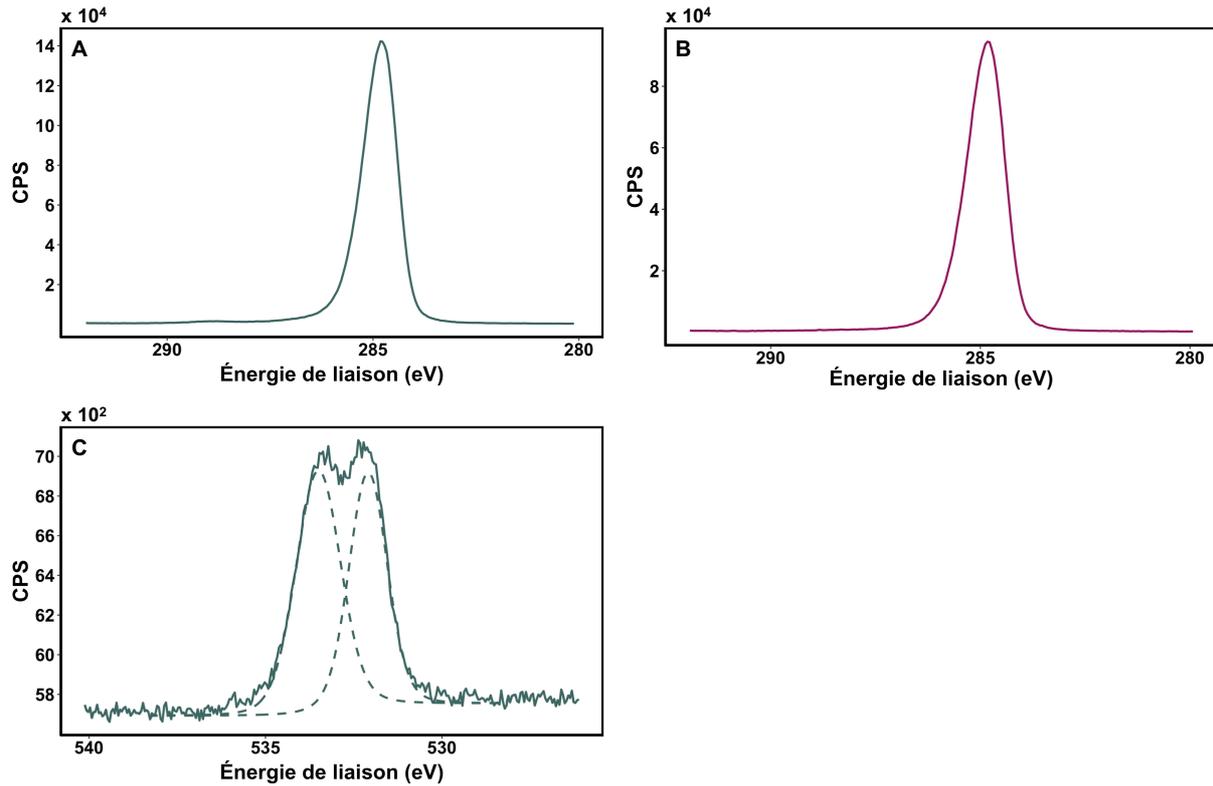


Figure 4.7. Spectres XPS du carbone 1s du PE (A) et du PP (B) et de l'oxygène 1s du PE (C). Les traits pleins représentent le signal et les traits en pointillés les différentes composantes.

Les spectres XPS des MP natifs (Figure 4.7) montrent la présence de carbone 1s, ce qui est attendu puisque les matériaux étudiés sont des polyoléfines. Dans le cas du PE, des pics caractéristiques de l'oxygène sont présents dans deux environnements bien distincts. La composante à 532,1 eV peut être attribuée à $\text{O}-\text{C}=\text{O}$ et la composante à 533,5 eV à $\text{O}-\text{C}-\text{O}$.⁹ La concentration atomique de l'oxygène est de 0,9% et celle du carbone de 99,1%. La présence d'oxygène sur la surface du PE peut être due à une contamination de surface ou bien à une oxydation du matériau.

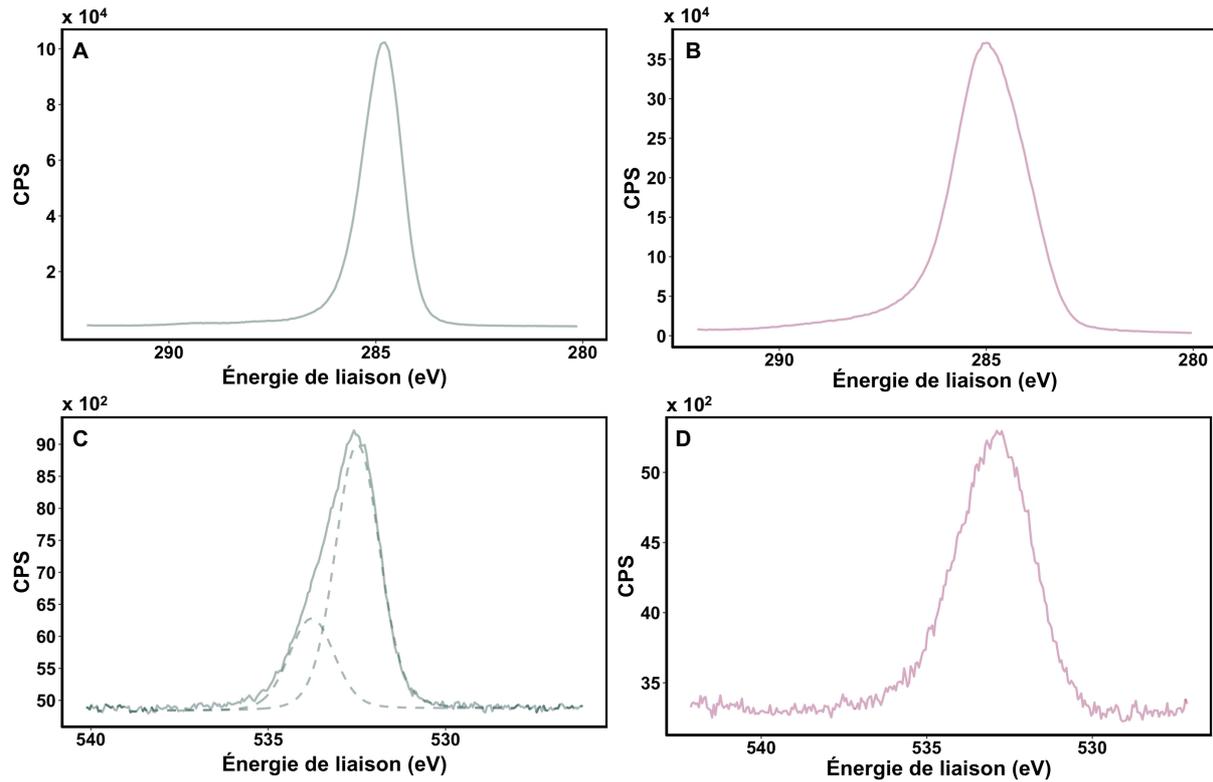


Figure 4.8. Spectres XPS du carbone 1s du PEV (A), du PPV (B) et de l'oxygène 1s du PEV (C) et du PPV (D). Les traits pleins représentent le signal et les traits en pointillés les différentes composantes.

Les spectres XPS des MP vieillis (Figure 4.8) montrent des évolutions sur les pics caractéristiques de l'oxygène. Dans le cas du PEV, une composante à 532,5 eV apparaît comme majoritaire. La proportion en oxygène suite au vieillissement est accrue et atteint 2,6%. Dans le cas du PPV, à l'inverse du PP, de l'oxygène a été détecté en surface et représente 2,6% de la concentration atomique.

La chimie de surface des microplastiques étudiés correspond bien à celle attendue pour des chaînes carbonées, avec de l'oxygène en surface du PE natif dans des proportions relativement faibles. Après vieillissement, la quantité d'oxygène pour le PE et le PP atteint 2,6%, montrant que le vieillissement modifie la chimie de surface des matériaux en les oxydant.

4.1.4. Composition et structure

La composition des microplastiques a été déterminée à différentes échelles. La spectroscopie infrarouge et l'analyse calorimétrique permettent une observation globale des poudres, l'imagerie Raman quant à elle donne des informations à l'échelle d'une particule.

4.1.4.1. Spectres infrarouges

Les spectres infrarouges (Figure 4.9, données acquises par F. Saudrais) réalisés sur les plastiques natifs correspondent aux spectres classiques du PE et du PP dans un état semi-cristallin^{10,11}. Aucun additif n'a été identifié sur ces spectres, l'odeur des MP vieillis semble donc due à la présence de monomères.^{3,4} Pour les MP vieillis, l'apparition de pics vers 1715 cm^{-1} (encadrés sur la Figure 4.9) est due à la présence de groupements carbonyles. Ce pic peut être utilisé pour suivre l'évolution de l'état d'oxydation des matériaux.¹²

L'indice carbonyle, défini comme le rapport des intensités du signal des carbonyles (1850 à 1650 cm^{-1}) et du signal des ponts méthylènes (1500 à 1420 cm^{-1})¹³, a été calculé pour comparer le taux d'oxydation des matériaux. Les résultats montrent une évolution de l'indice carbonyle suite au vieillissement (PE : $0,00 \pm 0,02$ vs PEV : $0,08 \pm 0,02$ et PP : $0,02 \pm 0,02$ vs PPV : $0,12 \pm 0,02$). D'après ces résultats, le vieillissement semble engendrer une oxydation globale des plastiques, ce qui constitue une information complémentaire aux données obtenues en XPS, montrant une oxydation en surface.

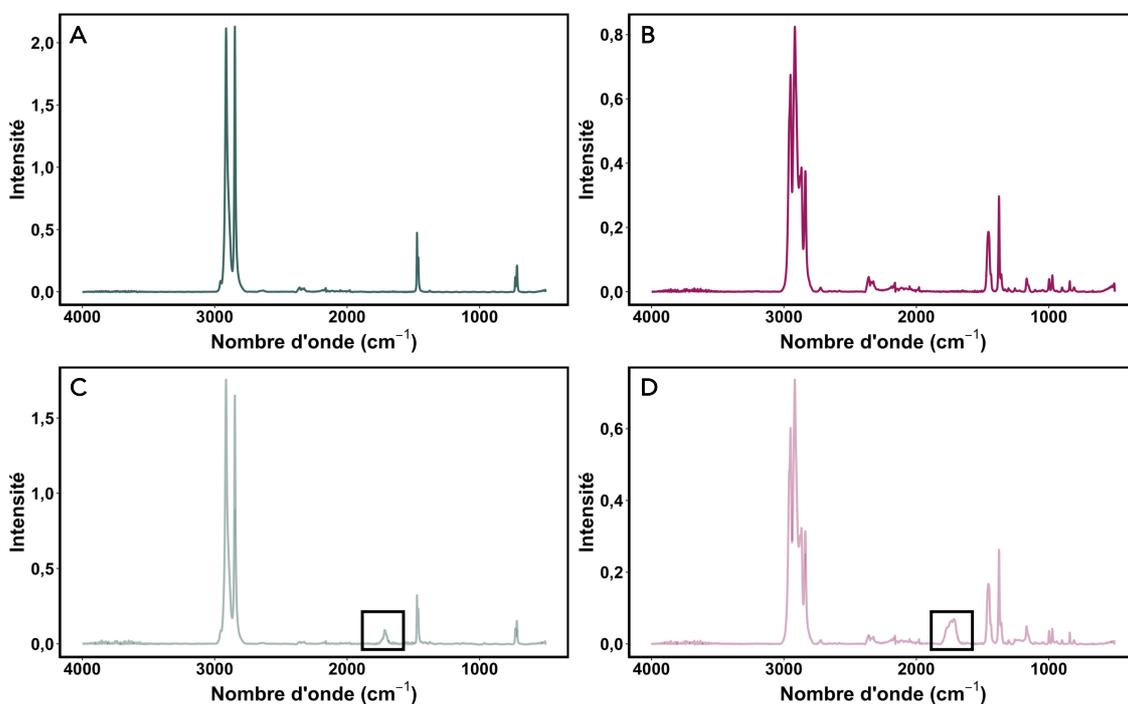


Figure 4.9. Spectres infrarouges du PE (A), PP (B), PEV (C) et PPV (D). Pour les MP vieillis, le pic à 1715 cm^{-1} est entouré.

4.1.4.2. Calorimétrie

Les MP ont été caractérisés par calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Les principales données relatives à ces expériences sont répertoriées dans le tableau 4.4.

Pour le PE et le PEV, une augmentation de l'enthalpie de fusion est à noter lors du second cycle de chauffage (correspondant à l'état de bulk) alors qu'elle reste comparable au premier cycle pour le PP et voire même diminue pour le PPV. D'autre part, l'enthalpie de cristallisation est deux fois plus importante pour le PE que pour le PP et dans tous les cas augmente au second cycle.

Il n'a pas été observé de température de transition vitreuse (T_g) sur la gamme de température balayée (-50 à 180°C), pour les quatre types de MP. S'il y a une partie d'amorphe, la T_g est donc située à une température inférieure à -50°C. Les T_g du PE et du PP sont généralement attendues respectivement vers -70°C et -10°C.¹⁴ En revanche, un pic de fusion, caractéristique d'une structure polymérique cristalline, est observé pour les quatre MP. La température de fusion du PP est plus élevée que celle du PE, comme généralement observé.^{15,16} Un point intéressant à noter est la diminution de la température de fusion à l'issue du vieillissement : environ -9°C pour le PE et -14°C pour le PPV. Cette diminution peut provenir d'une fragilisation du matériau.¹⁷

		PE		PEV		PP		PPV	
Cycle		1	2	1	2	1	2	1	2
Fusion	Température °C	124.3	124.3	115.7	117.8	137.9	134.4	124.0	128.1
	Largeur pic à mi-hauteur °C	4.6	4.6	16.8	16.8	16.7	9.4	23.3	10.3
	Hauteur pic W/g	-2.1	-2.1	-0.7	-0.7	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3
	Enthalpie J/g	167.4	297.2	166.1	285.0	74.5	77.2	81.9	60.1
Cristallisation	Température °C	107.1	112.6	103.3	106.9	99.9	108.2	98.4	106.2
	Largeur pic à mi-hauteur °C	4.9	5.0	15.5	4.8	7.5	5.6	8.3	5.7
	Hauteur pic W/g	4.9	2.3	2.7	1.0	2.2	0.7	2.0	0.6
	Enthalpie J/g	287.4	294.6	196.2	204.0	95.0	106.6	105.0	134.2

Tableau 4.4. Principales données extraites des expériences de DSC sur les MP de PE, PEV, PP et PPV au cours d'un premier puis d'un second cycle de chauffage (5°C.min⁻¹, de -50°C à 180°C) et refroidissement (20°C.min⁻¹, de 180°C à -50°C).

4.1.4.3. Imagerie Raman

L'analyse des MP de PE et PP par microscopie confocale Raman a montré que le PP a une structure et une composition homogène à l'échelle de la particule (Figure 4.10-B). En revanche, des différences spectrales localisées ont été observées pour les particules de PE à une échelle micrométrique (Figure 4.10-A). Trois composantes spectrales partageant les mêmes bandes de vibration mais avec des ratios d'intensité différents ont été identifiées en analysant les images hyperspectrales de PE. Pour le PP, une seule composante a été identifiée et correspond à la signature spectrale de ce matériau.¹⁸

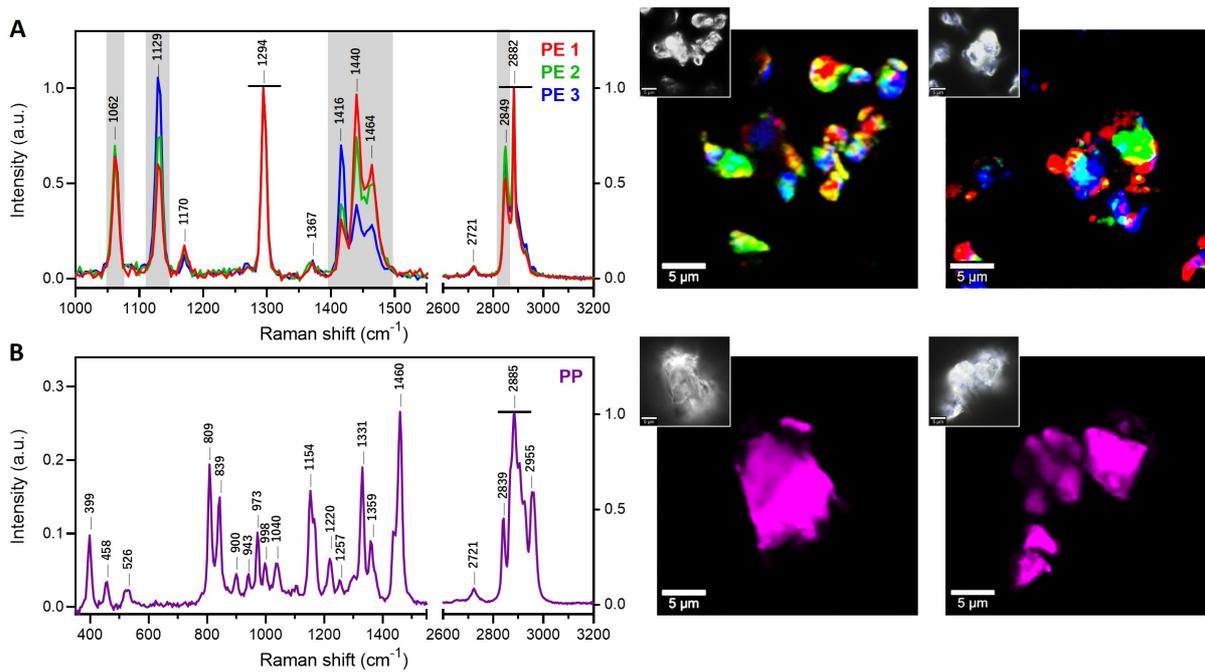


Figure 4.10. Cartographie des MP de PE (A) et de PP (B) par microscopie confocale Raman. Trois composantes spectrales ont été identifiées pour le PE (PE 1, rouge ; PE 2, vert ; PE 3, bleu) et correspondent à des degrés de cristallinité différents. Les différences significatives entre spectres sont indiquées en gris. Une composante spectrale a été identifiée pour le PP (violet). Les spectres Raman ont été normalisés à 1294 et 2882 cm⁻¹ pour le PE et 2885 cm⁻¹ pour le PP. Les images champ clair en mode réflexion sont montrées en encart (barre d'échelle 5 µm). Les différences spectrales sont indiquées sur les images Raman avec le même code couleur (barre d'échelle 5 µm).

Pour comparer les différentes composantes du PE, les spectres Raman ont été normalisés sur les bandes vibrationnelles à 1294 et 2882 cm⁻¹, correspondant respectivement à la torsion et à l'élongation asymétrique des CH₂. Des différences en intensité sont observées pour différentes bandes : 1062 cm⁻¹ (ν_{as}(C-C)), 1129 cm⁻¹ (ν_s(C-C)), 1416, 1440 et 1464 cm⁻¹ (δ(CH₂)) avec une contribution de ω(CH₂). Il a été montré que l'intensité de ces modes de vibration est étroitement liée à la structure et la cristallinité du PE.^{19,20}

Dans notre analyse, la composante PE 1 est caractérisée par une intensité plus faible des modes de vibration des CH₂ à 1418 cm⁻¹ (associés à une structure orthorhombique) et une intensité plus importante des modes de déformation des CH₂ à 1440 et 1464 cm⁻¹ (associés à une structure amorphe). Une tendance opposée est observée pour la composante PE 3. L'intensité des elongations symétriques et asymétriques des C-C est plus faible pour PE 1 que pour PE 3, cela peut être interprété par une augmentation de chaînes trans.¹⁹ Nous pouvons supposer que PE 3 correspond à une phase plus cristalline et PE 1 à une phase plus amorphe, PE 2 a une structure intermédiaire.

Nous pouvons également observer que ces trois composantes délimitent des sous-domaines à l'intérieur des MP de PE mais pas entre les particules, suggérant que l'hétérogénéité de la structure polymérique est importante.

Les analyses ont également été réalisées pour les microplastiques vieillis PEV et PPV (Figure 4.11). Les images et spectres sont identiques pour les MP natifs et vieillis avec trois composantes pour le PEV et une pour le PPV. Cette technique ne nous permet pas de caractériser le vieillissement de ces matériaux polymères.

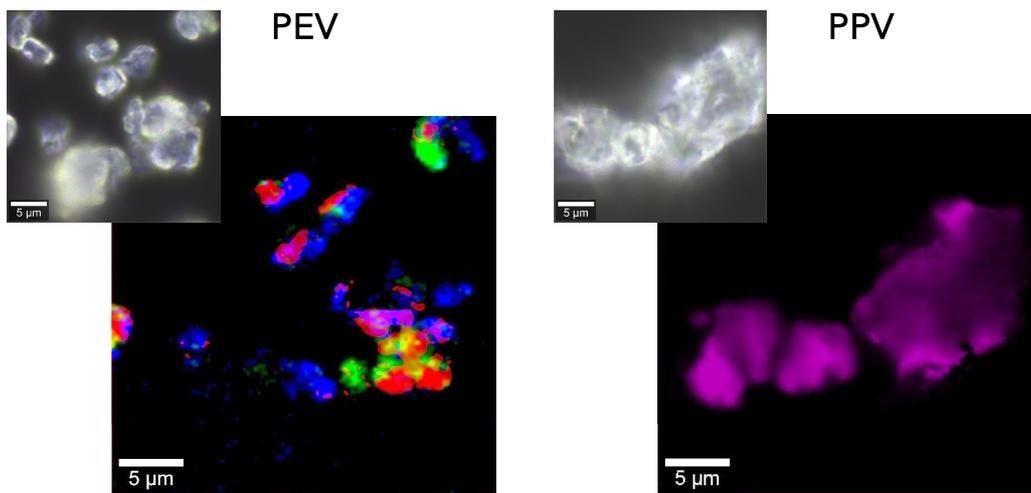


Figure 4.11. Cartographie des MP de PEV et de PPV par microscopie confocale Raman. Les images champ clair en mode réflexion sont montrées en encart (barre d'échelle 5 µm). Les différences spectrales sont indiquées sur les images Raman avec le même code couleur que la figure 4.10 (barre d'échelle 5 µm).

4.1.4.4. Diffraction des rayons X

Des mesures de diffraction des rayons X (DRX) ont été réalisées sur les MP natifs et vieillis afin d'obtenir des informations sur leur cristallinité. Les résultats présentés sur la figure 4.12 montrent que, pour l'ensemble des particules le taux de cristallinité est très important. Il est possible qu'il y ait une partie amorphe mais sa proportion serait anecdotique puisqu'il n'y a pas de bosse caractéristique étendue dans la région des pics de Bragg intenses (environ 20°).

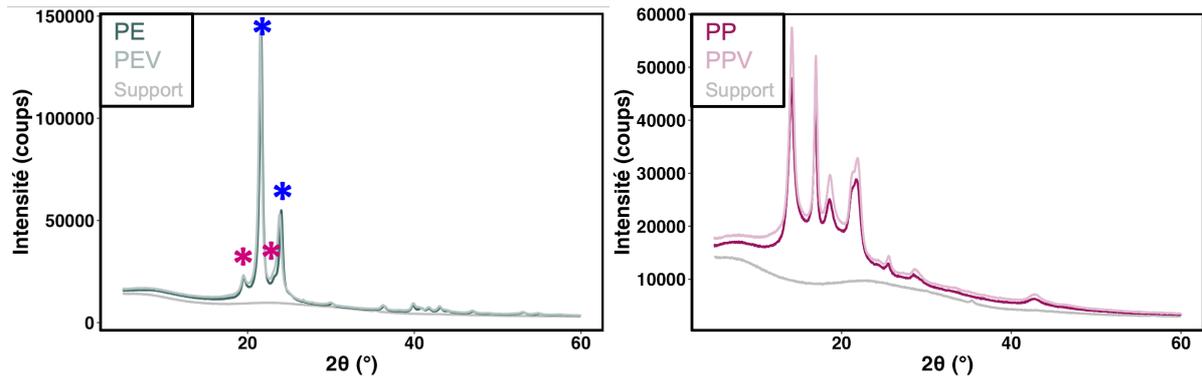


Figure 4.12. Diffractogrammes des poudres de MP de PE et PEV (à gauche) et de PP et PPV (à droite). Le signal du support est indiqué en gris. Les étoiles correspondent à des systèmes cristallins différents du PE (bleu = orthorhombique ; rose = monoclinique).

Pour les MP de PE, l'attribution des pics indique la présence de deux organisations cristallines. Les pics signalés par une étoile bleue peuvent être attribués à un système cristallin orthorhombique et les pics signalés par une étoile rose peuvent être attribués à un système monoclinique.^{21,22} D'après les intensités des pics, il semblerait que les particules comportent une part importante de structure orthorhombique avec une proportion de monoclinique nettement plus faible. En spectroscopie Raman, trois contributions ont été observées, elles sont donc probablement liées à des orientations différentes.

Pour les MP de PP, le diffractogramme semble indiquer qu'il s'agit de PP isotactique (les CH₃ sont tous orientés de la même façon par rapport à la chaîne carbonée).²³

La comparaison des MP natifs et vieillis montre qu'il y a peu d'effet du vieillissement sur la structure cristalline des particules. Les différences observées en SAXS (angles de diffusion inférieurs à 5°) pour le PPV ne sont pas retrouvées dans ces gammes d'angles.

4.1.4.5. Fluorescence

Des spectres 3D de fluorescence ont été réalisés pour connaître les éventuels domaines de fluorescence des particules avant et après vieillissement (Figure 4.13). Le spectre du PE natif montre une fluorescence jusqu'à une longueur d'onde d'excitation (λ_{exc}) de 225 nm et sur toute la gamme de longueurs d'onde d'émission (λ_{em}) étudiée (200 à 800 nm). Il n'y a pas de signal de fluorescence sur le reste du spectre. Pour le PP il n'a pas été observé de fluorescence significative sur les gammes d'excitation et émission étudiées. Dans le cas des MP vieillis, des différences sont à noter par rapport aux MP natifs. La gamme de fluorescence est déplacée après irradiation du PE, le pic se situe alors vers $\lambda_{excitation} = 325$ nm et $\lambda_{émission} = 400$ nm. Pour le PP, la fluorescence est importante suite au traitement thermique et ce sur une gamme très large.

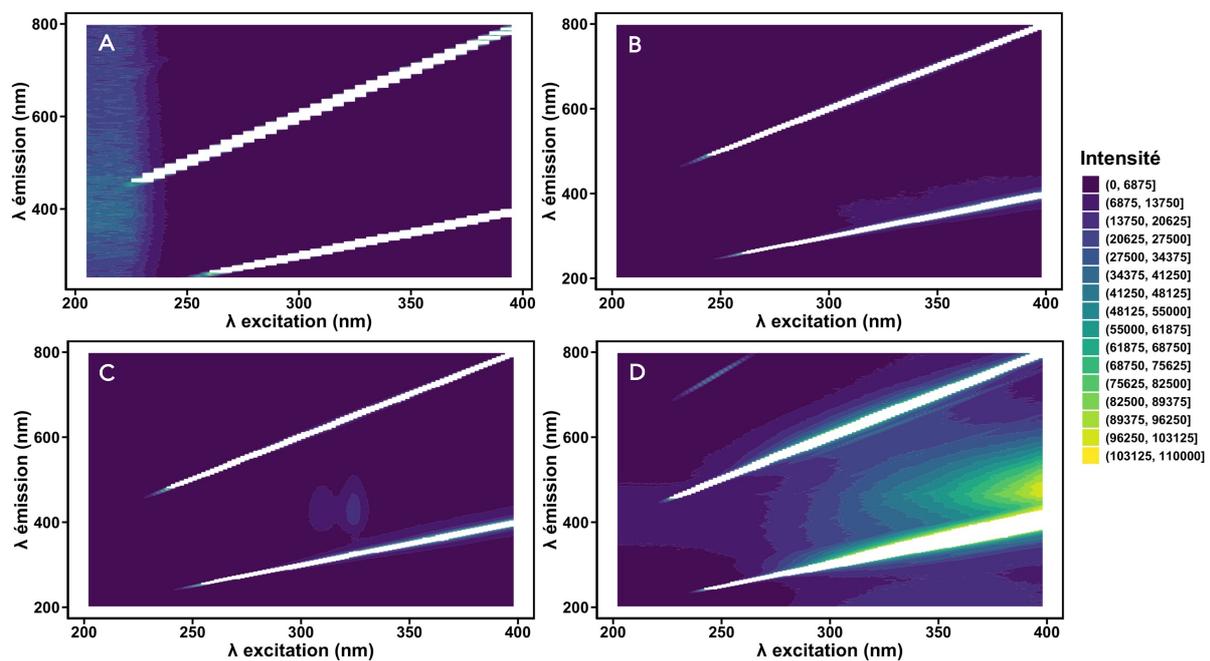


Figure 4.13. Spectres 3D de fluorescence des particules de polyéthylène (A), polypropylène (B), polyéthylène vieilli (C) et polypropylène vieilli (D).

Les polyoléfines sont des molécules carbonées sans insaturation. La fluorescence observée ici semble être caractéristique de l'oxydation des MP. En effet, comme le montre la figure 4.14, la présence d'oxygène crée des insaturations au niveau des atomes d'oxygène, responsables de la fluorescence.²⁴ Il est également possible que le vieillissement induise la formation de liaisons C=C, difficilement détectable en spectroscopie infrarouge, pouvant générer de la fluorescence UV-visible.

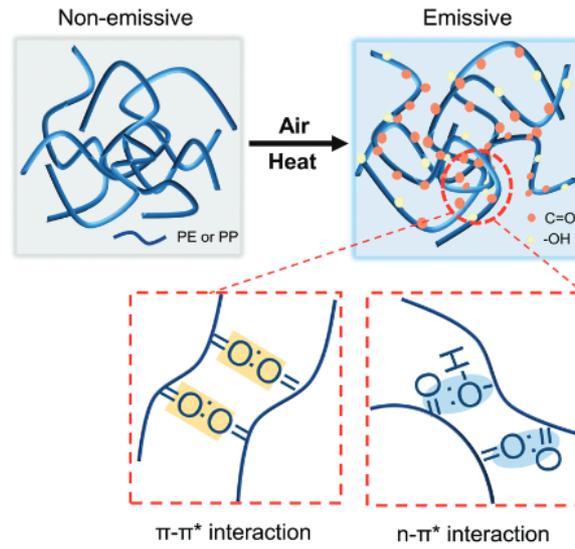


Figure 4.14. Illustration des mécanismes induisant l'émission de fluorescence de polyoléfines suite à leur vieillissement par oxydation.²⁴

4.1.5. Récapitulatif des informations obtenues

Les techniques de caractérisation présentées précédemment nous ont permis d'obtenir des informations nécessaires à l'étude des interactions MP/protéines. Le PE et le PP, bien que proche chimiquement, diffèrent dans leurs propriétés physico-chimiques. Les principales données obtenues sont répertoriées dans le tableau 4.5.

	Polyéthylène	Polyéthylène vieilli	Polypropylène	Polypropylène vieilli
Abréviation	PE	PEV	PP	PPV
Taille médiane en μm (microscopie optique)	4,2	5,8	10,0	9,9
Surface spécifique en $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ (SAXS)	2,5	2,4	1,1	1,2
Angle de contact d'eau pure ($^\circ$)	116	100	122	90
Chimie de surface en % atomique (XPS)	C : 99,1 O : 0,9	C : 97,4 O : 2,6	C : 100%	C : 97,4 O : 2,6
Indice carbonyle (Infrarouge)	0,00	0,08	0,02	0,12
Température de fusion 1^{er} cycle ($^\circ\text{C}$, DSC)	124,3	115,7	137,9	124
Nombre de domaines cristallins (Raman)	3	3	1	1
Cristallinité (DRX)	Pas/peu d'amorphe Orthorhombique +++ Monoclinique +		Pas/peu d'amorphe Polypropylène isotactique	
Fluorescence	Légère $\lambda_{\text{exc}} = 200-225$ $\lambda_{\text{em}} = 200-800$	Légère $\lambda_{\text{exc}} = 300-340$ $\lambda_{\text{em}} = 375-500$	Non identifiée	Intense $\lambda_{\text{exc}} = 250-400$ $\lambda_{\text{em}} = 100-600$

Tableau 4.5. Récapitulatif des données techniques des microplastiques natifs et vieillis obtenues dans le cadre de leur caractérisation.

4.2. QUANTIFICATION DES PROTEINES ADSORBÉES

4.2.1. Stratégie expérimentale

Nous avons montré dans le paragraphe 1.2.2.2 que l'adsorption de protéines sur une surface dépend à la fois de la nature de la surface, de la protéine et du milieu. Pour comprendre les mécanismes d'adsorption d'un Extrait Protéique de Levure (EPL) sur des MP, nous avons quantifié la masse de protéines adsorbées en faisant varier les conditions expérimentales. Pour cela, des isothermes d'adsorption ont été réalisés et un modèle de Langmuir a été appliqué pour l'analyse. Ce modèle est caractéristique de l'adsorption d'une monocouche sur une surface homogène. Il est très souvent utilisé dans ce type d'études, nous permettant de comparer les résultats obtenus avec la littérature. Les constantes obtenues sont la quantité maximale de protéines adsorbées par unité de surface (m_{∞}) et la constante d'adsorption (K_{ads}), proportionnelle à l'affinité des protéines pour le substrat.

4.2.1.1. Quantification des protéines

Comme évoqué dans le paragraphe 2.1.1.3, la quantification d'un extrait protéique est complexe. Dans cette étude, deux méthodes de quantification ont été appliquées :

- **La méthode de Bradford.**²⁵ Le réactif complexe les acides aminés basiques et aromatiques. Le principal intérêt est que l'absorbance est mesurée à 595 nm, il y a donc assez peu de diffusion due aux petits objets en solution. Une limite importante de la technique est liée à la composition de la solution. Une quantité importante de certains sels ou bien une incompatibilité avec le réactif peuvent altérer la capacité de complexation du réactif sur les acides aminés.
- **La mesure de l'absorbance à 205 nm.** Cette longueur d'onde correspond à l'absorbance de la liaison peptidique.²⁶ Cette technique, par rapport à la méthode de Bradford, permet d'utiliser des tampons dans des concentrations plus importantes. Cependant, la longueur d'onde d'analyse est plus faible, il y a donc davantage de sensibilité à la diffusion.

Les quantifications en tampon phosphate ont été réalisées à l'aide de la méthode de Bradford car si des MP restent dispersées après la centrifugation, elles peuvent modifier l'absorbance à 205 nm. En revanche, les quantifications en eau de mer ont été réalisées à l'aide de l'absorbance à 205 nm car la très forte salinité a rendu impossible l'utilisation du réactif de Bradford.

Le chapitre précédent a montré que la manipulation d'un extrait protéique peut induire l'agrégation des protéines. Nous avons identifié certains paramètres influant mais d'autres, non contrôlés (luminosité, durée de stockage des cellules ou de l'extrait protéique, force exacte appliquée lors du cassage des cellules, vitesse de congélation et décongélation...), peuvent également avoir un impact, à la fois sur les protéines elles-mêmes ou sur leur quantification. Dès que possible des tripliquas biologiques ont donc été réalisés indépendamment les uns des autres ainsi que des tripliquas techniques.

4.2.1.2. Mise en contact

Les microplastiques nus restent en surface des solutions aqueuses car ils sont hydrophobes et peu denses ; lorsqu'ils sont recouverts de protéines, ils se dispersent dans la colonne d'eau. Macroscopiquement, cela se traduit par une opacification de la solution.

Il a été observé qu'en l'absence d'agitation, les particules restent en surface, une opération de mélange est donc nécessaire à l'adsorption des protéines. Nous avons choisi d'utiliser une roue (Figure 4.15) pour qu'il y ait un renversement de la solution et ainsi forcer le contact entre les MP et les protéines.

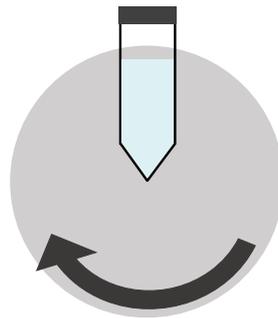


Figure 4.15. Schéma de la roue permettant la mise en contact des protéines et des MP.

Pour estimer une durée suffisante de mélange, nous nous sommes basés sur l'état de dispersion des particules (observation macroscopique). L'opacification d'un échantillon a été suivie au cours du mélange (Tableau 4.6).

- Directement après la préparation de l'échantillon, les MP sont en surface de la solution.
- Après 1 h d'homogénéisation, la solution est légèrement opaque, traduisant la présence de particules et donc l'adsorption de protéines sur leur surface.
- Après 4 h, l'opacité est plus importante, ce qui signifie qu'il y a davantage de protéines adsorbées.
- La solution n'est pas significativement différente entre 4 et 24 h de mélange, l'adsorption des protéines semble avoir atteint un plateau.

Nous avons donc choisi de mélanger les échantillons durant 4 h pour que les protéines aient le temps de se fixer, tout en minimisant l'impact de l'agitation sur les protéines non adsorbées.

Durée d'agitation (h)	0	1	4	24
Polyéthylène				
Polypropylène				

Tableau 4.6. Photographies d'échantillons contenant des MP de PE et de PP (10 g.L^{-1}) et de l'EPL ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) en tampon phosphate 100 mM à $\text{pH}7$ directement après ajout des constituants (A), après 1 h (B), 4 h (C) et 24 h (D) de mélange sur roue à 3 tr.s.min^{-1} à 6°C .

En ce qui concerne les autres paramètres de mélange, nous avons choisi d'utiliser les tubes en polypropylène étudiés dans le chapitre 3 car leur impact est connu et il s'agit d'un matériau très largement utilisé. L'agitation a été réalisée à 3 tr.s.min^{-1} car il a été montré qu'une agitation plus rapide endommage les protéines. Les mises en contact ont été réalisées à 6°C .

4.2.1.3. Séparation des protéines libres et des microplastiques

Dans ce chapitre nous souhaitons étudier séparément les protéines non adsorbées et les particules entourées de leur corona protéique. Différentes méthodes peuvent être envisagées pour la séparation. Nous avons écarté celles qui nécessitent l'introduction d'une nouvelle surface, comme la filtration, car les protéines pourraient s'adsorber, ce qui biaiserait les résultats. La séparation des phases liquides et solides peut également être effectuée par décantation. Les particules de plastique tendent à remonter à la surface car elles sont moins denses que l'eau. Les protéines pouvant stabiliser les MP en solution sur des temps longs (supérieurs à 24 h), nous avons donc choisi d'accélérer le déphasage par centrifugation (5 min , 15000 g). Les MP se trouvent alors concentrés en surface et les protéines non adsorbées restent en solution.

4.2.2. Effet de la surface

Nous avons observé précédemment que, malgré une chimie proche, les quatre types de MP étudiés ont des caractéristiques différentes (taille de particules, état d'oxydation, cristallinité...). L'impact de la surface plastique sur le comportement de l'extrait protéique de levure sera analysé en deux temps. Tout d'abord, nous étudierons l'impact de la nature du polymère sur les protéines (PE vs PP). Puis, nous appliquerons la même démarche pour identifier les effets liés au vieillissement (PE vs PEV et PP vs PPV).

4.2.2.1. Nature du polymère

Des isothermes d'adsorption ont été réalisés et représentent la quantité de protéines adsorbées par m^2 de plastique disponible en fonction de la concentration en protéines libres (Figure 4.16). Un modèle de Langmuir a été ajusté aux points expérimentaux et répond aux critères de qualité (p -value < 0,05). L'atteinte d'un plateau aux fortes concentrations indique que les protéines forment une couche saturée sur les MP de PE et de PP.

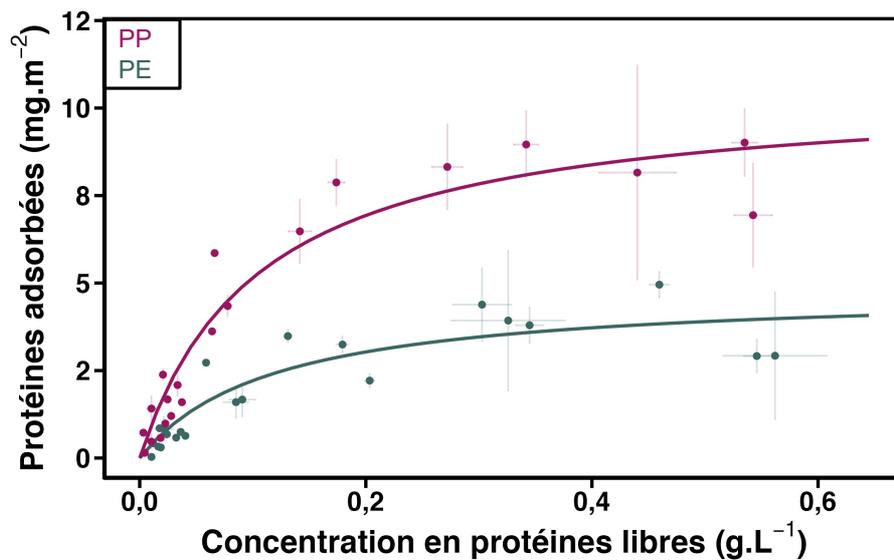


Figure 4.16. Isothermes d'adsorption de l'EPL en tampon phosphate 100mM, pH7 sur du PP (rose) et du PE (bleu), réalisés à 6°C. Les courbes représentent un ajustement avec un modèle de Langmuir.

		m_{∞}		K_{ads}	
		Valeur estimée (mg.m ⁻²)	Qualité de l'ajustement	Valeur estimée (L.g ⁻¹)	Qualité de l'ajustement
EPL	PE	4,8 ± 0,6	***	8,5 ± 3,0	*
	PP	10,6 ± 0,8	***	9,5 ± 2,0	***
BSA	PE	1,5 ± 0,1	***	4,9.10 ² ± 1,0.10 ²	**
	PP	2,6 ± 0,2	***	8,0.10 ² ± 2,7.10 ²	*

Tableau 4.7. Quantités maximales de protéines adsorbées (m_{∞}) et constantes d'adsorption (K_{ads}) déterminées à partir des isothermes d'adsorption ajustés avec un modèle de Langmuir (Figure 4.16 pour EPL et Annexe A.3.1 pour BSA). La qualité de l'ajustement est déterminée à partir des p-values.

Les résultats montrent un comportement distinct entre le PE et le PP. Malgré des constantes d'adsorption (K_{ads}) relativement proches, la masse maximale de protéines adsorbées (m_{∞}) est supérieure d'un facteur 2 pour le PP (Tableau 4.7). Peu d'études portent sur l'adsorption de protéines sur du PP mais, dans le cas de protéines purifiées, une couverture 1,8 fois plus importante a déjà été observée sur un film de PP par rapport à un film de polystyrène.²⁷

Deux hypothèses peuvent être envisagées :

- La corona du PP est plus épaisse ou plus dense
- Un mécanisme dynamique d'adsorption/désorption induit l'agrégation de protéines sur la surface du PP et la libération des agrégats en solution. Ils vont sédimenter et ne seront pas en solution lors de la quantification. Ces protéines sont alors identifiées comme adsorbées sur les particules, il s'agit d'une limite de la méthode d'analyse par déplétion.

Des isothermes d'adsorption sur ces mêmes MP ont été réalisés avec de l'Albumine de Sérum Bovin (BSA) par Florent Saudrais, ils sont présentés en Annexe A.3.1. Les constantes m_{∞} et K_{ads} extraites à partir des ajustements avec un modèle de Langmuir sont présentées dans le tableau 4.7. En comparaison avec l'EPL, les m_{∞} sont plus faibles d'un facteur 3 pour le PE et d'un facteur 4 pour le PP. Ce comportement peut être expliqué si dans l'EPL des protéines adsorbées sont impliquées dans des complexes. Elles ont une affinité pour d'autres protéines du complexe et des interactions protéine/protéine peuvent mener à une corona plus importante. En ce qui concerne les valeurs de K_{ads} , elles sont significativement plus importantes dans le cas de la BSA, indiquant une affinité plus forte que l'EPL qui contient probablement des protéines avec plus ou moins d'affinité pour les surfaces.

4.2.2.2. État de vieillissement

D'après la caractérisation des MP, le principal effet du vieillissement est relatif à l'oxydation des particules, peu d'effet ayant été observé sur la taille et la surface spécifique. Des isothermes d'adsorption de l'EPL sur les MP natifs et vieillis ont été réalisés et ajustés avec un modèle de Langmuir.

Les isothermes du PEV et du PE natifs (Figure 4.17 et Tableau 4.8) montrent que les masses maximales de protéines adsorbées sont dans le même ordre de grandeur. Nous ne pouvons pas conclure sur les constantes d'adsorption car le modèle appliqué ne rencontre pas les critères de qualité exigés pour le PEV (p -value > 0,05). Les points expérimentaux du PEV étant systématiquement sous les points du PE, il semblerait tout de même que l'affinité des protéines soit plus importante pour le PE avant vieillissement.

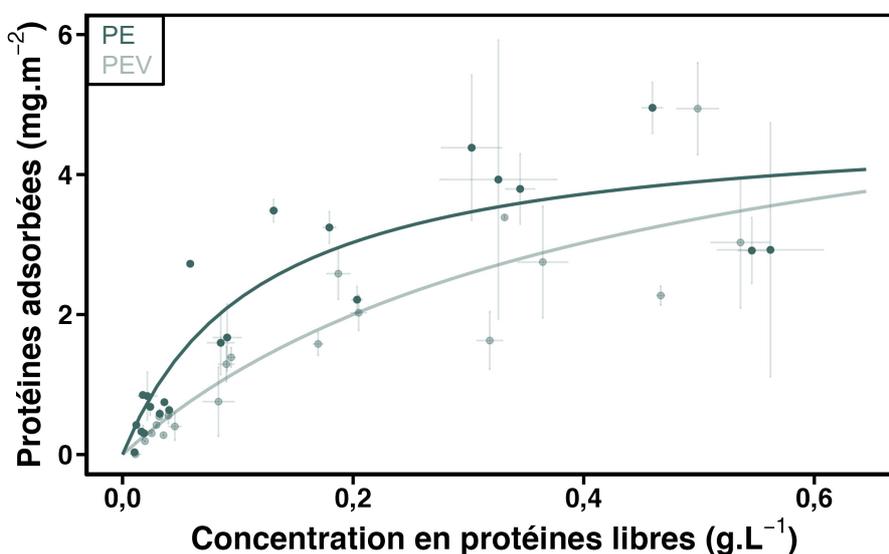


Figure 4.17. Isothermes d'adsorption de l'EPL en tampon phosphate 100mM, pH7 sur du PE (bleu) et du PEV (gris), réalisés à 6°C. Les courbes représentent un ajustement avec un modèle de Langmuir.

	m_{∞}		K_{ads}	
	Valeur estimée ($mg.m^{-2}$)	Qualité de l'ajustement	Valeur estimée ($L.g^{-1}$)	Qualité de l'ajustement
PE	$4,8 \pm 0,6$	***	$8,5 \pm 3,0$	*
PEV	$6,2 \pm 2,0$	**	$2,4 \pm 1,3$	X

Tableau 4.8. Quantités maximales de protéines adsorbées (m_{∞}) et constantes d'adsorption (K_{ads}) sur le PE et le PEV, déterminées à partir des isothermes d'adsorption (Figure 4.17). La qualité de l'ajustement est déterminée à partir des p -values.

Pour le PPV, les répliquas biologiques ont mené à des résultats sensiblement différents (Figure 4.18, Tableau 4.9). L'hypothèse la plus plausible serait que des monomères ayant été relargués suite au vieillissement soient incompatibles avec la solution de Bradford. La deuxième méthode de quantification a été expérimentée. Cependant, des absorbances à 205 nm supérieures aux valeurs initiales ont été obtenues, rendant le dosage impossible. Les résultats présentés correspondent à ceux obtenus avec la méthode de Bradford. La courbe relative à l'ajustement avec le modèle de Langmuir sert uniquement de guide pour le PPV. Les conclusions pour l'impact du vieillissement dans le cas du PP sont plus compliquées à tirer mais la quantité de protéines adsorbées semble moins importante que sur le plastique natif.

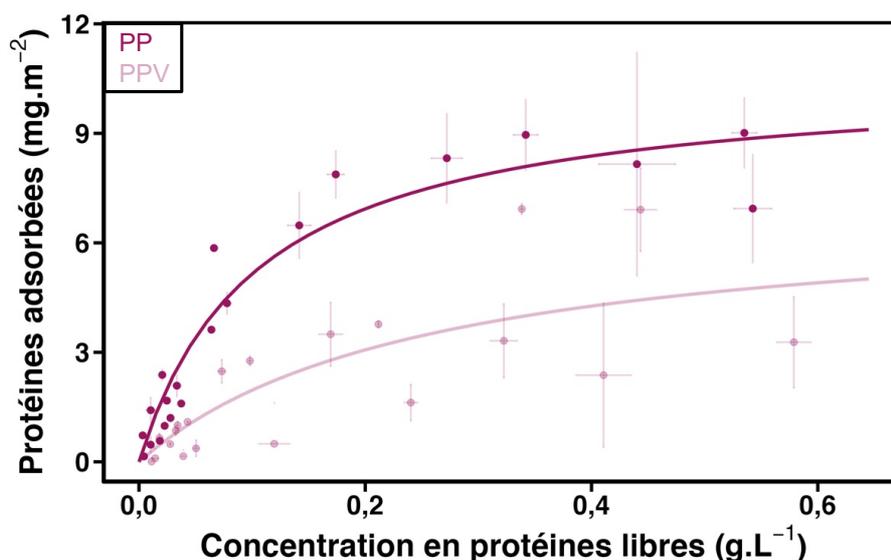


Figure 4.18. Isothermes d'adsorption de l'EPL en tampon phosphate 100mM, pH7 sur du PP (rose) et du PPV (rose clair), réalisés à 6°C. Les courbes représentent un ajustement avec un modèle de Langmuir.

	m_{∞}		K_{ads}	
	Valeur estimée ($mg.m^{-2}$)	Qualité de l'ajustement	Valeur estimée ($L.g^{-1}$)	Qualité de l'ajustement
PP	$10,6 \pm 0,8$	***	$9,5 \pm 2,0$	***
PPV	$7,0 \pm 2,7$	*	$3,9 \pm 3,1$	X

Tableau 4.9. Quantités maximales de protéines adsorbées (m_{∞}) et constantes d'adsorption (K_{ads}) sur le PP et le PPV, déterminées à partir des isothermes d'adsorption (Figure 4.18). La qualité de l'ajustement est déterminée à partir des p-values.

Dans cette partie, malgré une certaine variabilité dans les données, des différences sont à noter entre les MP natifs et vieillis. La principale observation est la quantité moins importante de protéines adsorbées sur les MP après vieillissement. En corrélant ces informations avec la caractérisation des particules décrite dans la première partie de ce chapitre, il semblerait qu'une

augmentation de la quantité d'oxygène et donc une diminution de l'hydrophobie soit défavorable à l'adsorption des protéines. Cela peut sembler étonnant puisque dans l'EPL, par le procédé d'extraction des protéines, ce sont uniquement (ou en grande majorité) les protéines solubles qui sont récoltées. Ces protéines hydrosolubles auraient donc une affinité plus forte pour les surfaces les plus hydrophobes.

4.2.3. Effet du changement de pH et de l'eau de mer

Les protéines possèdent des charges, elles sont donc sensibles aux variations ioniques de la solution. Le point isoélectrique (pI) correspond au pH auquel la charge globale de la protéine est nulle. Il s'agit d'un paramètre couramment indiqué pour caractériser les protéines. Dans l'environnement, la salinité et le pH de l'eau vont donc avoir un impact sur le comportement des protéines. Des isothermes d'adsorption ont été réalisés en eau de mer, tamponnée ou non à pH 8, et comparés à ceux obtenus en tampon phosphate 100 mM pH7. Les concentrations protéiques présentées dans cette partie ont été calculées à partir de l'absorbance à 205 nm.

L'eau de mer a été recueillie à Brest puis a été autoclavée et filtrée. Cette solution a un pH initial d'environ 8,3 tandis que la solution stock de protéines à 25 g.L⁻¹ a un pH de 5,9. En l'absence de tampon, l'ajout de protéines fait diminuer significativement le pH de l'eau de mer (Figure 4.19). Un tampon tris a été utilisé à 50 mM afin de maintenir un pH constant quelle que soit la concentration en protéines.

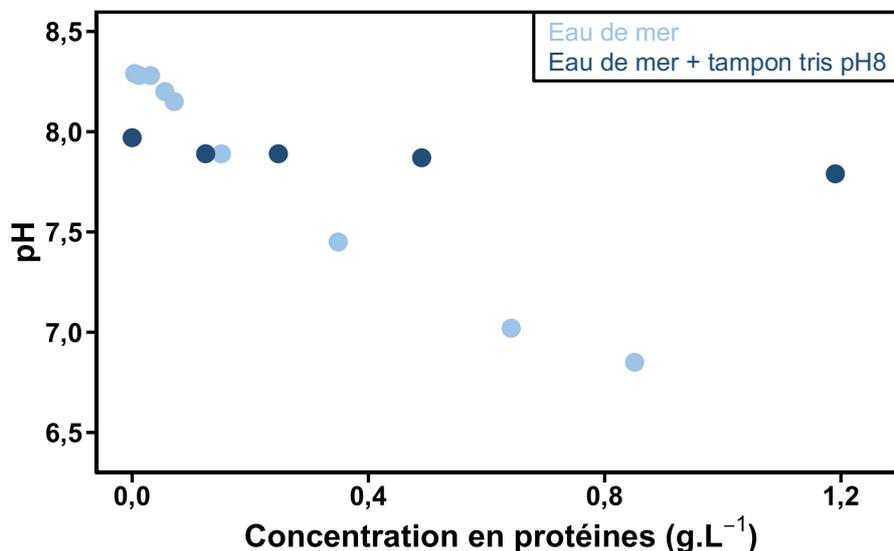


Figure 4.19. Évolution du pH en fonction de la quantité d'EPL introduite dans de l'eau de mer non tamponnée (bleu clair) et dans de l'eau de mer en tampon tris 50mM, pH8 (bleu foncé).

Les isothermes d'adsorption (Figure 4.20, Tableau 4.10) montrent des tendances similaires pour le PE et le PP. Les protéines sont adsorbées en quantités plus importantes dans le tampon phosphate 100 mM à pH 7 plutôt que dans l'eau de mer. La seconde observation est qu'il y a moins de protéines adsorbées aux MP dans l'eau de mer lorsque celle-ci est tamponnée à pH 8. Les constantes d'adsorption sont relativement proches lorsque les MP sont en tampon phosphate ou en eau de mer non tamponnée. Dans le cas de l'eau de mer tamponnée, la qualité de l'ajustement du modèle de Langmuir n'est pas satisfaisante (p -value > 0,05), potentiellement à cause d'un nombre trop faible de points expérimentaux.

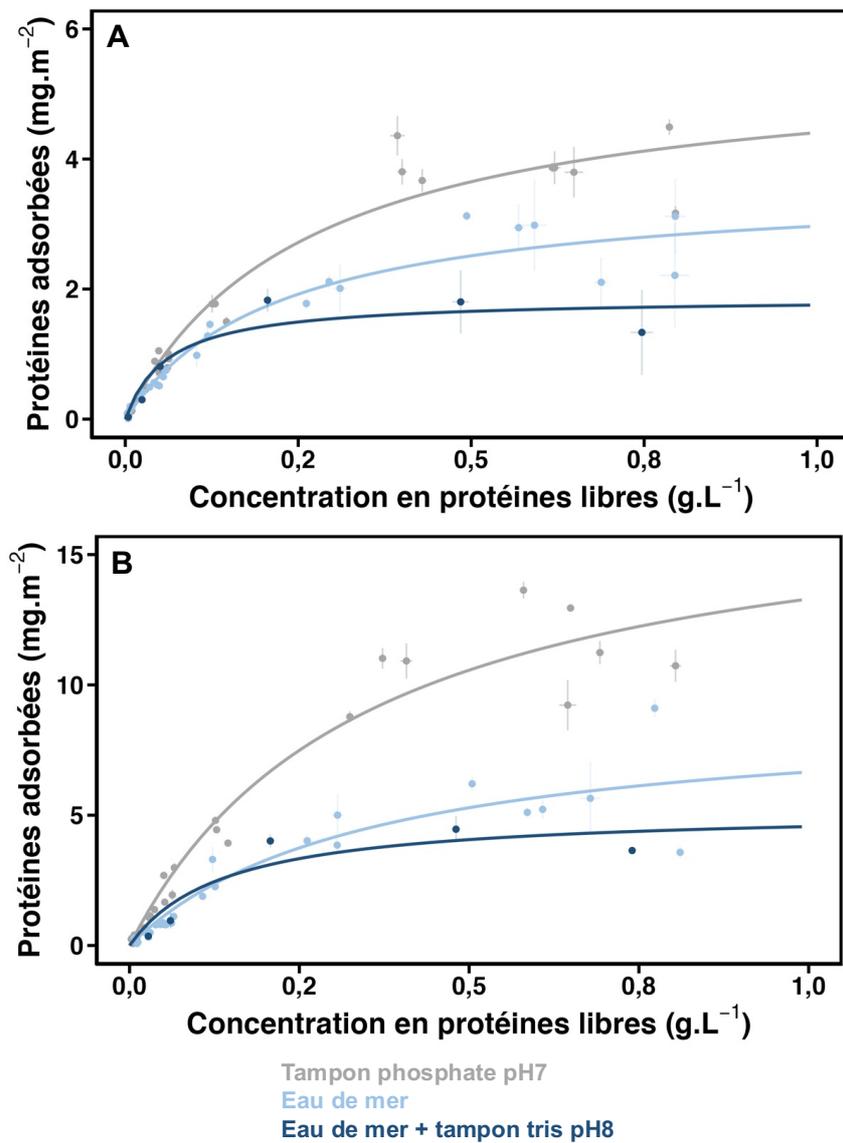


Figure 4.20. Isothermes d'adsorption de l'EPL sur le PE (A) et sur le PP (B) dans un tampon phosphate 100mM, pH7 (gris), dans de l'eau de mer non tamponnée (bleu clair) et dans de l'eau de mer en tampon tris 50mM, pH8 (bleu foncé), réalisés à 6°C. Les courbes représentent un ajustement avec un modèle de Langmuir.

	m_{∞}		K_{ads}		
	Valeur estimée (mg.m ⁻²)	Qualité de l'ajustement	Valeur estimée (L.g ⁻¹)	Qualité de l'ajustement	
PE	Phosphate 100mM, pH7	5,6 ± 0,4	***	3,8 ± 0,8	***
	Eau de mer	3,6 ± 0,3	***	4,5 ± 0,9	***
	Eau de mer Tris 50 mM, pH8	1,9 ± 0,3	**	16,3 ± 10,5	X
PP	Phosphate 100mM, pH7	17,9 ± 1,9	***	2,9 ± 0,7	***
	Eau de mer	9,0 ± 1,6	***	2,9 ± 1,1	*
	Eau de mer Tris 50 mM, pH8	5,2 ± 1,3	*	7,1 ± 5,7	X

Tableau 4.10. Quantités maximales de protéines adsorbées (m_{∞}) et constantes d'adsorption (K_{ads}) sur le PE et le PP dans différentes solutions. Déterminées à partir des isothermes d'adsorption (Figure 4.20). La qualité de l'ajustement est déterminée à partir des p-values.

Nous avons observé dans le paragraphe 3.1.4.2, qu'en l'absence de particule, l'augmentation de la quantité de sel est défavorable pour les protéines. L'hypothèse est que les ions écrantent les charges des protéines, la répulsion électrostatique n'est alors plus assurée et les protéines forment des agrégats. Ces phénomènes peuvent avoir lieu rapidement, avant le contact avec les MP, ce qui pourrait expliquer qu'il y ait moins de protéines adsorbées sur les particules en présence d'une grande quantité de sels ($43 \pm 6 \text{ g.L}^{-1}$, déterminé par extraits secs).

Les résultats montrent également que l'adsorption des protéines dépend du pH. Cela est attendu car il est connu qu'un pH proche de celui du point isoélectrique des protéines est favorable à leur adsorption sur des surfaces.^{28,29} Dans le cas de l'extrait protéique utilisé, 12% des protéines ont un pI compris entre 6,5 et 7,5 et 14% ont un pI compris entre 7,5 et 8,5 (méthode de prédiction IPC, déterminé à partir de ³⁰). Aux différents pH étudiés, les protéines n'ont pas toutes les mêmes prédispositions à l'adsorption.

Dans l'environnement, il existe des gradients de pH et de salinité pouvant modifier le comportement des particules de plastique.³¹ L'adsorption des protéines sur leur surface dépend de la localisation.

4.3. IMAGERIE DE LA COURONNE DE PROTEINES

Les isothermes d'adsorption constituent une méthode d'étude indirecte de l'impact des microplastiques sur les protéines. Ils permettent d'être quantitatifs à l'échelle macroscopique de l'échantillon global. Pour observer directement les protéines adsorbées à l'échelle microscopique des particules, nous avons choisi une technique basée sur la fluorescence intrinsèque des protéines. La caractérisation de la corona est généralement réalisée par des techniques indirectes ou par l'utilisation d'un marquage des protéines. Ici, l'utilisation de la radiation du synchrotron dans les ultraviolets lointains (SR-DUV) permet une analyse *in situ* avec une sensibilité permettant une analyse détaillée de la corona.

Cette série d'expériences a été réalisée sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL. Le faisceau synchrotron est utilisé ici pour son flux, sa monochromaticité et sa grande stabilité. Cela permet d'accumuler longtemps à une puissance faible et ainsi d'améliorer la résolution en imagerie tout en évitant la détérioration de l'échantillon car les protéines sont sensibles au faisceau.

4.3.1. Conditions expérimentales

4.3.1.1. Obtention des particules dispersées

Les protéines, en s'adsorbant sur les MP jouent un rôle de tensioactif et permettent le passage en solution de ces particules hydrophobes. Les mises en contact entre les protéines et les MP ont été réalisées de la même façon que pour les isothermes d'adsorption. Les échantillons n'ont en revanche pas été centrifugés, ce sont les particules en solution qui ont été analysées. Les dispersions formées avec le PP étant moins stables, les particules ont été collectées après 3 h de crémage tandis que 24 h ont été attendues pour le PE. Pour être reproductible dans le prélèvement des particules dans la colonne d'eau, les tubes ont été percés afin de les utiliser comme des ampoules à décanter : les 6 premiers mL sont évacués et le 7^{ème} mL est récupéré pour être analysé. Pour diminuer le signal dû aux protéines non adsorbées, les échantillons contenant des concentrations élevées en protéines ont été dilués par quatre.

4.3.1.2. Conditions d'analyse

Trois acides aminés peuvent être responsables de la fluorescence des protéines : la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine. Le tryptophane est le plus étudié, entre autre car il présente le rendement quantique le plus important.^{32,33}

Un spectre 3D de la fluorescence de l'extrait protéique de levure a été réalisé (Figure 4.21). Il présente une zone de forte intensité pour une excitation allant de 260 à 310 nm et une émission de 300 à 400 nm avec un maximum à $\lambda_{\text{excitation}} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 336 \text{ nm}$. Ce domaine de fluorescence correspond à celui du tryptophane et de la tyrosine.³² Pour avoir un signal le plus

résolu possible, il faut se situer dans une gamme où l'intensité est importante. Nous avons donc choisi un filtre sélectionnant les longueurs d'onde d'émission de 329 à 351 nm.

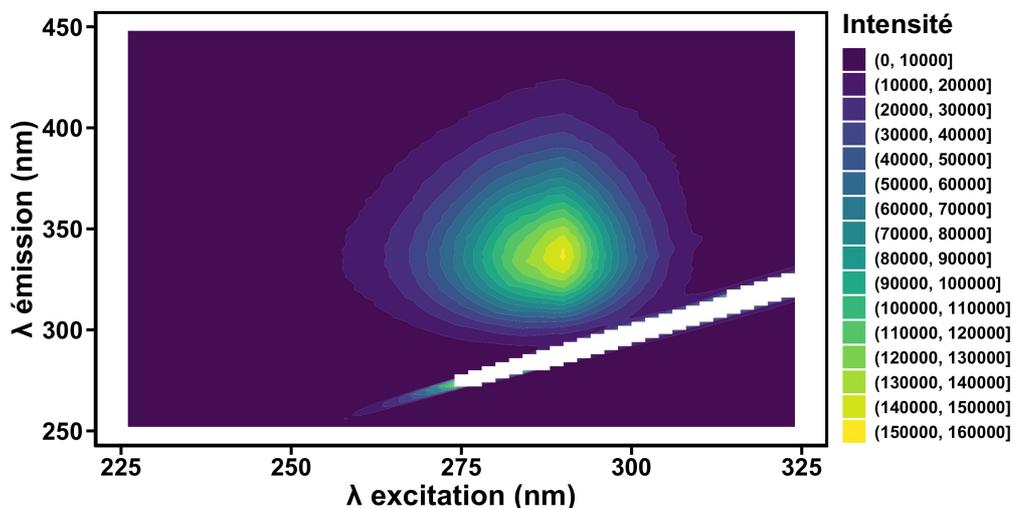


Figure 4.21. Spectre 3D de fluorescence de l'extrait protéique de levure à 25 g.L⁻¹.

Pour définir la longueur d'onde d'excitation optimale, nous avons réalisé des spectres de référence sur une particule de PP (Figure 4.22). L'échantillon a été excité à différentes longueurs d'onde (265, 270, 275, 280, 285 nm). En fin d'expérience un second spectre à 275 nm d'excitation a été réalisé pour savoir dans quelle mesure les protéines ont perdu leur fluorescence sous faisceau. Les spectres obtenus montrent la présence d'un pied de bande (< 315 nm) aux longueurs d'onde d'excitation les plus importantes. Il est causé par l'excitation et pourrait biaiser les résultats. A 265 nm, le pied de bande n'est pas présent et le signal des protéines reste important, nous avons donc choisi cette longueur d'onde d'excitation comme condition expérimentale.

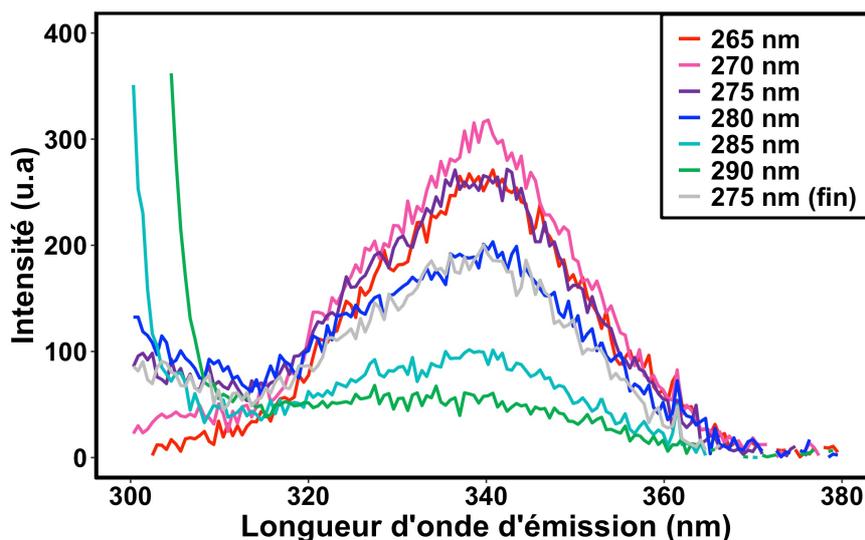


Figure 4.22. Spectres de fluorescence de l'EPL sur une particule de PP, obtenus par excitation à différentes longueurs d'onde (dans l'ordre : 265, 270, 275, 280, 285, 290 puis de nouveau 275 nm). Les spectres ont été réalisés sur un microspectrofluorimètre (ligne DISCO, synchrotron SOLEIL).

La perte de fluorescence des protéines sous faisceau (phénomène de photobleaching) montre que les éventuelles autres contributions peuvent être négligées (Figure 4.23).

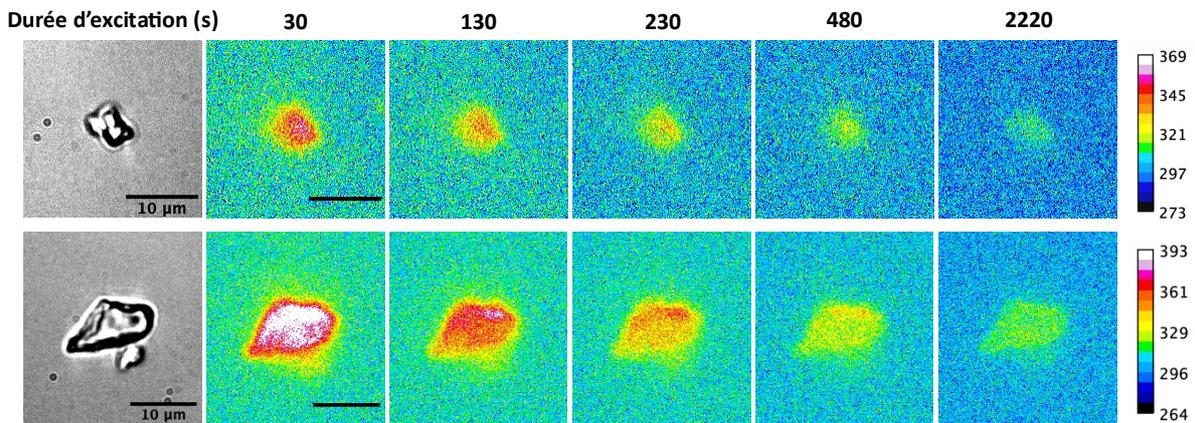


Figure 4.23. A gauche : image dans le visible du PE (haut) et du PP (bas). De gauche à droite : fluorescence de l'EPL après différentes durées d'excitation à 265 nm. Toutes les images sont à la même échelle (barre d'échelle : 10 μm). Images réalisées avec un microscope plein champ (ligne DISCO, synchrotron SOLEIL).

4.3.2. Développement d'une méthode d'analyse automatisée

De nombreuses images ont été générées au cours de ces expériences. Une méthode d'analyse automatisée a été développée pour accélérer le traitement et le rendre indépendant de l'utilisateur. Différentes étapes ont permis d'aboutir aux résultats : la correction des images, le seuillage des surfaces correspondant aux particules et aux protéines et enfin l'extraction des données d'intérêt. Ces étapes ont été réalisées à l'aide du logiciel Fiji.³⁴ Les macros sont en Annexe A.3.

4.3.2.1. Correction des images et sélection des zones d'intérêt

Deux types d'images générées par l'appareil ont été analysées : les images dans le visible permettent d'observer les particules de plastique et les images de fluorescence permettent d'observer les protéines adsorbées sur les particules. Le seuillage doit être le plus précis possible car il permet par la suite de déterminer la surface et la taille des particules ainsi que les propriétés de la corona. Les opérations réalisées et décrites ici ont été choisies suite à de nombreux tests comparatifs.

Les plastiques

Dans le cas des particules de plastiques, deux étapes sont nécessaires. Tout d'abord, un prétraitement est réalisé pour faciliter la différenciation entre les particules et le fond de l'image. Ensuite, une binarisation est réalisée et le contour des particules est affiné.

- Lors du **prétraitement**, une première opération consiste à soustraire le fond, c'est-à-dire l'image sans échantillon dans les conditions d'analyse. Pour l'obtenir, l'opération « Z Projection » du logiciel Fiji a été réalisée. Sur une série de 30 images, la médiane de chaque pixel est calculée et permet de créer une nouvelle image, sans particules mais en conservant les défauts de la caméra et l'hétérogénéité de l'illumination. Cette opération modifie les images 16 bits en 32 bits. Ensuite, un filtre médian a été appliqué (rayon = 2) pour retirer d'éventuels pixels isolés d'intensité élevée présents de manière aléatoire. Une fois cette image obtenue, elle est soustraite aux images brutes préalablement transformées en 32 bits (Figure 4.24).

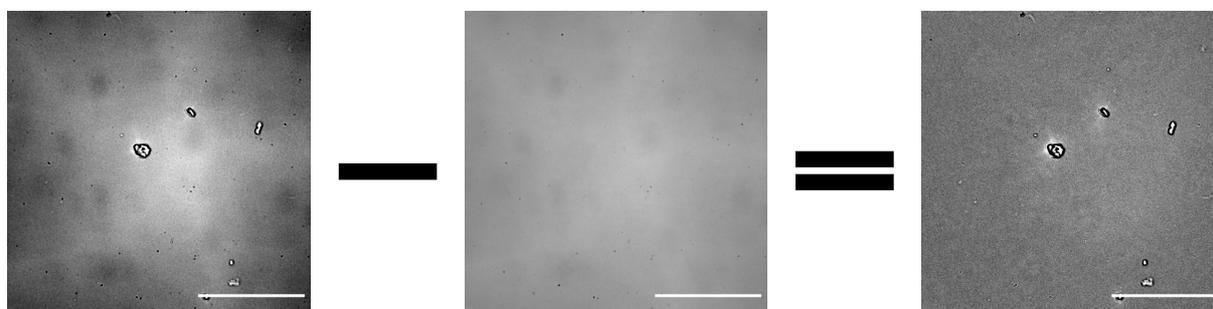


Figure 4.24. Opération de correction réalisée pour les images visibles. Le fond est soustrait à l'image brute pour obtenir une image soustraite des défauts de la caméra et de l'hétérogénéité de l'illumination. La barre d'échelle représente 50 μm .

Des intensités négatives autour et sur les particules sont systématiquement observées et posent problème lors de la binarisation. C'est donc leur valeur absolue qui a été utilisée pour la suite du traitement (Figure 4.25). Un nouveau filtre médian est ensuite appliqué (rayon = 11) pour lisser le fond et les contours des particules. Enfin, le contraste est augmenté.

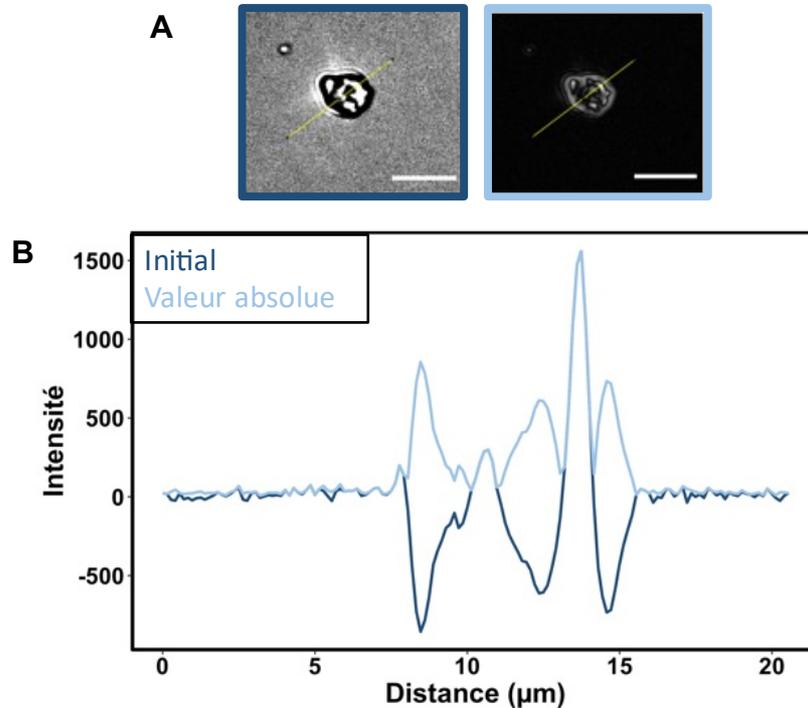


Figure 4.25. (A) Images d'une particule avant (encadré en bleu foncé) et après (bleu clair) opération de valeur absolue. La barre d'échelle représente 10µm. (B) Valeurs des intensités de pixels correspondant à la ligne jaune sur les images.

- Pour la **binarisation**, l'ensemble des fonctions de seuillage disponibles sur le logiciel Fiji ont été comparées. La fonction IsoData a été retenue car les contours des particules sont nets malgré des morphologies variées. Il s'agit d'une méthode de seuillage itérative basée sur l'algorithme isodata.³⁵ Le centre des particules est généralement moins contrasté que le contour, cela va se traduire par une tache blanche après binarisation (Figure 4.26.E). Celle-ci peut être comblée en appliquant la fonction « Fill Holes ». Enfin, pour certaines particules il peut arriver que les bords ne soient pas correctement définis. La fonction « Close » (itérations = 4) permet, dans la plupart des cas, de résoudre ce problème en réalisant une dilatation suivie d'une érosion.

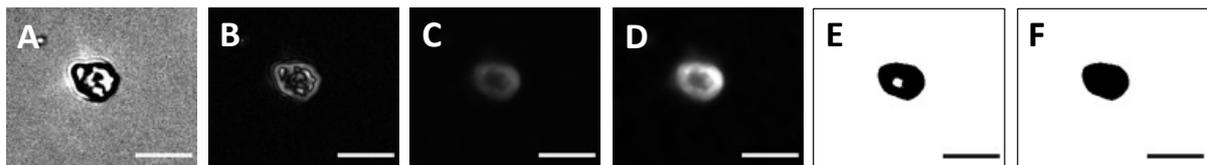


Figure 4.26. Suivi du traitement d'images pour une particule, après soustraction du fond (A), application de la fonction valeur absolue (B), filtre médian (C), augmentation du contraste (D), binarisation (E) et application des fonctions « Fill holes » et « Close » (F). La barre d'échelle représente 10 µm.

Les protéines

- **Correction.** Le faisceau traversant les échantillons est une gaussienne élargie, certaines zones (au centre) reçoivent davantage de lumière que d'autres (sur les bords). Il est donc nécessaire d'appliquer une correction. La première étape pour le traitement des images de fluorescence des protéines consiste à appliquer l'équation 4.1.

$$\text{Image}_{\text{corrigée}} = \frac{\text{Image}_{\text{brute}} - \text{Fond}_{\lambda}}{\text{Illumination} - \text{Fond de l'illumination}} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Pour chaque filtre dichroïque, le fond correspond à l'image obtenue sans échantillon ni faisceau. L'illumination est l'image obtenue avec faisceau et sans filtre. Enfin, le fond de l'illumination (FI) correspond à l'illumination sans faisceau, il permet de corriger la lumière ambiante.

Une première opération est effectuée sur le fond, l'illumination et le fond de l'illumination pour retirer les pixels de très hautes intensités positionnés aléatoirement. Un filtre moyen (rayon = 2) suivi d'un filtre médian (rayon = 10) sont appliqués. Le fond est alors soustrait à l'image brute et le fond de l'illumination est soustrait à l'illumination. L'étape suivante est alors la division, cependant, comme indiqué sur la figure 4.27, l'intensité des pixels au centre de l'illumination est bien plus importante que l'intensité de fluorescence des protéines. Une image noire résulte donc de cette opération, ainsi que la perte des informations. Pour pallier à cela, une solution est de multiplier l'image d'intérêt par le pixel de plus haute intensité de l'illumination. Une transformation préalable de l'image en 32 bits est nécessaire pour éviter la saturation.

Bien que la correction ait été appliquée, le signal est trop faible sur les bords pour pouvoir analyser les particules. L'image est donc recadrée pour ne conserver que le carré central.

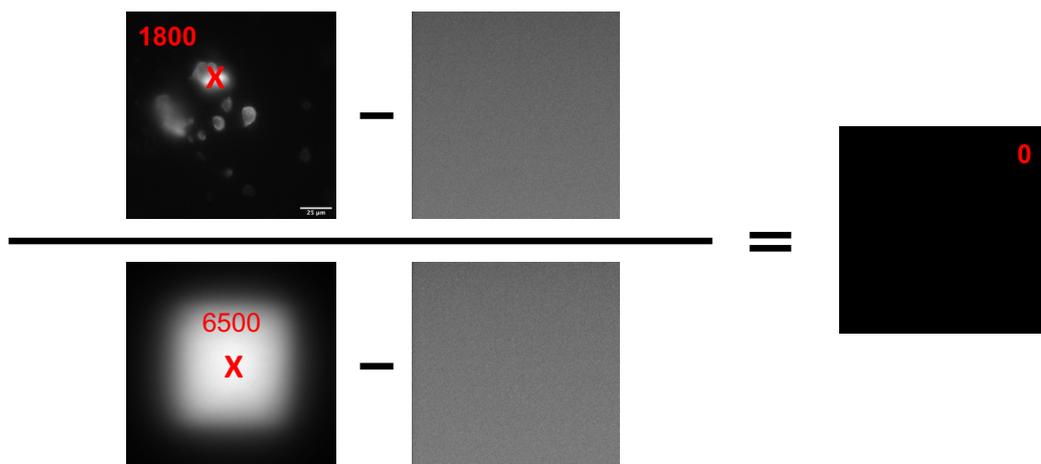


Figure 4.27. Opérations de corrections appliquées aux images de fluorescence. Mise en avant de la nécessité d'une opération supplémentaire consistant à multiplier l'image d'intérêt par la valeur du pixel de plus haute intensité de l'image d'illumination.

- Le **prétraitement** permet, de la même manière que pour les particules de plastique, de préparer les images à la binarisation. Il s'agit ici d'augmenter le contraste et de réaliser un filtre médian.
- En fonction de la nature des protéines, la procédure de **binarisation** n'est pas la même car la BSA a une intensité de fluorescence plus faible que l'EPL dans nos conditions d'analyse. Pour l'EPL, la fonction de seuillage appliquée est Otsu³⁶ puis, de la même manière que pour la binarisation des particules, les fonctions « Fill Holes » et « Close » (itérations = 4) sont appliquées. Pour la BSA, la fonction de seuillage appliquée est RenyiEntropy³⁷ et, à la place de la fonction « Close », la fonction « Open » (itérations = 2) est appliquée pour retirer des pixels isolés (érosion suivie d'une dilatation).

4.3.2.2. Extraction des données d'intérêt

A partir des images binaires, différents éléments peuvent être obtenus. La surface et le diamètre de Féret ont été relevés pour les particules et la couronne protéique. La densité intégrée (« RawIntDen » dans le logiciel Fiji), correspondant à la somme de la valeur des pixels d'une sélection, ainsi que l'écart-type des valeurs de pixels ont également été relevés pour les protéines. Les images dans le visible et de fluorescence sont analysées simultanément pour pouvoir associer une particule à sa corona protéique. A partir de ces données, trois informations principales ont été extraites :

- Le **quantité relative de protéines** permet de rendre compte de la quantité de protéines adsorbées par unité de surface. Elle est calculée d'après l'équation 4.2.

$$\text{Quantité relative de protéines} = \frac{\text{RawIntDen}_{\text{protéine}}}{\text{Surface}_{\text{particule}}} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

Il n'est pas possible d'être quantitatif à cause d'un éventuel quenching de fluorescence des matériaux. En revanche, nous pouvons comparer les intensités de fluorescence dans le cas où l'étude porte sur le même plastique et la même protéine, par exemple pour comparer la quantité de protéines adsorbées en fonction de la quantité initialement introduite.

- Le **taux de couverture protéique** est calculé à partir de l'équation 4.3. Si la valeur est supérieure à 1, les protéines recouvrent totalement la particule.

$$\text{Taux de couverture protéique} = \frac{\text{Surface}_{\text{protéine}}}{\text{Surface}_{\text{particule}}} \quad (\text{Eq. 4.3})$$

La précision de la technique ne permet pas de remonter à des épaisseurs de corona mais il est possible de comparer les taux de couvertures en fonction des différentes conditions.

- L'**hétérogénéité de la couronne protéique** a été déterminée à partir de l'écart-type des intensités de pixels dus à la fluorescence des protéines (équation 4.4, avec x_m , l'intensité moyenne de la corona sur une particule).

$$\text{Hétérogénéité} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - x_m)^2} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

L'imagerie directe, c'est-à-dire sans marquage, des protéines adsorbées apporte un point de vue intéressant sur la structure de la corona. En effet, les études *in situ* s'appuient généralement sur des stratégies complexes de microscopie ou sur des techniques de diffusion.³⁸⁻⁴⁰ Ces techniques permettent des mesures d'épaisseurs mais donnent rarement accès à des informations sur l'hétérogénéité de la corona, un paramètre qui peut se révéler crucial pour la compréhension de réponse biologique.⁴¹

4.3.2.3. Limites

Dans cette partie, seuls les MP natifs seront présentés. Des images ont également été acquises pour les MP vieillis mais le traitement n'a pas pu être réalisé. En effet, le vieillissement des plastiques modifie leur chimie et les rend davantage fluorescents, y compris dans le domaine de fluorescence des protéines. Leur intensité n'étant pas homogène d'une particule à l'autre ou au sein d'une même particule (Figure 4.28), une correction par une valeur moyenne n'est pas envisageable. Par ailleurs, ces hétérogénéités de fluorescence pourraient indiquer que les effets du vieillissement ne sont pas homogènes sur l'ensemble de l'échantillon.

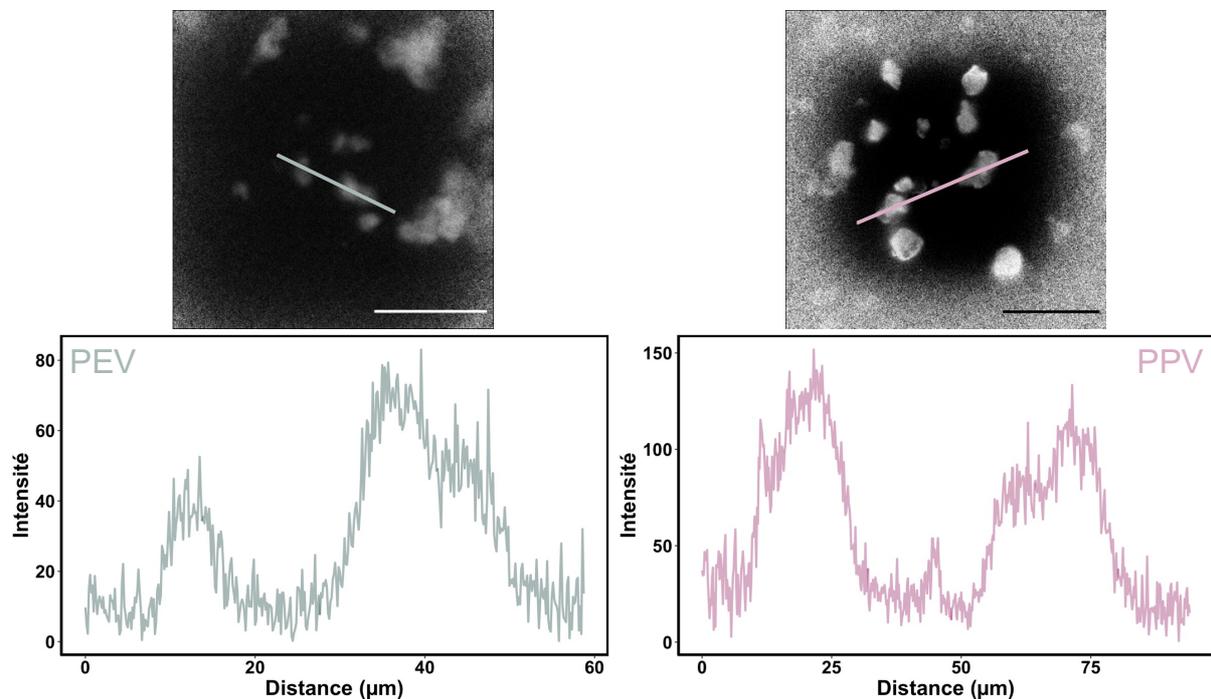


Figure 4.28. Intensité de fluorescence du PEV (à gauche) et du PPV (à droite) suite à une excitation à 265 nm et pour une gamme d'émission de 329 à 251 nm. La barre d'échelle représente 50 μm.

Nous avons observé que, sous faisceau, les protéines perdent leur caractère fluorescent (phénomène de photobleaching). Ce phénomène étant irréversible,⁴² il aurait pu être

envisageable de quantifier les protéines adsorbées sur les MP de manière indirecte, en faisant le rapport des intensités avant et après photobleaching. Cependant, nous avons observé que les MP vieillissent eux-mêmes subissent des modifications de fluorescence sous faisceau. Un marquage des protéines pourrait être envisagé pour analyser la fluorescence sur une gamme différente. Cependant, selon le type de marquage, il pourrait y avoir un impact sur les interactions entre les protéines et les MP.

4.3.3. Détermination des paramètres impactant la corona

4.3.3.1. Paramètres étudiés

La microscopie de fluorescence ainsi que le traitement d'images décrit précédemment nous ont permis d'étudier les effets de différents paramètres sur la qualité de la couronne protéique. Ces paramètres sont les suivants :

- **La nature du plastique** : PE vs PP
- **La quantité de protéines adsorbées** à l'échelle macroscopique des isothermes. Deux zones ont été comparées, correspondant respectivement à une Couche Incomplète (CI) au début de l'isotherme et à une Couche Saturée (CS) sur le plateau (Figure 4.29). Pour l'EPL les concentrations sont les suivantes : $0,07 \text{ g.L}^{-1}$ (CI) et $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ (CS) et pour la BSA : $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ (CS) en accord avec les isothermes d'adsorption (Figure 4.16 et Annexe A.3.1)

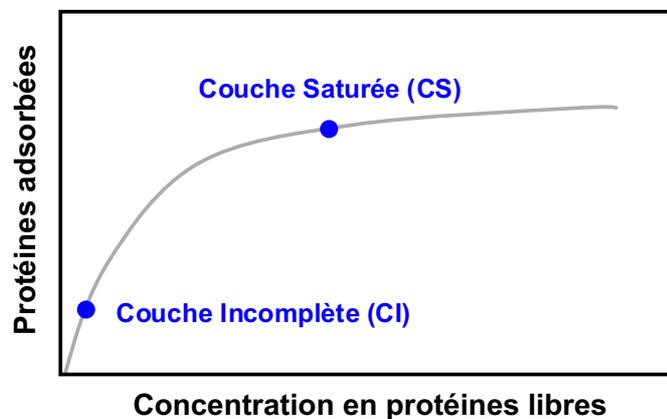


Figure 4.29. Représentation schématique d'un isotherme d'adsorption indiquant la position d'une couche incomplète (au début de la pente) et d'une couche saturée (sur le plateau).

- **La nature des protéines** : L'Extrait Protéique de levure (EPL) a été comparé à l'Albumine de Sérum Bovin (BSA). La BSA est une protéine très bien caractérisée dont la structure et les propriétés ont été largement décrites dans la littérature. Elle est utilisée ici comme protéine modèle pour comparer les résultats obtenus avec l'EPL.

4.3.3.2. Résultats

La **quantité relative de protéines adsorbées** en fonction des deux positions sur les isothermes d'adsorption est indiquée sur la figure 4.30. Pour les deux MP, une plus grande quantité de protéines est adsorbée dans des conditions saturantes (p-values : 6.10^{-3} et $7,8.10^{-3}$ respectivement pour le PE et le PP). Ces résultats montrent qu'en moyenne, bien que la quantité de protéines puisse varier d'une particule à l'autre de manière significative, le comportement macroscopique observé sur les isothermes d'adsorption est retrouvé à l'échelle microscopique.

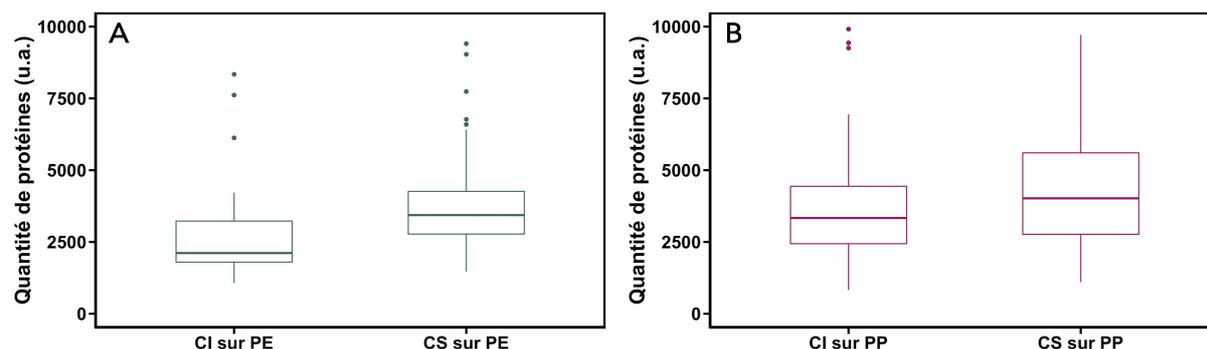


Figure 4.30. Quantité relative de protéines sur le PE (A) et le PP (B) représentée par la somme des intensités de pixels due à la fluorescence des protéines divisées par la surface des particules. Nombre de particules analysées de gauche à droite : 39, 53, 58, 32

La figure 4.31 représente le **taux de couverture protéique** sur les MP. Seul un échantillon sur les 6 étudiés a un comportement différent : dans des conditions non saturantes d'EPL sur du PE, le taux de couverture est significativement plus faible qu'en condition saturante (p-value = $1.1.10^{-2}$), avec une valeur inférieure à 1. Ce résultat est là encore en accord avec les isothermes d'adsorption et montre que, dans le cas du PE, une couronne protéique complète n'est pas obligatoire pour stabiliser les particules en solution. Ce résultat montre également que la méthode d'imagerie utilisée est capable d'identifier, à l'échelle des particules, des différences en termes de couverture protéique.

Dans les autres cas, le taux de couverture est supérieur à 1 et aucune différence n'est significative (p-value > 0,05), dans la même gamme que la BSA, indiquant que la corona formée par l'extrait a une épaisseur dans le même ordre de grandeur.

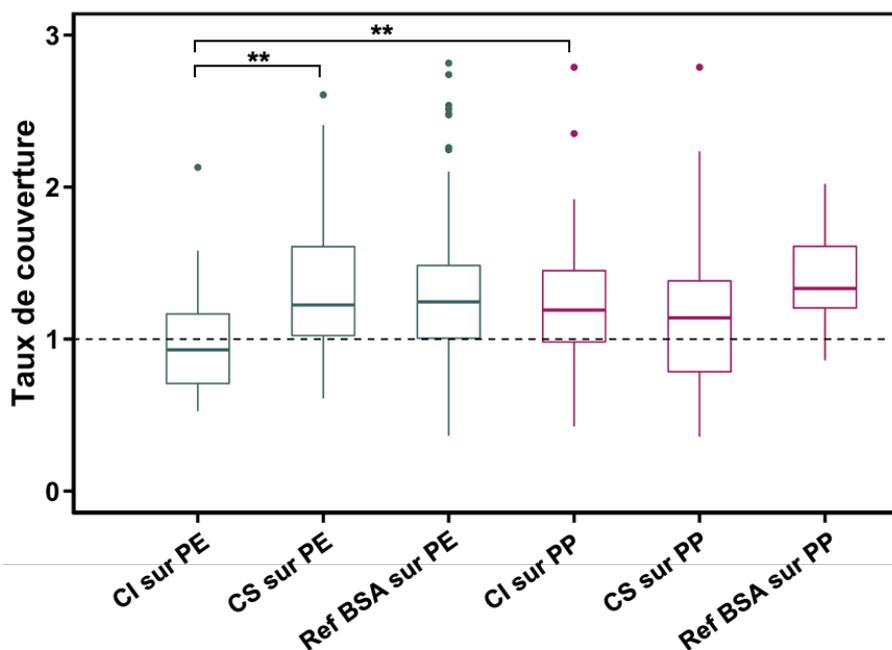


Figure 4.31. Taux de couverture protéique sur les MP. Représente la surface la corona divisée par la surface de la particule associée. Nombre de particules analysées de gauche à droite : 39, 53, 131, 58, 32, 42. (** p-value < 0,05)

La figure 4.32 montre les écart-types des intensités de fluorescence des protéines adsorbées sur les MP pour caractériser l'hétérogénéité de la corona. Les échantillons avec l'EPL sont relativement proches, quelle que soit la position sur l'isotherme d'adsorption et la nature du plastique. En revanche, les échantillons avec la BSA sont sensiblement différents. Sur le PE, les valeurs d'écart-types sont beaucoup plus faibles avec la BSA qu'avec l'EPL alors que sur le PP, elles ne sont pas significativement différentes.

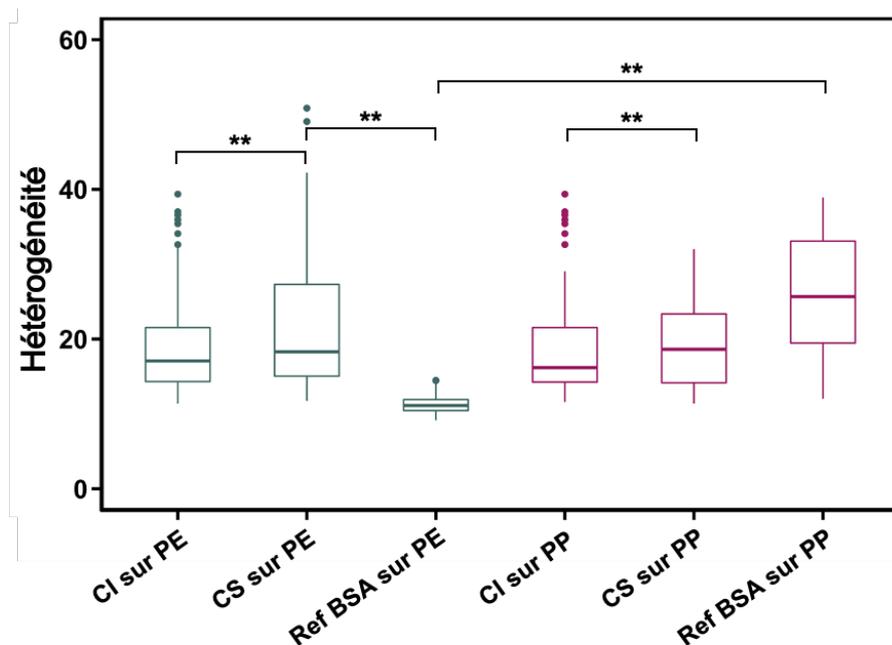


Figure 4.32. Écart-types des intensités relatives à la fluorescence de la corona sur le PE et le PP. Nombre de particules analysées de gauche à droite : 40, 53, 133, 61, 32, 42. (** p-value < 0,05)

4.3.3.3. Bilan

Les résultats présentés montrent que les paramètres étudiés ont un impact sur la structure de la corona, dans des proportions différentes selon la nature du plastique.

- La position sur l'isotherme d'adsorption (CI vs CS) a un impact sur la quantité de protéines adsorbées à l'échelle microscopique, bien qu'il y ait une variabilité importante. Le taux de couverture est plus faible dans le cas d'une CI sur le PE. En revanche il n'a pas été observé de différence significative pour le PP. Pour rappel, nous étudions ici les particules stables en solution. Dans le cas du PP, le crémage est plus rapide, cela sera étudié plus en détails ultérieurement (Chapitre 5).
- La nature des protéines (EPL vs BSA) a un impact sur l'hétérogénéité de la couverture protéique. La BSA forme une couche extrêmement homogène sur le PE. La différence avec l'EPL peut s'expliquer par la présence de protéines issues de complexes dans l'extrait, étant plus enclines à s'associer et ainsi à générer une certaine hétérogénéité.
- La différence d'hétérogénéité des coronas de BSA sur le PE et le PP est plus compliquée à expliquer puisque ces matériaux sont très proches chimiquement. Une certaine hétérogénéité est attendue puisque la BSA subit un réarrangement plus important sur des surfaces hydrophobes (greffées CH₃) que sur des surfaces hydrophiles (greffées OH).⁴³ Ces modifications structurelles peuvent mener à de nouvelles interactions protéine/protéine sur la surface et ainsi augmenter l'hétérogénéité. Une hypothèse pour expliquer la grande homogénéité de la corona de BSA sur le PE peut être liée à la cinétique d'adsorption qui est plus lente pour le PE vis-à-vis du PP (Annexe A.3.1 et Tableau 4.7). Les protéines s'organisent sur la surface de PE, tandis que sur le PP, les interactions sont trop fortes pour permettre la réorganisation. Cela peut également être dû aux propriétés structurales des microplastiques.

4.3.4. Étude des agrégats protéiques

Pour essayer de mieux comprendre les différences d'homogénéité et identifier pourquoi les isothermes ont montré une quantité plus importante d'EPL adsorbée sur les MP par rapport à la BSA, nous nous sommes intéressés aux agrégats de protéines. L'adsorption de protéines sur des surfaces est un phénomène dynamique, appelé effet Vroman.⁴⁴ De premières protéines entrent en contact avec la surface puis, sont remplacées par d'autres, plus affines. Ces phénomènes sont complexes et peuvent favoriser les interactions protéines/protéines et la formation d'agrégats.⁴⁵ Dans les agrégats, les protéines exposent leurs parties hydrophobes, qui sont dans la structure interne des protéines à l'état natif. Ceux-ci peuvent rester sur les particules ou bien être libérés en solution pour être remplacés par d'autres protéines. Les images de fluorescence des échantillons nous ont permis d'identifier et de comptabiliser les agrégats protéiques en solution (exemples en Figure 4.33).

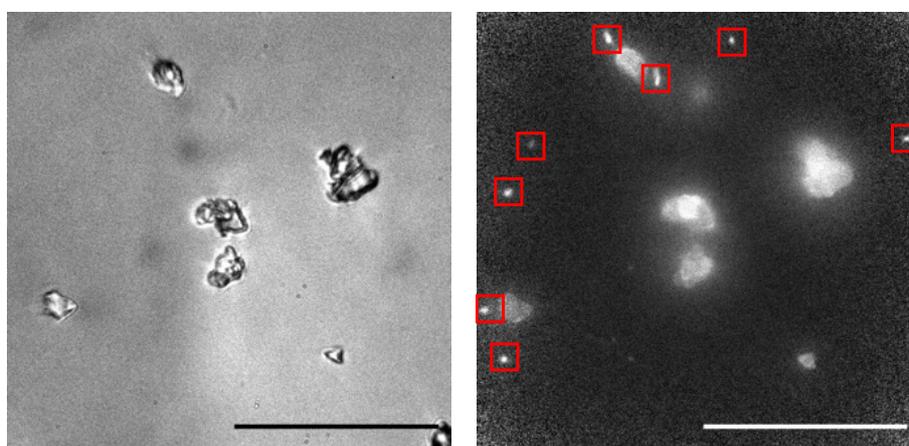


Figure 4.33. Images d'un échantillon de PP avec de l'EPL en conditions saturantes dans le visible (à droite) et en fluorescence $\lambda_{\text{excitation}} = 265 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 329 - 351 \text{ nm}$ (à gauche). Les agrégats de protéine sont visibles en fluorescence et encadrés en rouge. La barre d'échelle représente $50 \mu\text{m}$.

Les résultats des comptages sont présentés dans le tableau 4.11, les principales observations sont les suivantes :

- Pour l'EPL, il y a un nombre d'agrégats, ou complexes, considérablement plus important lorsque la couche protéique est saturée (facteur 26 pour le PE et 33 pour le PP). Deux hypothèses peuvent être considérées : i) il y a davantage de compétition en conditions saturantes, les phénomènes d'adsorption et de désorption sont donc plus nombreux. Des agrégats peuvent être générés suite à la désorption de protéines s'étant dénaturées (exposition de leurs parties hydrophobes pour le contact avec les surfaces) ; ii) une condition saturante est liée à une quantité plus importante de protéines en solution. Cela augmente la probabilité de rencontre entre les protéines lors de l'agitation et favorise l'agrégation.

- En conditions saturante et non saturante de l'EPL, il y a autant d'agrégats formés lorsque les protéines ont été mises en contact avec le PP ou le PE. Les différences observées sur les isothermes ne semblent donc pas liées à des phénomènes d'agrégation mais d'adsorption.
- La comparaison entre les deux systèmes protéiques montre qu'il n'y a que très peu d'agrégats de BSA en solution. Il est possible, dans le cas du PP, que des agrégats protéiques se soient formés en surface de la particule. Les phénomènes de compétition et d'échange sont limités dans le cas d'un système monoprotéique, les agrégats ne sont pas remplacés et restent donc fixés sur les particules. Cela expliquerait à la fois la quantité plus importante de BSA adsorbée sur le PP et une hétérogénéité plus élevée que sur le PE.

MP	Système protéique	État de saturation d'après les isothermes d'adsorption	Nombre d'agrégats pour 10 µL de solution
PE	EPL	CI	29
	BSA	CS	4
PP	EPL	CI	22
	EPL	CS	731
	BSA	CS	11

Tableau 4.11. Nombre d'agrégats de protéines en solution comptabilisés sur les images de fluorescence. Le nombre d'agrégats est déterminé sur une série d'images de 93,55 x 93,55 µm, l'équivalent sur 10 µL est calculé en considérant que l'épaisseur de liquide dans la cellule est de 10 µm. Nombre d'images analysées de haut en bas : 32, 29, 30, 21, 15, 31.

4.4. IDENTIFICATION DES PROTEINES IMPACTEES PAR LES MICROPLASTIQUES

4.4.1. Approche expérimentale

Afin d'identifier les protéines adsorbées sur les MP, des expériences de protéomique ont été réalisées. Une technique classique pour ce type d'expérience est représentée sur la figure 4.34-A. Elle consiste à collecter les particules entourées de leur corona après centrifugation. Suite à différents lavages, les protéines sont désorbées, à l'aide d'un tensioactif par exemple. L'analyse protéomique permet alors l'identification directe des protéines ayant été adsorbées.

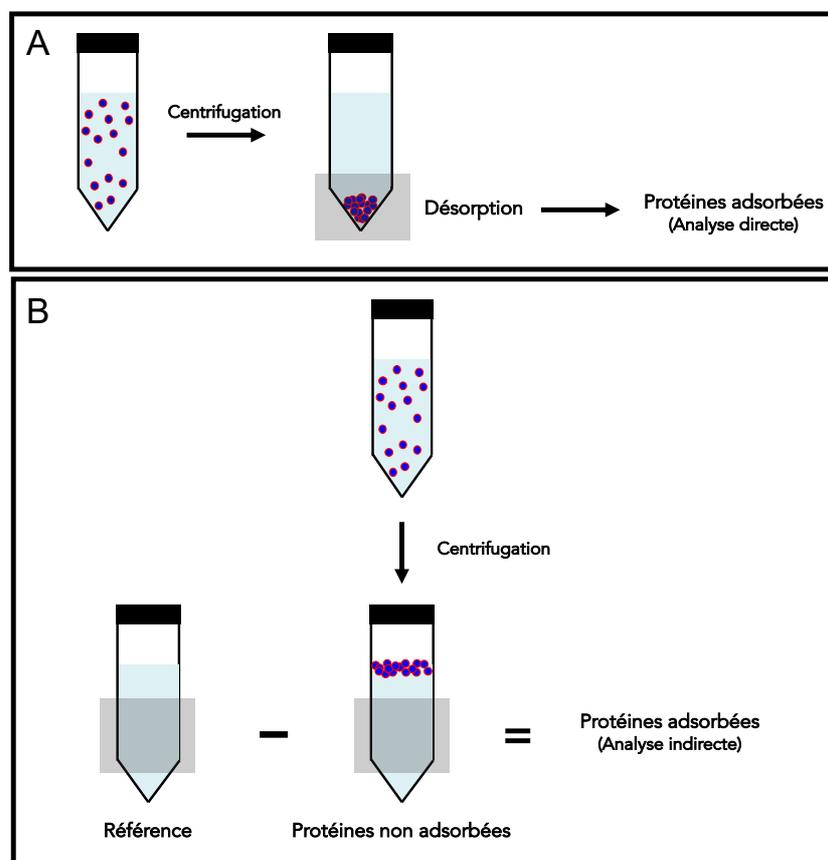


Figure 4.34. Schémas représentant (A) une démarche classique en analyse protéomique de protéines adsorbées sur des particules et (B) la stratégie appliquée ici : les protéines adsorbées sont identifiées par différence entre une référence sans MP et les protéines en solution (non adsorbées) suite à une exposition avec des MP.

Dans le cas présent, ce procédé n'est pas réalisable pour différentes raisons :

- Les particules sont moins denses que l'eau, par centrifugation elles remontent à la surface. Pour les isoler il faudrait les prélever et les placer dans un nouveau contenant, introduisant de nouvelles surfaces pouvant avoir un impact sur les équilibres d'adsorption des protéines.

- De premiers essais ont montré que les protéines sont liées très fortement aux MP, rendant la désorption seulement partielle.

Pour ces raisons, nous avons choisi une approche différente : ce sont les protéines non adsorbées ainsi qu'un échantillon de référence sans MP qui ont été analysés (Figure 4.34-B). Par différence entre les deux échantillons, il est possible de déterminer quelles sont les protéines fixées aux particules. La concentration initiale de 0,4 g.L⁻¹ en EPL a été choisie de sorte à être sur le plateau des isothermes, c'est-à-dire dans des conditions saturantes de protéines adsorbées sur les MP. Cette concentration correspond à un point au début du plateau, permettant de limiter la quantité de protéines libres afin de garder une bonne sensibilité pour la détection des protéines de faible abondance. Par ailleurs, lorsque la concentration en protéines est faible, l'agrégation est limitée (Tableau 4.11). Dans cette série d'expériences, nous ferons l'hypothèse que les protéines déplétées sont en majorité adsorbées aux particules plutôt qu'agrégées.

Pour cette expérience, nous avons raisonné à partir de comptages de spectres (Spectral Count en anglais, abréviation : SC) : le nombre total de spectres de peptides associés à une protéine donnée est comptabilisé.⁴⁶ Cette méthode ne permet pas de générer des données quantitatives mais elle est suffisante pour comparer des abondances au sein d'un échantillon.

Les expériences de protéomique sont complexes et différents éléments peuvent venir biaiser les résultats : problème d'échantillonnage lors du prélèvement, rétention de protéines dans la colonne chromatographique, sensibilité de la détection, etc. Ces biais sont intrinsèques à cette technique, c'est pourquoi nous avons appliqué des filtres afin de sélectionner uniquement les protéines dont les abondances sont significativement différentes entre l'échantillon de référence sans MP et les échantillons ayant été en contact avec les quatre types de MP. Ces filtres, appliqués sur la médiane des quatre répliquas, sont les suivants :

- Pour la référence, le nombre de spectres identifiés pour une protéine est supérieur à 10. Cela permet de s'assurer que la protéine est présente en quantité suffisamment importante dans la solution protéique.
- Un ratio $\frac{\text{Nombre de spectres (Référence)}}{\text{Nombre de spectres (Echantillon)}}$ supérieur à 2 permet de ne sélectionner que les protéines dont la différence entre la référence et l'échantillon est importante.
- Un facteur bayésien supérieur à 10 constitue une « preuve forte » que les plastiques ont un effet sur une protéine par rapport à l'hypothèse nulle (les plastiques n'ont pas d'effet).

Suite à l'application de ces filtres, des listes ont été établies et correspondent à l'identification des protéines déplétées suite au contact avec les quatre types de microplastiques. Ces protéines peuvent être adsorbées sur les particules ou sous forme d'agrégats en solution.

4.4.2. Résultats

4.4.2.1. Analyse quantitative

Protéines en solution

Les valeurs des concentrations protéiques finales sont indiquées dans le tableau 4.12. Une différence significative de concentration est observée entre la référence sans MP et les échantillons contenant des MP, mise à part pour le PPV. Comme évoqué précédemment, la quantification des protéines dans les échantillons ayant été en contact avec le PPV est difficile, potentiellement à cause de monomères relargués. Dans cette partie, nous pourrions positionner le PPV par rapport aux autres MP.

Concentration finale de protéines en solution (g.L ⁻¹)	
REF	0,35 ± 0,01
PE	0,25 ± 0,03
PEV	0,26 ± 0,01
PP	0,29 ± 0,02
PPV	0,35 ± 0,02

Tableau 4.12. Concentrations en EPL, déterminées par la méthode de Bradford, suite à un contact avec les MP de PE, PEV, PP et PPV. La concentration initiale est de 0,4 g.L⁻¹.

Les analyses ont systématiquement été réalisées à partir de quatre répliquas techniques, c'est-à-dire issus du même échantillon. La figure 4.35 présente les sommes de spectres identifiés (avant application des filtres) pour chaque échantillon. Il y a davantage de protéines détectées dans la référence sans MP et dans les échantillons avec MP vieillis en comparaison aux MP natifs. Les quantités détectées sont donc en accord avec les isothermes d'adsorption : les protéines se fixent en plus grande quantité sur les MP natifs. Ces résultats montrent donc que la stratégie développée dans le cadre de ces expériences de protéomique est adaptée.

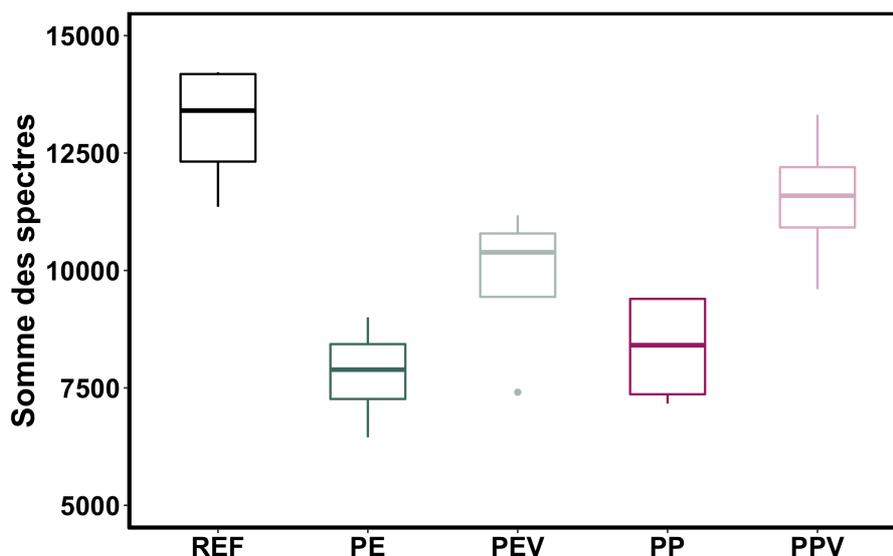


Figure 4.35. Nombre de spectres identifiés par échantillon ayant été mis ou non en contact avec des MP de PE, PEV, PP et PPV. Données relatives à quatre répliques techniques.

Protéines déplétées de la solution

Suite à l'application des filtres mentionnés précédemment, les listes des protéines adsorbées sur les différents MP ont été établies (listes complètes en Annexe A.3.4). La comparaison des données relatives au PE et au PP (figure 4.36) montre que sur les 1252 protéines détectées dans cette expérience, il y a respectivement 227 (PE, 18%) et 205 protéines (PP, 16%) considérées comme déplétées suite à une mise en contact avec l'un de ces deux MP.

La plupart de ces protéines sont déplétées de manière commune au PE et au PP (78%). Ces matériaux ont une chimie de surface proche mais, d'après les isothermes d'adsorption (normalisés par la surface), il y a une quantité plus importante (en masse) de protéines perdues en présence de PP. Une hypothèse était qu'une plus grande diversité de protéines soient fixées sur le PP. Ces données de protéomique, qui rapportent le nombre de protéines différentes et non pas la quantité massique de protéines interagissant, montrent que ce n'est pas le cas. La différence entre les deux types de MP ne semble donc pas résider dans la nature des interactions mais plutôt dans l'organisation des protéines sur la surface. Pour aller plus loin dans la proposition de modèles tenant compte de l'échelle moléculaire des contacts, une caractérisation plus poussée des états de surface serait nécessaire. Il pourrait par exemple s'agir d'essayer de corrélérer la topologie et la rugosité de surface des particules (AFM) à leur interaction avec les protéines ou d'utiliser des techniques de simulations moléculaires.

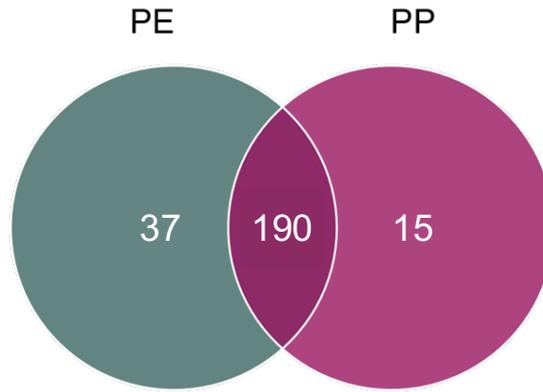


Figure 4.36. Nombre de protéines déplétées suite à une mise en contact avec des MP de PE (227 au total) ou de PP (205 au total), de manière spécifique ou commune aux deux types de MP.

La comparaison des effets des MP natifs et vieillis (Figure 4.37) montre que les MP vieillis ont un impact sur un moins grand nombre de protéines (PE : 227, PEV : 104, soit une diminution de 54% ; PP : 205, PPV : 27, soit une diminution de 87%). D'après les isothermes d'adsorption (Figures 4.17 et 4.18), la masse de protéines impactées est également plus faible pour les MP vieillis. Comme évoqué précédemment (paragraphe 1.2.2.2), les protéines sont connues pour s'adsorber plus facilement sur des surfaces hydrophobes.^{47,48} Les MP vieillis sont moins hydrophobes que les MP natifs à cause de l'oxydation. Les expériences de protéomique sont en accord avec la littérature, indiquant la robustesse de ces analyses.

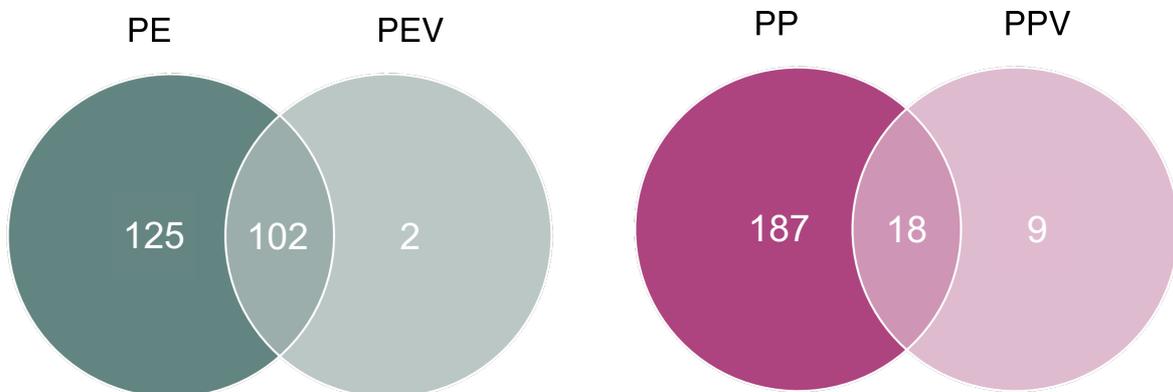
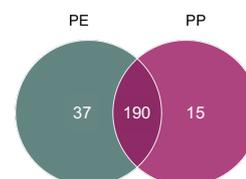


Figure 4.37. Nombre de protéines déplétées suite à une mise en contact avec, à gauche, des MP de PE (227 au total) ou de PEV (104 au total) et, à droite, des MP de PP (205 au total) ou de PPV (27 au total), de manière spécifique ou commune aux deux types de MP.

4.4.2.2. Analyse des paramètres physico-chimiques

Les structures primaires des protéines identifiées comme déplétées dans les échantillons contenant des MP ont été comparées à celles de l'ensemble des protéines détectées au cours de l'expérience. La liste des critères analysés ainsi que leur définition sont présentées en Annexe A.3.3.

Spécificité PE/PP



Bien qu'il n'y ait que peu de protéines perdues spécifiquement suite à l'exposition au PE (37) ou au PP (15), nous avons tout de même analysé leurs paramètres physico-chimiques. Il apparaît que, parmi les protéines déplétées en présence de PE, celles qui ne le sont pas en présence de PP sont plus petites. A l'inverse, il n'a pas été observé de spécificité quant aux propriétés des protéines perdues spécifiquement avec le PP. Parmi ces protéines (listes en Annexe A.3.5), une quantité importante est issue de complexes ribosomiques (14/37 pour le PE et 7/15 pour le PP). Pour ces protéines, cela semble indiquer qu'il s'agit d'effets indirects : des interactions protéine/protéine et non des interactions protéine/microplastique.

Vue d'ensemble

Parmi les paramètres identifiés comme significativement différents entre la référence et les échantillons ayant été en contact avec des MP (Figure 4.38), nous pouvons observer que :

- Certains paramètres sont communs pour les quatre MP : les protéines déplétées sont enrichies en arginine, charges positives et hélices α et appauvries en régions déstructurées.
- Les protéines perdues suite au contact avec le PE, le PP et le PEV sont plus longues que celles de la référence. Celles perdues suite au contact avec le PPV sont plus courtes mais, puisqu'elles sont très peu nombreuses, ce résultat n'est pas nécessairement représentatif de l'affinité des protéines pour le PPV.

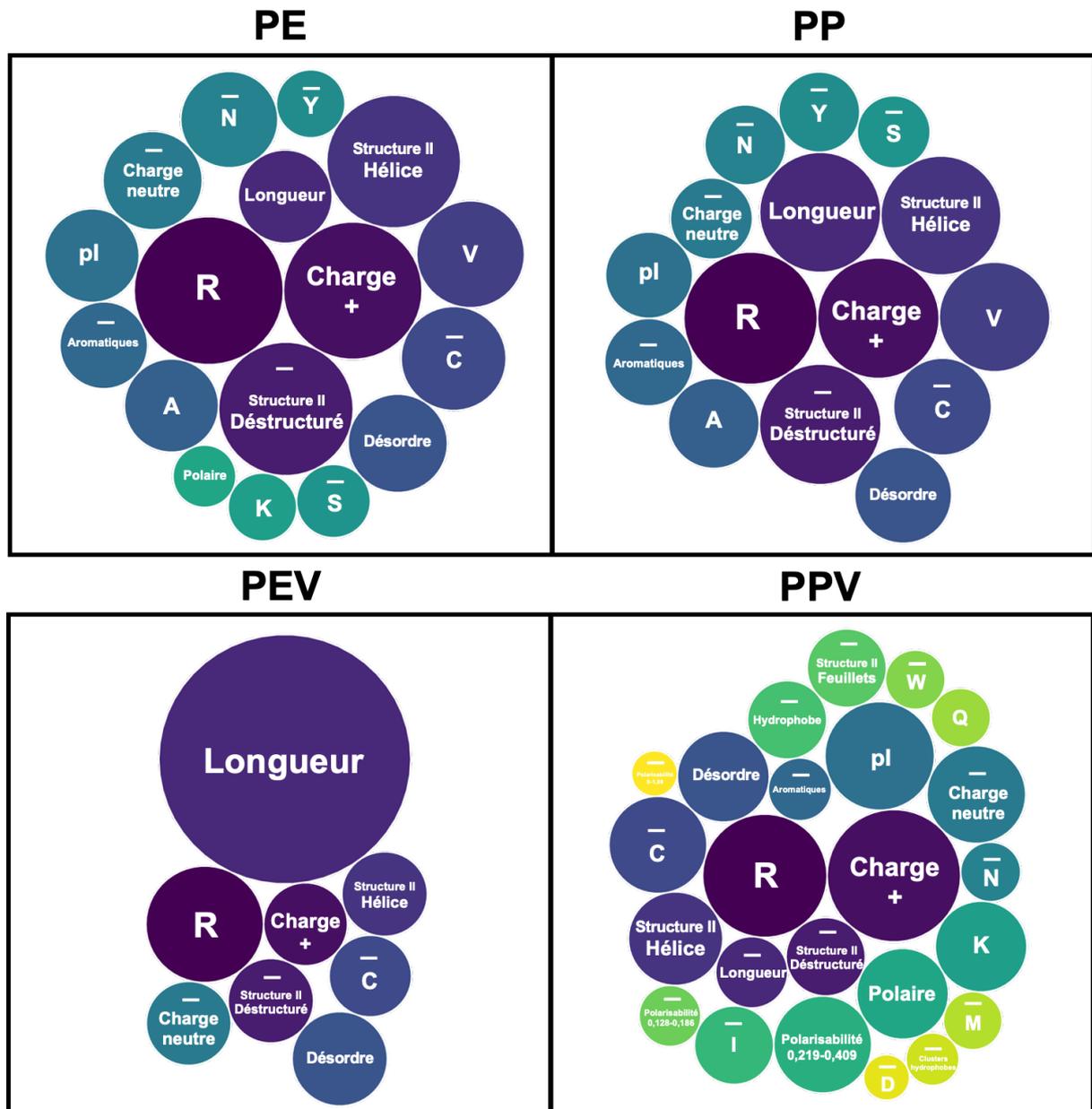


Figure 4.38. Caractéristiques des protéines déplétées. Les études statistiques sont réalisées en comparant la moyenne des échantillons de référence avec les moyennes des échantillons contenant des MP de PE, PP, PEV ou PPV). Les paramètres présentés sont statistiquement déterminants ($p\text{-value} < 0,05$). Les paramètres sont classés par couleur et la taille du cercle est proportionnelle à $\log(1/p\text{-value})$. Les signes moins (-) indiquent que le paramètre est moins représenté dans les échantillons ayant été en contact avec les MP que dans la référence. En l'absence de précision, le paramètre est plus représenté dans les échantillons que dans la référence.

Structure II^{aire}



Les résultats montrent que les protéines adsorbées sont enrichies en hélices α et appauvries en régions déstructurées. Ce résultat peut sembler étonnant car ce sont généralement les protéines peu structurées qui s'adsorbent car elles ont la capacité de se déformer pour s'étaler sur les surfaces, augmentant le nombre de points d'accroche. Au contraire, les protéines structurées perdent plus difficilement leur forme et ont plutôt tendance à rebondir sans se fixer sur les surfaces.⁴⁸ Il s'agit probablement d'un effet indirect : puisque les protéines adsorbées sont enrichies en hélices α , elles possèdent moins de régions déstructurées.

Des simulations ont montré que, sur des surfaces hydrophobes de graphite, des fragments protéiques contenant des hélices α ou feuillets β , s'adsorbent de manière parallèle.⁴⁹ Cette organisation, non observée sur des surfaces hydrophiles, pourrait constituer la base d'un raisonnement pour expliquer nos résultats. Il a également été observé qu'en s'adsorbant sur des surfaces hydrophobes, la réorganisation des protéines se fait via la perte d'une partie de leurs hélices α .⁴³ Cette capacité à se déstructurer, pour mener à un état plus stable énergétiquement, peut également participer à l'explication d'un enrichissement en hélices α dans les protéines adsorbées.

Pour aller plus loin dans cette analyse, il faudrait raisonner directement à partir des structures complètes des protéines et non pas à partir des structures primaires comme c'est le cas ici. AlphaFold⁵⁰ est un outil donnant accès, entre autres, à l'ensemble des structures du protéome de la levure et permettrait donc de réaliser ces analyses ainsi que des simulations.

Longueur



Nos résultats indiquent que protéines les plus longues sont plus enclines à s'adsorber sur les MP. De nombreuses propriétés des protéines dépendent de la longueur des protéines, y compris leur stabilité.⁵¹ Ainsi, les protéines les plus longues semblent de nature plus fragile.^{52,53} Ces observations sont également réalisées pour les polymères : les macromolécules les plus longues sont adsorbées préférentiellement.^{54,55} Cela peut s'expliquer par un meilleur ancrage (interactions sur différentes parties du polymère).

Charge positive / Arginine



L'arginine (R) est l'un des seuls acides aminés chargés positivement à pH7 (figure 4.39). Puisque cet acide aminé est identifié comme particulièrement présent dans les protéines adsorbées, il n'est pas étonnant que la charge positive le soit également. Il ne s'agit pas d'un acide aminé particulièrement abondant dans le protéome de la levure.⁵⁶

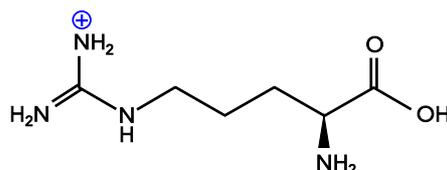


Figure 4.39. Représentation de l'arginine à pH7.

Ce qui est tout à fait contre-intuitif est le fait que ce soient les molécules chargées positivement qui se fixent préférentiellement sur des surfaces hydrophobes étant non (ou très peu) chargées, tels que les MP étudiés. Il ne s'agit pas d'un fait communément observé dans la littérature, bien au contraire (voir paragraphe 1.2.2). Quelques articles permettent tout de même d'émettre deux hypothèses :

- **La surface plastique est chargée.**

Une explication permettant de comprendre pourquoi des éléments chargés positivement se fixent sur des surfaces hydrophobes non chargée est liée à l'accumulation d'ions aux interfaces. Il a déjà été montré que les espèces chargées ont tendance à s'adsorber aux interfaces⁵⁷ et que les ions OH⁻ s'adsorbent davantage sur les surfaces hydrophobes que les ions H⁺.⁵⁸ Ce phénomène est dû à une asymétrie dans la répartition des charges, rendant une partie des ions OH⁻ et H⁺ très hydrophobe et l'autre partie très hydrophile. Puisque cet effet est plus prononcé pour OH⁻ que pour H⁺, les surfaces initialement hydrophobes deviennent alors des surfaces chargées négativement, disponibles pour des interactions avec des espèces chargées positivement, telle que l'arginine.

- **L'arginine est hydrophobe.**

L'arginine est un acide aminé cationique mais elle possède également une chaîne carbonée, donc une partie hydrophobe. Par ailleurs, sa partie polaire fait qu'elle peut être exposée au solvant, donc dans la structure externe des protéines, ce qui la rend accessible pour d'éventuelles interactions. Ce caractère hydrophobe de l'arginine, bien qu'étonnant, a déjà été remarqué, rendant cette hypothèse plus plausible que la première.⁵⁹⁻⁶¹ Des simulations indiquent que les interactions de Van der Waals entre la chaîne carbonée de l'arginine et la surface seraient suffisamment fortes pour compenser les effets de la charge.⁶²

Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les interactions. Par exemple, il serait intéressant de réaliser des isothermes d'adsorption avec de l'arginine purifiée. Des simulations s'approchant de nos conditions expérimentales sont en cours (Figure 4.40).

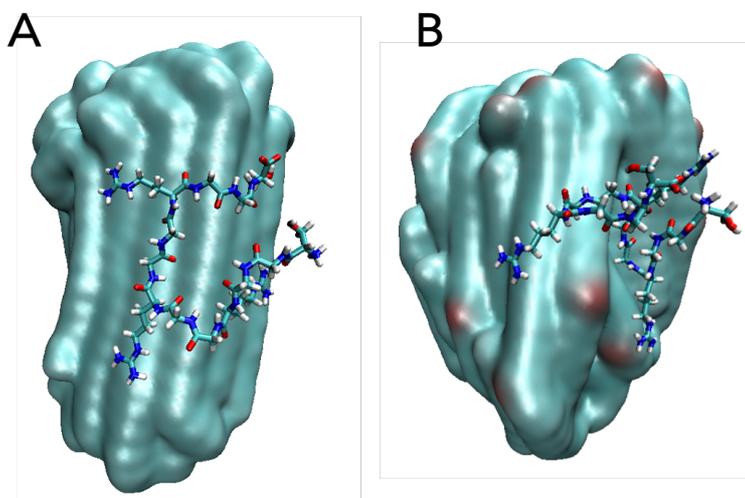


Figure 4.40. Simulations de contact entre un peptide SGGRGGRGGRGS (S=sérine : plus petit acide aminé polaire ; G = glycine : plus petit acide aminé et R = arginine) et une nanoparticule de PE (A) et de PE vieilli (B). La séquence du peptide a été choisie de sorte à ce que l'arginine puisse entrer en contact avec la particule. Simulations réalisées par Yves Boulard.

Quel que soit le mécanisme d'adsorption, ces interactions seraient tellement favorables que l'arginine pourrait être utilisée pour passiver des surfaces hydrophobes afin de prévenir l'adsorption de protéines, voire même pour désorber des protéines, ouvrant la voie à de nombreuses applications.⁶³

4.4.2.3. Apport des données de protéomique à la compréhension des interactions

Les données présentées ci-dessus nous ont permis d'identifier que, bien que les quantités de protéines adsorbées sur le PE et le PP soient significativement différentes (Figure 4.16), ces protéines sont en majorité communes aux deux MP. Une étude à l'échelle moléculaire permettrait de compléter la caractérisation et peut-être d'expliquer les comportements observés.

Une autre information clef tirée des données de protéomique est la différence entre les MP natifs et vieillis. Nous avons observé précédemment que les protéines s'adsorbent en moins grande quantité (en masse) sur les MP vieillis par rapport aux MP natifs (Figure 4.17 et 4.18) et ces données nous permettent d'affirmer qu'elles se fixent également en moins grand nombre. Il semblerait donc que l'organisation des protéines sur les MP soit différente en fonction de l'état d'oxydation des particules.

En comparaison avec des surfaces hydrophiles, les protéines adsorbées sur des surfaces hydrophobes ont un degré de structure inférieur. Cela s'explique par un réarrangement des protéines adsorbées lors des interactions hydrophobes avec la surface ou avec des protéines adsorbées voisines (interactions latérales).⁴³ Ces interactions sont encore mal comprises mais dépendent, entre autres, de la solvation des protéines, de la surface, des forces intramoléculaires des protéines, de la force ionique et du pH de la solution.^{64,65} Lorsque les répulsions électrostatiques entre protéines sont faibles, elles sont davantage comprimées et occupent moins d'espace sur la surface (qui peut alors accueillir une quantité plus importante de protéines).⁶⁵ Lorsque l'hydrophobie de la surface n'est pas continue mais sous forme de patches, les protéines n'ont plus la même liberté de réorganisation, ni la capacité de compression.⁶⁶ Elles sont donc adsorbées en plus faible quantité.

Le modèle que nous proposons pour expliquer les différences entre MP natifs et vieillis est le suivant : les oxygènes des MP vieillis rompent l'homogénéité de la surface hydrophobe et empêchent les protéines de se réarranger, diminuant la quantité de protéines adsorbables en surface (Figure 4.41). D'après les résultats des premières simulations réalisées, il semblerait que, sur les MP vieillis, les protéines s'ancrent sur les parties hydrophobes et sur les zones oxygénées.

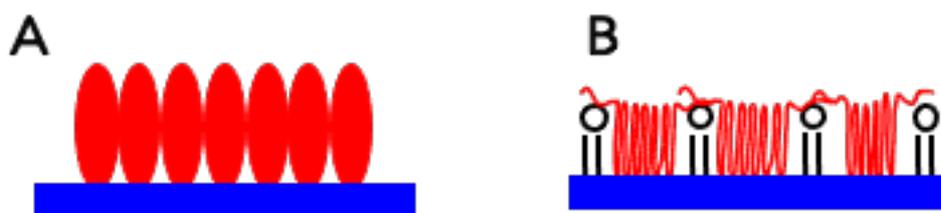


Figure 4.41. Représentation schématique de l'organisation des protéines sur

(A) Une surface totalement hydrophobe : les protéines sont comprimées par des interactions latérales

(B) Une surface hydrophobe avec des patches hydrophiles générés suite au vieillissement des MP : les interactions latérales sont minimisées, les protéines s'étalent davantage sur la surface.

Les protéines sont en rouge, les surfaces hydrophobes en bleu et les patches hydrophiles sont représentés par des doubles liaisons carbone/oxygène en noir.

Enfin, un résultat surprenant a été obtenu par analyse des paramètres liés à l'adsorption : l'arginine est enrichie dans les protéines adsorbées, quelle que soit la nature du plastique (PE, PP, natifs et vieillis). Sur des nanoparticules de silice et pour le même extrait protéique, l'arginine est également enrichie dans les protéines adsorbées sur les particules.⁶⁷ Dans le cas de la silice, cela semble plus évident puisque les groupes silanols peuvent plus facilement interagir avec les charges positives de l'arginine. Il faudrait confronter les listes afin d'identifier si ce sont les mêmes protéines. Des hypothèses ont été émises mais pour analyser plus finement ces données, des expériences et simulations sont nécessaires.

4.5. POINTS CLEFS ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE

Ce chapitre nous a permis de mieux comprendre les phénomènes à l'origine des pertes de protéines en présence de microplastiques. Certaines d'entre elles vont être adsorbées à leur surface tandis que d'autres se trouveront sous formes d'agrégats en solution.

Les deux types de microplastiques (MP) étudiés (polyéthylène, PE et polypropylène, PP), bien que proches chimiquement, ont montré des comportements différents : les protéines impactées sont globalement les mêmes mais, à surface équivalente, le PP engendre significativement plus de perte que le PE, indiquant un caractère plus défavorable pour les protéines. A partir des informations collectées lors de la caractérisation des MP, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer ce phénomène. Une étude à l'échelle moléculaire permettrait une meilleure compréhension.

L'imagerie de la corona par microscopie de fluorescence utilisant les radiations synchrotron s'est avérée être adaptée à l'étude de la corona protéique sur des particules dont le signal est négligeable dans la gamme de fluorescence des protéines. Cela nous a permis d'étudier la quantité relative, le taux de couverture ainsi que l'hétérogénéité de la couche protéique sur les MP. Les principales conclusions sont les suivantes :

- La position sur l'isotherme d'adsorption (Couche Incomplète : CI vs Couche Saturée : CS) a un impact sur la quantité de protéines adsorbées à l'échelle microscopique, bien qu'il y ait une variabilité importante. Le taux de couverture est plus faible dans le cas d'une CI sur le PE.
- La nature des protéines (extrait protéique de levure, EPL vs albumine de sérum bovin, BSA) a un impact sur l'hétérogénéité de la couverture protéique. La BSA forme une couche extrêmement homogène sur le PE. La différence avec l'EPL peut s'expliquer par la présence de protéines issues de complexes dans l'extrait, étant plus enclines à s'associer et ainsi à générer une certaine hétérogénéité.

L'imagerie de fluorescence nous a également permis d'identifier qu'une quantité importante de protéines considérées comme perdues se trouvent sous forme d'agrégats en solution, non adsorbées aux MP. Pour l'EPL, il y a un nombre d'agrégats plus important lorsque la couche protéique est saturée. Ils peuvent être dus à une compétition sur les MP ou à une probabilité de rencontre en solution plus importante. Le fait qu'il y ait une quantité similaire d'agrégats formés lorsque les protéines ont été mises en contact avec le PP ou le PE semble indiquer que les différences sur les isothermes sont bien liées à l'adsorption des protéines. Enfin, l'EPL est plus enclin à l'agrégation que la BSA dans ces conditions, probablement car il ne peut pas y avoir de compétition dans l'adsorption pour un échantillon monoprotéique.

La méthodologie appliquée en protéomique s'est également avérée être adaptée à notre étude et nous a permis de comparer les microplastiques natifs et vieillies. L'étude des paramètres physico-chimiques a montré que les protéines adsorbées sur les quatre types de microplastiques ont

sensiblement les mêmes propriétés : elles contiennent beaucoup d'hélice α , sont longues et sont enrichies en arginine. Ce dernier point était tout à fait inattendu puisque l'arginine est un acide aminé chargé. L'hypothèse nous semblant la plus plausible est que cet acide aminé est exposé au solvant grâce à son groupe polaire mais est de nature hydrophobe par sa chaîne carbonée.

Enfin, nous avons confirmé le fait que les protéines s'adsorbent moins sur les MP vieillis que sur les MP natifs. Nous avons proposé un modèle basé sur la rupture d'homogénéité de la surface hydrophobe induite par la présence d'oxygènes en surface.

4.6. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Abaroa-Pérez, B.; Ortiz-Montosa, S.; Hernández-Brito, J. J.; Vega-Moreno, D. Yellowing, Weathering and Degradation of Marine Pellets and Their Influence on the Adsorption of Chemical Pollutants. *Polymers* 2022, 14 (7), 1305. <https://doi.org/10.3390/polym14071305>.
- (2) Bissagou Koumba, G. Fragmentations Chimique et Physique de Plastiques et Microplastiques En Eau Douce Sous Irradiation UV-Visible, Université Clermont Auvergne, 2018.
- (3) 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>.
- (4) Mairesse, M.; Petit, J. M.; Chéron, J.; Falcy, M. Produits de Dégradation Thermique Des Matières Plastiques. *Cah. Notes Doc. - Hygiène Sécurité Trav. INRS* 1999, No. 174.
- (5) Hosmann, R.; Bagchi, S. N. Direct analysis of diffraction by matter. *Bull. Société Fr. Minéralogie Cristallogr.* 1963, 86 (1).
- (6) 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>.
- (7) 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>.
- (8) Lannon, J. M.; Meng, Q. Analysis of a Poly(Propylene)(PP) Homopolymer by XPS. *Surf. Sci. Spectra* 1999, 6 (2), 79–82. <https://doi.org/10.1116/1.1247902>.
- (9) 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.* 1991, 17 (5), 267–272. <https://doi.org/10.1002/sia.740170508>.
- (10) Fontana, L.; Santoro, M.; Bini, R.; Vinh, D. Q.; Scandolo, S. High-Pressure Vibrational Properties of Polyethylene. *J. Chem. Phys.* 2010, 133 (20), 204502. <https://doi.org/10.1063/1.3507251>.
- (11) Karacan, İ.; Benli, H. The Use of Infrared-Spectroscopy for the Structural Characterization of Isotactic Polypropylene Fibres. *Tekst. Ve Konfeksiyon* 2011, 116–123.
- (12) Benítez, A.; Sánchez, J. J.; Arnal, M. L.; Müller, A. J.; Rodríguez, O.; Morales, G. Abiotic Degradation of LDPE and LLDPE Formulated with a Pro-Oxidant Additive. *Polym. Degrad. Stab.* 2013, 98 (2), 490–501. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.12.011>.
- (13) 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>.
- (14) *Glass Transition Temperatures*. polymer database. <https://polymerdatabase.com> (accessed 2023-01-24).
- (15) Wong, A. C.-Y.; Lam, F. Study of Selected Thermal Characteristics of Polypropylene/Polyethylene Binary Blends Using DSC and TGA. *Polym. Test.* 2002, 21 (6), 691–696. [https://doi.org/10.1016/S0142-9418\(01\)00144-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9418(01)00144-1).
- (16) Majewsky, M.; Bitter, H.; Eiche, E.; Horn, H. Determination of Microplastic Polyethylene (PE) and Polypropylene (PP) in Environmental Samples Using Thermal Analysis (TGA-DSC). *Sci. Total Environ.* 2016, 568, 507–511. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.017>.
- (17) *Effect of Thermal Degradation on Polymer Thermal Properties*; TA430; TA Instruments.

- (18) 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>.
- (19) 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>.
- (20) Jin, Y.; Kotula, A. P.; Snyder, C. R.; Hight Walker, A. R.; Migler, K. B.; Lee, Y. J. Raman Identification of Multiple Melting Peaks of Polyethylene. *Macromolecules* 2017, 50 (16), 6174–6183. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.7b01055>.
- (21) 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>.
- (22) Chen, X.; Zhang, W.; Ye, K.; Meng, L.; Lv, F.; Cao, T.; Wan, C.; Chen, X.; Li, L. Stretch-Induced Melting and Recrystallization of Polyethylene-Plasticizer Film Studied by *In Situ* X-Ray Scattering: A Thermodynamic Point of View. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 2018, 56 (22), 1521–1528. <https://doi.org/10.1002/polb.24740>.
- (23) Jones, A. T.; Aizlewood, J. M.; Beckett, D. R. Crystalline Forms of Isotactic Polypropylene. *Makromol. Chem.* 1964, 75 (1), 134–158. <https://doi.org/10.1002/macp.1964.020750113>.
- (24) Zhao, Y.; Long, J.; Zhuang, P.; Ji, Y.; He, C.; Wang, H. Transforming Polyethylene and Polypropylene into Nontraditional Fluorescent Polymers by Thermal Oxidation. *J. Mater. Chem. C* 2022, 10 (3), 1010–1016. <https://doi.org/10.1039/D1TC05520H>.
- (25) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254.
- (26) Scopes, R. K. Measurement of Protein by Spectrophotometry at 205 Nm. *Anal. Biochem.* 1974, No. 59, 277–282.
- (27) Yui, N.; Suzuki, Y.; Mori, H.; Terano, M. Surface Properties of Polypropylene Films as Biomaterials. *Polym J* 1995, 27 (6), 9.
- (28) Dee, K. C.; Puleo, D. A.; Bizios, R. *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions*, Wiley-Liss.; 2002.
- (29) Horbett, T. A.; Weathersbp, P. K.; Boffman, A. S. Hemoglobin Adsorption to Three Polymer Surfaces. 1978, 12 (2), 319–329. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(78\)90302-X](https://doi.org/10.1016/0049-3848(78)90302-X).
- (30) *Proteome Isoelectric Point Database*. isoelectricpointdb.org (accessed 2022-09-01).
- (31) Venel, Z.; Tabuteau, H.; Pradel, A.; Pascal, P.-Y.; Grassl, B.; El Hadri, H.; Baudrimont, M.; Gigault, J. Environmental Fate Modeling of Nanoplastics in a Salinity Gradient Using a Lab-on-a-Chip: Where Does the Nanoscale Fraction of Plastic Debris Accumulate? *Environ. Sci. Technol.* 2021, 55 (5), 3001–3008. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07545>.
- (32) Lakowicz, J. R. *Topics in Fluorescence Spectroscopy*; Kluwer Academic Publishers, 2000; Vol. 6, Protein Fluorescence.
- (33) Royer, C. A. Probing Protein Folding and Conformational Transitions with Fluorescence. *Chem. Rev.* 2006, 106 (5), 1769–1784. <https://doi.org/10.1021/cr0404390>.
- (34) 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>.
- (35) Ridler, T. W.; Calvard, S. Picture Thresholding Using an Iterative Selection Method. *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.* 1978, 8 (8), 630–632. <https://doi.org/10.1109/TSMC.1978.4310039>.
- (36) Otsu, N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.* 1979, 9 (1), 62–66. <https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076>.

- (37) Kapur, J. N.; Sahoo, P. K.; Wong, A. K. C. A New Method for Gray-Level Picture Thresholding Using the Entropy of the Histogram. *Comput. Vis. Graph. Image Process.* 1985, No. 29, 273–285.
- (38) 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, *acs.nanolett.1c02416*. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.1c02416>.
- (39) 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>.
- (40) 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>.
- (41) Feiner-Gracia, N.; Beck, M.; Pujals, S.; Tosi, S.; Mandal, T.; Buske, C.; Linden, M.; Albertazzi, L. Super-Resolution Microscopy Unveils Dynamic Heterogeneities in Nanoparticle Protein Corona. *Small* 2017, *13* (41), 1701631. <https://doi.org/10.1002/sml.201701631>.
- (42) Demchenko, A. P. Photobleaching of Organic Fluorophores: Quantitative Characterization, Mechanisms, Protection. *Methods Appl. Fluoresc.* 2020, *8* (2), 022001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab7365>.
- (43) 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>.
- (44) Vroman, L.; Adams, A. L. Findings with the Recording Ellipsometer Suggesting Rapid Exchange of Specific Plasma Proteins at Liquid/Solid Interfaces. *Surf. Sci.* 1969, *16*, 438–446. [https://doi.org/10.1016/0039-6028\(69\)90037-5](https://doi.org/10.1016/0039-6028(69)90037-5).
- (45) Hirsh, S. L.; McKenzie, D. R.; Nosworthy, N. J.; Denman, J. A.; Sezerman, O. U.; Bilek, M. M. M. The Vroman Effect: Competitive Protein Exchange with Dynamic Multilayer Protein Aggregates. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2013, *103*, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.039>.
- (46) Lundgren, D. H.; Hwang, S.-I.; Wu, L.; Han, D. K. Role of Spectral Counting in Quantitative Proteomics. *Expert Rev. Proteomics* 2010, *7* (1), 39–53. <https://doi.org/10.1586/epr.09.69>.
- (47) Latour, R. A. Fundamental Principles of the Thermodynamics and Kinetics of Protein Adsorption to Material Surfaces. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2020, *191*, 110992. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110992>.
- (48) 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>.
- (49) 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>.
- (50) Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* 2021, *596* (7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- (51) Dill, K. A.; Ghosh, K.; Schmit, J. D. Physical Limits of Cells and Proteomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011, *108* (44), 17876–17882. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114477108>.
- (52) Leuenberger, P.; Gansch, S.; Kahraman, A.; Cappelletti, V.; Boersema, P. J.; von Mering, C.; Claassen, M.; Picotti, P. Cell-Wide Analysis of Protein Thermal Unfolding Reveals Determinants of Thermostability. *Science* 2017, *355* (6327), eaai7825. <https://doi.org/10.1126/science.aai7825>.
- (53) Ghosh, K.; Dill, K. A. Computing Protein Stabilities from Their Chain Lengths. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009, *106* (26), 10649–10654. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903995106>.
- (54) Frantz, P.; Granick, S. Kinetics of Polymer Adsorption and Desorption. *Phys. Rev. Lett.* 1991, *66* (7). <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.66.899>.

- (55) Cohen Stuart, M. A.; Cosgrove, T.; Vincent, B. Experimental Aspects of Polymer Adsorption at Solid/Solution Interfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* 1985, 24, 143–239. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(85\)80030-0](https://doi.org/10.1016/0001-8686(85)80030-0).
- (56) Chen, Y.; Nielsen, J. Yeast Has Evolved to Minimize Protein Resource Cost for Synthesizing Amino Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2022, 119 (4), e2114622119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2114622119>.
- (57) Tian, C. S.; Shen, Y. R. Structure and Charging of Hydrophobic Material/Water Interfaces Studied by Phase-Sensitive Sum-Frequency Vibrational Spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009, 106 (36), 15148–15153. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901480106>.
- (58) Kudin, K. N.; Car, R. Why Are Water–Hydrophobic Interfaces Charged? *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130 (12), 3915–3919. <https://doi.org/10.1021/ja077205t>.
- (59) Hong, Y.; Najafi, S.; Casey, T.; Shea, J.-E.; Han, S.-I.; Hwang, D. S. Hydrophobicity of Arginine Leads to Reentrant Liquid-Liquid Phase Separation Behaviors of Arginine-Rich Proteins. *Nat. Commun.* 2022, 13 (1), 7326. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35001-1>.
- (60) Li, J.; Garg, M.; Shah, D.; Rajagopalan, R. Solubilization of Aromatic and Hydrophobic Moieties by Arginine in Aqueous Solutions. *J. Chem. Phys.* 2010, 133 (5), 054902. <https://doi.org/10.1063/1.3469790>.
- (61) Wu, E.; Coppens, M.-O.; Garde, S. Role of Arginine in Mediating Protein–Carbon Nanotube Interactions. *Langmuir* 2015, 31 (5), 1683–1692. <https://doi.org/10.1021/la5043553>.
- (62) Gu, Z.; Yang, Z.; Wang, L.; Zhou, H.; Jimenez-Cruz, C. A.; Zhou, R. The Role of Basic Residues in the Adsorption of Blood Proteins onto the Graphene Surface. *Sci. Rep.* 2015, 5 (1), 10873. <https://doi.org/10.1038/srep10873>.
- (63) Shikiya, Y.; Tomita, S.; Arakawa, T.; Shiraki, K. Arginine Inhibits Adsorption of Proteins on Polystyrene Surface. *PLoS ONE* 2013, 8 (8), e70762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070762>.
- (64) 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>.
- (65) 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>.
- (66) Ostuni, E.; Grzybowski, B. A.; Mrksich, M.; Roberts, C. S.; Whitesides, G. M. Adsorption of Proteins to Hydrophobic Sites on Mixed Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* 2003, 19 (5), 1861–1872. <https://doi.org/10.1021/la020649c>.
- (67) Mathé, C.; Devineau, S.; Aude, J.-C.; Lagniel, G.; Chédin, S.; Legros, V.; Mathon, M.-H.; Renault, J.-P.; Pin, S.; Boulard, Y.; Labarre, J. Structural Determinants for Protein Adsorption/Non-Adsorption to Silica Surface. *PLoS ONE* 2013, 8 (11), e81346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081346>.

CHAPITRE 5. LE ROLE DE LA CORONA PROTEIQUE SUR LE COMPORTEMENT COLLOIDAL DE MICROPLASTIQUES NATIFS ET VIEILLIS

D'après des études récentes, il y aurait au moins vingt-cinq mille milliards de MP dans les océans.¹ Leur devenir dans l'environnement dépend de leur dégradabilité et de leur comportement colloïdal, c'est-à-dire de leur propension à s'agréger et/ou sédimenter/crémer. Des études sur des protéines purifiées ont montré le rôle de la couronne protéique sur la stabilité de nanoparticules en solution.²⁻⁶ Selon la charge de la protéine et la salinité du milieu, il est possible d'induire l'agrégation des particules ou leur stabilisation en solution. Il a également été montré qu'une couche protéique complète à l'échelle macroscopique, est nécessaire pour assurer une stabilisation stérique.⁵ Cependant, les informations à l'échelle des particules sont peu nombreuses dans la littérature.

Le chapitre précédent nous a permis d'identifier des conditions favorables et défavorables à l'adsorption de protéines sur des microplastiques (MP). Nous avons évoqué le fait que les protéines permettent le passage en solution aqueuse des MP hydrophobes qui, en leur absence, restent à l'interface avec l'air et les bulles. Comme discuté plus précisément en annexe A.1, trois aspects doivent être considérés pour comprendre leur stabilité colloïdale des particules :

- Les propriétés intrinsèques des particules (taille, densité, charges et chimie de surface).^{2,7}
- La composition de la solution aqueuse (pH, salinité).^{5,8}
- La présence de molécules (organiques ou autres) ou de microorganismes pouvant être entourés de particules.^{9,10}

Cependant, les plastiques se dégradent peu à peu au cours de leur vie aquatique et la composition des solutions en milieu naturel varie selon la localisation et les conditions météorologiques. Il n'y a donc pas de constante, ce qui rend la compréhension du transport des MP très complexe.

L'objectif de ce chapitre est d'identifier s'il y a des critères plus importants que d'autres dans le transport des MP en solution. Plus précisément, nous souhaitons comprendre l'influence de certains paramètres (la nature des microplastiques, leur état de vieillissement et la couche de biomolécules formée par la corona protéique) dans le comportement colloïdal de ces objets.

Pour cela, nous avons caractérisé la stabilité en solution des MP natifs et vieillis de PE et PP entourés d'une corona protéique par analyse de turbidité et par détermination de la quantité de particules dispersées. La qualité de la corona a été observée à l'échelle des particules grâce à des expériences originales de microscopie de fluorescence réalisées sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL. Dans le cadre de cette étude, deux systèmes protéiques ont été comparés : un Extrait Protéique de Levure *Saccharomyces cerevisiae* (EPL) et l'Albumine de Sérum Bovin (BSA).

La BSA est connue pour s'adsorber très rapidement sur les surfaces (voir paragraphe 3.1.2), c'est d'ailleurs ce que nous avons observé en la comparant avec l'EPL sur les isothermes d'adsorption (paragraphe 4.2.2.1, valeurs de K_{ads}). Il s'agit d'une protéine ayant été largement caractérisée et qui est couramment utilisée comme protéine modèle en laboratoire puisqu'elle est accessible dans des quantités importantes. Nous avons souhaité la comparer à l'EPL dans cette étude sur le comportement colloïdal des MP afin d'identifier si les propriétés d'adsorption de la BSA, particulièrement favorables, confèrent une plus grande stabilité aux particules en solution. Par ailleurs, nous avons montré précédemment (paragraphe 3.5) que la passivation protège les protéines en solution, la BSA est donc une protéine robuste, peu sensible aux stress lorsqu'elle est mélangée dans des tubes en plastique.

La compréhension des mécanismes à l'origine de la stabilisation/déstabilisation des MP en solution peut mener à différents types d'applications nécessitant le contrôle du comportement colloïdal des MP. Il peut s'agir de problématiques de dépollution (MP déstabilisés) ou des études de toxicologie *in vivo* (MP stabilisés en solution). Un exemple d'application en toxicologie sur des poissons zèbres sera présenté.

CHAPITRE 5. LE ROLE DE LA CORONA PROTEIQUE SUR LE COMPORTEMENT COLLOIDAL DE MICROPLASTIQUES NATIFS ET VIEILLIS	193
5.1. STABILITE DES DISPERSIONS DE MP	197
5.1.1. EFFET DE LA NATURE DU PLASTIQUE ET DE SON ETAT DE VIEILLISSEMENT.....	197
5.1.1.1. Cinétiques de crémage	197
5.1.1.2. Quantification des particules stabilisées	203
5.1.2. COMPARAISON AVEC L'ALBUMINE DE SERUM BOVIN (BSA)	205
5.2. INSTABILITES DES DISPERSIONS DE MP	207
5.2.1. CAS DES PARTICULES INSTABLES	207
5.2.2. DESTABILISATION DES PARTICULES DISPERSEES – APPLICATION A LA DEPOLLUTION	211
5.3. ROLE DE LA CORONA DANS LA STABILITE COLLOIDALE DES MICROPLASTIQUES ...	213
5.3.1. NATURE DU PLASTIQUE	213
5.3.2. CORONA PROTEIQUE.....	213
5.3.2.1. Répulsion électrostatique	214
5.3.2.2. Encombrement stérique	215
5.3.3. SURFACE DU PLASTIQUE.....	216
5.4. VERS DES ETUDES <i>IN VIVO</i>	217
5.4.1. OBJECTIFS ET METHODOLOGIE	217
5.4.2. PREMIERS RESULTATS.....	218
5.4.2.1. Incubation sous agitation	218
5.4.2.2. Incubation avec remise en suspension des MP crémés	220
5.4.3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	222
5.5. POINTS CLEFS ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE.....	223
5.6. BIBLIOGRAPHIE.....	224

5.1. STABILITE DES DISPERSIONS DE MP

Les microplastiques étudiés ici sont hydrophobes et relativement peu denses (densité du PE : 0,98 et du PP : 0,90). En solution aqueuse ils restent donc à l'interface air/liquide pour limiter leur contact avec les molécules d'eau, ne pouvant pas former de liaisons hydrogènes avec elles. Lorsque des protéines sont ajoutées à la solution et que l'échantillon est homogénéisé doucement, un passage en solution d'une partie des particules est observé (Figure 5.1). Cela s'explique par le caractère amphiphile des protéines qui jouent un rôle de tensioactif en s'adsorbant sur ces particules hydrophobes.¹¹ Nous étudierons en premier lieu les MP dispersés en solution, puis les MP instables, ayant crémé.

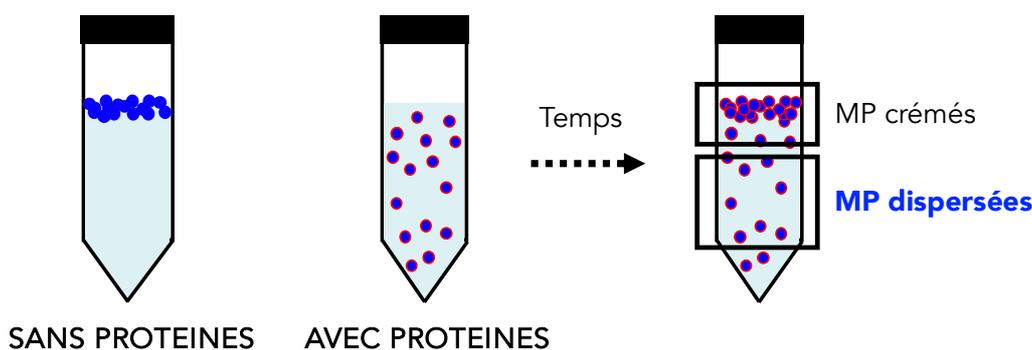


Figure 5.1. Représentation schématique de solutions contenant des MP en présence ou non de protéines et de l'évolution des dispersions formées.

5.1.1. Effet de la nature du plastique et de son état de vieillissement

Les MP de PE et PP à l'état natif et vieilli ont été étudiés afin de comprendre l'impact de la nature du polymère et de son état de vieillissement sur le comportement colloïdal des particules en présence d'une corona protéique.

5.1.1.1. Cinétiques de crémage

La stabilité des dispersions de MP a été caractérisée par des cinétiques de crémage afin de comparer le pouvoir tensioactif des protéines en fonction de la saturation de la couronne protéique, pouvant recouvrir partiellement ou totalement la surface des particules.

Un analyseur de stabilité (Turbiscan LAB, Formulaction) a permis de mener une étude de turbidimétrie par des mesures de transmission et de rétrodiffusion des échantillons sur toute la hauteur de la colonne d'eau impliquée et à intervalles de temps réguliers. Les données en transmission ont été moyennées de 5 à 18 mm de hauteur, correspondant à la fraction sous-nageante. Une transmission faible est caractéristique d'un échantillon opaque, indiquant qu'une

grande quantité de particules est dispersée ; une transmission élevée est caractéristique d'un échantillon translucide, indiquant qu'il n'y a que peu de particules en suspension. Les quatre types de MP ont été étudiés, dans le cas de couches Corona Insaturées (CI, 0,07 g.L⁻¹) et Corona Saturées (CS, 0,5 g.L⁻¹) d'EPL, à l'échelle macroscopique des isothermes (voir paragraphe 4.2.2).

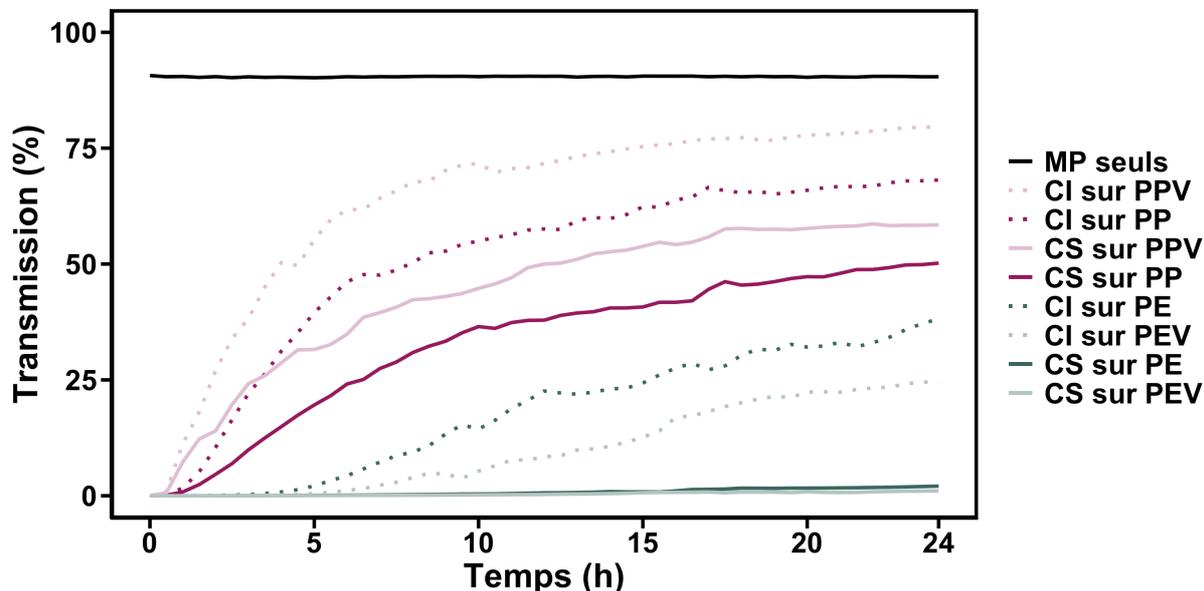


Figure 5.2. Cinétiques de crémage, mesurées par turbidimétrie, des microplastiques de PE, PEV, PP et PPV à 10 g.L⁻¹ en présence ou non d'extrait protéique de levure en tampon phosphate pH7, 100 mM. La transmission de la lumière, moyennée de 5 à 18 mm sur la hauteur de l'échantillon, est représentée en fonction du temps (une mesure toutes les 30 min durant 24 h). Les effets stabilisants des Couches Incomplètes (CI) et Couches Saturées (CS) d'EPL sur les quatre types de MP ont été comparés.

A partir des profils en transmission représentés sur la figure 5.2, trois phases peuvent être identifiées : les phases de latence, de crémage et éventuellement de stabilisation. Les temps caractéristiques ont été déterminés et sont présentés dans le Tableau 5.1. La phase de latence est définie comme la durée pendant laquelle la transmission est stable, avant qu'elle n'augmente fortement, indiquant alors le début du phénomène de crémage. Cette phase de latence correspond également à une diminution de la rétrodiffusion (Figure 5.3), pouvant être associée à un phénomène d'agrégation des particules ou de leur migration (sédimentation ou crémage).^{12,13} En effet, à fraction volumique constante en solution, les objets de tailles plus importantes obtenus par agrégation mèneront à une rétrodiffusion plus faible (mais plus de diffusion vers l'avant). Pour la plupart des échantillons, un pic de rétrodiffusion est observé à la fin de la phase de latence, dans le bas du tube. Cela peut être dû à la présence d'agrégats protéiques ayant sédimenté ou à des petites particules en suspension. Ces particules crèment moins vite et diffusent davantage la lumière vers l'arrière que les particules plus larges (prévu par le modèle de diffusion de Mie).¹⁴ Après la phase de latence et la phase de crémage, si le temps d'analyse est suffisant pour l'évolution du système, l'évolution de la transmission atteindra un plateau, correspondant à la phase de stabilisation.

		Phase de latence	Phase de crémage		Phase de stabilisation	Vitesse crémage (cm.h ⁻¹)	Temps nécessaire au crémage des particules (h)
		Temps (h)	Durée (h)	Pente (%.h ⁻¹)	Pente (%.h ⁻¹)		
PE	EPL CI	4,5	5-24	y = 1,8x	n.a.	0,15	12
	EPL CS	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
PEV	EPL CI	5	5,5-24	y = 1,5x	n.a.		
	EPL CS	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
PP	EPL CI	0,5	1-6,5	y = 8,8x	y = 1,1x	2,0	< 1
	EPL CS	0,5	1-9,5	y = 4,2x	y = 1,1x		
PPV	EPL CI	0,5	1-6,5	y = 10x	y = 0,78x		
	EPL CS	0,5	1-9,5	y = 4,1x	y = 0,92x		

Tableau 5.1. Données quantitatives déterminées à partir des profils de turbidimétrie présentés sur la figure 5.2. Les pentes sont obtenues par régression linéaire des phases de crémage et de stabilisation. (n.a. : non applicable).

Les cases grisées correspondent aux données théoriques calculées à partir de la loi de Stokes en considérant, respectivement pour PE/PEV et PP/PPV, un diamètre de 5 et 10 µm (sphérique) et une densité de 0,97 et 0,90 g.cm⁻³. La densité de l'eau à 20°C est de 1,00 g.cm⁻³ et sa viscosité de 1.10⁻³ Pa.s. Le temps nécessaire au crémage des particules est calculé pour une hauteur de 18 mm (hauteur analysée en turbidimétrie).

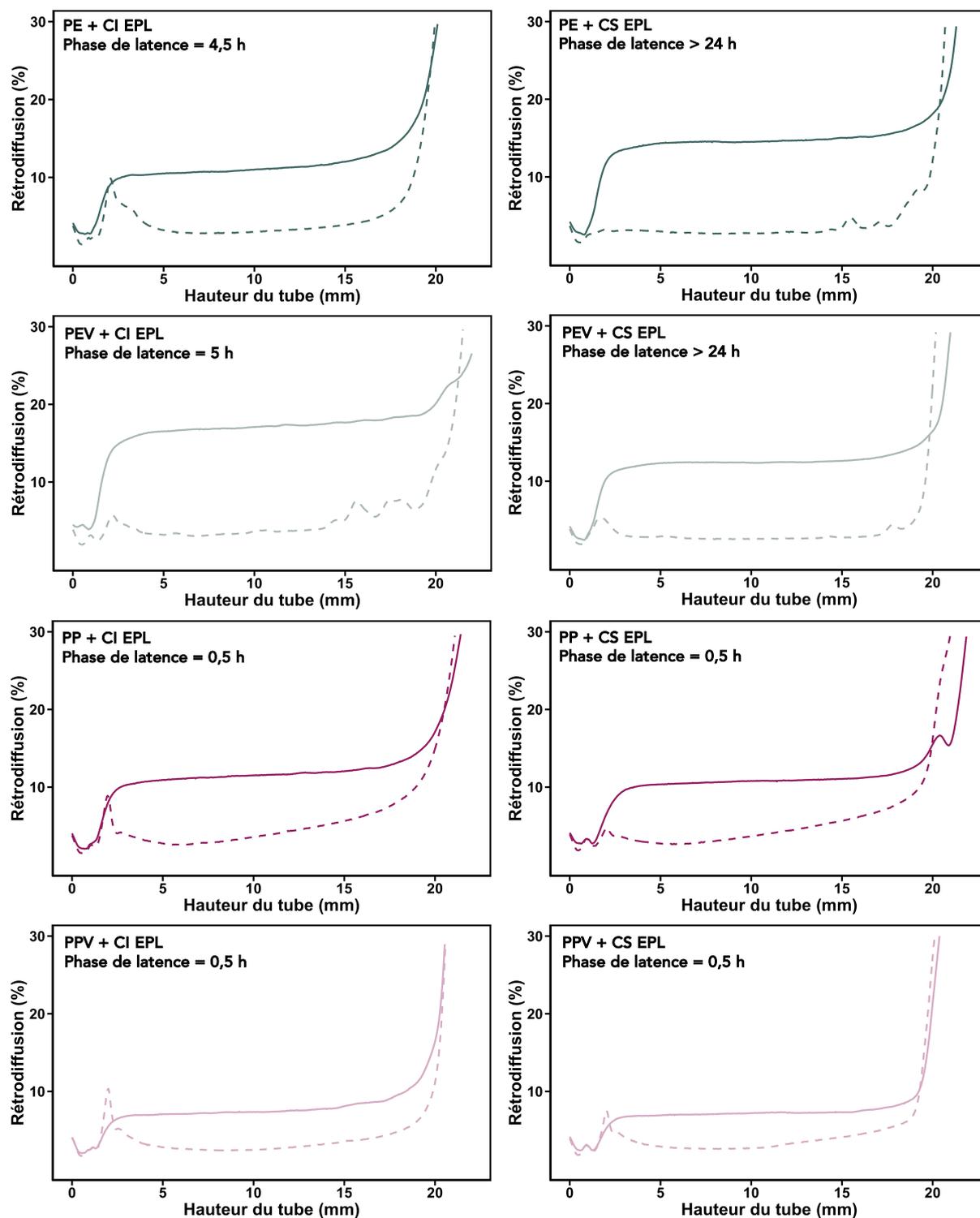


Figure 5.3. Mesure par turbidimétrie de la rétrodiffusion des échantillons contenant, de haut en bas, des MP de PE, PEV, PP ou PPV à 10 g.L⁻¹ avec une Couche Incomplète (CI, à gauche) ou une Couche Saturée (CS, à droite) d'EPL, en fonction de la hauteur du tube. Les lignes continues correspondent à la première mesure de rétrodiffusion (t₀) et les lignes discontinues à la fin de la phase de latence, ou à 24 h si la phase de crémage n'a pas été observée dans l'intervalle de temps étudié.

Pour les MP en l'absence de protéines, la transmission est maximale dès le début de l'analyse (90%), équivalent à la transmission de l'eau pure à travers le contenant. Cela indique l'absence de particules en solution. A l'inverse, en présence d'EPL, quelle que soit la nature des MP ou la quantité de protéines, la transmission est nulle au début de l'analyse indiquant que des MP sont bien dispersés en solution et diffusent très fortement la lumière. L'évolution cinétique sera alors fonction de l'échantillon, avec différents comportements observés (Figure 5.2) :

- Pour une couche protéique saturée d'EPL sur le PE et le PEV, la transmission est proche de zéro sur toute la durée de l'expérience. Cela indique qu'une quantité importante de MP reste dispersés en solution durant au moins 24 h. Une phase de clarification est tout de même observée à partir des données de rétrodiffusion, suggérant le crémage rapide d'objets de tailles importantes. Il peut s'agir d'agrégats ne s'étant pas dissociés lors du mélange ou bien formés en solution.
- Pour une CI de protéines sur du PE et du PEV, la transmission augmente après une phase de latence relativement longue (environ 5 h). Les données de rétrodiffusion montrent le même comportement que pour une couche saturée, suggérant également le crémage de larges objets. Les pentes des équations des phases de crémage (Tableau 5.1) montrent que la déstabilisation est significativement plus douce pour le PE et le PEV ($d \sim 5 \mu\text{m}$, $\rho = 0,97 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$) avec une CI par rapport au PP et au PPV ($d \sim 10 \mu\text{m}$, $\rho = 0,9 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$), même avec une CS de protéines.
- Dans les deux conditions de saturation du PP et du PPV, la phase de latence est très courte et suivie d'une augmentation très rapide de la transmission : la phase de crémage. Le système évolue alors plus de deux fois plus vite dans le cas d'une CS de protéines que dans le cas d'une CI, indiquant clairement le rôle stabilisant des protéines. Une rupture de pente indique ensuite une phase de stabilisation (après 6,5 h d'analyse pour une CI et 9,5 h pour une CS). Au cours de cette phase, il n'y a plus de différence notable selon l'état de saturation de la surface.
- Ces résultats mettent également en avant le fait qu'il n'y a pas de différence marquée entre les MP natifs et vieillis. Cela peut sembler étonnant au vu de leurs différences en termes de chimie de surface (MP vieillis plus hydrophiles) ou de quantité de protéines adsorbées (plus de protéines sur les MP natifs).

La loi de Stokes (Équation A.1, Annexe A.1) permet de calculer la vitesse de migration verticale en connaissant le diamètre des objets (considérés comme sphériques), la masse volumique des particules et de la solution et la viscosité de la solution. Les vitesses théoriques ont été calculées ainsi que les durées nécessaires au crémage des particules (sur une distance de 18 mm, correspondant à la hauteur analysée en turbidimétrie), elles sont indiquées dans les cases grisées du Tableau 5.1. Ces valeurs représentent l'évolution attendue du système en l'absence de protéines. Elles montrent tout d'abord que, par leurs propriétés intrinsèques (taille et densité), les MP de PP et PPV doivent migrer beaucoup plus vite que les MP de PE et PEV, ce que nous observons expérimentalement. Elles montrent également qu'à l'issue de 12 h (pour PE et PEV) ou 1 h (pour PP et PPV), il n'est plus sensé y avoir de particules en solution. Or, expérimentalement,

nous avons observé la présence de particules en suspension sur des temps bien plus longs. Cela indique que la corona protéique permet de ralentir significativement le phénomène de crémage.

Dans le cas de particules ayant des propriétés intrinsèques favorables (petites particules, densité proche de celle du solvant), les particules sont stables sur des temps longs (supérieurs à 24 h). En revanche, pour des particules ayant des propriétés défavorables, la corona reste insuffisante pour un maintien durable des particules dans un état dispersé.

5.1.1.2. Quantification des particules stabilisées

Les données obtenues par turbidimétrie peuvent difficilement être reliées à des concentrations de particules en solution. Pour obtenir des informations quantitatives sur les particules stabilisées après 24 h, notamment pour identifier d'éventuelles différences entre les MP natifs et vieillis, nous avons déterminé leur concentration à l'aide de cellules de comptage (Figure 5.4). Les trois observations suivantes peuvent être faites à partir de ces données.

- Les MP de PE et PEV sont stabilisées en bien plus grande quantité que les MP de PP et PPV. Le facteur dominant ici semble donc lié aux propriétés des particules : taille et densité.
- A diamètre équivalent, la corona protéique joue un rôle majeur. En effet, le nombre de particules stabilisées est nettement supérieur lorsque les protéines forment une couche saturée plutôt qu'incomplète.
- Étonnamment, le vieillissement des MP n'a pas un impact très important sur le comportement colloïdal des particules en solution aqueuse alors que les particules sont moins hydrophobes. Théoriquement, elles devraient être plus stables. Les particules de PE et de PEV sont stabilisées en quantités similaires. Pour le PP, les particules vieilles sont un peu moins stables que les particules natives. D'après les isothermes d'adsorption (Chapitre 4.2.2), il y a moins de protéines adsorbées sur le PPV comparativement au PP. Ces résultats semblent indiquer que la quantité de protéines adsorbées est un critère plus important que le caractère hydrophobe des particules.

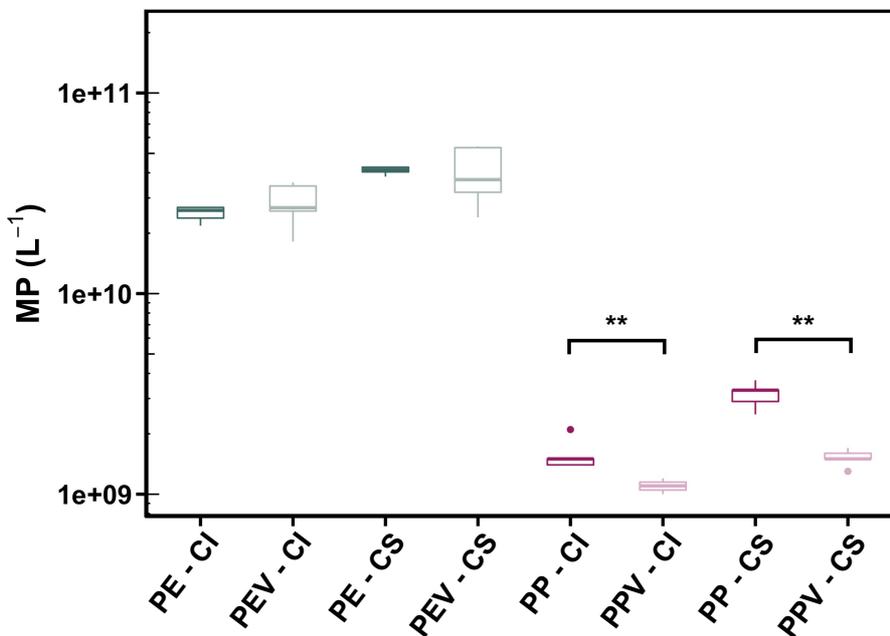


Figure 5.4. Quantité de particules stabilisées par litre de solution après 24 h de crémage pour des couches d'EPL incomplètes (CI) et saturées (CS) sur des MP de PE, PEV, PP et PPV initialement introduits à 10 g.L⁻¹. Détermination en cellules de comptage contenant 0,1 µL, données sur 5 mesures. (** p-value < 0.05, déterminé pour la comparaison des MP natifs et vieillis à saturation en protéines identique).

Nous pouvons estimer la quantité de particules totales dans l'échantillon à partir de la masse introduite, du diamètre et de la densité des particules (en considérant les particules comme sphériques). Il est alors possible d'obtenir une valeur approximative de la concentration massique de plastique en solution et du pourcentage de particules dispersées, par rapport à la quantité initialement introduite. Ces données, présentées dans le tableau 5.2, sont des approximations permettant d'identifier des tendances. D'après ces calculs, dans les cas les plus favorables, environ un quart des particules sont encore dispersées à l'issue de 24 h de crémage. Ces données mettent également en avant le fait que, bien qu'il y ait moins de particules de PP stabilisées, le taux de dispersion est relativement important puisqu'il y a moins de particules introduites initialement (introduction à pourcentage massique équivalent : 10 g.L⁻¹). Il reste tout de même inférieur à celui du PE.

	PE		PEV		PP		PPV	
	CI	CS	CI	CS	CI	CS	CI	CS
Masse de particules stabilisées à 24 h (g.L⁻¹)	1,6	2,6	1,8	2,5	0,7	1,5	0,5	0,7
Particules stabilisées à 24 h (%)	16	26	18	25	7	15	5	7

Tableau 5.2. Masse de MP restant en solution après 24 h au repos (g.L⁻¹) et pourcentages correspondant par rapport à la quantité initialement introduite. Informations déterminées à partir de la Figure 5.4, de la densité des particules (PE/PEV : 0,97 et PP/PPV : 0,90 g.cm⁻³) et de leur diamètre (PE/PEV : 5 µm et PP/PPV : 10 µm).

5.1.2. Comparaison avec l'Albumine de Sérum Bovin (BSA)

Comme évoqué dans l'introduction de ce chapitre, la BSA est connue pour ses propriétés d'adsorption, ce qui l'a conduit à être utilisée comme agent passivant sur des surfaces.¹⁵⁻¹⁷ Cette partie vise à comparer la BSA par rapport au mélange de l'EPL pour identifier si une protéine globulaire se fixant rapidement confère une meilleure stabilité colloïdale aux MP hydrophobes en solution aqueuse. L'étude est réalisée en condition saturante de protéines sur les MP d'après les isothermes d'adsorption (EPL 0,5 g.L⁻¹, voir paragraphe 4.2.2 et BSA 0,1 g.L⁻¹, voir annexe A.3.1).

Les cinétiques de crémage représentées à partir de l'évolution de la transmission dans le temps (Figure 5.5) montrent des comportements assez similaires pour les deux systèmes protéiques. Dans le cas du PP, le système évolue rapidement (crémage) et, à l'inverse, les particules de PE semblent plus stables sur la durée de l'analyse (24 h).

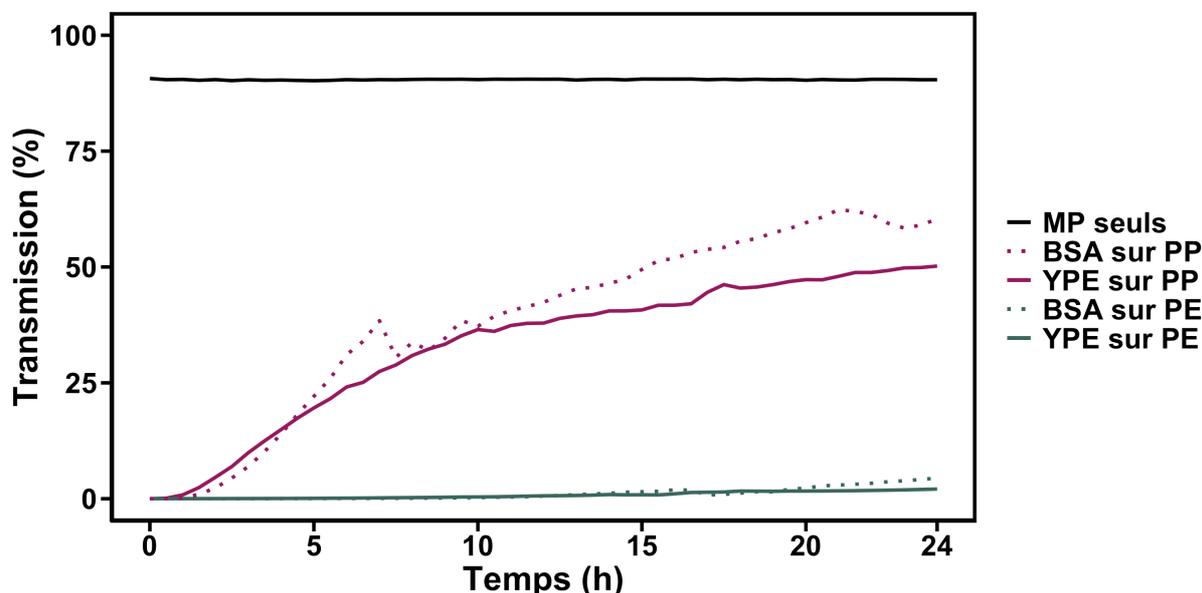


Figure 5.5. Cinétiques de crémage, mesurées par turbidimétrie, des microplastiques de PE et PP en conditions saturantes d'EPL ou de BSA. La transmission de la lumière, moyennée de 5 à 18 mm sur la hauteur de l'échantillon, est représentée en fonction du temps (une mesure toutes les 30 min durant 24 h).

En revanche, en termes de quantité de particules stabilisées à l'issue de 24 h de crémage (figure 5.6), des différences sont à noter entre les deux systèmes protéiques. A la fois pour le PE et pour le PP, la BSA stabilise davantage de MP que l'EPL alors que, d'après les isothermes d'adsorption (paragraphe 4.2.2.1, valeurs de m_{∞}), la BSA est adsorbée en quantité moins importante au plateau de saturation. Nous avons observé précédemment (paragraphe 4.3.3) que la BSA forme une couche plus homogène que l'EPL sur le PE, les répulsions (électrostatiques/stériques) sont alors mieux réparties sur la particule, ce qui peut expliquer une meilleure efficacité tensioactive. Pour le PP, il n'a pas été observé de plus grande homogénéité avec la BSA, les mécanismes de stabilisation sont probablement plus complexes. Puisque le point

isoélectrique de la BSA ($pI_{BSA} = 4,7$)¹⁸ est relativement éloigné du pH de la solution (pH = 7), les molécules sont dans des conditions où elles possèdent une forte densité de charges.¹⁹ La stabilité colloïdale des particules peut être expliquée par de plus fortes répulsions électrostatiques.

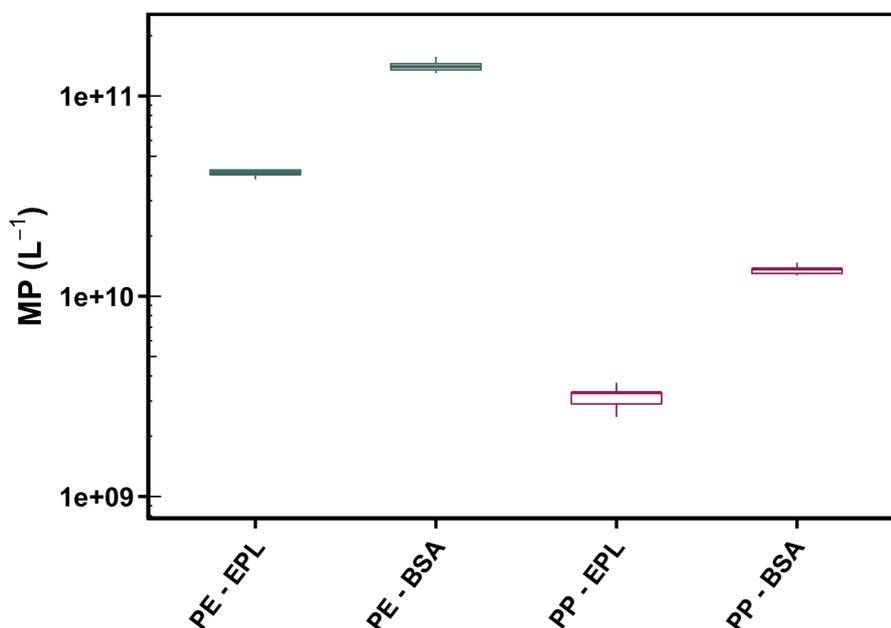


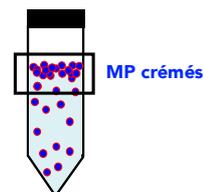
Figure 5.6. Quantité de particules stabilisées par litre de solution après 24 h de crémage pour des couches saturées d'EPL ou de BSA sur des MP de PE et de PP. Déterminées en cellules de comptage contenant 0,1 μ L, données sur 5 mesures.

Dans le cas le plus favorable (BSA sur PE), la concentration atteint $1 \cdot 10^{11}$ particules par litre, ce qui est dans le même ordre de grandeur que les nanoparticules de PE relarguées dans des produits de gommage pour visage²⁰ ($3 \cdot 10^{11} \text{ L}^{-1}$) ou dans des tasses à usage unique⁵ ($5 \cdot 10^{11} \text{ L}^{-1}$) dans leur utilisation normale. Les quantités dans l'environnement sont bien plus faibles : de 10^{-5} à 10^5 L^{-1} , selon le site et la méthode de prélèvement.²¹⁻²³

La stabilisation de MP hydrophobes en solution aqueuse à l'aide d'un système protéique facile d'accès et bien connu laisse envisager de nombreuses applications et la réalisation d'expériences modèles, comme par exemple, des études toxicologiques ou environnementales (transport des particules).

5.2. INSTABILITES DES DISPERSIONS DE MP

5.2.1. Cas des particules instables



Au sein des échantillons étudiés, certaines particules restent stables en solution sur des temps longs alors que d'autres sont déstabilisées très rapidement et crèment. L'objectif de cette partie est d'identifier les paramètres pouvant être à l'origine du crémage ou de la stabilité en suspension des particules au sein d'un même échantillon. Nos observations suggèrent que les MP les plus stables sont toujours des particules isolées car la présence d'agrégats n'a pas été constatée en suspension par microscopie optique (pour plusieurs centaines de particules observées). Dans la crème cependant, des particules isolées et agrégées ont été observées (Figure 5.10).

Dans un premier temps, nous étudierons les propriétés de la corona afin d'identifier si elles sont différentes entre les deux familles de particules isolées (dispersées vs crémées). La condition saturante d'EPL (CS) a été choisie pour mener cette étude et la BSA a été utilisée comme système protéique modèle, à titre comparatif. Après une mise en contact entre l'EPL et les MP (4 h, 3 trs.min⁻¹, 6°C) ainsi qu'un temps de crémage au repos (24 h pour le PE, 3 h pour le PP à cause de différences de stabilité majeures) des particules issues de la fraction supérieure de l'échantillon, la crème, ont été recueillies. De la même façon que dans le chapitre 4, uniquement les résultats des MP natifs sont présentés ici en raison de la fluorescence additionnelle des MP vieillis (voir paragraphe 4.3.2.3).

Les taux de couverture protéique sur les MP de PE et PP dispersés et crémés sont présentés sur la figure 5.7. La méthode de détermination est expliquée en détails dans le paragraphe 4.3.2. Le taux de couverture est significativement différent entre les particules de PE en suspension et crémées avec l'EPL : la médiane est respectivement de 1,25 et 1,0 avec une p-value de $1,7 \cdot 10^{-2}$. Cela correspond à une couche protéique plus épaisse pour les particules en suspension. Au contraire, pour le PE avec la BSA et le PP avec l'EPL, il n'y a pas de différence significative entre les deux populations de particules et le taux de couverture est d'environ 1. Ce paramètre ne semble donc pas être le principal déterminant de la stabilité des particules isolées.

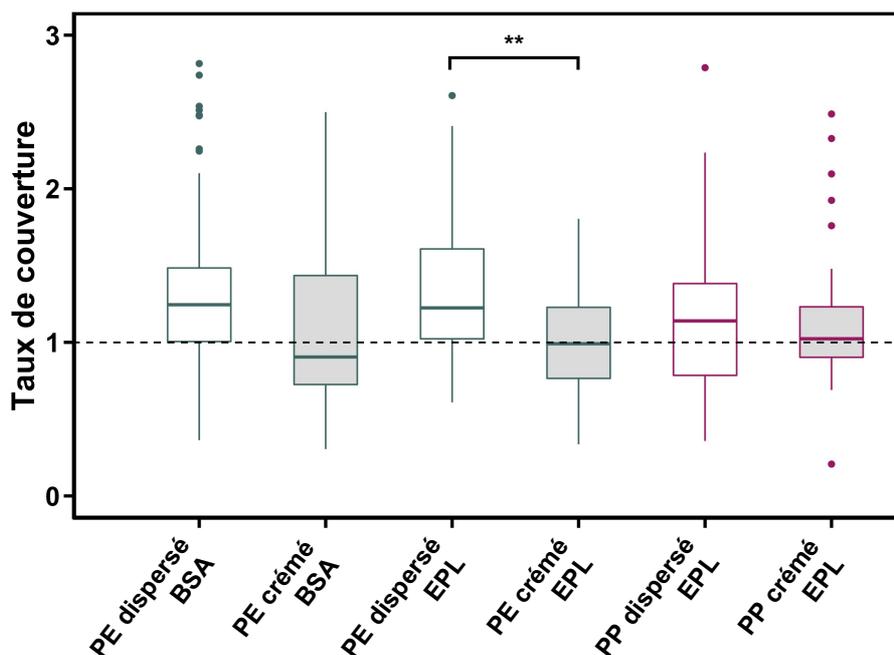


Figure 5.7. Taux de couverture protéique de MP en suspension et dans la crème (gris) pour les microplastiques de PE et PP. Nombre de particules analysées de gauche à droite : 131, 36, 52, 66, 32, 53. (** p-value < 0.05)

Les données relatives à l'hétérogénéité de la couronne protéique ont également été déterminées et sont présentées sur la figure 5.8. Il n'a pas été observé de différence significative entre les particules en suspension et celles prélevées dans la crème. Il ne s'agit donc pas non plus du principal facteur déterminant la stabilité des MP.

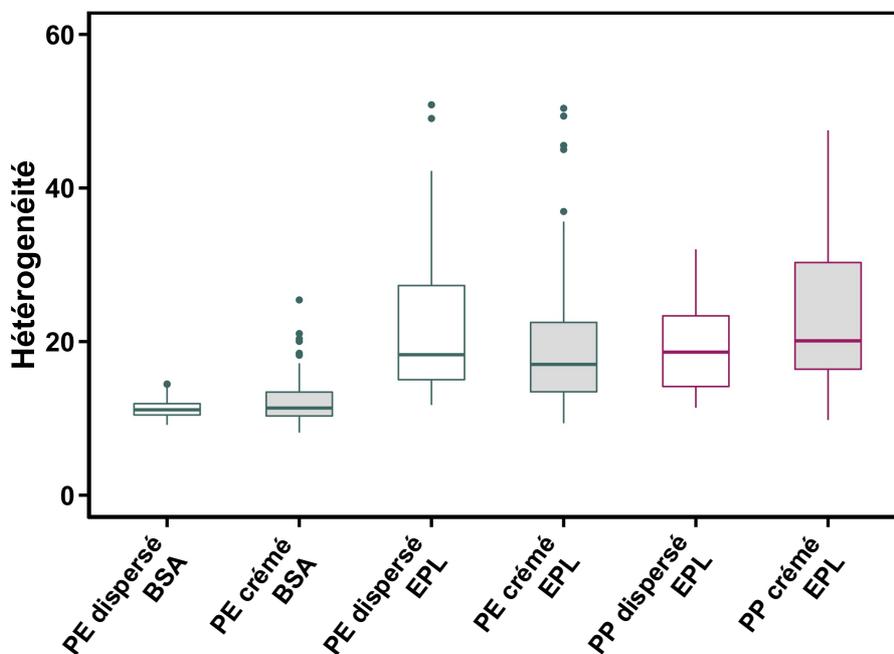


Figure 5.8. Hétérogénéité de la couronne protéique sur des MP en suspension et dans la crème (gris) pour les microplastiques de PE et PP. Nombre de particules analysées de gauche à droite : 133, 36, 53, 67, 32, 55.

Nous avons alors déterminé la taille des MP dans les phases dispersées et crémées à partir des diamètres de Féret (Figure 5.9). Il apparaît que les particules en suspension sont systématiquement plus petites que les particules de la crème, avec des p-value respectives de $1.3 \cdot 10^{-6}$, $4,7 \cdot 10^{-5}$ et $2,0 \cdot 10^{-6}$ pour la BSA sur le PE, l'EPL sur le PE et l'EPL sur le PP. De plus, les MP de PP, qui ont la stabilité la plus faible en solution aqueuse, sont à la fois plus larges et moins denses que le PE. La conclusion que nous pouvons en tirer est que les MP les plus stables sont les plus petits et ceux ayant la densité la plus proche de celle de l'eau. Cela est en accord avec la loi de Stokes.²⁴ Ce sont également les particules qui diffusent le plus (mouvement brownien).

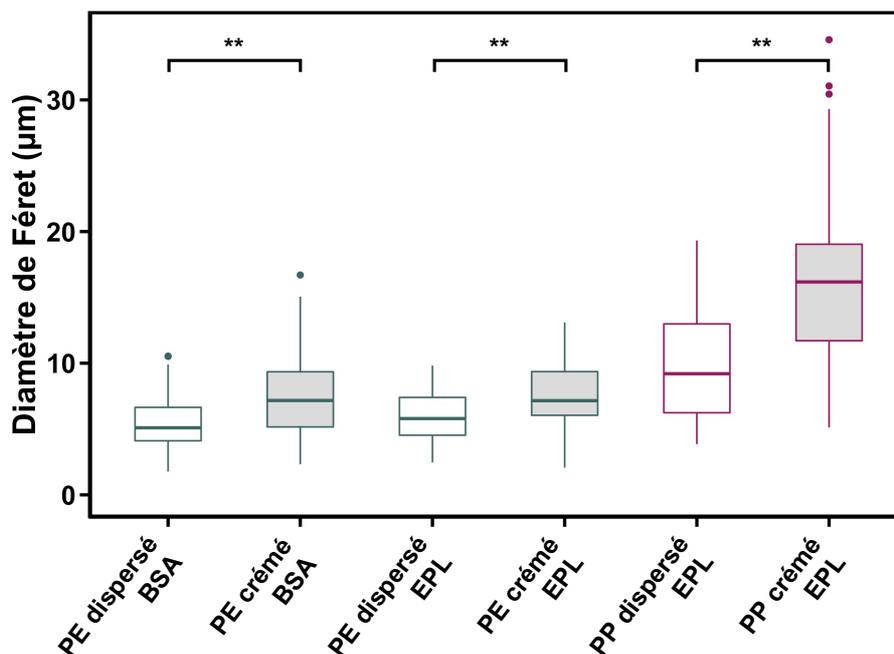


Figure 5.9. Diamètre de Féret des particules en suspension et crémées (grisé) des MP de PE et PP. Nombre de particules analysées de gauche à droite : 133, 36, 53, 67, 32, 55. (** p-value < 0.05)

Ces résultats démontrent que l'adsorption des protéines est nécessaire à la dispersion des MP et à leur stabilisation. Néanmoins, les propriétés intrinsèques des particules, telles que leur taille et leur densité, sont des critères importants pouvant favoriser la destabilisation et leur crémage.

Les observations microscopiques ont révélé, en plus de particules isolées, la présence de trois types d'assemblages dans la crème : des agrégats de MP, des MP pontés par des agrégats protéiques, sans contact direct entre particules et des bulles d'air entourées et stabilisées par des MP (Figure 5.10). Si ces assemblages particuliers sont formés en solution, une augmentation de la taille des objets (agrégation, pontage) ou une diminution de leur densité (bulles d'air) peuvent en résulter et ainsi accélérer les cinétiques de crémage. S'ils sont formés après le crémage, ils seront défavorables à une remise en suspension, stabilisant le système dans son état déphasé.

Ces trois types assemblages incluent des protéines, comme le montrent les images de fluorescence (Figure 5.10) dans la gamme de fluorescence du tryptophane et de la tyrosine. La stabilisation de bulles d'air à proximité de l'interface air/liquide est conditionnée par la présence

d'une couronne protéique sur des MP puisque ces objets n'ont pas été observés en l'absence de protéines ou de MP. Il est en effet connu que les protéines se fixent sur les bulles d'air (pouvant également mener à la formation d'agrégats protéiques).²⁵ De la même manière que pour des émulsions de Pickering, où des gouttes liquides sont stabilisées par des particules dans une seconde phase liquide, ici une bulle de gaz est stabilisée sur des temps longs par des particules de plastique recouvertes d'une couronne protéique.

En environnements aquatiques, l'écume est formée par des vagues introduisant de l'air dans la couche supérieure de l'eau. Les bulles d'air peuvent alors être stabilisées par des biomolécules et potentiellement former le même type d'assemblages. Il est donc attendu que des MP présents dans l'environnement et stabilisés par une corona protéique ou une éco-corona, stabilisent des bulles d'air formées par les vagues. Ces bulles peuvent alors, par aérosolisation, servir de vecteur dans la migration des MP de l'eau vers l'air. Ce mécanisme de transfert peut contribuer en partie à la présence des MP dans l'atmosphère.²⁶

Ces bulles, de diamètres compris entre 50 et 100 μm , sont stabilisées dans en solution sur des durées supérieures à 24 h. Dans le domaine de l'imagerie médicale, des agents de contraste ultrasonore sont constitués de microbulles ayant un diamètre de l'ordre de 10 μm .^{27,28} L'une des limites de cette technique est la stabilité de ces microbulles.²⁹ Les mécanismes de stabilisation de bulles par des protéines associées à des microplastiques mériteraient une étude approfondie pour d'éventuelles applications dans ce domaine.

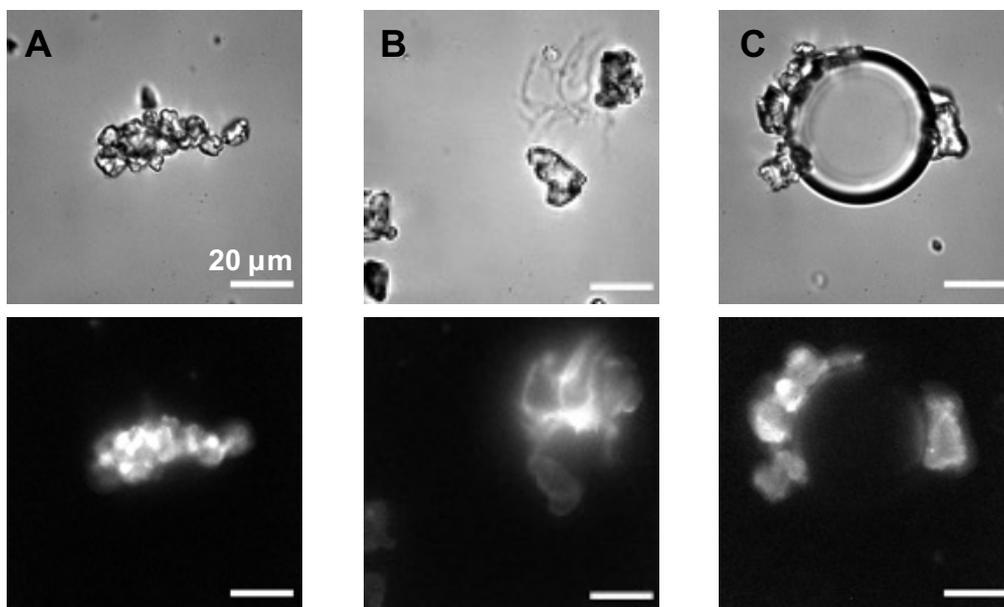


Figure 5.10. Images en champ clair (en haut) et de fluorescence (en bas) des trois types d'assemblages observés suite au crémage de particules de PP en présence d'EPL : agrégats de MP ayant une couronne protéique (A), pontage de MP par des agrégats protéiques (B) et bulles d'air entourées de MP (C). Les images de fluorescence sont obtenues à $\lambda_{\text{excitation}} = 265 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = [329-351] \text{ nm}$.

5.2.2. Déstabilisation des particules dispersées – Application à la dépollution

Le retrait des particules de plastique de l'eau potable est aujourd'hui nécessaire au vu de la quantité de MP détectés et de leur potentiels effets sur la santé.³⁰ La plupart des stratégies actuelles reposent sur des systèmes de filtration et permettent de retirer efficacement les particules de tailles importantes. Il est toutefois plus difficile de retirer les petits microplastiques (inférieurs à 20 μm) tels qu'étudiés ici. En se basant sur la sensibilité du comportement colloïdal des MP lorsqu'ils sont entourés d'une corona protéique, une stratégie pourrait être d'altérer la corona pour accélérer le crémage (pour des MP dont la densité est inférieure à 1) ou la sédimentation (pour des MP dont la densité est supérieure à 1), et ainsi les retirer plus aisément. Cette stratégie est similaire à celles appliquées lors de la vinification : des protéines sont introduites et se fixent sur les tanins qui peuvent alors être retirés par co-précipitation.³¹

Pour essayer cette stratégie avec des particules de PE, nous avons sélectionné deux méthodes connues pour favoriser la déstabilisation des protéines :³²

- La précipitation induite par une forte quantité de sels. Le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a été choisi car ce sel est connu pour induire la précipitation des protéines en écrantant les charges, sans avoir d'effet dénaturant. Deux concentrations ont été étudiées : 1,1 et 5,3 M.
- La dénaturation thermique, menant à l'agrégation des protéines. Pour cela, les échantillons ont été placés à 80°C durant 1 h.

Les MP ont été dispersés en solution (agitation 4 h, 3 trs.min⁻¹, 6°C) en conditions saturantes d'EPL. A l'aide de cellules de comptage, nous avons quantifié les MP restant en suspension à l'issue du traitement déstabilisant, suivi de 24 h de crémage (Figure 5.11). Pour 14% de sulfate d'ammonium (équivalent à 25% de la saturation³³ et à 1,1 M), nous n'avons observé qu'une faible diminution du nombre de particules stabilisées ($4 \cdot 10^{10}$ pour la référence sans traitement déstabilisant et $3 \cdot 10^{10}$ particule.L⁻¹ après l'ajout de sulfate d'ammonium). Avec 70% de sulfate d'ammonium (équivalent à 100% de la saturation et à 5,3 M), les MP sont très fortement déstabilisés. Par rapport à la référence, environ 95% des MP ont crémé à l'issue de 24 h. Un effet similaire a été observé pour le traitement à 80°C durant 1 h.

Les deux traitements ont eu pour effet de déstabiliser très rapidement les dispersions de MP. Pour le traitement thermique, la déstabilisation est probablement causée par la dénaturation des protéines et le pontage entre les particules, favorisant le crémage. Pour le traitement au sel, le fait que 1,1 M de sulfate d'ammonium n'ait quasiment pas d'effets suggère qu'il n'agit pas uniquement en écrantant les charges, mais aussi probablement en augmentant les effets hydrophobes par déshydratation de la surface des particules.³⁴⁻³⁶

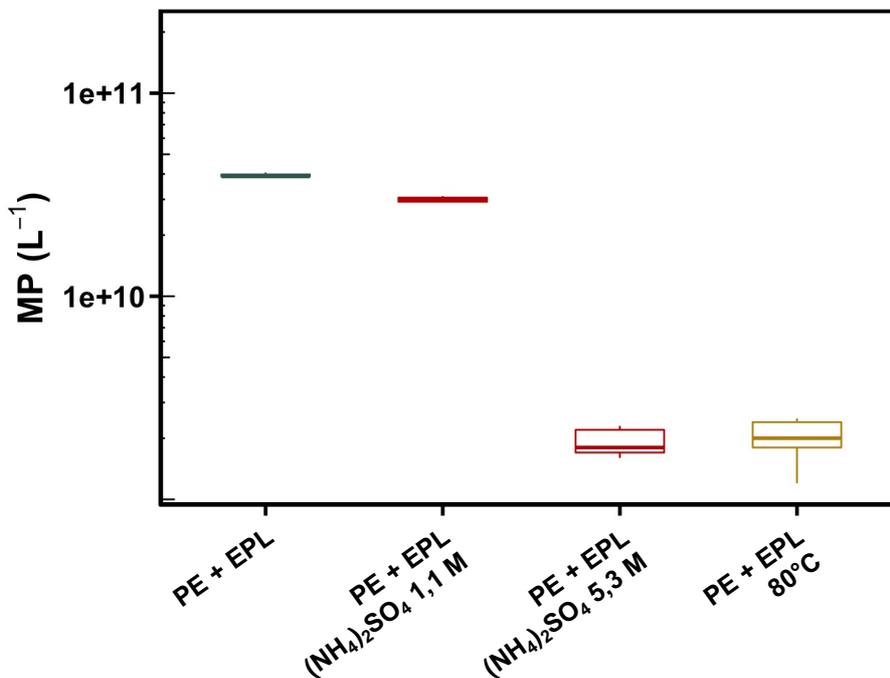


Figure 5.11. Nombre de MP de PE en présence d'EPL en conditions saturantes stabilisés en suspension après un traitement à forte concentration en sulfate d'ammonium ou à haute température, suivi de 24 h de crémage. Données sur 5 mesures.

Ces essais de déstabilisation montrent, qu'en contrôlant la corona protéique, il devient possible d'accélérer le crémage des MP de PE et de les collecter pour les éliminer plus facilement. Dans le cas de nanoplastiques, la quantité de surface peut être plus importante de plusieurs ordres de grandeur, ce qui favorise l'adsorption de protéines et donc la possibilité de contrôler leur stabilité en solution par action directe sur la corona. Cette méthode devrait donc être envisageable également dans le cas de la dépollution des nanoplastiques.

5.3. ROLE DE LA CORONA DANS LA STABILITE COLLOIDALE DES MICROPLASTIQUES

Les expériences présentées dans ce chapitre montrent que différents paramètres sont impliqués dans le devenir des MP en solution aqueuse et qu'ils peuvent agir de manière synergique. D'une manière générale, les MP mis en contact avec une protéine modèle ou avec un extrait protéique composé de plusieurs milliers de protéines différentes, ont montré que l'adsorption des protéines favorise la dispersion et le maintien de particules fortement hydrophobes en milieu aqueux. Cette partie vise à discuter des mécanismes impliqués dans la stabilité colloïdale des MP.

Les MP étudiés ici sont hydrophobes. Dans l'eau, ils se placent à l'interface air/liquide pour minimiser l'énergie libre interfaciale.³⁷ Les tensioactifs constituent une autre voie menant à une minimisation de l'énergie. Ces molécules sont amphiphiles et, en entourant les MP, créent une frontière entre les particules hydrophobes et la solution aqueuse. Les protéines adsorbées agissent en tant que tensioactifs biologiques, rendant la surface des objets plus hydrophile. En effet, la tension de surface d'une solution d'EPL à 25 g.L⁻¹ est de 55 mN.m⁻¹ alors que celle de l'eau est de 72 mN.m⁻¹. Dans le cas étudié ici, la diminution de la tension de surface par les protéines permet aux MP, une fois qu'ils sont partiellement ou totalement couverts de protéines, de pénétrer en solution aqueuse.³⁸

5.3.1. Nature du plastique

D'après nos observations, la taille et la densité des particules restent les propriétés les plus importantes pour prédire le comportement des MP une fois qu'ils sont entrés en solution aqueuse. En effet, comparativement au PE, les particules de PP, qui sont de tailles plus importantes et sont moins denses, sont systématiquement dispersées en moins grand nombre et crèment plus rapidement (Figure 5.2 et 5.4). Cependant, la couronne protéique peut moduler ce comportement prévu par la loi de Stokes dans une certaine mesure. Ainsi, les MP de PP, lorsqu'ils sont couverts par une couche protéique saturée, ont des cinétiques de crémage qui tendent à se rapprocher de celles des MP de PE avec une couche protéique incomplète.

5.3.2. Corona protéique

Nous avons introduit la notion de qualité de la corona. Cela inclut la notion traditionnelle de saturation, déterminée à partir des mesures d'isothermes d'adsorption, mais ne se limite pas à celle-ci. Nous y avons ajouté les notions de taux de couverture et d'homogénéité des protéines, deux paramètres nécessitant une description microscopique de la corona et une analyse individuelle des particules. A partir de cette définition de la qualité, une protéine purifiée telle que la BSA, semble produire, sur le PE, une corona de plus grande qualité que les extraits protéiques complexes.

Dans le contexte de la stabilisation colloïdale, la qualité de la corona permet une répartition uniforme des charges ainsi qu'une densité importante de chaînes polymériques, assurant respectivement des répulsions électrostatiques et stériques. L'importance de la qualité de la couronne protéique s'étend probablement au-delà de ce contexte et peut également être déterminante dans sa propre stabilité et dans la réponse biologique qu'elle déclenche.

5.3.2.1. Répulsion électrostatique

La stabilisation colloïdale est un phénomène souvent abordé via la théorie DLVO.^{39,40} Bien que les MP étudiés soient des polyoléfines non ou très peu chargées, lorsque des protéines sont adsorbées à leur surface, les objets deviennent chargés. Ces charges créent un profil de concentration des ions à proximité qui résulte en une barrière de potentiel, assurant des répulsions électrostatiques, prévenant de l'agrégation des MP.

Des mesures de zétamétrie, indiquées dans le tableau 5.3, ont été réalisées sur les MP de PE et PEV (données sur le PP et le PPV non exploitables, voir paragraphe 2.3.1.2). Elles montrent que l'état de vieillissement et de saturation de la couche protéique sur les MP à l'échelle des isothermes n'ont pas d'effet sur la charge des objets.

	PE	PEV
CI	-11,1 ± 1,3	-10,6 ± 0,6
CS	-11,1 ± 0,8	-11,6 ± 0,6

Tableau 5.3. Mesure de potentiels zêta des microplastiques de PE et PEV recouverts d'une couche incomplète (CI) ou saturée (CS) d'EPL en tampon phosphate 100 mM, pH7.

D'autre part, nous avons observé une légère diminution de la stabilité des MP de PE ayant une CS d'EPL suite à l'ajout de 1,1 M de sulfate d'ammonium (Figure 5.11). Cependant, cet effet est bien trop faible en comparaison aux CCC généralement observées (de quelques dizaines à quelques centaines de mM, en fonction de la valence des ions et des propriétés des particules).^{5,41,42} Ce résultat suggère donc l'existence de mécanismes de stabilisation additionnels, dont les répulsions stériques attendues pour les groupes hydrophiles et hydratés des protéines.

La réversibilité du crémage constitue une autre observation suggérant que la théorie DLVO n'est pas suffisante pour expliquer la stabilité colloïdale des MP ayant une couronne protéique. En effet, dans le cas d'une déstabilisation causée par un manque de répulsions électrostatiques, les particules sont agrégées de manière irréversible. Ici, le crémage est réversible et les particules sont très rapidement redispersées lors d'une homogénéisation douce (Figure 5.12), ce qui suggère également des répulsions stériques hydratées au contact.

La théorie DLVO peut tout de même expliquer le fait que la BSA se révèle être un meilleur stabilisant que l'EPL. En effet, une couronne de BSA présentera une répartition des charges plus

homogène à un pH donné alors qu'une couronne d'EPL, composée de protéines ayant des densités de charges en surface et des points isoélectriques différents, présentera des fluctuations dans ses propriétés électrostatiques.

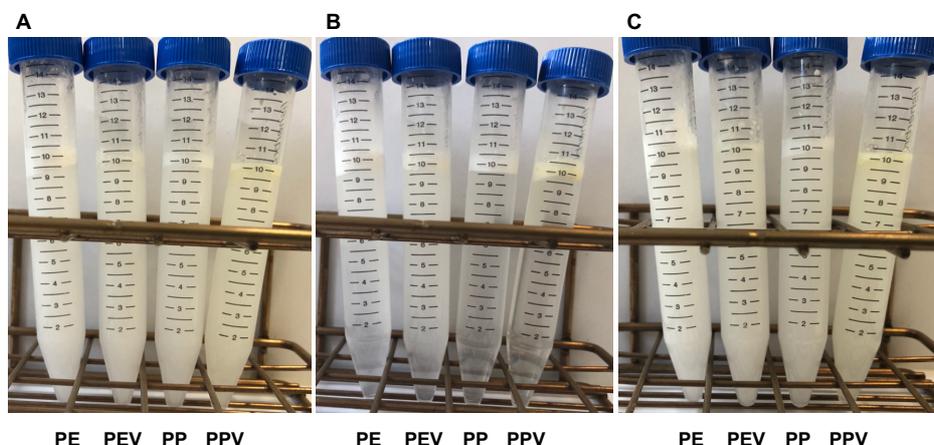


Figure 5.12. Photographie des échantillons des quatre types de MP (PE, PEV, PP, PPV) à 10 g.L^{-1} ayant une couche insaturée d'EPL :
(A) à l'issue de la mise en contact (3 trs.min^{-1} , 6°C , 24 h)
(B) suivie du crémage (6°C , 24 h)
(C) puis d'une réhomogénéisation (3 trs.min^{-1} , 6°C , 60 s)

5.3.2.2. Encombrement stérique

L'encombrement stérique peut être considéré comme un mécanisme de stabilisation additionnel et important. Une publication récente suggère un effet similaire de la corona protéique et des brosses de polymères, assurant une répulsion stérique entre les particules.⁴³ Les protéines sont également des polymères d'acides aminés, pouvant générer une gêne stérique si elles sont adsorbées sur des particules.^{6,44}

La répulsion stérique au contact peut expliquer pourquoi les couches protéiques présentant le taux de couverture le plus important (Figure 5.7), sont associées aux MP stabilisés en plus grande quantité. De plus, par comparaison entre le PP et le PPV, nous pouvons établir le lien entre une quantité moins importante de protéines adsorbées et une stabilité moins importante des particules en solution. L'encombrement stérique sera également moins efficace si la corona n'est pas complète, permettant le pontage entre particules via des zones non recouvertes.⁴⁵

5.3.3. Surface du plastique

L'effet du vieillissement des MP sur leur comportement colloïdal en solution est très faible. Cette observation est particulièrement étonnante et inattendue au vu des différences observées en termes de propriétés de surface (davantage d'atomes d'oxygènes et hydrophobie moins importante pour les MP vieillis, voir paragraphe 4.1.3) et des différences d'affinité avec les protéines (moins de protéines adsorbées en quantité et en diversité, voir paragraphes 4.2.2.2 et 4.4.2). Il semblerait donc que la corona protéique agisse comme une barrière stérique entre la particule et la solution. Les propriétés de surface du microplastique n'ont alors plus d'impact sur son comportement colloïdal une fois la corona formée. Ce résultat est particulièrement intéressant dans la recherche d'une solution de dépollution universelle ou de compréhension des mécanismes d'interactions dans l'environnement.

5.4. VERS DES ETUDES *IN VIVO*

5.4.1. Objectifs et méthodologie

Il a été reporté la présence de MP dans la plupart des écosystèmes mais il est encore difficile de connaître leurs effets potentiels en termes de toxicité, souvent en raison de la difficulté de conception d'expériences modèles.⁴⁶

Du fait de la forte hydrophobie des polyoléfines, les études *in vivo* sont difficiles à mener car la probabilité de rencontre entre les organismes aquatiques et les particules est très faible. Les études portant sur les effets du plastique sur des poissons zèbres sont généralement réalisées avec des particules de polystyrène qui sont fonctionnalisées.^{47,48} La présence de charges de surface permet une dispersion des particules en milieu aqueux. Très peu de données relatent de la toxicité de MP de polyoléfines sur des organismes aquatiques en l'absence de surfactant chimique. Une voie semble être de réaliser les mises en contact sous agitation, cependant la faible quantité de particules dispersables dans ces conditions n'a jusqu'ici pas permis d'observer d'effets.⁴⁹

Dans l'environnement ces particules ne restent pas nues mais sont rapidement recouvertes de biomolécules.^{46,50} Dans ce chapitre, nous avons montré que les protéines permettent le passage en solution des MP et leur stabilité sur des temps longs. La faible quantité nécessaire et le fait qu'il s'agisse de molécules biologiques laisse envisager que cela peut être une méthode pour étudier les effets des MP hydrophobes sur des organismes vivants.

Des expériences ont été menées à partir d'œufs et de larves de poissons zèbres (*Danio Rerio*, « Tupfel long-fin », « wild-type »). Ces expériences ont été réalisées à l'Université de Montréal au cours d'un séjour de deux semaines, en accord avec les directives du « Canadian Council on animal Care » (CCAC), dans le cadre d'un financement du Fonds France-Canada pour la recherche (FFCR).

Les solutions de MP ont été préparées à l'aide de protéines. La BSA a été sélectionnée car elle permet de stabiliser un maximum de particules en suspension. Les quatre types de MP (PE, PEV, PP, PPV à 10 g.L⁻¹) ont été mis en contact avec de la BSA à 0,1 g.L⁻¹ (conditions saturantes pour le PE et le PP) en tampon phosphate 100 mM, pH7 et agités durant 4 h sur roue à 21°C. Un échantillon de référence sans MP, contenant uniquement de la BSA à 0,1 g.L⁻¹ en tampon phosphate, a été traité de la même manière et utilisé comme référence dans le but d'identifier les effets dus à la BSA. Ces mises en contact sont réalisées dans des tubes en PP de 15 mL contenant 10 mL de liquide. Les solutions de MP ont été utilisées diluées d'un facteur 10, en milieu E3 (pH de 7,2, composition : 5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂ et 0,33 mM MgSO₄),⁵¹ milieu favorable au développement des poissons zèbres.

Deux méthodes de mise en contact ont été expérimentées : une incubation sous agitation sur roue et une incubation avec remise en suspension des MP crémés par aspiration et réinjection.

5.4.2. Premiers résultats

5.4.2.1. Incubation sous agitation

Les incubations sous agitation sont réalisées dans des tubes en PP de 15 mL. Cependant, il a été observé qu'au cours de l'agitation, une partie importante des MP se positionnent sur l'interface liquide/solide des tubes neufs et ce, même avec un coating des tubes avec de la BSA (solution de BSA à 0,1 g.L⁻¹ stockée dans les tubes durant 16 h). Il est probable que la dilution et le changement de milieu aient modifié les équilibres, induisant la désorption d'une partie des protéines, défavorisant la stabilité des dispersions. Ce phénomène, observé pour l'ensemble des MP, a été davantage marqué pour le PP et le PPV. Par manque de temps, il n'a pas été possible de résoudre ce problème.

Au total, sept types de conditions sont comparées (Tableau 5.4) avec trois répliquas par condition. 26 œufs ont été introduits dans chaque échantillons 24 h après la fertilisation (HPF, heures post fertilisation). Le volume de solution est de 5 mL et les tubes ont été ouverts deux fois par jour pour maintenir une quantité d'oxygène suffisante à la survie des poissons.

	Contenant et conditions	Solution
Pétri 28°C	Boîte de pétri statique, 28°C	Milieu E3
Pétri 21°C	Boîte de pétri statique, 21°C	Milieu E3
Réf BSA	Tube en PP Agitation 3 trs.min ⁻¹ , 21°C	Solution de BSA de référence diluée par 10 en milieu E3
PE, PEV, PP, PPV	Tube en PP Agitation 3 trs.min ⁻¹ , 21°C	Solutions de MP diluées par 10 en milieu E3

Tableau 5.4. Conditions comparées dans le cas de mises en contact d'œufs de poissons zèbres (heures post fertilisation = 24 h). Les échantillons contiennent 26 œufs et il y a 3 répliquas par condition.

Différentes analyses ont été réalisées dans l'objectif d'identifier l'impact des MP sur les œufs puis sur les larves de poissons zèbres. Le suivi de l'éclosion (Figure 5.13) a montré qu'à 21°C la vitesse d'éclosion est significativement retardée par rapport à 28°C. Ce suivi a également montré que les conditions de mise en contact (agitation à 3 trs.min⁻¹ et résidu de BSA < 0,01 g.L⁻¹) accélèrent l'éclosion (comparaison pétri 21°C et Réf BSA). Enfin, dans ces conditions, il n'y a pas de différence en termes de cinétique d'éclosion entre les échantillons contenant des MP et la référence.

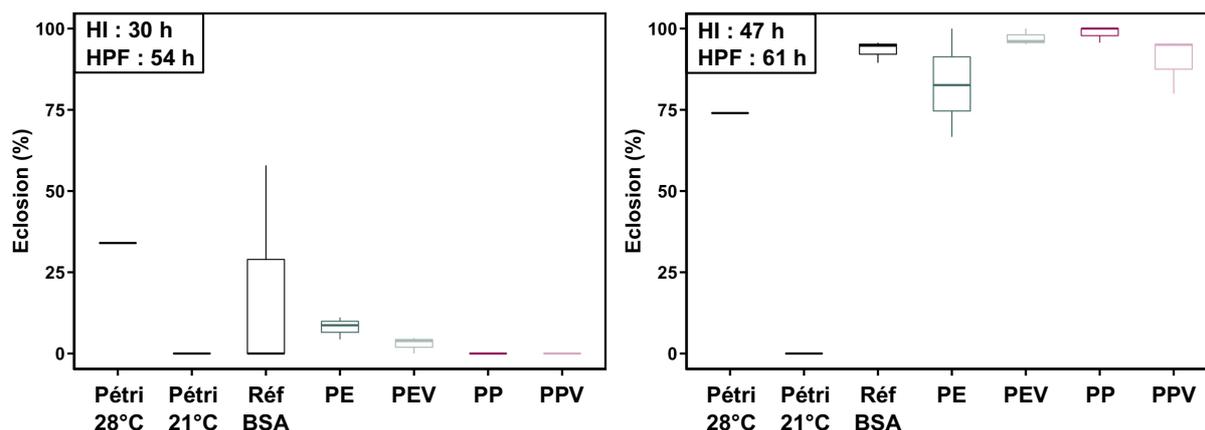


Figure 5.13. Suivi de l’éclosion des larves après 30 h et 47 h d’incubation, représentés en %. Les échantillons sont réalisés en tripliquas. Ils sont en milieu E3 et contiennent 26 œufs. Les références « Pétri » sont statiques. Les échantillons avec MP (environ 1 g.L⁻¹) et la référence BSA sont agités à 21°C à 3 trs.min⁻¹ dans des tubes en PP de 15 mL contenant 5 mL et oxygénés deux fois par jour.

HI = heures d’incubation ; HPF = heures post fertilisation.

Il est également possible de mesurer les larves ayant écloses comme représenté sur la figure 5.14. La largeur du sac Vitellin et la longueur de la larve sont des indicateurs de croissance. Dans notre cas, les différences ne sont pas suffisamment importantes pour admettre un quelconque effet. Il serait intéressant de réaliser ces analyses sur des durées plus importantes pour identifier si cette observation est confirmée dans le temps.

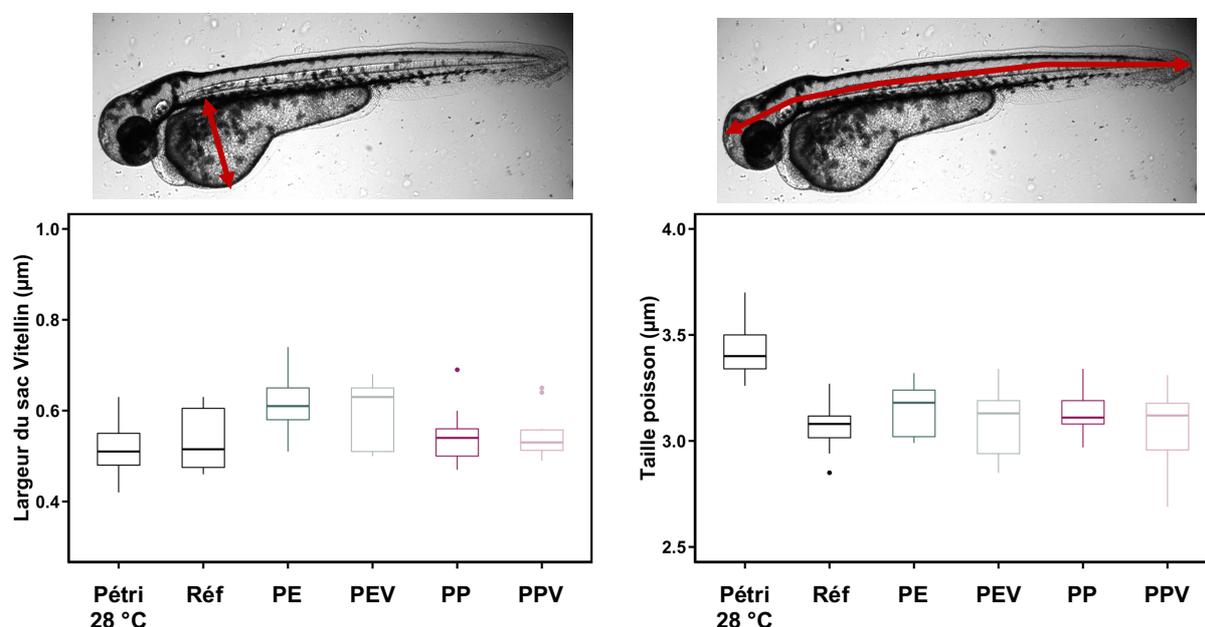


Figure 5.14. Largeur du sac Vitellin et taille des poissons après 47 h d’incubation (heures post fertilisation = 61 h) en milieu E3. Les échantillons avec MP (environ 1 g.L⁻¹) et la référence BSA sont agités à 21°C à 3 trs.min⁻¹ dans des tubes en PP de 15 mL contenant 5 mL et oxygénés deux fois par jour. Nombre de larves mesurées de gauche à droite : 9, 10, 9, 9, 9, 10.

5.4.2.2. Incubation avec remise en suspension des MP crémés

Une deuxième méthode de mise en contact des MP avec des œufs de poissons zèbres a été réalisée (Figure 5.15). Des tubes de culture cellulaire (Nunc™, Thermo Scientific) en polystyrène ont été sélectionnés car ils disposent d'une membrane perméable à l'air. Un volume de 40 mL a été introduit et trois conditions ont été comparées : solutions de BSA, de PP et de PPV diluées par 10 en milieu E3. Pour maintenir les MP en solution, les tubes ont été percés au niveau de l'interface air/liquide (pour aspirer les particules crémées) et à environ 1 cm du fond du flacon (pour réinjecter les MP tout en évitant d'envoyer le flux sur les œufs, statiques au fond) à l'aide de pompes péristaltiques à un débit de 55 mL.min⁻¹. Les flacons ont été placés dans un bain thermostaté à 28°C et 20 œufs ont été introduits par condition (HPF = 6).



Figure 5.15. Photos du système d'incubation avec remise en suspension des MP crémés par aspiration au niveau de l'interface air/liquide et relargage à environ 1 cm du fond du flacon. Le bain thermostaté permet de maintenir la température à 28°C.

A l'issue de quatre jours dans ces conditions, les MP ont crémé malgré le système de pompe (aspiration légèrement trop basse par rapport à l'interface). Par ailleurs, pour les trois conditions, aucun œuf n'a éclos alors que, dans des conditions optimales, 72 h suffisent à observer 100% d'éclosion. Les larves sont vivantes et développées à l'intérieur des œufs et sont de taille importante pour être encore à l'état d'œuf. En cassant le chorion (paroi de l'œuf), elles semblent avoir une activité normale. Il est possible que la BSA se soit adsorbée sur le chorion et ait formé un réseau, créant un film et rendant l'éclosion plus difficile.

Après observation des œufs à l'aide d'un microscope inversé (Figure 5.16), une granularité de surface peut être observée sur les œufs ayant été en contact avec les MP. La morphologie et le fait que cette granularité ne soit pas observée pour l'échantillon de référence indique qu'il s'agit de microplastiques. Aucun des autres essais réalisés n'a montré l'adsorption de MP sur les œufs. La composition protéique du chorion évolue au cours du temps.⁵² Dans cette expérience, il est resté autour des œufs plus longtemps que dans les expériences précédentes. Il est donc possible que les interactions avec les MP soient favorisées par la présence de certaines protéines

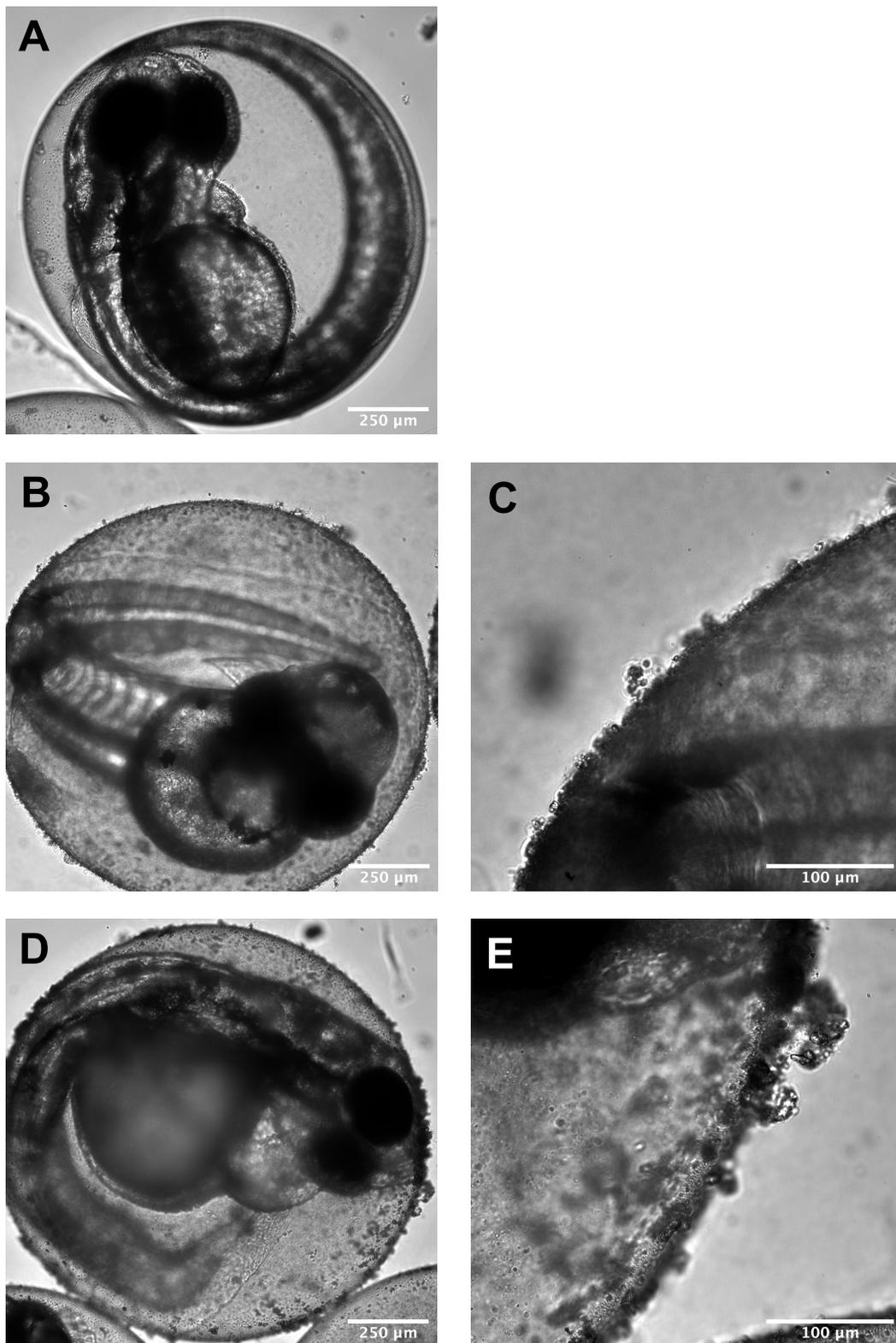


Figure 5.16. Images d'œufs de poissons zèbres réalisées suite à 4 jours d'incubation avec (A) une solution de BSA à 0,01 g.L⁻¹ en milieu E3, (B) et (C) des MP de PP, (D) et (E) des MP de PPV également en milieu E3. Les MP sont recouverts de BSA et introduits à environ 1 g.L⁻¹.

Les images de gauche ont été acquises avec un objectif 10X, la barre d'échelle correspond à 250 µm. Les images de droite ont été acquises avec un objectif 40X, la barre d'échelle correspond à 100 µm.

5.4.3. Conclusions et perspectives

Cette étude préliminaire de toxicologie *in vivo* sur des poissons zèbres a montré qu'il est possible de mettre en contact des MP, stabilisés en solution par une corona protéique, avec des organismes vivants. Nos expériences ont permis d'observer que dans certaines conditions, une quantité importante de MP se fixe sur les œufs des poissons zèbres, pouvant éventuellement impacter leur développement. Il serait intéressant de réaliser une mise en contact avec le système d'aspiration/relargage des MP avec un suivi cinétique et ainsi identifier à partir de quel moment les particules se fixent sur les œufs. Il serait également intéressant d'incuber les poissons avec les MP sur des temps plus longs. Cela n'a pas pu être fait dans le cadre de ce projet car les études sur les poissons à l'état larvaire ne nécessitent pas de protocole d'éthique, au-delà de 5 jours après la fertilisation, des démarches administratives sont nécessaires.

Des ajustements sont toutefois nécessaires pour mieux contrôler la quantité de MP en suspension. En effet, ces expériences ont montré que la stabilité colloïdale des MP est fragile et que l'équilibre peut rapidement être renversé lors du changement de milieu. Le protocole de mise en contact va être optimisé par l'équipe Infection et Immunité des poissons (INRAE) en considérant ces premières données.

5.5. POINTS CLEFS ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE

Dans ce chapitre, nous avons montré que la corona protéique permet l'entrée en solution aqueuse d'une quantité importante de MP de faible densité et fortement hydrophobes. Les protéines se comportent comme des tensioactifs, rendant les surfaces plus hydrophiles et permettant de désagglomérer les particules. Les MP peuvent alors acquérir un comportement colloïdal comme particules isolées. En conditions favorables, la corona protéique auto-assemblée permet aux MP hydrophobes de rester dispersés en solution aqueuse sur de longues périodes (plus de 24 h, avec une diminution de la vitesse de crémage d'un facteur supérieur à 2). Leur stabilité en solution et dans la crème est complexe et dépend de différents paramètres dont les principaux sont les suivants :

1. **Les propriétés des particules** (taille et densité), conformément à la loi de Stokes.
2. **La qualité de la corona** (pour des particules ayant une taille et une densité fixées), un paramètre que nous avons pu définir à l'échelle microscopique par une technique d'imagerie de fluorescence sans marquage sur des particules isolées.
3. Les effets du **vieillissement** sont nettement moins importants qu'attendu et la stabilité n'est pas améliorée par l'hydrophilisation de la surface. Le vieillissement modifie cependant la quantité et l'organisation des protéines sur les particules et a donc un impact indirect sur la stabilité des MP.

En contrôlant ces paramètres, il devient possible de manipuler les MP dans et en dehors des solutions, une stratégie qui pourrait être investiguée pour le retrait des MP polluants. Une expérience préliminaire a permis de montrer qu'une application dans le domaine de la dépollution pourrait être possible. Puisque les propriétés de surface des particules n'interviennent pas de manière prédominante, la recherche d'une solution universelle peut être envisagée.

Le contrôle de ces paramètres permet également d'ouvrir la voie à des études toxicologiques sur les MP hydrophobes. En effet, la mise en suspension est nécessaire pour étudier les effets des particules sur des organismes aquatiques et le recours à l'utilisation de tensioactifs artificiels n'est pas conseillée car ils sont souvent eux-mêmes à l'origine d'une certaine toxicité et ne sont pas présents dans les milieux étudiés.⁵³

5.6. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Isobe, A.; Azuma, T.; Cordova, M. R.; Cózar, A.; Galgani, F.; Hagita, R.; Kanhai, L. D.; Imai, K.; Iwasaki, S.; Kako, S.; Kozlovskii, N.; Lusher, A. L.; Mason, S. A.; Michida, Y.; Mituhasi, T.; Morii, Y.; Mukai, T.; Popova, A.; Shimizu, K.; Tokai, T.; Uchida, K.; Yagi, M.; Zhang, W. A Multilevel Dataset of Microplastic Abundance in the World's Upper Ocean and the Laurentian Great Lakes. *Microplastics Nanoplastics* 2021, 1 (1), 16. <https://doi.org/10.1186/s43591-021-00013-z>.
- (2) 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>.
- (3) Gebauer, J. S.; Malissek, M.; Simon, S.; Knauer, S. K.; Maskos, M.; Stauber, R. H.; Peukert, W.; Treuel, L. Impact of the Nanoparticle-Protein Corona on Colloidal Stability and Protein Structure. *Langmuir* 2012, 28 (25), 9673–9679. <https://doi.org/10.1021/la301104a>.
- (4) 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>.
- (5) Sáringer, S.; Akula, R. A.; Szerlauth, A.; Szilagyi, I. Papain Adsorption on Latex Particles: Charging, Aggregation, and Enzymatic Activity. *J. Phys. Chem. B* 2019, 123 (46), 9984–9991. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b08799>.
- (6) Vasti, C.; Bedoya, D. A.; Rojas, R.; Giacomelli, C. E. Effect of the Protein Corona on the Colloidal Stability and Reactivity of LDH-Based Nanocarriers. *J. Mater. Chem. B* 2016, 4 (11), 2008–2016. <https://doi.org/10.1039/C5TB02698A>.
- (7) Khatmullina, L.; Chubarenko, I. Transport of Marine Microplastic Particles: Why Is It so Difficult to Predict? *Anthr. Coasts* 2019, 2 (1), 293–305. <https://doi.org/10.1139/anc-2018-0024>.
- (8) Grolimund, D.; Elimelech, M.; Borkovec, M. Aggregation and Deposition Kinetics of Mobile Colloidal Particles in Natural Porous Media. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 2001, 191 (1–2), 179–188. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)00773-7](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)00773-7).
- (9) Kooi, M.; Nes, E. H. van; Scheffer, M.; Koelmans, A. A. Ups and Downs in the Ocean: Effects of Biofouling on Vertical Transport of Microplastics. *Environ. Sci. Technol.* 2017, 51 (14), 7963–7971. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04702>.
- (10) Kaiser, D.; Kowalski, N.; Waniek, J. J. Effects of Biofouling on the Sinking Behavior of Microplastics. *Environ. Res. Lett.* 2017, 12 (12), 124003. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa8e8b>.
- (11) Krog, N. Additives in Dairy Foods I Emulsifiers. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*; 2011; pp 61–71.
- (12) Bongono, J. Caractérisation des suspensions par des méthodes optiques. Modélisation par réseaux de neurones, École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne, Alès, 2010.
- (13) Mengual, O. TURBISCAN MA 2000: Multiple Light Scattering Measurement for Concentrated Emulsion and Suspension Instability Analysis. *Talanta* 1999, 50 (2), 445–456. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00129-0).
- (14) Eremin, Y. A. Scattering - Scattering Theory. In *Encyclopedia of Modern Optics*; 2005; pp 326–330.
- (15) Erill, I.; Campoy, S.; Erill, N.; Barbé, J.; Aguiló, J. Biochemical Analysis and Optimization of Inhibition and Adsorption Phenomena in Glass-Silicon PCR-Chips. *Sens. Actuators B Chem.* 2003, 96 (3), 685–692. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(03\)00522-7](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00522-7).
- (16) Convert, L.; Chabot, V.; Zermatten, P.-J.; Hamel, R.; Cloarec, J.-P.; Lecomte, R.; Aimez, V.; Charette, P. G. Passivation of KMPR Microfluidic Channels with Bovine Serum Albumin (BSA) for Improved Hemocompatibility Characterized with Metal-Clad Waveguides. *Sens. Actuators B Chem.* 2012, 173, 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.07.061>.
- (17) Sweryda-Krawiec, B.; Devaraj, H.; Jacob, G.; Hickman, J. J. A New Interpretation of Serum Albumin Surface Passivation. *Langmuir* 2004, 20 (6), 2054–2056. <https://doi.org/10.1021/la034870g>.

- (18) Salis, A.; Bostr, M.; Ninham, B. W.; Monduzzi, M. Measurements and Theoretical Interpretation of Points of Zero Charge/Potential of BSA Protein. *Langmuir* 2011, 27, 11597–11604. <https://doi.org/10.1021/la2024605>.
- (19) Sieberz, J.; Wohlgemuth, K.; Schembecker, G. The Influence of Impurity Proteins on the Precipitation of a Monoclonal Antibody with an Anionic Polyelectrolyte. *Sep. Purif. Technol.* 2015, 146, 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.03.055>.
- (20) Enfrin, M.; Lee, J.; Gibert, Y.; Basheer, F.; Kong, L.; Dumée, L. F. Release of Hazardous Nanoplastic Contaminants Due to Microplastics Fragmentation under Shear Stress Forces. *J. Hazard. Mater.* 2020, 384, 121393. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121393>.
- (21) Li, Y.; Li, W.; Jarvis, P.; Zhou, W.; Zhang, J.; Chen, J.; Tan, Q.; Tian, Y. Occurrence, Removal and Potential Threats Associated with Microplastics in Drinking Water Sources. *J. Environ. Chem. Eng.* 2020, 8 (6), 104527. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104527>.
- (22) Wang, Z.; Lin, T.; Chen, W. Occurrence and Removal of Microplastics in an Advanced Drinking Water Treatment Plant (ADWTP). *Sci. Total Environ.* 2020, 700, 134520. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134520>.
- (23) Koelmans, A. A.; Mohamed Nor, N. H.; Hermesen, E.; Kooi, M.; Mintenig, S. M.; De France, J. Microplastics in Freshwaters and Drinking Water: Critical Review and Assessment of Data Quality. *Water Res.* 2019, 155, 410–422. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.02.054>.
- (24) *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>.
- (25) Xiao, Y.; Konermann, L. Protein Structural Dynamics at the Gas/Water Interface Examined by Hydrogen Exchange Mass Spectrometry: Protein Dynamics at Gas/Water Interfaces. *Protein Sci.* 2015, 24 (8), 1247–1256. <https://doi.org/10.1002/pro.2680>.
- (26) Trainic, M.; Flores, J. M.; Pinkas, I.; Pedrotti, M. L.; Lombard, F.; Bourdin, G.; Gorsky, G.; Boss, E.; Rudich, Y.; Vardi, A.; Koren, I. Airborne Microplastic Particles Detected in the Remote Marine Atmosphere. *Commun. Earth Environ.* 2020, 1 (1), 64. <https://doi.org/10.1038/s43247-020-00061-y>.
- (27) Novell, A. *Imagerie de Contraste Ultrasonore Avec Transducteurs Capacitifs Micro-Usinés*, Université François - Rabelais, 2011.
- (28) Blomley, M. J. K. Science, Medicine, and the Future: Microbubble Contrast Agents: A New Era in Ultrasound. *BMJ* 2001, 322 (7296), 1222–1225. <https://doi.org/10.1136/bmj.322.7296.1222>.
- (29) Lee, H.; Kim, H.; Han, H.; Lee, M.; Lee, S.; Yoo, H.; Chang, J. H.; Kim, H. Microbubbles Used for Contrast Enhanced Ultrasound and Theragnosis: A Review of Principles to Applications. *Biomed. Eng. Lett.* 2017, 7 (2), 59–69. <https://doi.org/10.1007/s13534-017-0016-5>.
- (30) Xu, Z.; Bai, X.; Ye, Z. Removal and Generation of Microplastics in Wastewater Treatment Plants: A Review. *J. Clean. Prod.* 2021, 291, 125982. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.125982>.
- (31) Karamanidou, A.; Kallithraka, S.; Hatzidimitriou, E. Fining of Red Wines: Effects on Their Analytical and Sensory Parameters. *OENO One* 2011, 45 (1), 47. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2011.45.1.1481>.
- (32) Ako, K.; Nicolai, T.; Durand, D.; Brotons, G. Micro-Phase Separation Explains the Abrupt Structural Change of Denatured Globular Protein Gels on Varying the Ionic Strength or the PH. *Soft Matter* 2009, 5 (20), 4033. <https://doi.org/10.1039/b906860k>.
- (33) Duong-Ly, K. C.; Gabelli, S. B. Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2014; Vol. 541, pp 85–94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0>.
- (34) Arakawa, T.; Timasheff, S. N. Mechanism of Protein Salting in and Salting out by Divalent Cation Salts: Balance between Hydration and Salt Binding. *Biochemistry* 1984, 23 (25), 5912–5923. <https://doi.org/10.1021/bi00320a004>.
- (35) Hyde, A. M.; Zultanski, S. L.; Waldman, J. H.; Zhong, Y.-L.; Shevlin, M.; Peng, F. General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series. *Org. Process Res. Dev.* 2017, 21 (9), 1355–1370. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.7b00197>.

- (36) Zangi, R.; Hagen, M.; Berne, B. J. Effect of Ions on the Hydrophobic Interaction between Two Plates. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129 (15), 4678–4686. <https://doi.org/10.1021/ja068305m>.
- (37) Al Harraq, A.; Bharti, B. Microplastics through the Lens of Colloid Science. *ACS Environ. Au* 2022, 2 (1), 3–10. <https://doi.org/10.1021/acsenvironau.1c00016>.
- (38) Liu, X.; Wang, X.; Liang, Y.; Zhou, F. Floating Behavior of Hydrophobic Glass Spheres. *J. Colloid Interface Sci.* 2009, 336 (2), 743–749. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.02.065>.
- (39) Derjaguin, B.; Landau, L. Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged Particles in Solutions of Electrolytes. *Prog. Surf. Sci.* 1993, 43 (1–4), 30–59. [https://doi.org/10.1016/0079-6816\(93\)90013-L](https://doi.org/10.1016/0079-6816(93)90013-L).
- (40) Verwey, E.; Overbeek, T. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids: The Interaction of Sol Particles Having an Electric Double Layer*, Elsevier Publishing Company.; New York, 1948.
- (41) Ince-Coskun, A. E.; Ozdestan-Ocak, O. Effects of Salt Ions and Heating on the Behaviour of Whey Protein Particle Dispersions. *Food Hydrocoll.* 2020, 101, 105433. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105433>.
- (42) Cao, T.; Szilagyi, I.; Oncsik, T.; Borkovec, M.; Trefalt, G. Aggregation of Colloidal Particles in the Presence of Multivalent Co-Ions: The Inverse Schulze–Hardy Rule. *Langmuir* 2015, 31 (24), 6610–6614. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01649>.
- (43) Witzmann, T.; Ramsperger, A. F. R. M.; Wieland, S.; Laforsch, C.; Kress, H.; Fery, A.; Auernhammer, G. K. Repulsive Interactions of Eco-Corona-Covered Microplastic Particles Quantitatively Follow Modeling of Polymer Brushes. *Langmuir* 2022.
- (44) Likos, C. N.; Vaynberg, K. A.; Löwen, H.; Wagner, N. J. Colloidal Stabilization by Adsorbed Gelatin. *Langmuir* 2000, 16 (9), 4100–4108. <https://doi.org/10.1021/la991142d>.
- (45) Gregory, J.; Barany, S. Adsorption and Flocculation by Polymers and Polymer Mixtures. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2011, 169 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.06.004>.
- (46) Paul-Pont, I.; Tallec, K.; Gonzalez-Fernandez, C.; Lambert, C.; Vincent, D.; Mazurais, D.; Zambonino-Infante, J.-L.; Brotons, G.; Lagarde, F.; Fabioux, C.; Soudant, P.; Huvet, A. Constraints and Priorities for Conducting Experimental Exposures of Marine Organisms to Microplastics. *Front. Mar. Sci.* 2018, 5, 252. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00252>.
- (47) van Pomeroy, M.; Brun, N. R.; Peijnenburg, W. J. G. M.; Vijver, M. G. Exploring Uptake and Biodistribution of Polystyrene (Nano)Particles in Zebrafish Embryos at Different Developmental Stages. *Aquat. Toxicol.* 2017, 190, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.017>.
- (48) Bhagat, J.; Zang, L.; Nishimura, N.; Shimada, Y. Zebrafish: An Emerging Model to Study Microplastic and Nanoplastic Toxicity. *Sci. Total Environ.* 2020, 728, 138707. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138707>.
- (49) Beiras, R.; Bellas, J.; Cachot, J.; Cormier, B.; Cousin, X.; Engwall, M.; Gambardella, C.; Garaventa, F.; Keiter, S.; Le Bihanic, F.; López-Ibáñez, S.; Piazza, V.; Rial, D.; Tato, T.; Vidal-Liñán, L. Ingestion and Contact with Polyethylene Microplastics Does Not Cause Acute Toxicity on Marine Zooplankton. *J. Hazard. Mater.* 2018, 360, 452–460. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.101>.
- (50) Abarca-Cabrera, L.; Fraga-García, P.; Berensmeier, S. Bio-Nano Interactions: Binding Proteins, Polysaccharides, Lipids and Nucleic Acids onto Magnetic Nanoparticles. *Biomater. Res.* 2021, 25 (1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40824-021-00212-y>.
- (51) Perrichon, P. Développement de Tests Embryonnaires Prédicatifs d'effets Toxiques Précoces et Tardifs Pour Des Molécules Hydrophobes, Université de La Rochelle, 2014.
- (52) Ali, M. K.; Saber, S. P.; Taite, R.; Emadi, S.; Irving, R. The Protective Layer of Zebrafish Embryo Changes Continuously with Advancing Ages of Embryo Development (AGED). *Journal Toxicol. Pharmacol.* 2017, 1 (2).
- (53) Wang, Y.; Zhang, Y.; Li, X.; Sun, M.; Wei, Z.; Wang, Y.; Gao, A.; Chen, D.; Zhao, X.; Feng, X. Exploring the Effects of Different Types of Surfactants on Zebrafish Embryos and Larvae. *Sci. Rep.* 2015, 5 (1), 10107. <https://doi.org/10.1038/srep10107>.

CHAPITRE 6.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans le chapitre 1 nous avons présenté un état de l'art des interactions entre protéines et plastiques et des questions encore ouvertes dans la littérature ont été identifiées :

- Quelles protéines interagissent avec les plastiques ? Quelle est leur nature ? Quelles sont leurs propriétés physico-chimiques ? Interagissent-elles toutes de la même façon ou y a-t-il différents types d'interactions ?

A l'issue de ces interactions :

- Quels sont les effets des plastiques sur les protéines ? Est-ce que ces surfaces sont particulièrement déstabilisantes ? Les protéines sont-elles dans un état agrégé ? Dans un état adsorbé ? Le cas échéant, comment sont-elles-réparties sur les surfaces ?
- Quels sont les effets des protéines sur le comportement colloïdal de microplastiques ?

Les chapitres 3, 4 et 5 ont apporté des éléments de réponse à ces questions. L'objectif de cette partie est de discuter des principaux résultats obtenus et de faire une comparaison entre les différentes dimensions de matériaux plastiques étudiés : macroplastiques, microplastiques et quelques données récentes obtenues avec des nanoplastiques.

1. Quelles protéines interagissent avec les plastiques et comment interagissent-elles ?

Dans le cas des macroplastiques, relativement peu de protéines contenues dans l'extrait protéique de levure (EPL) ont été identifiées comme impactées par les plastiques, nous avons donc pu analyser les protéines une à une. Pour les microplastiques, le nombre de protéines est plus importante, ce qui nous a conduit à réaliser une analyse statistique globale afin d'identifier les paramètres physico-chimiques liés à l'adsorption.

Macroplastiques. Les protéines contenues dans l'EPL et identifiées comme déplétées de la solution par les expériences de protéomique sont principalement des protéines issues de complexes, mais également des oligomères, des protéines chaperonnes et des protéines partiellement dépliées.

Nous avons proposé un mécanisme de dégradation des protéines dans lequel, au-delà de l'adsorption, l'interface liquide/solide a un effet fragilisant. Les protéines déstabilisées s'adsorbent alors à l'interface air/liquide où des phénomènes de compression et dilatation surviennent durant l'agitation, favorisant l'agrégation. Les cisaillements peuvent faciliter les transferts vers la solution ou casser les films protéiques à l'interface air/liquide. Des solutions à envisager lors de la mise en œuvre des protéines ont été proposées pour limiter les pertes.

Microplastiques. Grâce à une technique d'imagerie de fluorescence aux UV lointains utilisant les rayonnements synchrotron (imagerie SR-DUV, ligne DISCO, synchrotron SOLEIL), nous avons pu analyser la couche de protéines adsorbées sur les MP. Cela nous a permis de constater que, selon la nature des MP et du système protéique, les protéines s'organisent sur la surface de sorte à former une couche plus ou moins homogène. L'homogénéité de la couche protéique à l'échelle des particules n'est pas un paramètre couramment étudié puisque les techniques de caractérisation classiques ne permettent pas d'accéder à cette information. L'imagerie SR-DUV est adaptée à d'autres morphologies de MP, comme des microfibrilles, ou à d'autres polymères, bien qu'il soit difficile de se procurer des MP sans additif pour réaliser des expériences modèles.

Par ailleurs, les données de protéomique nous ont permis d'identifier que les protéines adsorbées, par rapport à la composition globale de l'EPL, sont plus longues, enrichies en hélice α et en arginine. L'arginine n'est généralement pas un acide aminé associé à l'adsorption des protéines sur des surfaces hydrophobes. Ce résultat nouveau rend la comparaison avec la littérature difficile mais permet d'envisager des voies pour aller plus loin dans la compréhension des interactions. Pour cela, des simulations à partir de la structure des protéines ainsi que des expériences complémentaires de caractérisation des MP ont été proposées. Pour l'étude d'autres familles de biomolécules, la technique d'identification doit être adaptée : lipidomique ou glycomique par exemple (basées sur la spectrométrie de masse et l'analyse statistique).

2. Quels sont les effets des plastiques sur les protéines ?

Quelle que soit la dimension des plastiques, il a été observé qu'à leur contact, les protéines se comportent principalement de trois manières différentes. Certaines protéines ne sont pas impactées et restent dans leur état natif en solution, d'autres sont déstabilisées et peuvent s'adsorber aux interfaces ou bien s'agréger. Cependant, selon le fait qu'il s'agisse de macroplastiques ou de microplastiques, les proportions de protéines adsorbées et agrégées ne sont pas les mêmes.

Macroplastiques

Peu d'études considèrent les effets combinés des surfaces plastiques et de l'agitation sur les protéines, c'est pourquoi nous avons essayé d'en comprendre les mécanismes. En l'absence d'agitation, les protéines impactées par les surfaces plastiques sont uniquement dans un état adsorbé et en faible quantité. En revanche, sous agitation, elles finissent majoritairement dans un état agrégé plutôt qu'adsorbé. L'agitation douce de solutions de protéines dans des tubes en plastique mène à la formation d'agrégats de taille micronique non déshydratés et donc avec des protéines non totalement dénaturées.

Microplastiques

Les isothermes d'adsorption ont révélé une grande quantité de protéines impactées par les microplastiques (soustraction faite de l'effet du tube). Cette quantité est nettement supérieure à celle observée dans le cas des macroplastiques. Cela s'explique par le fait que les macroplastiques lisses, comme les parois de tubes, ont une faible surface spécifique par rapport aux particules.

Outre la couche de protéines adsorbées sur les MP, l'imagerie SR-DUV est une technique permettant d'observer des agrégats protéiques en solution. Nous avons observé qu'à faible concentration protéique, les protéines impactées sont majoritairement dans un état adsorbé plutôt qu'agrégué. Lorsque la quantité de protéines est plus importante, le nombre d'agrégats générés augmente. Une comparaison de ces agrégats avec ceux formés au cours du mélange sur roue dans des tubes en polypropylène en l'absence de MP permettrait d'identifier si les mécanismes d'agrégation sont semblables. Pour cela, l'imagerie SR-DUV et l'imagerie Raman pourraient être utilisées.

Pour aller plus loin dans la compréhension des effets des plastiques sur les protéines, la conformation des protéines adsorbées serait à identifier. Les microplastiques ont une taille trop importante pour permettre l'analyse par dichroïsme circulaire en leur présence. Des nanoplastiques permettraient d'accéder à cette information.

3. Quels sont les effets des protéines sur les plastiques ?

Aux différentes dimensions des plastiques, les protéines ont elles aussi des effets sur les microplastiques. Adsorbées à leur surface, elles forment une corona protéique : une biointerface modifiant l'identité des plastiques. Cela a un impact sur les interactions avec le vivant, et dans le cas de particules plastiques, leur transport dans les organismes et dans l'environnement.

Macroplastiques

L'effet passivant de la BSA est bien connu dans la littérature et a mené à de multiples applications.^{1,2} De la même manière, nous avons observé que l'adsorption des protéines de l'EPL aux parois des tubes apporte une protection aux protéines en solution vis-à-vis des stress induits par l'agitation.

Dans le contexte de la dégradation enzymatique pour le recyclage des déchets plastiques, la propension des protéines à s'adsorber sur les surfaces plastiques est un véritable atout. Des essais à une échelle pilote sont actuellement menés pour déployer plus largement cette technologie.³

Microplastiques

Adsorbées sur des MP hydrophobes, les protéines peuvent avoir un effet tensioactif, rendant la surface plus hydrophile. Nous avons observé que les particules peuvent alors entrer en solution et acquérir un comportement colloïdal, dont l'évolution dépend principalement de la capacité des protéines à rester adsorbées et des propriétés physiques des particules (taille et densité). Étonnamment, l'état d'oxydation du plastique, et donc son évolution dans le temps, n'ont que peu d'impact sur le comportement des MP une fois des protéines sont adsorbées. La biointerface créée par la corona modifie l'identité des particules en masquant leur état de surface. En revanche, la composition de la corona est différente selon l'état de vieillissement des plastiques.

A partir de la compréhension des mécanismes intervenant dans la stabilité des MP en présence de protéines, nous avons montré qu'il est possible de réaliser des études toxicologiques *in vivo* en environnement aquatique. Ces études étaient jusqu'à présent très compliquées à mener à cause du caractère hydrophobe des microplastiques de polyoléfines natifs. Avec un système favorable (BSA et petites particules de polyéthylène ayant une densité proche de celle du solvant), il est possible de stabiliser en solution jusqu'à $1 \cdot 10^{11}$ particules par litre pour $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de protéines. En considérant qu'elles soient sphériques, cela correspond à environ 60% des particules introduites, c'est-à-dire, à 6 g.L^{-1} de microplastiques en solution. Pour disperser des microplastiques de polyéthylène et polypropylène, des tensioactifs sont généralement utilisés, dans des concentrations parfois plus élevées.⁴ Cependant, des tensioactifs ont été identifiés comme toxiques dans certains cas.⁵ Les protéines apparaissent donc comme une solution pour la dispersion des MP dans le cadre d'études toxicologiques. Un transfert de connaissances est en

cours dans le but d'optimiser le protocole et d'identifier si les MP agissent sur le développement des poissons (INRAE, équipe Infection et immunité des poissons).

Nous avons également souhaité comparer les effets d'une protéine purifiée issue de l'EPL par rapport au mélange complexe de plus de six mille protéines. La Phosphoglucose Isomérase (PGI), contenue dans l'EPL, a été identifiée comme adsorbée aux MP de PE et PP lors d'expériences préliminaires de protéomique (résultat non confirmé par la suite des analyses). Cette protéine, disponible commercialement et dans des quantités relativement importantes, a été comparée à l'extrait total. Dans un souci économique, le protocole expérimental a été modifié pour réduire le volume des échantillons (1,1 mL dans des tubes en polypropylène de 2 mL). L'agitation a duré 24 h car les cinétiques d'adsorption se sont révélées plus longues dans cette géométrie de tube (observations réalisées avec l'EPL). Ces résultats ont été obtenus par Yassine Mahieddine dans le cadre d'un stage d'IUT.

La figure 6.1 présente la quantité de particules stabilisées après un contact avec la PGI ou l'EPL suivi de 24 h de crémage. La PGI ne fait pas partie des protéines les plus affines pour les MP et a un pI proche de 7 donc du pH de la solution. Ces conditions ne sont pas favorables et pourtant, elle s'adsorbe sur le PE et le PP lorsqu'il n'y a pas de compétition et possède un pouvoir de stabilisation proche de celui de l'EPL.

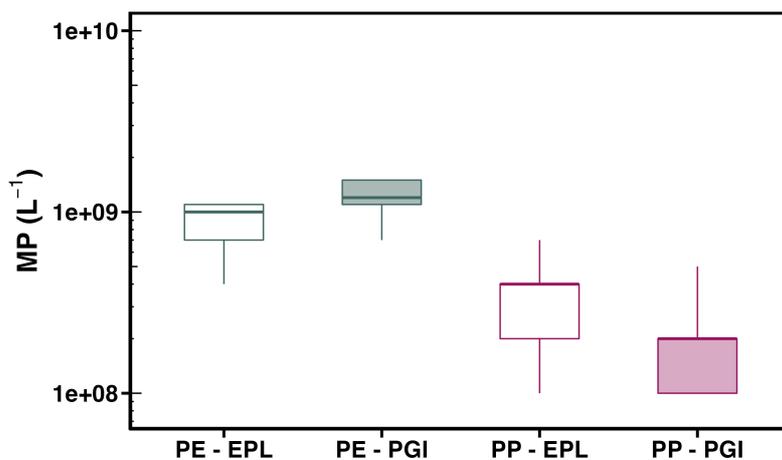


Figure 6.1. Quantité de MP de PE ou PP (introduits à 10 g.L^{-1}) stabilisés par litre de solution après agitation (24 h, 3 trs.min^{-1}) puis 24 h de crémage en présence d'EPL ou de PGI à $0,025 \text{ g.L}^{-1}$ dans une solution de tampon phosphate 100 mM, $pH7$.

Des tendances peuvent être observées sur les quantités de particules stabilisées après 24 h au repos : (i) la PGI est légèrement plus efficace que l'EPL sur le PE, (ii) la PGI est légèrement moins efficace que l'EPL sur le PP.

Cela suggère qu'il puisse exister des protéines sélectives, se fixant spécifiquement sur certains types de polymères. Si de telles protéines sont identifiées, il pourrait être envisagé de les utiliser comme biosenseurs pour reconnaître des matériaux plastiques dans une problématique de tri des déchets plastiques.

Perspectives

1. Autres tailles de plastiques

En comparaison avec les microplastiques, les nanoplastiques donnent accès à d'autres techniques, apportant des informations complémentaires à la compréhension des interactions protéines/plastiques. Par exemple, des mesures de potentiel zêta permettent de connaître l'effet des protéines sur la charge des particules. Des expériences de SAXS ou de SANS peuvent également être réalisées afin de déterminer l'épaisseur de la couronne de protéines ou leur état d'agrégation en fonction de différents paramètres (nature et concentration des protéines, présence de sels, taille/morphologie des particules, etc.)

Dans le cadre d'un partenariat avec le Laboratoire de Catalyse, Polymérisation, Procédés et Matériaux (CP2M, Université Claude Bernard, Lyon 1), des nanoparticules de polyéthylène (PE) nous ont été données. La synthèse des particules nécessite l'introduction de tensioactifs et d'un amorceur de polymérisation. Dans le cas des particules étudiées, il s'agit de dodécyl sulfate de sodium (SDS) et de persulfate d'ammonium (APS). Une fois les particules obtenues, du SDS est encore en solution, pouvant modifier le comportement des protéines. Une dialyse a été effectuée pour retirer un maximum de SDS (voir Chapitre 2.3.2). L'APS en revanche ne peut pas être retiré puisqu'il est lié de manière covalente. Les distributions en tailles ont été déterminées par le laboratoire partenaire et sont discutées dans la thèse de T. Perrault.⁶ Une majorité des particules a un diamètre de 20 nm et une deuxième population, nettement moins importante, a un diamètre de 250 nm. Pour les calculs, nous avons considéré uniquement la population de petites particules.

Un isotherme d'adsorption (Figure 6.2) a été réalisé à partir de l'EPL et de ces nanoparticules de PE (NPE). Les particules ont été introduites en quantité de surface similaire à celle des microplastiques de polyéthylène (0,25 m²).

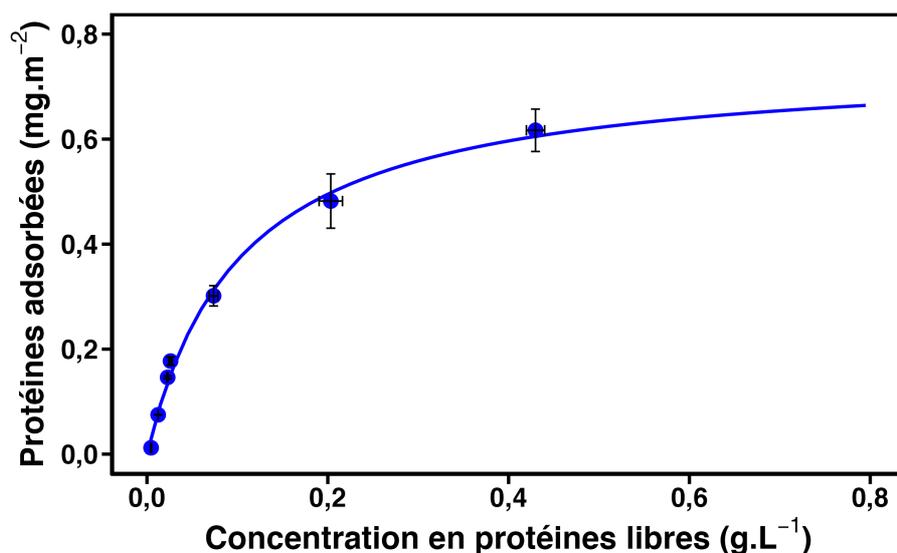


Figure 6.2. Isotherme d'adsorption de l'EPL en tampon phosphate 100 mM, pH7 sur des nanoparticules de PE. La courbe représente un ajustement avec un modèle de Langmuir.

Polyéthylène	m_{∞}		K_{ads}	
	Valeur estimée (mg.m ⁻²)	Qualité de l'ajustement	Valeur estimée (L.g ⁻¹)	Qualité de l'ajustement
Nano	0,75 ± 0,03	***	9,7 ± 1,1	***
Micro	4,8 ± 0,6	***	8,5 ± 3,0	*

Tableau 6.1. Quantités maximales d'EPL adsorbées (m_{∞}) et constantes d'adsorption (K_{ads}) déterminées à partir des isothermes d'adsorption ajustés avec un modèle de Langmuir (Figure 6.2 pour les nanoplastiques et Figure 4.16 pour les microplastiques). La qualité de l'ajustement est déterminée à partir des p-values.

Par comparaison avec l'isotherme d'adsorption obtenu pour les MP de polyéthylène, la quantité de protéines adsorbées est moins importante (m_{∞} environ 6 fois plus faible pour les nanoplastiques). En revanche, la constante d'affinité K_{ads} est dans le même ordre de grandeur (Tableau 6.1). Différentes hypothèses peuvent permettre d'expliquer ces observations :

- Il y a moins de protéines affines pour ces nanoplastiques que pour les microplastiques étudiés.
- La géométrie des particules n'est pas favorable à l'adsorption des protéines.
- L'estimation de la taille ou de la quantité de particules est incorrecte (à cause de leur agrégation ou de leur perte suite à la dialyse).
- L'adsorption des protéines est impactée par la présence des tensioactifs.

Différentes techniques permettraient d'obtenir des informations complémentaires sur les effets de ces nanoplastiques sur l'EPL. Par des expériences de protéomique nous pourrions identifier la nature des protéines adsorbées. Des expériences de SAXS ont récemment été réalisées sur la ligne SWING au synchrotron SOLEIL et sont en cours de traitement pour connaître l'épaisseur de la corona en fonction de la concentration en protéines. Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour l'isotherme d'adsorption (Figure 6.2).

Des informations peuvent être obtenues à partir des données tracées en intensité absolue (cm^{-1}) et simplement corrigées par la contribution du tampon. Sur la Figure 6.3, la courbe bleue correspond au signal des nanoparticules de polyéthylène (NPE) seules à une fraction massique de $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ dans le tampon. Elle présente un minima de l'oscillation de l'intensité vers $0,014 \text{ \AA}^{-1}$, lié au diamètre moyen des NPE. La courbe verte correspond au deuxième point de l'isotherme d'adsorption donc à une concentration initiale en EPL très faible ($0,02 \text{ g.L}^{-1}$), en contact avec la même concentration de NPE. A cette faible concentration, le signal SAXS des protéines seules dans le tampon est trop faible pour être mesuré et la courbe est très proche de celle du tampon pur (non représenté car les courbes sont soustraites au signal du solvant). La courbe verte représente donc majoritairement la contribution des NPE entourées de protéines. La principale différence entre la courbe bleue et la courbe verte apparaît sous la forme d'une pente plus abrupte aux petits q , dans le domaine de Guinier des NPE sans protéine. Cela indique un phénomène d'agrégation des particules qui est donc causé par l'introduction des protéines à faible concentration.

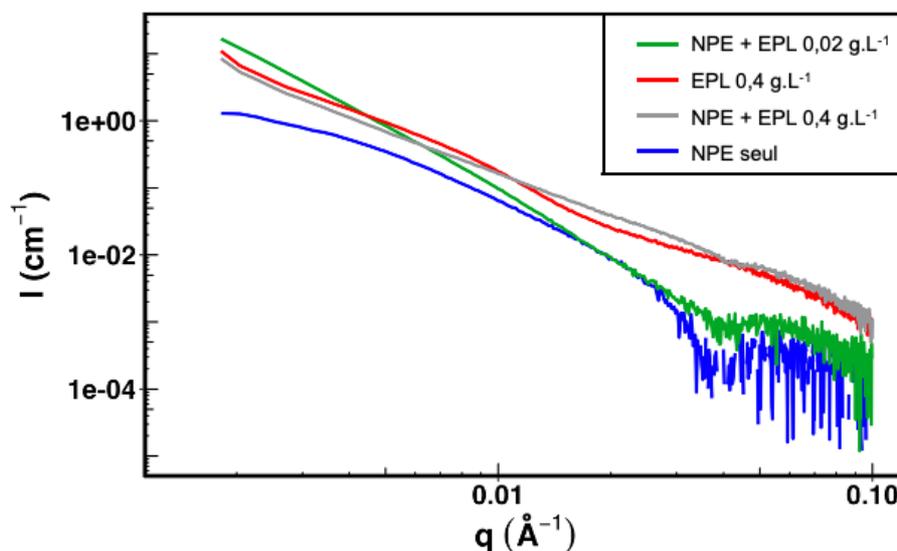


Figure 6.3. Courbes de SAXS de nanoparticules de polyéthylène (NPE, surface de particules : $0,25 \text{ m}^2$) seules (bleu), avec extrait protéique de levure (EPL) introduit à $0,02 \text{ g.L}^{-1}$ (vert), $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ (gris) et d'EPL seul à $0,4 \text{ g.L}^{-1}$. Les échantillons sont préparés en tampon phosphate 100 mM , $\text{pH}7$.

La courbe grise correspond à un point pris au début du plateau de l'isotherme (concentration initiale en EPL : 0,4 g.L⁻¹) et la courbe rouge correspond au signal de l'EPL à la même concentration en l'absence de NPE. Ces courbes sont relativement proches et dominées par la contribution des protéines. L'oscillation due aux NPE est cependant toujours visible sur la courbe grise ce qui montre, comme précédemment, que les agrégats de NPE formés conservent aux grands q un signal permettant d'identifier la sphéricité des NPE qui les composent. Les agrégats de NPE sont donc formés par des pontages de protéines entre NPE.

L'analyse de la charge des particules en fonction de la concentration en protéines introduite (Figure 6.4) montre qu'initialement les nanoplastiques ont un potentiel zêta d'environ -30 mV. Les charges de surface peuvent donc être considérées comme suffisantes pour assurer une répulsion maintenant les particules à distance.⁷ Elles peuvent être dues à l'amorceur de polymérisation (APS, (NH₄)₂S₂O₈) ou au SDS encore présent en surface des particules. Lors de l'ajout d'EPL, le potentiel zêta augmente pour atteindre un plateau à environ -7 mV. Cela traduit un écrantage des charges par les protéines adsorbées sur les NP. Les charges apparentes deviennent alors insuffisantes pour assurer la répulsion électrostatique, cela explique que les particules s'agrègent.

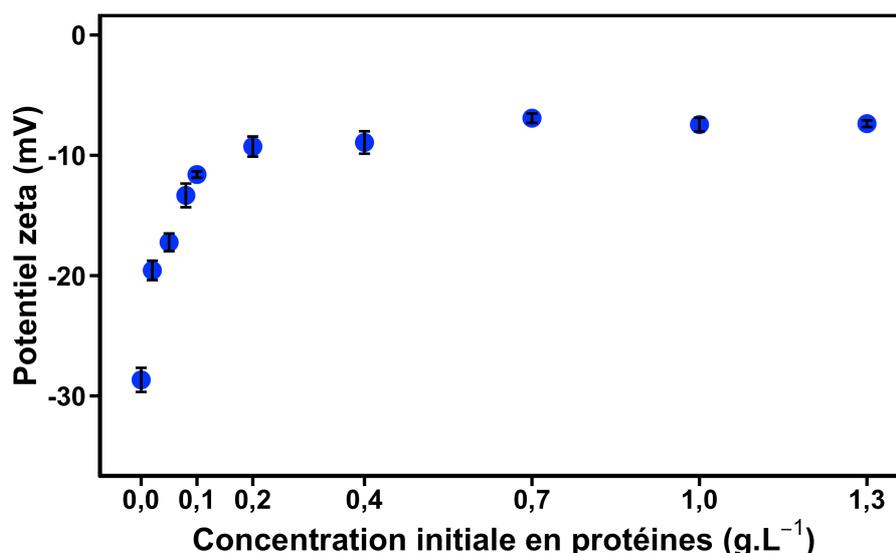


Figure 6.4. Suivi du potentiel zêta des nanoplastiques de polyéthylène en fonction de la concentration en EPL.

Les nanoparticules de polyéthylène nous ont permis d'explorer une autre dimension de matériaux plastiques et ainsi d'accéder à des informations différentes. Cependant, pour aller plus loin dans ces études sur les nanoplastiques, il serait nécessaire d'étudier des particules synthétisées sans tensioactif. Pour des raisons techniques, cela n'a pas encore pu être réalisé. Une voie pourrait être le cryobroyage mais elle ne permet pour l'instant que la production de microplastiques avec des morphologies hétérogènes.⁸

2. Autres formes/nature de plastiques

Dans l'environnement, les microplastiques sont présents sous forme de particules mais également sous forme de microfibrilles.⁹ Elles sont le plus souvent constituées de polyester ou polyamide car sont issues de la dégradation de textiles.¹⁰ Une méthodologie a été développée et de premiers résultats ont été obtenus avec des fibres de polyéthylène (ayant un diamètre moyen de 40 μm) pour pouvoir comparer les résultats avec ceux des MP de PE.

L'imagerie SR-DUV de ces objets peut être réalisée sous flux dans une chambre microfluidique. Un système, mis au point par Karol Rakotozandry (figure 6.5), a été utilisé dans ce but : des fibres de PE sont tendues dans une chambre d'un volume de 100 μL . La présence des protéines est identifiée par leur fluorescence intrinsèque ($\lambda_{\text{excitation}} = 265 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = [329 - 351 \text{ nm}]$). Le débit de 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ a été choisi de sorte à être dans un régime laminaire (simulations réalisées sur COMSOL Multiphysics).

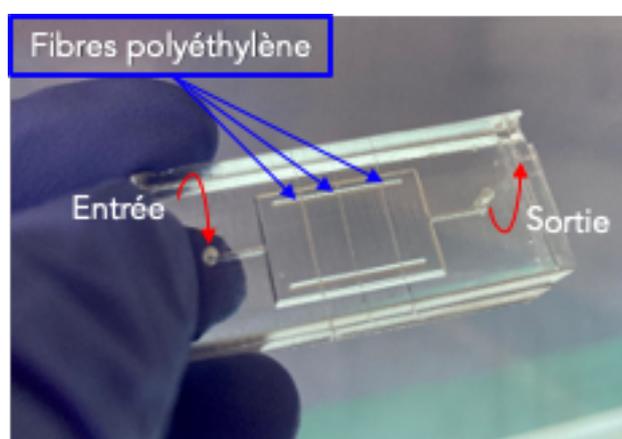


Figure 6.5. Chambre microfluidique utilisée pour réaliser un suivi dynamique de l'adsorption et de la désorption des protéines. Des fibres de PE sont tendues perpendiculairement au flux. Système développé par K. Rakotozandry.

De premiers essais ont été réalisés dans des gammes de concentrations similaires à celles des expositions avec les microplastiques (inférieures à 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Sur plusieurs heures d'analyse, l'adsorption de l'EPL n'a pas été observée. Les cinétiques d'adsorption dans ce système sont considérablement plus longues que pour les MP dans des tubes agités sur roue.

Des protéines ont tout de même été identifiées comme adsorbées sur les fibres à l'issue de 60 min de flux d'une solution d'EPL à 23 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Des images de fluorescence ont été acquises avant et après un flux de SDS à 0,1% (30 min). La figure 6.6. présente ces images sur deux zones : l'une étant initialement couverte de protéines non agrégées et l'autre ayant plusieurs agrégats fixés (A et C respectivement, courbes bleues). Dans ces deux situations différentes, le SDS a permis de désorber les protéines (B et D, courbes vertes), la fluorescence résultante étant due au signal de la fibre.

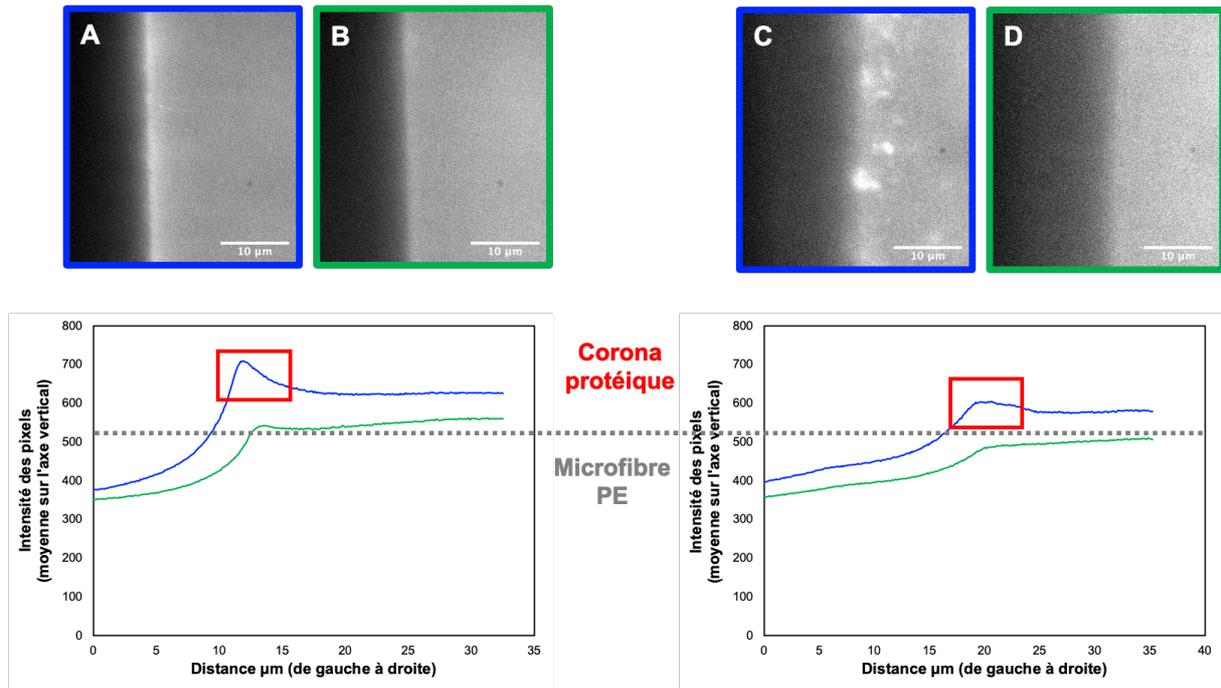


Figure 6.6. Images de fluorescence (ligne DISCO, synchrotron SOLEIL) de l'extrait protéique de levure (23 g.L^{-1}) sur des microfibrilles de polyéthylène (excitation : 265 nm , émission : $[329\text{-}351 \text{ nm}]$) sans agrégats adsorbés (A), ou avec agrégats adsorbés (B) avant (A, C, courbes bleues) et après (B, D, courbes vertes) lavage avec un flux de SDS à $0,1\%$ (débit : $10 \mu\text{L.min}^{-1}$, durée : 30 min).

Cette étude préliminaire a montré qu'il est tout à fait possible de réaliser un suivi dynamique de l'adsorption des protéines sur des microfibrilles. Les acquisitions sont réalisables sous flux, sans mouvement des fibres dans la chambre. De nombreuses perspectives peuvent être envisagées avec ce système : cinétiques d'adsorption ou de désorption en fonction du système protéique, de la concentration, de la solution (passage en eau de mer par exemple) ou encore, de la nature du plastique et de son état de vieillissement.

3. Autres types de biomolécules

Les protéines nous ont permis d'explorer une voie menant à la compréhension des interactions entre des plastiques et des biomolécules. En complément du travail présenté avec l'EPL, des protéines modèles ont été étudiées à travers le travail de thèse de F. Saudrais.¹¹ L'étude d'autres biomolécules serait nécessaire pour avoir une vision globale des interactions et de leurs effets. Les sucres et les lipides sont également des constituants importants des systèmes biologiques. Leur étude est très complexe et la littérature sur leurs interactions avec des surfaces est moins abondante que pour les protéines. La figure 6.7 propose quelques techniques envisageables pour la caractérisation de ces systèmes en solution aqueuse.

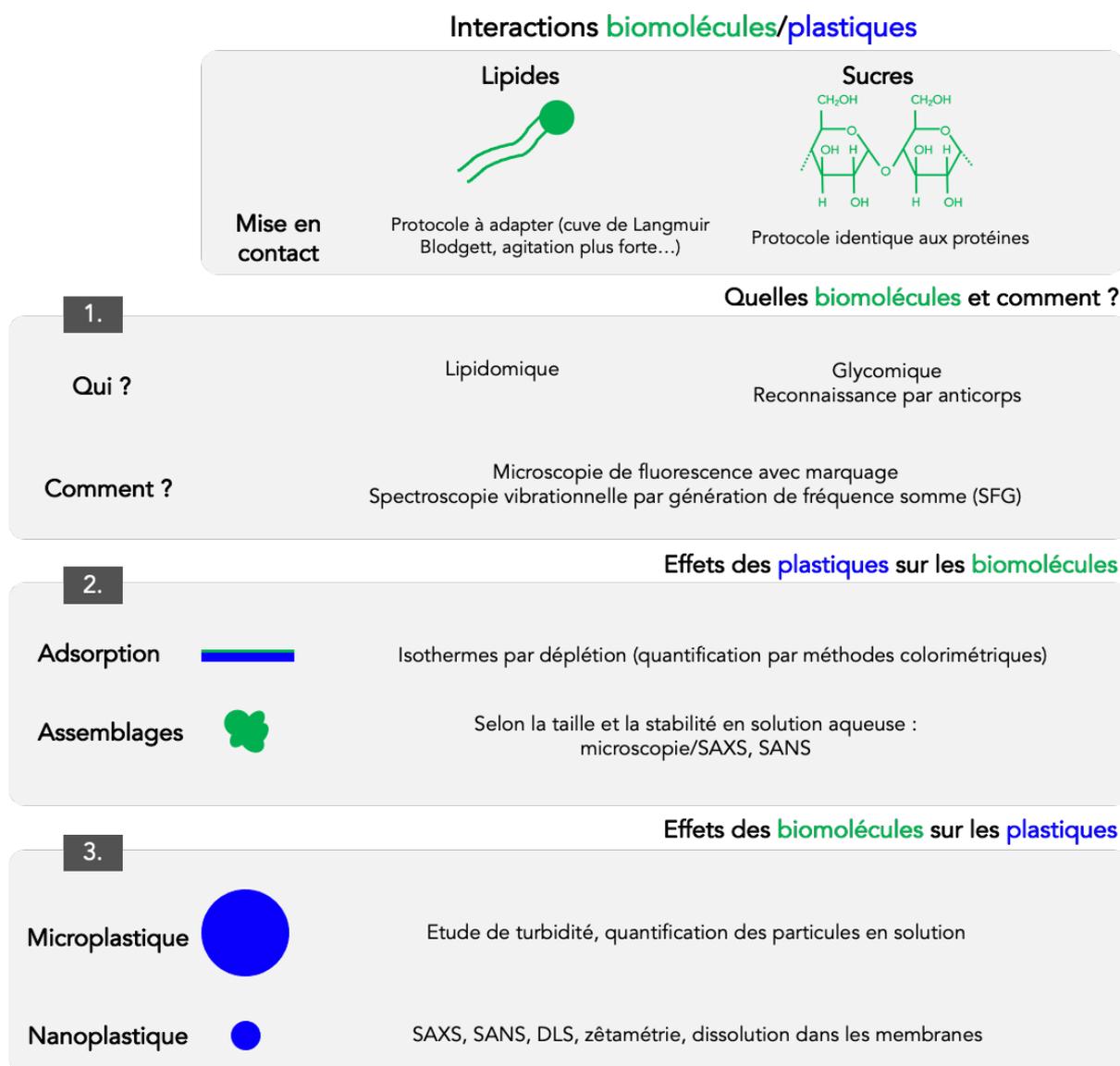


Figure 6.7. Proposition de techniques pouvant être appliquées pour la caractérisation des interactions plastiques/biomolécules et de leurs effets.

Bilan

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié les interactions entre des protéines et des plastiques de dimensions macroscopique et microscopique principalement. Des expériences préliminaires ont montré que les nanoplastiques de polyéthylène peuvent avoir un comportement encore différent avec les protéines. Cependant, la production de nanoparticules sans tensioactif est nécessaire pour véritablement étudier les interactions protéines/plastique. Les principaux résultats sont résumés sur la figure 6.8.

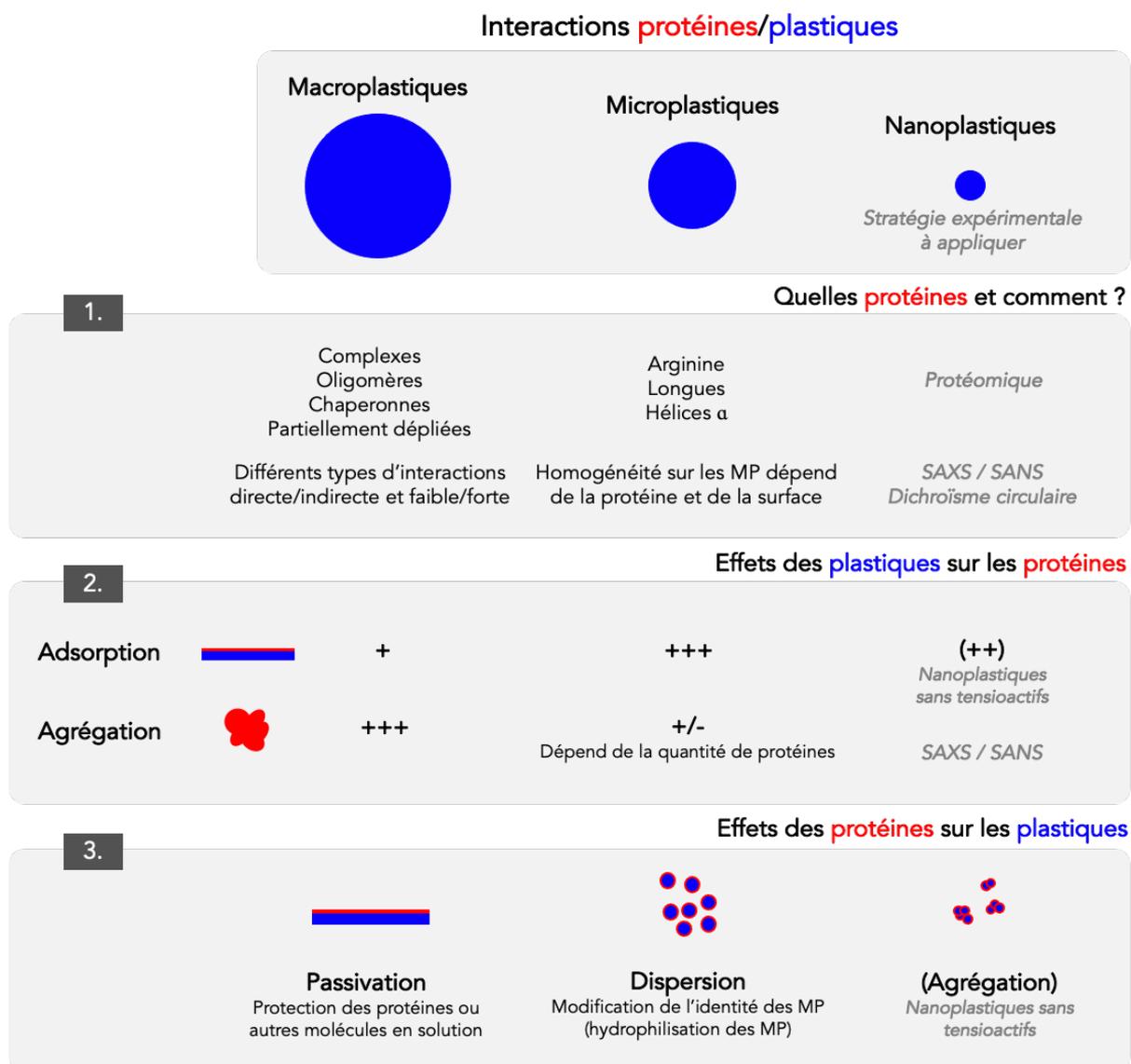


Figure 6.8. Représentation schématique des principaux résultats obtenus en réponse aux questions posées initialement.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Vogt, R. V.; Phillips, D. L.; Omar Henderson, L.; Whitfield, W.; Spierto, F. W. Quantitative Differences among Various Proteins as Blocking Agents for ELISA Microtiter Plates. *J. Immunol. Methods* 1987, 101 (1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(87\)90214-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(87)90214-6).
- (2) Convert, L.; Chabot, V.; Zermatten, P.-J.; Hamel, R.; Cloarec, J.-P.; Lecomte, R.; Aimez, V.; Charette, P. G. Passivation of KMPR Microfluidic Channels with Bovine Serum Albumin (BSA) for Improved Hemocompatibility Characterized with Metal-Clad Waveguides. *Sens. Actuators B Chem.* 2012, 173, 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.07.061>.
- (3) Carbios - Innover pour une véritable économie circulaire des plastiques. <https://www.carbios.com/fr/> (accessed 2023-01-23).
- (4) Jiang, Y.; Yin, X.; Xi, X.; Guan, D.; Sun, H.; Wang, N. Effect of Surfactants on the Transport of Polyethylene and Polypropylene Microplastics in Porous Media. *Water Res.* 2021, 196, 117016. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117016>.
- (5) Wang, Y.; Zhang, Y.; Li, X.; Sun, M.; Wei, Z.; Wang, Y.; Gao, A.; Chen, D.; Zhao, X.; Feng, X. Exploring the Effects of Different Types of Surfactants on Zebrafish Embryos and Larvae. *Sci. Rep.* 2015, 5 (1), 10107. <https://doi.org/10.1038/srep10107>.
- (6) Perrault, T. Devenir Des Micro-Nano-Plastiques (MNP) Au Contact Des Membranes Biomimétiques et Protéines. Suivi Par Microscopie 4D (r,t) et Diffusion Des Rayonnements, Le Mans Université, 2023.
- (7) Clogston, J. D.; Patri, A. K. Chapitre 6. Zeta Potential Measurement. In *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*; Methods in Molecular Biology; 2010; Vol. 697, pp 63–70.
- (8) Gardon, T.; Paul-Pont, I.; Le Moullac, G.; Soyez, C.; Lagarde, F.; Huvet, A. Cryogrinding and Sieving Techniques as Challenges towards Producing Controlled Size Range Microplastics for Relevant Ecotoxicological Tests. *Environ. Pollut.* 2022, 315, 120383. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120383>.
- (9) Geyer, R.; Jambeck, J. R.; Law, K. L. Production, Use, and Fate of All Plastics Ever Made. *Sci. Adv.* 2017, 3 (7), e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>.
- (10) Salvador Cesa, F.; Turra, A.; Baruque-Ramos, J. Synthetic Fibers as Microplastics in the Marine Environment: A Review from Textile Perspective with a Focus on Domestic Washings. *Sci. Total Environ.* 2017, 598, 1116–1129. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.172>.
- (11) Saudrais, F. Physico-Chimie Des Interactions de Plastiques Microstructurés Avec Des Protéines Ou Des Peptides Modèles Par Des Approches Expérimentales et in Silico, Université Paris-Saclay, 2023.

ANNEXES.

ANNEXES.....	243
A.1. COMPORTEMENT COLLOÏDAL	244
A.1.1. ASPECTS THEORIQUES.....	244
A.1.1.1. Stabilité des dispersions	244
A.1.1.2. Méthodes de stabilisation.....	246
A.1.2. LE CAS DES MICROPLASTIQUES.....	247
A.1.2.1. Les particules	247
A.1.2.2. La solution.....	248
A.2. ANNEXES DU CHAPITRE 3	249
A.3. ANNEXES DU CHAPITRE 4	251
A.3.1. ISOTHERMES D'ADSORPTION DE LA BSA SUR LES MP NATIFS.....	251
A.3.2. MACROS DEVELOPPEES SUR FIJI POUR LE TRAITEMENT DES IMAGES DE FLUORESCENCE.....	252
A.3.2.1. Correction des images de fluorescence.....	252
A.3.2.2. Binarisation des images de fluorescence (EPL).....	253
A.3.2.3. Binarisation des images de fluorescence (BSA)	254
A.3.2.4. Binarisation des images visibles.....	255
A.3.3. PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES ET STRUCTURELS DE L'ANALYSE PROTEOMIQUE	256
A.3.4. PROTEINES D'EPL DELETEES APRES CONTACT AVEC DES MP	258
A.3.5. PROTEINES D'EPL DELETEES SPECIFIQUEMENT	260
A.3.6. PARAMETRES DETERMINANTS DANS L'ADSORPTION DES PROTEINES D'EPL SUR DES MP.....	262
BIBLIOGRAPHIE.....	265

A.1. Comportement colloïdal

A.1.1. Aspects théoriques

A.1.1.1. Stabilité des dispersions

Les dispersions solide/liquide sont des systèmes dans lesquels une phase solide est dispersée de manière homogène dans une phase continue liquide.¹ Ces systèmes sont généralement instables et voués à évoluer vers un état thermodynamiquement plus stable dans lequel se séparent. Les phénomènes de déstabilisation peuvent survenir très tôt ou au contraire mettre longtemps à se manifester. C'est le cas des états métastables, dont la stabilité est contrôlée par la cinétique.²

Nous considérons ici des microparticules mais dans le cas de particules de taille inférieure comme des nanoparticules, le mouvement brownien, généré par l'agitation moléculaire en solution, intervient dans les mécanismes de dispersion et de stabilité colloïdale.

Échelle macroscopique

Comme expliqué précédemment, la déstabilisation d'une dispersion se caractérise par une séparation de phases. La loi de Stokes (Équation A.1) décrit la vitesse de déplacement vertical des particules sphériques dans une dispersion diluée (v).³

$$v = \frac{D^2 \cdot \Delta\rho \cdot g}{18 \eta} \quad (\text{Eq. A.1})$$

Les paramètres impactant la vitesse sont le diamètre des particules (D), la différence de masse volumique entre la phase continue et la phase dispersée ($\Delta\rho$) ainsi que la viscosité dynamique de la phase continue (η).

Lorsque la densité des particules est plus importante que celle de la phase continue, les particules migrent vers le bas, elles sédimentent. Dans le cas contraire, les particules migrent vers le haut, c'est le phénomène de crémage (Figure A.1).²

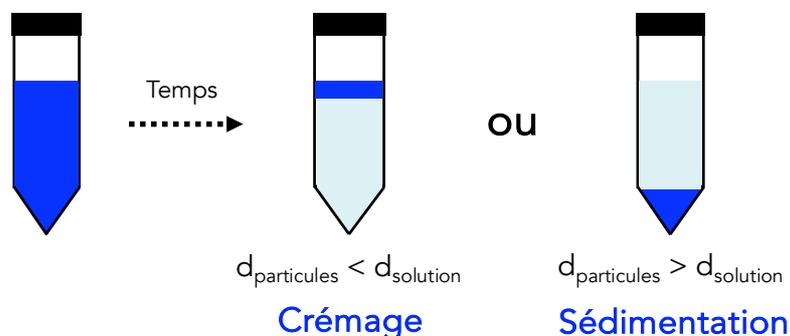


Figure A.1. Représentation schématique de l'évolution macroscopique d'une dispersion lorsque les particules ont une densité plus faible (crémage, à gauche) ou plus importante (sédimentation, à droite) que la solution.

Échelle microscopique

A l'échelle microscopique, les instabilités se caractérisent par l'agrégation des particules (Figure A.2). Le rayon des objets en solution est alors plus important. D'après la loi de Stokes, (Eq. A.1), cela va conduire au déphasage de la suspension.

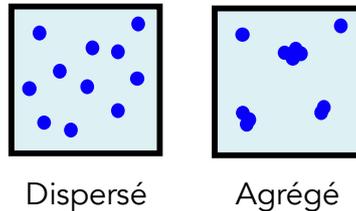


Figure A.2. Représentation schématique de particules dans un état dispersé et agrégé à l'échelle microscopique.

La théorie DLVO, développée par Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek, décrit les forces d'attraction et de répulsion des particules en suspensions dans un liquide.^{4,5} Il s'agit d'un modèle simplifié considérant uniquement deux types de forces :

- **Les forces de Van der Waals** sont attractives et tendent à déstabiliser le système. Il s'agit d'un nom général pour les forces intermoléculaires attractives incluant les forces de Keesom (interactions entre dipôles permanents), de Debye (interactions entre dipôle permanent et dipôle induit) et de dispersion (interactions entre dipôle instantané et dipôle induit). Ces forces ont une portée relativement importante (de l'ordre de 100 nm).⁶
- **Les forces électrostatiques** de la double couche ionique sont répulsives dans ce modèle et augmentent la stabilité d'une dispersion. Pour respecter l'électro-neutralité d'une solution, les éventuelles charges de surface d'une particule doivent être compensées. La réponse du système résulte en l'accumulation de charges opposées (contre-ions) et la déplétion des ions de même charge (co-ions) près de la surface de la particule. Ces contre-ions constituent la double couche ionique (couche de Stern). La portée de ces forces est plus faible que pour les forces de Van der Waals tout en restant supérieure au rayon atomique.⁶ Le potentiel zêta correspond à la charge des particules au niveau de la double couche électronique. Il est généralement considéré qu'au-delà de 30 mV en valeur absolue, les charges sont suffisantes pour assurer une répulsion électrostatique.⁷

La théorie DLVO est basée sur une hypothèse d'additivité des énergies : l'énergie potentielle totale des interactions correspond à la somme des forces de Van der Waals et des forces électrostatiques. La figure A.3 représente les deux types de force ainsi que leur résultante en fonction de la distance entre deux particules. A partir d'une certaine distance, dépendante du système, un puits de potentiel apparaît avec une résultante légèrement attractive. A une distance plus faible entre les particules, il existe une barrière d'énergie due au caractère prédominant des forces répulsives. Plus cette barrière est haute et plus le système est stable. L'importance du puits et de la barrière de potentiel dépend à la fois des particules et du milieu dispersant.

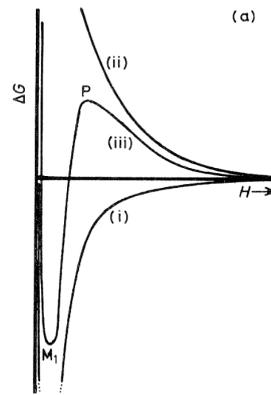


Figure A.3. Exemple de représentation des énergies d'interaction en fonction de la distance H entre deux particules. (i) correspond aux contributions attractives, (ii) aux contributions répulsives et (iii) à la résultante du système, présentant une barrière énergétique stabilisante.¹

A.1.1.2. Méthodes de stabilisation

Dans certains cas, il est souhaité d'obtenir une dispersion la plus stable possible, par exemple pour la dispersion de pigments ou de charges dans des peintures ou des produits cosmétique. Si les particules n'ont pas d'affinité pour le solvant, des agents dispersants, tels que des tensioactifs, peuvent être utilisés. Il s'agit de molécules amphiphiles qui, une fois à la surface des particules, vont diminuer les énergies de surfaces et permettre leur passage en solution.⁸

Si la barrière énergétique entre les particules n'est pas suffisante, des molécules peuvent être ajoutées afin d'augmenter les répulsions et ainsi favoriser le maintien des particules en suspension. Elles forment généralement une couronne autour des particules et ont des mécanismes d'action différents qui peuvent être combinés (Figure A.4).^{9,10}

- **Stabilisation électrostatique.** Les molécules ajoutées sont chargées, l'objectif est d'augmenter la valeur du potentiel zêta (en valeur absolue) afin d'améliorer la répulsion électrostatique.
- **Stabilisation stérique.** La couronne formée autour de la particule a une épaisseur importante, empêchant les particules de passer la barrière énergétique menant à l'agrégation.

Une **stabilisation électrosterique** correspond à la combinaison de ces deux mécanismes.

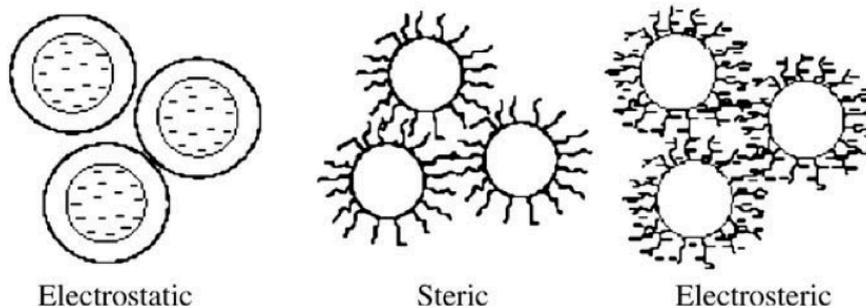


Figure A.4. Mécanismes de stabilisation de particules en suspension.⁹

A.1.2. Le cas des microplastiques

D'après les informations présentées précédemment, le comportement colloïdal des microplastiques doit dépendre de leurs propriétés intrinsèques, de la solution dans laquelle ils sont dispersés et de la présence éventuelle de molécules ou de microorganismes à leur surface. Ce dernier point est développé dans le chapitre 1 (paragraphe 1.2.3).

A.1.2.1. Les particules

Avant de considérer le transport des particules au sein de la colonne d'eau, il est nécessaire de comprendre pourquoi certaines particules vont y entrer alors que d'autres restent à l'interface air/liquide.

Certains MP ont une densité particulièrement faible, par exemple des mousses de polystyrène, dont la masse volumique est de l'ordre de $0,05 \text{ g.cm}^{-3}$. Ces particules restent à l'interface air/liquide et leur trajectoire subit les effets des vagues et du vent. Elles sont transportées sur un plan horizontal plutôt que vertical.¹¹ D'autres MP ont une densité supérieure, tout en restant inférieure à celle de l'eau. C'est par exemple le cas des polyoléfines de polyéthylène et polypropylène dont la masse volumique est généralement comprise entre 0,9 et 1. Ces particules sont plus enclines à entrer dans la colonne d'eau. Pour cela, il faut que l'énergie de liaison ΔE des microplastiques à l'interface air/liquide soit minimisée. Celle-ci peut être calculée à partir de l'équation A.2.^{12,13}

$$\Delta E = -\pi R^2 \gamma (1 - |\cos \theta|)^2 \quad (\text{Eq. A.2})$$

Avec γ la tension de surface de l'eau dans l'air, θ l'angle de contact d'une goutte d'eau sur la surface du matériau plastique et R le rayon d'une particule de plastique.

Les propriétés mouillantes des particules, c'est-à-dire leur caractère hydrophile ou hydrophobe leur permettra ou non d'entrer dans la colonne d'eau en minimisant l'énergie interfaciale. Cette équation montre également que les petites particules sont plus enclines à se détacher de l'interface pour entrer en solution.¹⁴

Une fois entrées dans l'eau, le comportement des MP est gouverné par la loi de Stokes. Ainsi une petite taille et une densité proche de celle du solvant sont des paramètres favorables au maintien des particules en suspension. Cependant, à l'échelle microscopique, d'autres phénomènes entrent en jeu, par exemple leur potentiel zêta. Si les plastiques ne sont pas suffisamment chargés, la répulsion électrostatique n'est pas suffisante, les particules s'agrègent, augmentant le diamètre des objets en solution, et menant au déphasage.¹⁵

Nous avons évoqué précédemment le fait que les particules subissent des modifications chimiques et structurelles lorsqu'elles sont dans l'environnement. Les propriétés intrinsèques des particules évoluant au cours du temps, il en est de même pour leur comportement colloïdal. Cela rend la question du devenir des plastiques encore plus complexe.¹⁶

A.1.2.2. La solution

Dans un milieu de dispersion, la nature et la quantité de composés chargés, tout comme le pH, vont avoir un impact sur la double couche ionique, modifier les interactions particule/particule, et donc la stabilité colloïdale.¹⁷⁻¹⁹ L'ajouts de sels mène généralement à l'agrégation des particules par écrantage électrostatique. En effet, au-dessus de la CCC, définie comme la Concentration de Coagulation Critique (en composés ioniques), les répulsions électrostatiques entre particules ne sont pas suffisantes pour assurer une barrière énergétique (Figure A.5), ce qui conduit à leur agrégation.²⁰ Plus la valence des ions est élevée, plus la CCC est faible puisqu'ils écrantent plus efficacement les charges des particules.

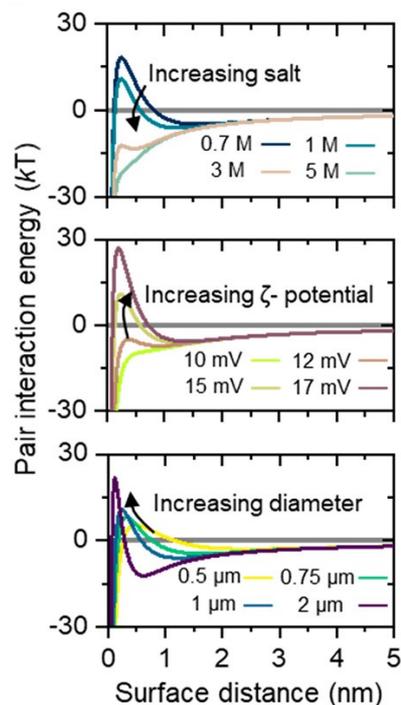


Figure A.5. Contributions DLVO des énergies d'interactions entre deux particules. L'augmentation de la quantité de sels diminue la barrière énergétique et l'augmentation du potentiel zêta et/ou de la taille des particules augmente la barrière énergétique.¹⁴

Dans l'environnement marin par exemple, la présence de sels, la température ainsi que la pression modifient la viscosité de la solution.^{21,22} Par ailleurs, la composition de l'eau n'est pas homogène, et a un impact sur de nombreux paramètres. Par exemple, la densité de l'eau augmente avec la profondeur.²³ Ces variations sont nombreuses et modifient le comportement colloïdal des MP tout au long de leur parcours dans la colonne d'eau et en surface.

A.2. ANNEXES DU CHAPITRE 3

Protéines	Caractéristiques structurelles et fonctionnelles	Verre	polypropylène	Téflon	LoBind
RS29A 40S ribosomal protein S29-A	Complexe, ribosomal activity	4.50%	1.54%	3.76%	2.19%
RS29B 40S ribosomal protein S29-B	Complexe, ribosomal activity	5.20%	0.00%	13.99%	0.00%
RS30A 40S ribosomal protein S30-A	Complexe, ribosomal activity	44.28%	66.96%	6.55%	0.00%
RS21B 40S ribosomal protein S21-B	Complexe, ribosomal activity	32.16%	12.48%	42.63%	39.49%
IF4B Eukaryotic translation initiation factor 4B	Complexe, ribosomal activity	22.47%	12.66%	59.40%	39.24%
RL38 60S ribosomal protein L38	Complexe, ribosomal activity	12.22%	26.31%	43.96%	57.91%
RS21A 40S ribosomal protein S21-A	Complexe, ribosomal activity	36.27%	14.07%	44.07%	44.54%
COX4 Cytochrome c oxidase subunit 4, mitochondrial	Complexe, energy metabolism	55.69%	31.94%	25.23%	46.51%
RS14A 40S ribosomal protein S14-A	Complexe, ribosomal activity	51.56%	48.00%	41.57%	49.27%
COX6 Cytochrome c oxidase subunit 6, mitochondrial	Complexe, energy metabolism	67.76%	40.67%	37.47%	47.72%
GRE1 Protein GRE1	partially unfolded, stress response	25.38%	20.32%	94.64%	59.14%
THO1 Protein THO1	partially unfolded, rna binding	79.03%	22.90%	30.68%	68.06%
ARPC4 Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	Complexe, cytoskeleton	45.96%	42.24%	65.75%	47.95%
FKBP FK506-binding protein 1	Chaperone, protein folding	59.32%	26.68%	51.57%	70.94%
ATPF ATP synthase subunit 4, mitochondrial	Complexe, energy metabolism	50.82%	58.43%	65.11%	50.08%
RTN2 Reticulon-like protein 2	partially unfolded, reticulum function	70.37%	65.12%	44.94%	52.20%
H2B1 Histone H2B.1	Complexe, chromatin organisation	79.51%	46.46%	49.00%	68.52%
SPEE Spermidine synthase	monomer, metabolism	70.09%	52.52%	38.20%	85.25%
HBT1 Protein HBT1	partially unfolded,	53.04%	40.67%	75.43%	83.02%
RS7B 40S ribosomal protein S7-B	Complexe, ribosomal activity	57.07%	57.43%	65.51%	73.20%
TSA1 Peroxiredoxin TSA1	homodimer, stress response	54.39%	76.78%	81.77%	49.26%
HSP12 12 kDa heat shock protein	Chaperone, stress response	68.09%	72.66%	63.29%	59.16%
RUVB1 RuvB-like protein 1	Complexe, chromatin organisation	52.15%	76.35%	64.25%	74.45%
DLDH Dihydropyridol dehydrogenase, mitochondrial	Complexe, metabolism	64.26%	56.71%	63.48%	83.73%
RS2 40S ribosomal protein S2	Complexe, ribosomal activity	67.16%	73.45%	76.49%	53.86%
DAK1 Dihydroxyacetone kinase 1	monomer, metabolism	60.10%	66.99%	71.09%	78.11%
RS15 40S ribosomal protein S15	Complexe, ribosomal activity	46.41%	62.80%	79.76%	89.12%
SIS1 Protein SIS1	Chaperone, protein folding	81.43%	51.16%	79.09%	68.27%
GSP2 GTP-binding nuclear protein GSP2/CNR2	partially unfolded, nucleus organisation	63.34%	62.70%	65.05%	89.31%
HSP60 Heat shock protein 60, mitochondrial	Chaperone, protein folding	62.32%	63.38%	76.66%	80.70%
STM1 Suppressor protein STM1	Complexe, DNA binding	83.48%	46.61%	83.87%	69.74%
GSP1 GTP-binding nuclear protein GSP1/CNR1	monomer, nucleus organisation	64.31%	62.62%	64.63%	99.29%
SODC Superoxide dismutase [Cu-Zn]	homodimer, stress response	75.29%	78.53%	41.63%	95.51%
RLA4 60S acidic ribosomal protein P2-beta	Complexe, ribosomal activity	76.06%	46.94%	77.92%	90.21%
RL9B 60S ribosomal protein L9-B	Complexe, ribosomal activity	98.44%	80.15%	59.14%	57.33%
NACA Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	Complexe, unfolded protein binding	81.52%	69.30%	75.46%	71.41%
RS31 Ubiquitin-40S ribosomal protein S31	Complexe, ribosomal activity	69.42%	90.95%	92.12%	46.82%
ATPO ATP synthase subunit 5, mitochondrial	Complexe, energy metabolism	75.76%	69.21%	90.68%	64.02%
RL12A 60S ribosomal protein L12-A	Complexe, ribosomal activity	59.14%	64.64%	77.49%	101.34%
RL12A 60S ribosomal protein L12-A	Complexe, ribosomal activity	59.14%	64.64%	77.49%	101.34%
MASS5 Mitochondrial protein import protein MASS5	Chaperone, protein folding	61.36%	64.53%	89.27%	88.25%
CBS Cystathionine beta-synthase	monomer, metabolism	65.20%	79.42%	79.77%	80.16%
PAA1 Polyamine N-acetyltransferase 1	monomer, metabolism	80.74%	58.65%	89.04%	80.55%
ABP1 Actin-binding protein	Complexe, cytoskeleton	78.16%	64.84%	76.81%	91.80%
SYFB Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	tetramer, protein biosynthesis, RNA binding	80.96%	64.58%	83.62%	89.75%
TKT2 Transketolase 2	homodimer, metabolism	76.94%	85.16%	87.99%	69.53%
APE2 Aminopeptidase 2, mitochondrial	partially unfolded, metabolism	89.20%	72.68%	75.93%	92.24%
ARC1 tRNA-aminoacylation cofactor ARC1	Complexe, protein biosynthesis, RNA binding	59.02%	57.91%	108.47%	107.01%
HSP72 Heat shock protein SSA2	Chaperone, protein folding, RNA binding	78.71%	76.09%	79.94%	98.96%
ADY2 Accumulation of dyads protein 2	partially unfolded, transporter	85.71%	70.84%	75.82%	104.53%
SYG Isoform Cytoplasmic of Glycine--tRNA ligase 1, mitochondrial GN=GR51	RNA binding, protein biosynthesis	67.14%	84.89%	81.62%	105.25%
STI1 Heat shock protein STI1	Chaperone, stress response	84.99%	73.86%	76.94%	103.41%
QCR1 Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Complexe, energy metabolism	88.37%	87.41%	76.52%	87.43%
ENO1 Enolase 1	homodimer, metabolism	81.41%	81.57%	90.36%	87.02%
TRXB1 Thioredoxin reductase 1	homodimer, stress response	90.25%	77.82%	111.33%	61.78%
ALDH3 Aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] 2	monomer, metabolism	77.62%	83.75%	83.95%	97.45%
RS7A 40S ribosomal protein S7-A	Complexe, ribosomal activity	72.97%	80.93%	95.50%	95.03%
G3P3 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	homotetramer, metabolism	93.67%	74.18%	90.84%	86.07%
HSP74 Heat shock protein SSA4	Chaperone, protein refolding	74.35%	83.40%	93.76%	94.97%
PYR1 Protein URA2	monomer, metabolism	75.17%	84.53%	92.44%	95.09%
HSP71 Heat shock protein SSA1	Chaperone, protein refolding	79.41%	80.48%	87.29%	100.25%
ENO2 Enolase 2	homodimer, metabolism	87.61%	76.32%	93.03%	90.78%
G3P1 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	homotetramer, metabolism	93.22%	71.55%	92.93%	91.24%
HSP73 Heat shock protein SSA3	Chaperone, protein folding,	79.43%	83.92%	90.01%	98.04%
FRDS Fumarate reductase 1	monomer, metabolism	96.27%	86.41%	67.97%	105.48%
RS13 40S ribosomal protein S13	Complexe, ribosomal activity	79.67%	66.82%	98.09%	120.09%
RS5 40S ribosomal protein S5	Complexe, ribosomal activity	91.27%	79.98%	91.93%	102.39%
TCTP Translationally-controlled tumor protein homolog	partially unfolded, stress response	61.00%	49.10%	117.39%	139.78%
HS104 Heat shock protein 104	Chaperone , protein folding	76.59%	100.09%	86.48%	105.76%
IF2G Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma	Complexe, ribosomal activity	85.26%	96.56%	88.75%	101.86%
RIR2 Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain 1	heterotetramer, metabolism	75.12%	82.32%	114.42%	111.57%
ACON Aconitate hydratase, mitochondrial	monomer, metabolism	96.75%	84.09%	99.62%	107.29%
EF2 Elongation factor 2	Complexe, ribosomal activity	94.53%	83.12%	111.53%	101.02%
BFR1 Nuclear segregation protein BFR1	monomer, RNA binding	95.55%	62.91%	127.45%	105.06%
HSP82 ATP-dependent molecular chaperone HSP82	Chaperone, protein folding, stress response	90.40%	91.91%	114.12%	98.89%
HSC82 ATP-dependent molecular chaperone HSC82	Chaperone , protein folding, stress response	95.10%	91.54%	115.52%	99.46%
UGPA1 UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	homooctamer, metabolism	86.92%	98.22%	97.22%	126.59%
RLA0 60S acidic ribosomal protein P0	Complexe, ribosomal activity	103.47%	74.57%	105.99%	137.41%
SYKC Lysine--tRNA ligase, cytoplasmic	homodimer, protein biogenesis	108.24%	96.40%	92.20%	126.86%

DHE5 NADP-specific glutamate dehydrogenase 2	homo-hexamer, metabolism	111.50%	91.74%	120.60%	108.42%
SYIC Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	Monomer, RNA binding	102.83%	92.14%	108.35%	138.01%
ACH1 Acetyl-CoA hydrolase	Monomer, metabolism	109.09%	87.15%	119.50%	130.71%
IDHC Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	homodimer, metabolism	118.64%	89.63%	119.26%	137.79%
WTM1 Transcriptional modulator WTM1	monomern transcription	117.76%	94.14%	129.70%	130.54%
ADH1 Alcohol dehydrogenase 1	homotetramer, metabolism	106.87%	122.52%	135.34%	111.71%
VPS1 Vacuolar protein sorting-associated protein 1	partially unfolded, cytoskeleton	123.54%	104.20%	114.34%	135.17%
PUR92 Bifunctional purine biosynthesis protein ADE17	homodimer, metabolism	140.74%	97.93%	116.69%	123.13%
RS3 40S ribosomal protein S3	Complexe, ribosomal activity	128.08%	117.97%	123.08%	113.96%
RL15B 60S ribosomal protein L15-B	Complexe, ribosomal activity	109.20%	124.21%	94.14%	157.22%
MLS1 Malate synthase 1	monomer, metabolism	121.35%	97.07%	134.97%	132.16%
DHE4 NADP-specific glutamate dehydrogenase 1	homo-hexamer, metabolism	118.05%	102.15%	150.02%	118.99%
ACT Actin	cytoskeleton	123.36%	121.29%	109.35%	136.07%
MPG1 Mannose-1-phosphate guanyltransferase	monomer, metabolism	128.08%	92.92%	153.14%	124.75%
G6PD Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	monomer, metabolism	121.02%	120.28%	153.99%	107.79%
6PGD1 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1	homodimer, metabolism	119.52%	105.43%	141.13%	140.07%
DCPS m7GpppX diphosphatase	homodimer, stress response	104.04%	98.38%	154.96%	155.91%
ARA1 D-arabinose dehydrogenase [NAD(P)+] heavy chain	heterodimer, metabolism	136.81%	97.76%	136.80%	159.36%
6PGD2 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2	homodimer, metabolism	129.05%	106.76%	133.64%	162.30%
RL1A 60S ribosomal protein L1-A	Complexe, ribosomal activity	125.04%	118.12%	179.44%	124.68%
EIF31 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	Complexe, ribosomal activity	98.09%	135.93%	189.15%	126.35%
ACS1 Acetyl-coenzyme A synthetase 1	monomer, metabolism	118.96%	112.41%	145.95%	176.17%
RS9B 40S ribosomal protein S9-B	Complexe, ribosomal activity	117.84%	126.10%	145.17%	166.59%
SYNC Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic	monomer, RNA binding, protein biosynthesis	149.20%	122.71%	141.77%	143.57%
PDC6 Pyruvate decarboxylase isozyme 3	homotetramer, metabolism	156.45%	109.55%	161.51%	170.12%
ADH3 Alcohol dehydrogenase 3, mitochondrial	homotetramer, metabolism	144.90%	165.24%	195.00%	95.89%
PUR91 Bifunctional purine biosynthesis protein ADE16	homodimer, metabolism	159.72%	117.24%	180.44%	147.23%
FPP5 Farnesyl pyrophosphate synthase	monomer, metabolism	149.86%	143.56%	141.94%	169.79%
ODPB Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	Complexe, metabolism	190.28%	136.24%	111.18%	176.04%
RS9A 40S ribosomal protein S9-A	Complexe, ribosomal activity	138.90%	140.42%	168.86%	191.62%
KAD2 Adenylate kinase	monomer, metabolism	227.51%	158.40%	224.50%	232.53%
ASNS2 Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] 2	monomer, metabolism	174.44%	144.76%	159.32%	#N/A
ILV3 Dihydroxy-acid dehydratase, mitochondrial	monomer, metabolism	#N/A	103.54%	152.67%	139.34%

Tableau A.1. Liste des protéines présentant une concentration significativement différente avant et après agitation d'une solution d'extrait protéique de levure à 0,2 g.L⁻¹ en tampon phosphate (100 mM, pH7) durant 24 h à 3 trs.min⁻¹ dans des tubes en verre, polypropylène, Téflon et LoBind remplis à 60% de leur volume total.

A.3. ANNEXES DU CHAPITRE 4

A.3.1. Isothermes d'adsorption de la BSA sur les MP natifs

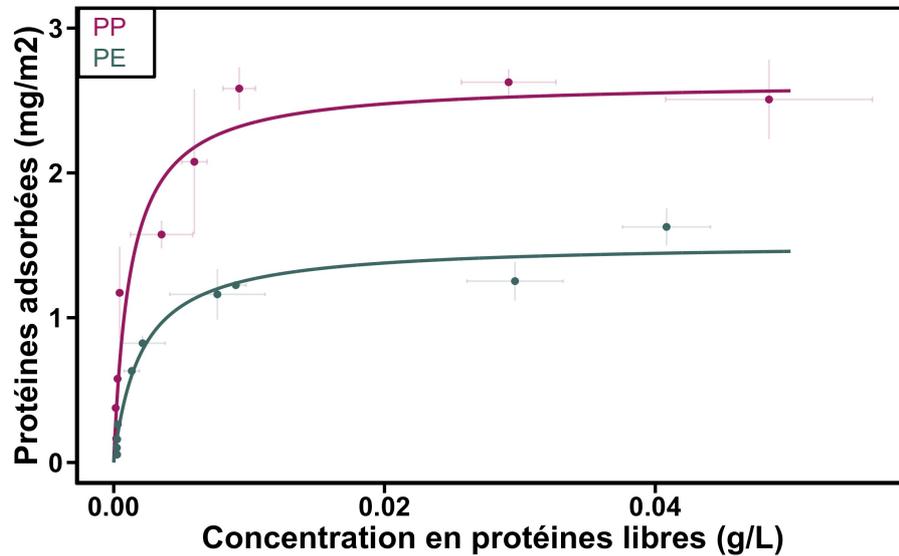


Figure A.6. Isothermes d'adsorption de la BSA en tampon phosphate 100mM, pH7 sur du PP (rose) et du PE (bleu), réalisés après 72 h d'agitation à 6°C. Les courbes représentent un ajustement avec un modèle de Langmuir. Expériences réalisées par Florent Saudrais.

A.3.2. Macros développées sur Fiji pour le traitement des images de fluorescence

A.3.2.1. Correction des images de fluorescence

```
// Efface le contenu de la fenêtre log
print("\Clear");

// Pour ne pas afficher les images (gain de temps +++)
setBatchMode(true);

// Récupération dossier source
showMessage("Bonjour ! Dans quel dossier sont les images à traiter ?");
//Création d'une variable correspondant au chemin
dossier_source = getDirectory("Bonjour ! Dans quel dossier sont les images à traiter ?");
//Vérification que le chemin est ok. Concaténation pour avoir le nom qui s'affiche avec "+"
print("source : " + dossier_source);

// Définir le dossier destination
showMessage("Dans quel dossier seront sauvées les images ?");
dossier_destination = getDirectory("Dans quel dossier seront sauvées les images ?");
print("destination : " + dossier_destination);

// Quelles sont les images du dossier source ? On veut un tableau qui liste tous les fichiers
liste_de_fichiers = getFileList(dossier_source);
nombre_de_fichiers = lengthOf(liste_de_fichiers);
print("Nombre d'images : " + nombre_de_fichiers);

// Ouverture Dark et White-DarkofWhite
showMessage("Fais glisser le dark et le white_dofw");
waitForUser;

// Pour chaque image du dossier source :
//cpt = compteur
for (cpt = 0; cpt < nombre_de_fichiers; cpt++) {
// Ouvrir l'image
open(dossier_source + liste_de_fichiers[cpt]);
// Corrections
imageCalculator("Subtract", liste_de_fichiers[cpt], "dark_channel001.tif");
run("32-bit");
run("Multiply...", "value=XXX");
imageCalculator("Divide", liste_de_fichiers[cpt], "white_dofw_32.tif");
run("16-bit");
makeRectangle(175, 175, 674, 674);
run("Crop");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
// Sauver le résultat
saveAs("Tiff", dossier_destination + liste_de_fichiers[cpt]);
}

// Fermer l'image
run("Close All");

// C'est fini !
showMessage("Youpi c'est fini !");
```

Valeur du pixel ayant l'intensité la plus élevée sur l'image d'illumination

A.3.2.2. Binarisation des images de fluorescence (EPL)

```
// Efface le contenu de la fenêtre log
print("\\Clear");

// Pour ne pas afficher les images (gain de temps +++)
setBatchMode(true);

// Récupération dossier source
showMessage("Bonjour ! Dans quel dossier sont les images à traiter ?");
//Création d'une variable correspondant au chemin
dossier_source = getDirectory("Bonjour ! Dans quel dossier sont les images à traiter ?");
//Vérification que le chemin est ok. Concaténation pour avoir le nom qui s'affiche avec "+"
print("source : " + dossier_source);

// Définir les dossiers destinations
showMessage("Dans quel dossier seront sauvées les images NON BINAIRES ?");
dossier_destination_nonbinaires = getDirectory("Dans quel dossier seront sauvées les images NON BINAIRES ?");
print("destination images non binaires:" + dossier_destination_nonbinaires);

showMessage("Dans quel dossier seront sauvées les images BINAIRES ?");
dossier_destination_binaires = getDirectory("Dans quel dossier seront sauvées les images BINAIRES ?");
print("destination images binaires:" + dossier_destination_binaires);

// Quelles sont les images du dossier source ? On veut un tableau qui liste tous les fichiers
liste_de_fichiers = getFileList(dossier_source);
nombre_de_fichiers = lengthOf(liste_de_fichiers);
print("Nombre d'images : " + nombre_de_fichiers);

// Ouverture Dark et White-DarkofWhite
open("/Users/marionschvartz/Desktop/treated_images/dark_channel001.tif");
open("/Users/marionschvartz/Desktop/treated_images/white_dofw_32.tif");

// Pour chaque image du dossier source :
//cpt = compteur
for (cpt = 0; cpt < nombre_de_fichiers; cpt++) {
// Ouvrir l'image
open(dossier_source + liste_de_fichiers[cpt]);
// Corrections
imageCalculator("Subtract", liste_de_fichiers[cpt], "dark_channel001.tif");
run("32-bit");
run("Multiply...", "value=3752");
imageCalculator("Divide", liste_de_fichiers[cpt], "white_dofw_32.tif");
makeRectangle(175, 175, 674, 674);
run("Crop");
//save
saveAs("Tiff", dossier_destination_nonbinaires + liste_de_fichiers[cpt]);
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
run("Median...", "radius=3");
setAutoThreshold("Otsu dark no-reset");
//setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Fill Holes");
run("Options...", "iterations=4 count=1 do=Close");
run("Fill Holes");
// Sauver le résultat
saveAs("Tiff", dossier_destination_binaires + liste_de_fichiers[cpt]);
}

// Fermer l'image
run("Close All");

// C'est fini !
showMessage("Youpi c'est fini !");
```

A.3.2.3. Binarisation des images de fluorescence (BSA)

```
// Efface le contenu de la fenêtre log
print("\\Clear");

// Pour ne pas afficher les images (gain de temps +++)
setBatchMode(true);

// Récupération dossier sources
showMessage("Bonjour ! Dans quel dossier sont les images à traiter ?");
//Création d'une variable correspondant au chemin
dossier_source = getDirectory("Bonjour ! Dans quel dossier sont les images à traiter ?");
//Vérification que le chemin est ok. Concaténation pour avoir le nom qui s'affiche avec "+"
print("source : " + dossier_source);

// Définir les dossiers destinations
showMessage("Dans quel dossier seront sauvées les images NON BINAIRES ?");
dossier_destination_nonbinaires = getDirectory("Dans quel dossier seront sauvées les images NON BINAIRES ?");
print("destination images non binaires:" + dossier_destination_nonbinaires);

showMessage("Dans quel dossier seront sauvées les images BINAIRES ?");
dossier_destination_binaires = getDirectory("Dans quel dossier seront sauvées les images BINAIRES ?");
print("destination images binaires:" + dossier_destination_binaires);

// Quelles sont les images du dossier source ? On veut un tableau qui liste tous les fichiers
liste_de_fichiers = getFileList(dossier_source);
nombre_de_fichiers = lengthOf(liste_de_fichiers);
print("Nombre d'images : " + nombre_de_fichiers);

// Ouverture Dark et White-DarkofWhite
open("/Users/marionschvartz/Desktop/treated_images/dark_channel001.tif");
open("/Users/marionschvartz/Desktop/treated_images/white_dofw_32.tif");

// Pour chaque image du dossier source :
//cpt = compteur
for (cpt = 0; cpt < nombre_de_fichiers; cpt++) {
// Ouvrir l'image
open(dossier_source + liste_de_fichiers[cpt]);
// Corrections
imageCalculator("Subtract", liste_de_fichiers[cpt], "dark_channel001.tif");
run("32-bit");
run("Multiply...", "value=3752");
imageCalculator("Divide", liste_de_fichiers[cpt], "white_dofw_32.tif");
makeRectangle(175, 175, 674, 674);
run("Crop");
//save
saveAs("Tiff", dossier_destination_nonbinaires + liste_de_fichiers[cpt]);
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
run("Median...", "radius=6");
setAutoThreshold("RenyiEntropy dark no-reset");
run("Convert to Mask");
run("Options...", "iterations=2 count=1 do=Open");
// Sauver le résultat
saveAs("Tiff", dossier_destination_binaires + liste_de_fichiers[cpt]);
}

// Fermer l'image
run("Close All");

// C'est fini !
showMessage("Youpi c'est fini !");
```

A.3.2.4. Binarisation des images visibles

```
// Efface le contenu de la fenêtre log
print("\\Clear");

// Pour ne pas afficher les images (gain de temps +++)
setBatchMode(true);

// Récupération dossier source
showMessage("Bonjour ! Dans quel dossier sont les images à traiter ?");
//Création d'une variable correspondant au chemin
dossier_source = getDirectory("Bonjour ! Dans quel dossier sont les images à traiter ?");
//Vérification que le chemin est ok. Concaténation pour avoir le nom qui s'affiche avec "+"
print("source : " + dossier_source);

// Définir le dossier destination
showMessage("Dans quel dossier seront sauvées les images ?");
dossier_destination = getDirectory("Dans quel dossier seront sauvées les images ?");
print("destination : " + dossier_destination);

// Quelles sont les images du dossier source ? On veut un tableau qui liste tous les fichiers
liste_de_fichiers = getFileList(dossier_source);
nombre_de_fichiers = lengthOf(liste_de_fichiers);
print("Nombre d'images : " + nombre_de_fichiers);

// Ouverture dark
open("/Users/marionschvartz/Desktop/treated_images/Dark_smooth_channel000.tif");

// Pour chaque image du dossier source :
//cpt = compteur
for (cpt = 0; cpt < nombre_de_fichiers; cpt++) {
    // Ouvrir l'image
    open(dossier_source + liste_de_fichiers[cpt]);
    // Soustraction dark
    run("32-bit");
    imageCalculator("Subtract", liste_de_fichiers[cpt], "Dark_smooth_channel000.tif");
    // Valeur absolue
    run("Abs");
    run("16-bit");
    // Smooth
    run("Median...", "radius=11");
    // Binarisation
    run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
    setAutoThreshold("IsoData dark no-reset");
    run("Convert to Mask");
    run("Fill Holes");
    run("Options...", "iterations=4 count=1 do=Close");
    run("Fill Holes");
    // Sauver le résultat
    saveAs("Tiff", dossier_destination + liste_de_fichiers[cpt]);
}

// Fermer l'image
run("Close All");

// C'est fini !
showMessage("Youpi c'est fini !")
```

A.3.3. Paramètres physico-chimiques et structuraux de l'analyse protéomique

Classe	Paramètre	Définition
Composition	A	Alanine
	C	Cystéine
	D	Acide aspartique
	I	Isoleucine
	K	Lysine
	M	Méthionine
	N	Asparagine
	Q	Glutamine
	R	Arginine
	S	Sérine
	V	Valine
	W	Tryptophane
	Y	Tyrosine
	Aromatiques	W,F,Y
Propriétés physico-chimiques	Charge négative	D,E
	Charge neutre	A,N,C,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y, V
	Charge positive	K,R
	Longueur	Nombre de résidus de la protéine
	Masse molaire	Redondant avec longueur
	Hydrophobie : hydrophobe	C,L,V,I,M,F,W
	Hydrophobie : neutre	G,A,S,T,P,H,Y
	Hydrophobie : polaire	R,K,E,D,Q,N
	Polarité 4.9-6.2	L,I,F,W,C,M,V,Y (redondant avec hydrophobie)
	Polarité 8.0-9.2	P,A,T,G,S (hydrophobie)
	Polarité 10.4-13.0	H,Q,R,K,N,E,D (redondant avec hydrophobie)
	Polarisabilité 0.128-0.186	C,P,N,V,E,Q,I,L
	Polarisabilité 0.219-0.409	K,M,H,F,R,Y,W
	Polarisabilité 0-1.08	G,A,S,D,T
Volume de Van der Waals 0-2.78		
Volume de Van der Waals 2.95-4.0	Redondant avec la polarisabilité	
Volume de Van der Waals 4.03-8.08		

Classe	Paramètre	Définition
Paramètres liés à la structure	Structure secondaire : hélices α	E,A,L,M,Q,K,R,H
	Structure secondaire : feuillets β	V,I,Y,C,W,F,T
	Structure secondaire : déstructurées	G,N,P,S,D
	Disorder_Full.pondr ²⁴	Désordre sur l'ensemble de la protéine
	Disorder_Long.pondr ²⁴	Longue séquence désordonnée (30 acides aminés)
	h2cd_full	Haute densité de clusters hydrophobes, protéine structurée pour l'ensemble de la séquence
	h2cd_long	Clusters hydrophobes sur une longue séquence
	Peu accessible au solvant	
	Accessibilité intermédiaire au solvant	Redondant avec l'hydrophobie/polarité
	Exposé au solvant	

Tableau A.2. Liste et définition des paramètres physico-chimiques étudiés. Les paramètres en bleu ont été conservés pour l'analyse et ceux en rouge n'ont pas été considérés car redondants avec d'autres paramètres. Informations extraites de ²⁵.

A.3.4. Protéines d'EPL déplétées après contact avec des MP

ACAC	ACS1	ACS2	ACT	ADT1	ADT2	AIM17	AIM9	APA1	ARA1
ARO1	ARP2	ARP3	ARPC2	ASNS1	ATP7	BBC1	BCA2	BFR1	CACM
CBF5	CBS	CDC48	CLH	CLU	COPA	COPB	COPB2	COPG	DCPS
DCS2	DED1	DHE2	DHYS	EDE1	EF1A	EF1G2	EF2	EF3A	EF3B
EFGM	EFTU	EIF3A	EIF3B	EIF3C	F16P	FIMB	FKBP3	FOX2	GFA1
GLT1	GLYC	GPD1	GPD2	GPDM	GSP1	GSP2	GST1	GUAA	GYS1
GYS2	HEMH	HOSC	HOSM	HS104	HSC82	HSP60	HSP78	HSP79	HSP7F
HSP82	IF2A	IF2B	IF2G	IF2P	IF4A	IF4B	IF4E	IF5	ILVB
IMB4	KAPR	KES1	KPR3	LCF1	LEUC	MAOM	MDHC	MPCP	MPG1
MSC1	NACB1	NAT1	NDI1	NEW1	NOP56	NSR1	ODO1	ODO2	ODP2
OM45	PAA1	PHSG	PIL1	PLR1	PRS10	PRS6A	PRS6B	PRS7	PRS8
PRX1	PUR1	PUR2	PUR6	PUR7	PURA	PYR1	RIR2	RIR4	RL10
RL15A	RL16B	RL18A	RL24A	RL24B	RL26A	RL26B	RL28	RL2A	RL3
RL30	RL31A	RL31B	RL32	RL33B	RL35A	RL36B	RL38	RL43A	RL44A
RL5	RL6A	RL6B	RL7A	RLA0	RLI1	RPB1	RPB2	RPN1	RPN11
RPN2	RPN3	RRP5	RS10A	RS13	RS15	RS16A	RS17A	RS19B	RS2
RS20	RS21A	RS21B	RS24A	RS26A	RS28A	RS3A1	RS3A2	RS6A	RS7A
RS7B	RSP5	RTN1	RUVB1	SC160	SEC14	SEC23	SEC24	SEC31	SFC1
SIS1	SPT16	SPT5	SPT6	SSZ1	SUB2	SYC	SYDC	SYG	SYH
SYKC	SYMC	SYRC	SYTC	SYV	SYWC	TCPB	TCPD	TCPG	TCPH
TCPQ	TCPZ	THIK	TPS2	TPS3	TREA	TRP	TSA1	TSL1	UBA1
UBP6	VATA	VATB	VATC	VATD	VATH	VPH1	VPS1	VTC4	WTM1
YAT2	YHIO	YKR18	YM71	YP225	YRA1	ZUO1			

Tableau A.3. Liste des protéines déplétées (227) suite à une mise en contact d'EPL à 0,5 g.L⁻¹ avec des MP de PE à 10 g.L⁻¹.

ACAC	ACT	AIM17	AIM9	APA1	ARP3	BBC1	CACM	CBS	CLU
COPA	COPB	COPG	DCPS	DCS2	DED1	DHYS	EDE1	EF1G2	EF3A
EF3B	EFGM	EIF3A	EIF3B	EIF3C	FIMB	FOX2	GFA1	GPD1	GPD2
GPDM	GST1	GYS1	GYS2	HOSC	HOSM	HS104	HSC82	HSP78	HSP79
HSP82	IF2B	IF2G	IF2P	ILVB	IMB4	KAPR	LEUC	MAOM	MSC1
NEW1	NOP56	NSR1	PRS6A	PRS7	PUR2	PURA	RIR2	RL24A	RL24B
RL44A	RLI1	RPB2	RPN1	RRP5	RS10A	RS15	RS17A	RUVB1	SC160
SEC14	SEC24	SPT16	SPT5	SPT6	SUB2	SYC	SYG	SYH	SYKC
SYMC	SYRC	SYTC	SYWC	TCPB	TCPQ	TCPZ	THTR	TOM70	TPS3
TREA	TRP	UBA1	UBP6	VATC	VATD	VATH	VPH1	VPS1	VTC4
YAT2	YHIO	YKR18	YM71						

Tableau A.4. Liste des protéines déplétées (104) suite à une mise en contact d'EPL à 0,5 g.L⁻¹ avec des MP de PEV à 10 g.L⁻¹.

ACAC	ACS1	ACS2	ADT1	AIM17	AIM9	APA1	ARO1	ARP2	ARP3
ATP7	BBC1	BFR1	CACM	CBS	CDC48	CLH	CLU	COPA	COPB
COPB2	COPG	DCPS	DCS2	DED1	DHE2	DHYS	EDE1	EF1A	EF1G2
EF3A	EF3B	EFGM	EFTU	EIF3A	EIF3B	EIF3C	F16P	FIMB	FKBP3
FOX2	GFA1	GLT1	GPD1	GPD2	GPDM	GSP1	GSP2	GST1	GUAA
GYS1	GYS2	HEMH	HIBCH	HOSC	HOSM	HS104	HSC82	HSP78	HSP79
HSP82	IF2A	IF2B	IF2G	IF2P	IF4A	IF4B	IF4E	ILVB	IMB4
IMDH1	JEN1	KAPR	KES1	KPR3	LCF1	LEUC	MAOM	MPG1	MSC1
NAT1	NDI1	NEW1	NOP56	NOP58	NSR1	ODO1	ODO2	ODP2	PHSG
PRS10	PRS6A	PRS6B	PRS7	PRS8	PRX1	PUR1	PUR2	PUR6	PURA
PYR1	RIR2	RIR4	RL10	RL11A	RL15A	RL18A	RL24A	RL24B	RL25
RL28	RL2A	RL32	RL35A	RL38	RL43A	RL44A	RL5	RL6A	RL6B
RL7A	RLA0	RLI1	RPA1	RPB1	RPB2	RPN1	RPN11	RPN2	RPN3
RRP5	RS10A	RS15	RS16A	RS17A	RS18A	RS2	RS21A	RS21B	RS24A
RS27A	RS3A1	RS3A2	RS4A	RS6A	RS7B	RS9A	RS9B	RSP5	RTN1
RUVB1	SC160	SEC14	SEC23	SEC24	SEC31	SFC1	SPT16	SPT5	SPT6
SSZ1	SUB2	SYC	SYDC	SYG	SYH	SYKC	SYMC	SYRC	SYTC
SYV	SYWC	TCPB	TCPD	TCPG	TCPH	TCPQ	TCPZ	THIK	TPS2
TPS3	TREA	TRP	TSA1	TSL1	UBA1	UBP6	UPP	VATB	VATC
VATD	VATH	VPH1	VPS1	VTC4	WTM1	XRN1	YAT2	YHI0	YKR18
YM71	YM94	YP225	YRA1	ZUO1					

Tableau A.5. Liste des protéines déplétées (205) suite à une mise en contact d'EPL à 0,5 g.L⁻¹ avec des MP de PP à 10 g.L⁻¹.

BFR1	EIF3B	GST1	IF2B	IF4B	LYS1	MBF1	RL24B	RL26A	RL26B
RL31A	RL31B	RL35A	RL38	RL44A	RS10A	RS15	RS17A	RS19B	RS21A
RS7A	RS7B	SPT5	THTR	TREA	UBP6	YHI0			

Tableau A.6. Liste des protéines déplétées (27) suite à une mise en contact d'EPL à 0,5 g.L⁻¹ avec des MP de PPV à 10 g.L⁻¹.

A.3.5. Protéines d'EPL déplétées spécifiquement

Nom	description	spectres PE	spectres référence
RS19B	40S ribosomal protein S19-B	3.75	10.75
RS20	40S ribosomal protein S20	6.25	14.25
RS26A	40S ribosomal protein S26-A	2.5	8
RS28A	40S ribosomal protein S28-A	1.75	4.75
RS7A	40S ribosomal protein S7-A	12.5	25.25
RL16B	60S ribosomal protein L16-B	8.5	22.75
RL26A	60S ribosomal protein L26-A	6.25	16.25
RL26B	60S ribosomal protein L26-B	6.75	16.5
RL3	60S ribosomal protein L3	16.25	36.5
RL30	60S ribosomal protein L30	5.75	12
RL31A	60S ribosomal protein L31-A	4.75	10.75
RL31B	60S ribosomal protein L31-B	4.75	10.25
RL33B	60S ribosomal protein L33-B	1.25	4.75
RL36B	60S ribosomal protein L36-B	2.5	7.25
ACT	Actin	18.75	37.75
ARPC2	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	1	5.5
ADT2	ADP,ATP carrier protein 2	11	24.5
ASNS1	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] 1	11.5	25.75
BCA2	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, cytosolic	7.5	18
ARA1	D-arabinose dehydrogenase [NAD(P)+] heavy chain	7.5	17.75
EF2	Elongation factor 2	47	99
IF5	Eukaryotic translation initiation factor 5	2	7.75
CBF5	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit CBF5	6	13.75
HSP60	Heat shock protein 60, mitochondrial	22.75	48.5
HSP7F	Heat shock protein homolog SSE1	18	37.5
MDHC	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	9.25	20
OM45	Mitochondrial outer membrane protein OM45	10.25	21.25
MPCP	Mitochondrial phosphate carrier protein	4.5	10.5
NACB1	Nascent polypeptide-associated complex subunit beta-1	3.5	7.25
PUR7	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	3.75	10.25
PAA1	Polyamine N-acetyltransferase 1	2.25	5.75
SIS1	Protein SIS1	1.75	9
PLR1	Putative pyridoxal reductase	3.75	9.25
GLYC	Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic	18.75	44.5
PIL1	Sphingolipid long chain base-responsive protein PIL1	11.25	27.25
VATA	V-type proton ATPase catalytic subunit A	29	62.25

Tableau A.7. Protéines adsorbées spécifiquement sur des MP de PE et non sur des MP de PP. Les valeurs indiquent les nombres de spectres moyens détectés par protéine suite à un contact avec le PE et dans la référence. Les protéines ribosomales sont indiquées en gras.

Nom	description	spectres PP	spectres référence
HIBCH	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	2.25	5.75
RS18A	40S ribosomal protein S18-A	5.75	12.25
RS27A	40S ribosomal protein S27-A	1	5.25
RS4A	40S ribosomal protein S4-A	18.75	40.5
RS9A	40S ribosomal protein S9-A	8	18.25
RS9B	40S ribosomal protein S9-B	8.75	18.25
XRN1	5'-3' exoribonuclease 1	0.25	4.25
RL11A	60S ribosomal protein L11-A	8	16.5
RL25	60S ribosomal protein L25	5.25	10.75
JEN1	Carboxylic acid transporter protein homolog	1.25	4.75
RPA1	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA190	1.75	6
NOP58	Nucleolar protein 58	2.75	7
IMDH1	Putative inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1	1.5	5.5
YM94	Uncharacterized protein YMR315W	5.25	11
UPP	Uracil phosphoribosyltransferase	2	5.75

Tableau A.8. Protéines adsorbées spécifiquement sur des MP de PP et non sur des MP de PE. Les valeurs indiquent les nombres de spectres moyens détectés par protéine suite à un contact avec le PP et dans la référence. Les protéines ribosomales sont indiquées en gras.

A.3.6. Paramètres déterminants dans l'adsorption des protéines d'EPL sur des MP

Paramètre	p-value
R	2.1E-08
Charge positive	2.39E-07
Structure secondaire : déstructurées (-)	5.57E-07
Structure secondaire : hélices α	6.54E-07
V	9.81E-05
C (-)	0.00016
Charge neutre (-)	0.000399
Disorder_Full.pondr	0.000399
N (-)	0.000559
Longueur	0.000833
pI	0.000833
A	0.000889
Aromatiques (-)	0.002215
S (-)	0.013129
K	0.023771
Y (-)	0.023771
Hydrophobie : polaire	0.043515

Tableau A.9. Liste des paramètres identifiés comme significativement différents entre l'ensemble des protéines détectées et les protéines adsorbées sur le PE. Les signes moins (-) indiquent que le paramètre est moins représenté dans les échantillons ayant été en contact avec les MP que dans la référence. En l'absence de précision, le paramètre est plus représenté dans les échantillons que dans la référence.

Paramètre	p-value
Longueur	1.35E-13
R	0.001549
Disorder_Full.pondr	0.014352
Structure secondaire : hélices α	0.032854
Structure secondaire : déstructurées (-)	0.032971
Charge neutre (-)	0.034581
Charge positive	0.037585
C (-)	0.041688

Tableau A.10. Liste des paramètres identifiés comme significativement différents entre l'ensemble des protéines détectées et les protéines adsorbées sur le PEV. Les signes moins (-) indiquent que le paramètre est moins représenté dans les échantillons ayant été en contact avec les MP que dans la référence. En l'absence de précision, le paramètre est plus représenté dans les échantillons que dans la référence.

Paramètre	p-value
R	6.0294E-06
Charge positive	4.62462E-05
Structure secondaire : déstructurées (-)	4.62462E-05
Longueur	4.62462E-05
Structure secondaire : hélices α	5.94707E-05
V	0.000258069
C (-)	0.001550698
Disorder_Full.pondr	0.001754168
A	0.003828327
Composition.Aromatic (-)	0.005196286
pI	0.006027147
Charge.Neutral (-)	0.010731825
N (-)	0.012014889
Y (-)	0.012014889
S (-)	0.027590105

Tableau A.11. Liste des paramètres identifiés comme significativement différents entre l'ensemble des protéines détectées et les protéines adsorbées sur le PP. Les signes moins (-) indiquent que le paramètre est moins représenté dans les échantillons ayant été en contact avec les MP que dans la référence. En l'absence de précision, le paramètre est plus représenté dans les échantillons que dans la référence.

Features	pvalue.adtest
Charge positive	8.35E-12
R	2.38E-10
pl	3.38E-08
Charge neutre (-)	8.92E-07
C (-)	1.06E-06
Polarizabilité 0.219-0.409	1.09E-06
Structure secondaire : hélices α	2.93E-06
Disorder_Full.pondr = désordre	5.62E-06
K	5.94E-06
Hydrophobie : polaire	5.94E-06
I (-)	0.000126
Hydrophobie : hydrophobe (-)	5.94E-06
Structure secondaire : feuillets (-)	0.000126
Structure secondaire : déstructurées (-)	0.000126
Longueur (-)	0.000454
Aromatiques (-)	0.003259
Polarizabilité 0.128-0.186 (-)	0.004242
N (-)	0.005834
W (-)	0.006059
Q	0.006542
M (-)	0.007265
h2cd_full = cluster hydrophobes (-)	0.01775
D (-)	0.048935
Polarizability.0-1.08 (-)	0.048935

Tableau A.12. Liste des paramètres identifiés comme significativement différents entre l'ensemble des protéines détectées et les protéines adsorbées sur le PPV. Les signes moins (-) indiquent que le paramètre est moins représenté dans les échantillons ayant été en contact avec les MP que dans la référence. En l'absence de précision, le paramètre est plus représenté dans les échantillons que dans la référence.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Everett, D. H. *Basic Principles of Colloid Science*, The Royal Society of Chemistry.; 1988.
- (2) Benoît, J.-P.; Burgot, G. *Mise En Forme Des Médicaments et Autres Produits de Santé; Médicaments et produits pharmaceutiques*; 42611; Technique de l'ingénieur.
- (3) *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>.
- (4) Verwey, E.; Overbeek, T. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids: The Interaction of Sol Particles Having an Electric Double Layer*, Elsevier Publishing Company.; New York, 1948.
- (5) Derjaguin, B.; Landau, L. Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged Particles in Solutions of Electrolytes. *Prog. Surf. Sci.* **1993**, 43 (1–4), 30–59. [https://doi.org/10.1016/0079-6816\(93\)90013-L](https://doi.org/10.1016/0079-6816(93)90013-L).
- (6) Feinberg, G. The Dispersion Theory of Dispersion Forces. *Phys. Rep.* **1989**, 180 (2), 83–157. [https://doi.org/10.1016/0370-1573\(89\)90111-7](https://doi.org/10.1016/0370-1573(89)90111-7).
- (7) Clogston, J. D.; Patri, A. K. Chapitre 6. Zeta Potential Measurement. In *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*; Methods in Molecular Biology; 2010; Vol. 697, pp 63–70.
- (8) Leja, J. *Surface Chemistry of Froth Flotation*; Springer US: Boston, MA, 1981. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7975-5>.
- (9) Farrokhpay, S. A Review of Polymeric Dispersant Stabilisation of Titania Pigment. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, 151 (1–2), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2009.07.004>.
- (10) Vincent, B. The Effect of Adsorbed Polymers on Dispersion Stability. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1974**, No. 4, 193–277.
- (11) Chubarenko, I.; Bagaev, A.; Zobkov, M.; Esiukova, E. On Some Physical and Dynamical Properties of Microplastic Particles in Marine Environment. *Mar. Pollut. Bull.* **2016**, 108 (1–2), 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.048>.
- (12) Angioletti-Uberti, S.; Ballauff, M.; Dzubiella, J. Competitive Adsorption of Multiple Proteins to Nanoparticles: The Vroman Effect Revisited. *Mol. Phys.* **2018**, 116 (21–22), 3154–3163. <https://doi.org/10.1080/00268976.2018.1467056>.
- (13) Lee, J. G.; Larive, L. L.; Valsaraj, K. T.; Bharti, B. Binding of Lignin Nanoparticles at Oil–Water Interfaces: An Ecofriendly Alternative to Oil Spill Recovery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, 10 (49), 43282–43289. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b17748>.
- (14) Al Harraq, A.; Bharti, B. Microplastics through the Lens of Colloid Science. *ACS Environ. Au* **2022**, 2 (1), 3–10. <https://doi.org/10.1021/acsenvironau.1c00016>.
- (15) 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>.
- (16) Khatmullina, L.; Chubarenko, I. Transport of Marine Microplastic Particles: Why Is It so Difficult to Predict? *Anthr. Coasts* **2019**, 2 (1), 293–305. <https://doi.org/10.1139/anc-2018-0024>.
- (17) Witzmann, T.; Ramsperger, A. F. R. M.; Wieland, S.; Laforsch, C.; Kress, H.; Fery, A.; Auernhammer, G. K. Repulsive Interactions of Eco-Corona-Covered Microplastic Particles Quantitatively Follow Modeling of Polymer Brushes. *Langmuir* **2022**.
- (18) Venel, Z.; Tabuteau, H.; Pradel, A.; Pascal, P.-Y.; Grassl, B.; El Hadri, H.; Baudrimont, M.; Gigault, J. Environmental Fate Modeling of Nanoplastics in a Salinity Gradient Using a Lab-on-a-Chip: Where Does the Nanoscale Fraction of Plastic Debris Accumulate? *Environ. Sci. Technol.* **2021**, 55 (5), 3001–3008. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07545>.
- (19) Tallec, K.; Blard, O.; González-Fernández, C.; Brotons, G.; Berchel, M.; Soudant, P.; Huvet, A.; Paul-Pont, I. Surface Functionalization Determines Behavior of Nanoplastic Solutions in Model Aquatic Environments.

- Chemosphere* **2019**, 225, 639–646. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.077>.
- (20) Grolimund, D.; Elimelech, M.; Borkovec, M. Aggregation and Deposition Kinetics of Mobile Colloidal Particles in Natural Porous Media. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2001**, 191 (1–2), 179–188. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)00773-7](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)00773-7).
- (21) Applebey, M. P. The Viscosity of Salt Solutions. *J. Chem. Soc. Trans.* **1910**, 97.
- (22) Chen, S. F.; Chan, R. C. Viscosity of Sea Water Solutions. *Desalination* **1973**.
- (23) Kooi, M.; Nes, E. H. van; Scheffer, M.; Koelmans, A. A. Ups and Downs in the Ocean: Effects of Biofouling on Vertical Transport of Microplastics. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, 51 (14), 7963–7971. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04702>.
- (24) Peng, K.; Vucetic, S.; Radivojac, P.; J Brown, C. Optimizing Long Intrinsic Disorder Predictors with Protein Evolutionary Information. *J. Bioinforma. Comput.* **2005**, 3 (1), 35–60. <https://doi.org/10.1142/S0219720005000886>.
- (25) Ismail, H.; White, C.; AL-Barakati, H. FEPS: A Tool for Feature Extraction from Protein Sequence. *Comput. Methods Predict. Post-Transl. Modif. Sites* **2022**, 65–104. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2317-6_3.



Titre : Protéines en contact avec des macro et microplastiques : devenir en solution et aux interfaces

Mots clés : microplastiques, macroplastiques, protéines, adsorption, comportement colloïdal, interfaces

Résumé : Les matériaux plastiques sont utilisés dans de nombreux domaines, y compris pour des applications où ils sont en contact avec des biomolécules. Des études récentes ont montré la présence de microplastiques dans la plupart des écosystèmes, où ils peuvent entrer en interaction avec des biomolécules. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés aux interactions entre des matériaux plastiques et un certain type de biomolécules : les protéines. Ce choix s'explique par le fait que les protéines ont été identifiées comme les principaux composants des couronnes de biomolécules entourant des nanoparticules lorsqu'elles sont en environnement biologique. Un extrait protéique de levure contenant environ six mille protéines a été sélectionné afin d'identifier les protéines sensibles et celles étant résistantes aux stress imposés par les plastiques.

Ce stress « plastique » se traduit par l'adsorption des protéines et/ou leur agrégation. L'étude de l'agitation de solutions de protéines dans des tubes en plastique a permis de proposer un mécanisme plus précis de déstabilisation des protéines par leur exposition aux interfaces air/liquide et solide/liquide. Sur des microplastiques de polyéthylène et polypropylène, choisis pour leur persistance dans l'environnement, une caractérisation de la couronne protéique a été réalisée par quantification, imagerie (par microscopie de fluorescence utilisant les radiations synchrotron) et identification des protéines adsorbées (par protéomique).

Il a également été montré que les protéines, par leur adsorption sur des microplastiques, en modifiant le comportement colloïdal, ouvrant la voie à de nombreuses applications, par exemple de dépollution ou d'études *in vivo*.

Title: Proteins in contact with macro and microplastics: fate in solution and at interfaces

Keywords : microplastics, macroplastics, proteins, adsorption, colloidal behavior, interfaces

Abstract : The plastic materials are used in various domains, including for applications where they are in contact with biomolecules. Moreover, recent studies have shown the presence of microplastics in almost all ecosystems, where they can also interact with biomolecules. In this work, we studied the interactions between plastic materials and one category of biomolecules: the proteins. This choice is explained by the fact that proteins has been identified as the main component of the biomolecule corona, surrounding nanoparticles in biological environment. A yeast protein extract, containing about six thousands of proteins has been selected to identify the sensitive proteins and the resistant ones to the imposed stresses.

This "plastic" stress results in the adsorption or aggregation of proteins. The effect of the protein solution agitation in plastic vials allowed the proposition of a protein destabilization mechanism in solution and at the air/liquid and solid/liquid interfaces.

On polyethylene and polypropylene microplastics, chosen for their persistence in the environment, a protein corona characterization has been realized by quantification, imaging (by fluorescence microscopy using synchrotron radiation) and identification (by proteomic) of the adsorbed proteins. It has been shown that protein, by their adsorption on microplastics, modify their colloidal behavior, paving the way to various applications, such as depollution or *in vivo* studies.