République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE DE MEDEA

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

Mémoire de Fin d'Etudes pour l'obtention du diplôme de Master en
Génie des Procédés

Spécialité : **Procédés Pharmaceutiques**

THEME

Etude théorique de l'Adsorption des protéines sur les nanomatériaux : Compréhension et application

Dirigé par :
Pr. HANINI Salah

Co-Dirigé par :
Dr. KHAOUANE Latifa

Etudié par :
M^lle^ CHABRI Zoubeyda
M^lle^ HAMLA Faiza

2013 - 2014

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mon cher père,

Ma chère mère,

Tous mes frères,

Toutes mes sœurs,

Toute la famille Hamla,

Tous mes amis sans exception,

Ma promotion de master,

Ma binôme : Chabri Zoubyda

Faiza

Dédicace

Je dédie ce travail à :

L'esprit de ma Chère Mère

Mon cher père et ma belle-mère

Tous mes frères

Toutes mes sœurs

Ma binôme Faiza

Tous mes amis chère Hakima et Naima

Tous les amis, en particulier Ahmed

Toute la famille CHABRI

Ma promotion de master

Zoubeyda

Remerciement

Au terme de ce mémoire nous tenons à remercier tout naturellement en premier lieu **ALLAH** le tout puissant qui nous adonné la force, le courage et la patience de bien mener ce travail.

Un hommage particulier ou promoteur de cette étude le Pr. Salah HANINI qu'il trouve ainsi l'expression de notre profonde reconnaissance pour sa compétence, ses encouragements et ses précieux conseils durant le déroulement de ce travail.

Nos sincères remerciements vont aussi à notre co-promotrice Dr. Latifa KHAOUANE, pour ces aides et encouragements.

Nos plus vifs remerciements vont également à Messieurs les membres jury.

Nos sentiments vont également à toutes les personnes qui ont contribué de prés ou de lion à la réalisation de ce travail.

ملخص : امتزاز البروتين على النانو مواد

الهدف من هذه الدراسة هو وصف اشمل طريقة ممكنة لهيكل وديناميك ونشاط البروتين المكثف مع تحديد امكانية الية للامتزاز ومراعاة مختلف المناهج والنماذج لشرح التفاعلات مابين البروتين وسطح المادة المكونة للنانو.

تعتبر ظاهرة إمتزاز البروتين على النانو مواد ظاهرة كميائية وفيزيائية تعتمد على ثلاثة عناصر أولها البروتين والذي يعتبر المادة الأساسية في عملية الإمتزاز والذي يمكن القول انه المادة الممتصة. وكذا عملية الإمتزاز هي عملية أساسية تقوم عليها هذه الظاهرة وثالثا المواد النانوية وهي المواد الدقيقة ذات الحدود اللامتناهية في الصغر والدقة كما يمكن القول على هذه المواد النانوية بالمواد الماصة. و أهم العوامل التي تؤثر على ظاهرة الامتزازهي نوعية البروتين و خاصية مساحة السطح و درجة الحرارة و كتلة الإمتصاص و إختلاف المواد النانو

الكلمات المفتاحية: الامتزاز, البروتين, النانو مواد.

Résumé : L'adsorption des protéines sur les nanomatériaux

L'objectif de cette étude est donc de caractériser de la façon la plus complète possible la structure, la dynamique et l'activité d'une protéine adsorbée est de déterminer quels mécanismes permis son adsorption, ainsi les différentes approches et modèles pour expliquer les interactions entres protéines et surface nanométrique.

L'adsorption des protéines sur les nanomatériaux se considère comme un phénomène chimique-physique. D'un coté l'adsorption se base sur trois éléments très essentiels, d'abord les protéines est la matière indispensable dans l'opération de l'adsorption, cet élément on peut le considérer comme une Substance «adsorbat». En suite, l'adsorption est l'opération la plus importante de se déroulement de ce phénomène. En fin, les nanomatériaux sont des substances minimes qui ont des limites infinis précision, donc on peut les nommés des «adsorbant». D'un autre coté, les principaux facteurs qui influencent sur le phénomène sont : Le type des protéines, la surface spécifique et les type de nanomatériaux.

Mots clés : Adsorption, protéines, nanomatériaux.

Abstract: Protein adsorption onto nonmaterials

The objective of this study is to characterize the most comprehensive way possible the structure, dynamics and activity of adsorbed protein is to determine its adsorption mechanism enabled, and the various approaches and models to explain interactions entered proteins and nanoscale surface.

Protein adsorption on nanomaterials is considered a chemical-physical phenomenon. On the one hand the adsorption is based on three very essential elements, first the protein is the essential material in the adsorption operation, and this element can be considered as a substance "adsorbate". As a result, adsorption is the most important operation to progress of the phenomenon. In the end, nanomaterials are substances that have minimal limits infinite precision so they can be named the "adsorbent". On the other hand, the main factors that influence the phenomenon are: The type of protein, the specific surface area and the type of nanomaterials.

Keywords: Adsorption, Protein, Nonmaterial.

Sommaire

Sommaire……i
Liste des abréviations……iii
Nomenclature……iv
Liste des figures……v
Liste des tableaux……vii

INRODUCTION GENERALE……1
I. ADSORPTION
I.1. Introduction……2
I.2. Définition……3
I.3. Type d'adsorption……4
I.4. Description du mécanisme d'adsorption……5
I.5. Adsorbants……6
I.5.1. Porosité et surface spécifique……6
I.5.2. Principaux type d'adsorbants……7
I.5.2.1. Charbon actif……7
I.5.2.2. Alumines activées……8
I.5.2.3. Gels de silices……8
I.6. Modélisation de la cinétique de l'adsorption……8
I.7. Facteurs influençant l'adsorption……11
I.8. Isothermes d'adsorption……12
I.9. Classification des isothermes d'adsorption……13
I.9.1. Modélisation de l'équilibre d'adsorption……16
I.10. Utilisations de l'adsorption……17
Conclusion……18

II. PROTEINES
II.1. Introduction……19
II.2. Définition……19
II.3. Fonctions des protéines……20
II.4.Types de protéines……20
II.4.1. Protéines complètes……20
II.4.2. Protéines incomplètes……20
II.5. Fabrication des protéines……20
II.6. Structure des protéines……22
II.6.1. Acides aminés et liaison peptidique……22
II.6.1.1. Acides aminés……22
II.6.1.2. La liaison peptidique……23
II.6.2. Structure primaire ……24
II.6.3. Structure tridimensionnelle des protéines……25
II.6.3.1. Structure secondaire……25
II.6.3.2. Structures tertiaire ……26
II.6.3.3. Structures quaternaire……27
II.7. Classification des protéines……27
II.8. Rôles physiologiques……28
II.8.1. Protéines fibreuses……29
II.8.1.1. Le collagène……29
II.8.1.2. La kératine……29
II.8.1.3. Le fibrinogène……29
II.8.2. Protéines globulaires……30
II.8.2.1. La catalyse……30
II.8.2.2. La transport……30
II.8.3. La régulation du pH……30
II.8.4. La régulation du métabolisme……30
II.8.5. La défense de l'organisme……30
II.9. Propriétés des protéines……31
II.9.1. Propriétés physico-chimiques……31
II.9.2. Solubilité des protéines……32

II.9.3. Propriétés électriques……...32
II.10. Le repliement des protéines……..33
Conclusion……..34

III. NANOMATERIAUX
III.1. Introduction……...35
III.2. Historique……..35
III.3. Définition……...36
III.4. Echelles……..37
III.5. Structure et classification de nanomatériaux…… 38
III.6.Type des nanomatériaux……39
III.7. Propriétés des nanomatériaux……...41
III.8. Morphologies de nanomatériaux actuellement étudiés ou exploités……43
III.9. Procèdes de fabrication de nano-objets et de nanomatériaux……...44
III.9.1. Procédés par voie physique……45
III.9.2. Procédés par voie chimique……46
III.9.3. Procédés par voie mécanique……47
III.10. Utilisation……48
Conclusion…… 49

IV. ADSORPTION DE PROTEINE SUR NANOMATERIAUX
IV.1. Pourquoi étudier l'adsorption des protéines sur les surfaces?.....50
IV.1.1. Les premières études……..50
IV.1.2. De nouvelles questions sur les nanomatériaux : quelle toxicité?……...51
IV.1.3. Mécanisme de toxicité intracellulaire ……52
IV.1.4. Un risque de toxicité par adsorption des protéines ……53
IV.2. Les modèles d'adsorption des protéines……55
IV.3. Choix des protéines et des nanomatériaux étudié……60
IV.4. Caractérisation des nanomatériaux……62
IV.4.1. Quelle critères pour caractériser les nanomatériaux……...62
IV.4.2. Nanoparticules de silice ……65
IV.4.2.1. Chimie de la silice colloïdale……..65
IV.5. Mécanismes d'adsorption des protéines ……...66
IV.5.1. Isothermes d'adsorption……..67
IV.5.2. Modèles d'isothermes appliqués à l'adsorption des protéines……....71
IV.5.3. Caractérisation de l'adsorption des protéines sur la silice nanostructurée ……....73
IV.5.3.1 Effet du matériau……..74
IV.5.3.2 Effet de la protéine……...75
IV.5.3.3 Effet du pH et du tampon……75
IV.6. Energie d'adsorption de la myoglobine sur les nanoparticules de Silice……..76
IV.7. Echelle d'affinité des protéines pour les nanoparticules de silice……77
IV.7.1 Compétition entre hémoglobine et sérum albumine……....77
IV.7.2 Adsorption de protéines à partir d'un extrait cellulaire de levure……..78
IV.8.Critères structuraux d'adsorption des protéines de levure sur les nanoparticules de silice……78
IV.8.1 Analyse statistique de la séquence primaire……79
IV.8.2 Flexibilité des protéines adsorbées et non adsorbées ……80
IV.9. Structure des protéines adsorbées……....80
IV.9.1.Surface occupée par la myoglobine et l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice……81
IV.9.2. Structure secondaire des protéines adsorbées sur la silice……83
IV.9.2.1 Hémoglobine et nanoparticules de silice 20 nm……...84
IV.10. Dynamique des protéines adsorbées……86
Conclusion générale ……....89

Références bibliographique

Liste des abréviations

ADN	**A**cide **d**ésoxyribo**n**ucléique
ARNm	**A**cide **r**ibonucléique **m**essager
ARN	**A**cide **r**ibo**n**ucléique
ApoMb	**A**pomyoglobine
BSA	**S**érum **A**lbumine **B**ovine
C_{60}	une nanosphère de carbone
CO	Monoxyde de **c**arbone
CPG	**C**ontrolled **P**ore **G**lass
CVD	**C**hemical **V**apor **D**eposition
Hb	**H**ymoglobine
IEF	**I**soElectroFocalisation
INRS	**I**nstitut **N**ational de **R**echerche en **S**écurité
ISO	**I**nternational **S**tandardisation **O**rganisation
Mb	**M**yoglobine
NP	**N**anoparticules
NTC	**N**ano **T**ube de **C**arbone
PDM	**P**ore **D**iffusion **M**odel
PI	**P**oint **I**soélectrique
PLD	**P**ulsed **L**aser **D**eposition
PVD	**P**hysical **V**apor **D**eposition
R	**R**ayon de giration de la protéine, (…)
SDS	**S**odium **D**odécyl **S**ulfate
UICPA	**U**nion **I**nternationale de **C**himie **P**ure et Appliquée
UV	**U**ltra**v**iolet

Nomenclature

C	Concentration en protéine libre à l'équilibre *(mol/l)*
C_0	Concentration initiale de l'adsorbat *(mg l^{-1})*
C_e	Concentration à l'équilibre de l'adsorbat *(mg l^{-1})*
k_1	Constante de vitesse d'adsorption pour le premier ordre *(min^{-1})*
k_2	Constante de vitesse d'adsorption pour le pseudo second ordre *(g mol^{-1} min^{-1})*
K_f	Constante de Freundlich caractéristiques de l'efficacité d'un adsorbant donné vis-à-vis d'un soluté donné (-)
K_{ads}	Constante d'adsorption du modèle *(l/mol)*
K_{int}	Constante de la diffusion intraparticule en *(mg g^{-1} $min^{-1/2}$)*
m	Masse d'absorbant *(g)*
m_{ads}	Masse d'adsorption *(mg/m^2)*
n_{ads}	Quantité de protéine adsorbée par gramme de solide *(mol/g_{NP})*
n_∞	Quantité maximale de protéine adsorbée par gramme de solide *(-)*
pH	Potentiel Hydrogène *(-)*
q_e	Quantité d'adsorbat à l'équilibre par gramme d'adsorbant *(mg g^{-1})*
q_t	Quantité adsorbée *(mg g^{-1})*
Q	Quantité adsorbée par gramme du solide *(-)*
t	Temps de contact *(min)*
T	Température *(ºC)*
V	Volume de la solution *(l)*

Liste des figures

Fig. I.1: Schéma du mécanisme de transport d'un adsorbat au sein d'un grain du solide……...6

Fig. I.2: Classification des isothermes d'adsorption…….....14

Fig. II.1: Procédé général de la synthèse d'une protéine**.** À gauche, on trouve l'illustration des mécanismes de synthèse à travers les différentes localisations cellulaires dans une cellule eucaryote. À droite, on voit l'évolution de la séquence d'ADN d'un gène à la séquence d'acides aminés d'une protéine, lors de la traduction et de la transcription …….....22

Fig. II.2: La Structure d'acide amine…….22

Fig. II.3: Diagramme de Venn regroupant les acides aminés en fonction de leurs propriétés physicochimiques……23

Fig. II.4: Formation d'une liaison peptidique…….24

Fig. II.5: Structures secondaires formées par la chaîne polypeptidique……26

Fig. II.6: Niveaux d'organisation structurale des protéines……...27

Fig. II.7: Organisation structurale de la triple hélice du collagène……29

Fig. II.8: Immunoglobuline avec 2 sites de fixation de l'antigène.....31

Fig. II.9: Dénaturation réversible et irréversible d'une protéine……...32

Fig. III.1: extrait du dossier les nanomatériaux de l'INRS……37

Fig. III.2: Différentes classe des nanomatériaux……...39

Fig. III.3: Résonance des plasmon localisé……...42

Fig. III.4: Nanoparticule excitée par une onde électromagnétique ; polarisation de la nanoparticule……..42

Fig. III.5: Evolution du pourcentage d'atomes situés en surface en fonction du nombre d'atomes constituant la nanoparticule……...43

Fig. III.6: Approche ascendante et approche descendante……45

Fig. IV.1: Image par microscopie électronique à transmission d'un macrophage après exposition à des nanoparticules d'argent recouvertes d'un peptide……..52

Fig. IV.2: Toxicité potentielle due à l'interaction directe entre protéine et nanoparticule……53

Fig. IV.3: Adsorption d'un polymère flexible sur une surface par plusieurs points d'ancrape……55

Fig. IV.4: Exemple de silice amorphe micro et nanostructurées, biogénique et synthétique crustules diatomées……...61

Fig. IV.5: Principaux paramètres influençant la solubilité de la silice dans l'eau……66

Fig. IV.6: Photographie de solutions contenant hémoglobine (50 µM) et nanoparticules de silise 20 nm en tampon Tris-HCl 100 mM à pH 9 (en haut) et BisTris-HCl 100 mM à pH6 (en bas) après centrifugation……...67

Fig. IV.7: Photographie d'une solution de myoglobine libre (C_{Mb}=40µM) (à droite) et en présence de silice nanoporeuse CPG 8nm (m=150mg) (à gauche) en tampon Phosphate 100mM à pH 7,4 après décantation des particules……...68

Fig. IV.8: Pourcentage d'hémoglobine adsorbée (C_{MB} = 3,8 µM) sur les nanoparticules de silice 7 nm en fonction de la concentration en NP et du temps de contact……..69

Fig. IV.9: Isothermes d'adsorption de l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice 20 nm……..70

Fig. IV.10: Isothermes d'adsorption de la myoglobine sur la silice nanoporeuse CPG 8 nm en tampon 100 mM BisTris-HCl à pH 6) et Phosphate à pH 7,4……70

Fig. IV.11: Isothermes d'adsorption de l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice 20nm……..71

Fig. IV.12: Schéma de l'adsorption de molécules sur une surface plane……72

Fig. IV.13: Isothermes d'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice 20 nm en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 pour différentes concentrations initiales en BSA….....77

Fig. IV.14: Ecart entre la valeur moyenne de chacun des 432 critères testés par le programme Profeat entre protéines de levure adsorbées et non adsorbées (%)…….....79

Fig. IV.15: Surface occupée par la myoglobine sur les nanoparticules de silice 20 nm à pH 6 : (a) surface théorique occupée par une molécule de myoglobine native et dénaturée en solution (S_{calc}) comparée à la surface estimée à partir des isothermes d'adsorption si la surface est homogène et entièrement recouverte par la myoglobine ($S_{estimée}$), (b) hypothèses d'hétérogénéité de la surface et/ou d'étalement de la protéine adsorbée permettant d'expliquer la grande surface estimée……82

Fig. IV.16: Spectres de dichroïsme circulaire de l'hémoglobine (C_{Hb} = 10 µM) en tampons 10 mM BisTris-HCl à pH 6 (a), Phosphate à pH 7,4 (b) et Tris-HCl à pH 8,7 (c) : Hb sans NP (en bleu) et en présence de NP de silice 20 nm à une concentration de 2 mg/ml (en vert), 4 mg/ml (en orange) et 6 mg/ml (en rouge). L'hémoglobine est partiellement à totalement adsorbée à pH 6 et pH 7,4 et non adsorbée à pH 8,7 ……...85

Fig. IV.17: Principales échelle de temps et d'espace de la dynamique des protéines….....87

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Distinction entre l'adsorption physique et chimique……5

Tableau. I.2 : Caractéristiques des principaux adsorbants indus……...7

Tableau. III.1: les principaux secteurs d'activités dans lesquels on retrouve les nanomatériaux……46

Tableau. IV.1: conditions d'adsorption des protéines sur la surface selon le modèle de Norde en fonction de la stabilité structurale de la protéine (protéine ″dure″, protéine ″molle″), de son point isoélectrique (charge global de la protéine), de la charge et de l'hydrophobicité de la surface. Prédiction de l'adsorption (A) ou du non adsorption (NA) de la protéine sur la surface……..54

Tableau. IV.2: Liste des critères de caractérisation des nanomatériaux définie par l'OCDE……60

Tableau. IV.3: Modèles d'isothermes à deux paramètres étudiés et expression mathématique pour une concentration massique en molécule adsorbée……..69

Tableau. IV.4: Caractéristiques de l'adsorption de la myoglobine, l'apomyoglobine, l'hémoglobine et le sérum albumine sur la silice nanostructurée dans différentes conditions de pH et de tampon 100 Mm à 25°C. L'isotherme d'adsorption de l'apomyoglobine, instable à température ambiante, a été mesurée à 4°C…….....70

Tableau. IV.5: Pourcentages d'augmentation des interactions des protéines non adsorbées par rapport aux protéines adsorbées calculés à partir des structures 3D de10 protéines adsorbées et 10 protéines non adsorbées……77

Tableau. IV.6: Comparaison à partir de la littérature de la structure secondaire de l'hémoglobine (% de structure) déterminées par spectroscopie infrarouge, dichroïsme circulaire et cristallographie des rayons X …….....80

Tableau. IV.7: Comparaison à partir de la littérature de la structure secondaire de la myoglobine (% de structure) déterminées par spectroscopie infrarouge, dichroïsme circulaire et cristallographie des rayons X ……80

Tableau. IV.8: Pourcentage d'hémoglobine adsorbée sur les nanoparticules de silice 20 nm en fonction de la concentration en NP et du pH de la solution en tampon 10 mM BisTris-HCl à pH 6, Phosphate à pH 7,4 et Tris-HCl à pH 8,7 pour une concentration en hémoglobine de 10 µM……81

Notre modeste travail va se baser sur le thème suivant «l'adsorption des protéines sur les nanomatériaux», il traitera aussi le coté physique et chimique de ce phénomène.

En premier lieu, le présent travail est entamé par une précision de l'objectif de cette étude et par une caractérisation de la façon complète et possible de la structure, de la dynamique et de l'activité d'une protéine adsorbée et de déterminer quels mécanismes permis son adsorption. Ensuite, on entamera les différentes approches et modèles pour expliquer les interactions entre protéines et surface nanométrique.

Par ailleurs, on essayera de définir et de clarifier brièvement la notion de l'adsorption qui est un phénomène d'interface pouvant se manifester entre un solide et un gaz et entre un solide et un liquide. Aussi, il peut se définir comme un phénomène physico-chimique se traduisant par une modification de la concentration à l'interface de deux phases non miscible (liquide, solide) on perlera donc de couple (adsorbat/adsorbant) ainsi, le mécanisme de l'adsorption se déroule par la diffusion.

En second lieu, on citera l'importance des protéines qui sont considérées comme la base principale de cette étude. Ces protéines constituent l'élément de base de toutes cellules vivantes, elles représentent la seule source d'azote, et l'élément indispensable à la vie.

Les protéines sont des macromolécules de type polymère et une substance qui adsorbé sur les nanomatériaux, le nanomère étant l'acide animé.

De même, on parlera de la Nanotechnologie «terme générique» qui décrit des applications dans nombreux domaines scientifiques mais recouvre d'une manière générale la recherche sur les principes et propriétés existant à l'échelle nanométrique c'est-à-dire au niveau des atomes et des molécules. L'objectif des nanotechnologies consiste à produire des objets aux matériaux inferieurs à 100 nanomètres. Les nanomatériaux dans cette étude représentent la surface adsorbant.

En dernier lieu, le présent travail est fini par une étude de l'adsorption des protéines sur la silice nanostructuré. Les protéines utilisées dans cette étude sont : les pomyoglobine , la sérume albumine et myoglobine ,[Devineau (2013)].

Ainsi, les modèles employés le plus couramment pour décrire l'adsorption des protéines sur une surface sont : le modèle de Langmuir, L'isotherme de Freundlich, modèle de Temkin-Pyzhev et la Dynamique des protéines adsorbées.

Pour ce faire, le présent travail a été divisé en quatre chapitres :

- **Le chapitre I : l'adsorption.**
- **Le chapitre II : les protéines.**
- **Le chapitre III : les nanomatériaux.**
- **Le chapitre IV : l'adsorption des protéines sur les nanomatériaux.**

Enfin une conclusion générale qui rassemble la synthèse du mémoire.

I.1. Introduction

Les molécules, ions ou atomes formant la surface d'un solide sont soumis à des forces dissymétriques qui se traduisent par un champ de force attractif. Ce champ a une portée limitée de l'ordre de 1Aº, mais il est suffisant pour attirer les molécules de gaz ou de liquide situées au voisinage immédiat de l'interface. Ce sont ces forces qui provoquent la fixation des molécules à la surface. Ce phénomène est appelé adsorption.

L'adsorption est le processus où des molécules d'une espèce appelée adsorbat (gaz ou liquide) viennent se fixer sur la surface d'un solide, appelé adsorbant. L'adsorption peut être physique ou chimique selon la nature des interactions qui se produisent entre l'adsorbat et la surface de l'adsorbant. L'énergie d'adsorption est supérieure à 80 $kJ.mol^{-1}$: la désorption est difficile. L'adsorption physique peut se faire en monocouche ou multicouches, alors que l'adsorption chimique est uniquement mono-moléculaire. De manière générale, l'adsorption est un phénomène exothermique qui se produit avec un dégagement de chaleur ce qui peut conduire à un échauffement du solide. Le mécanisme du transport d'un adsorbat au sein d'un grain du solide est diffusion externe; diffusion interne (dans les pores); migration en surface et les facteurs influençant l'adsorbant...etc.

I.2. Définition

Plusieurs définitions ont été données par divers auteurs, les plus usuels parmi celles -ci sont:

L'adsorption est un phénomène d'interface, pouvant se manifester entre un solide et un gaz ou entre un solide et un liquide, [Edeline (1992)].

L'adsorption est un phénomène physico-chimique se traduisant par une modification de la concentration à l'interface de deux phases non miscibles: (liquide/solide) ou (gaz/solide), on parlera donc du couples (adsorbat/adsorbant), [Robel (1989)].

L'adsorption est un phénomène de surface, qui est à distinguer de l'absorption qui est un phénomène de profondeur. Le terme surface doit s'étendre à la totalité des surfaces externe et interne, engendrée par les fissures, cavernes ou capillaires, [Robel (1989)].

L'adsorption peut aussi être définie comme étant une opération physique de séparation des mélanges, celle-ci permet une élimination d'une substance par une autre de la phase gazeuse ou liquide, dans laquelle elle se trouve, [Jelly et al. (1997)]. Le solide est appelé adsorbant et la substance qui s'adsorbe est l'adsorbat qui est appelée plus couramment soluté afin d'éviter toute confusion avec l'adsorbant.

I.3. Type d'adsorption

Selon les catégories des forces attractives, l'énergie et la nature des liaisons mises en jeu, on peut distinguer deux types d'adsorption: l'adsorption physique et l'adsorption chimique.

- ***Adsorption physique***

Contrairement à la chimisorption, l'adsorption physique se produit à des températures basses. Les molécules s'adsorbent sur plusieurs couches (multicouches) avec des chaleurs d'adsorption souvent inférieures à 20 Kcal/mole, [Wiley et Sons (1985), Weber et al. (1991), Ferro-Garcia et al. (1998), Calvet et al. (1980)]. Les interactions entre les molécules du soluté (adsorbât) et la surface du solide (adsorbant) sont assurées par des forces électrostatiques type dipôles, liaison hydrogène ou Van der Waals [Khan (1980), Senesi (1989)]. La physisorption est rapide, réversible et n'entraînant pas de modification des molécules adsorbées. La distinction entre les deux types d'adsorption n'est pas toujours facile. En effet, les énergies mises en jeu dans les physisorptions fortes rejoignent celles qui interviennent dans les chimisorptions faibles.

- ***Adsorption chimique***

Elle met en jeu une ou plusieurs liaisons chimiques covalentes ou ioniques entre l'adsorbât et l'adsorbant. La chimisorption est généralement irréversible, produisant une modification des molécules adsorbées. Ces dernières ne peuvent pas être accumulées sur plus d'une monocouche. Seules sont concernées par ce type d'adsorption, les molécules directement liées au solide, [Calvet (1980)]. La chaleur d'adsorption, relativement élevée, est comprise entre 20 et 200 Kcal/mol

{[Montgomery (1985)], [Weber (1991)], [Ferro (1998)], [Calvet (1980)]}. La distance entre la surface et la molécule adsorbée est plus courte que dans le cas de la physisorption. Le tableau 1, regroupe quelques critères de distinction entre l'adsorption physique et chimique.

Tableau I.1. Distinction entre l'adsorption physique et chimique, [Chitour (2000)].

Propriétés	Adsorption physique	Adsorption chimique
Température du processus	Relativement basse	Plus élevé
Chaleur d'adsorption	5kcal/mol environ	10kcal/mol environ
Liaisons	Physique : Wan der Waals	Chimiques
Cinétique	Rapide, réversible	Lente, irréversible
Spécificité	Processus non spécifique	Processus très spécifique
Désorption	Facile	Difficile
Couches formées	Mono ou multicouche	Uniquement monocouches

I.4. Description du mécanisme d'adsorption

A chaque fois qu'un gaz ou un liquide est en contact avec un solide ; celui-ci est retenu par les atomes superficiels du solide et ce concentre à sa surface. Ce processus se déroule en trois étapes :

- Diffusion externe : elle correspond au transfert du soluté (molécules de la phase liquide) de sein de la solution à la surface externe des particules. le transfert de matière externe dépend des conditions hydrodynamiques de l'écoulement d'un fluide dans un lit d'adsorbant.
- Diffusion interne : les particules de fluide pénètrent à l'intérieur des pores. elle dépend du gradient de concentration du soluté.
- Diffusion de surface : elle correspond à la fixation des molécules sur la surface des pores.

Le mécanisme du transport d'un adsorbat au sein du solide est donné par la figure1.

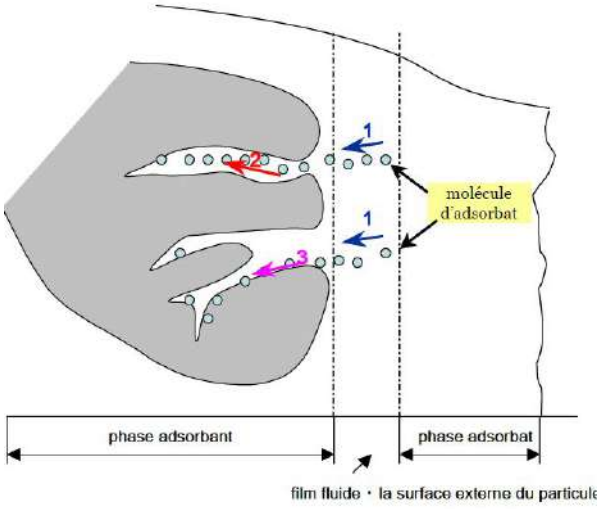


Figure I.1. Schéma du mécanisme de transport d'un adsorbat au sein d'un grain du solide:
1– diffusion externe ; **2**– diffusion interne (dans les pores) ; **3**– diffusion de surface.

I.5. Adsorbants

Un bon adsorbant doit avoir les qualités suivantes :

- Une haute capacité d'adsorption,
- Une grande efficacité pour adsorber des substances de faibles concentrations,
- Une sélectivité élevée,
- Une aptitude à être facilement régénéré et utilisé de nouveau,
- Une grande inertie chimique,
- Un prix peu élevé.

Les capacités d'adsorption particulièrement élevées des adsorbants sont en partie liées à leur structure poreuse très développée et leur grande surface spécifique.

I.5.1. Porosité et surface spécifique

- ***Porosité***

La classification d'U.I.C.P.A.définit trois types de porosité :

- les pores de largeur excédant 50 nm appelés macropores ;
- les pores de largeur comprise entre 2 et 50 nm appelés mesopores ;
- les pores de largeur inférieure à 2 nm appelés micropores (ou nanopores).

La présence de micropores dans un adsorbant a pour effet d'augmenter considérablement sa capacité d'adsorption. de plus ,le recouvrement des champs de force généré par les parois des nanopores conduit à une augmentation du potentiel d'adsorption à l'intérieur de ces cavités.par

conséquent ,l'adsorption dans les nanopores est beaucoup plus grande que sur la surface des mesopores. L'adsorption sur la surface des macropores est souvent négligeable par rapport à celle dans les nano et mesopores.

- ***Surface spécifique***

Par définition, la surface spécifique d'un adsorbant est une surface par unité de masse. Elle est généralement exprimée en m^2/g.son estimation est conventionnellement fondée sur des mesures de la capacité d'adsorption de l'adsorbant en question, correspondant à un adsorbat donné ; la molécule adsorbée doit avoir une surface connue et acceptable. Il suffit à cet effet, de déterminer la valeur de la capacité de la monocouche à partir de l'isotherme d'adsorption.

I.5.2. Principaux type d'adsorbants

Les Principaux adsorbants employés dans l'industrie sont les charbons actifs, les zéolithes, les gels de silices et les alumines activées dont les caractéristiques sont récapitulées dans le tableau. **Tableau I.2.** Caractéristiques des principaux adsorbants industriels, [Sun et Meunier.2007].

Adsorbants	**Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)**	**Taille des pores (nm)**	**Porosité interne (---)**
Charbon actif	400 à 2000	1.0 à 4.0	0.4 à 0.8
Zéolites	500 à 800	0.3 à 0.8	0.3 à 0.4
Gels de silices	600 à 800	2.0 à 5.0	0.4 à 0.5
Alumines activées	200 à 400	1.0 à 6.0	0.3 à 0.6

I.5.2.1. Charbon actif

Les charbons actifs ont une caractéristique essentielle qu'est l'existence d'un réseau très développé de micropores, lesquels sont à l'origine de leur pouvoir adsorbant très important. Par conséquent, ces derniers constituent les adsorbants les plus fabriqués et les plus utilisés Industriellement.

Les charbons actifs sont des adsorbants non spécifique ou très peu spécifiques avec une structure poreuse bien développée formée majoritairement par des micropores et des mésopores de différents diamètres.

La surface spécifique des charbons actifs est bien développée, elle est en générale supérieure à 1000 m^2/g, ce qui contribue à une grande capacité d'adsorption. Cette surface spécifique dépend du matériau de base, de la méthode d'activation et de la densité.

I.5.2.2. Alumines activées

Les Alumines activées sont obtenue par la thermolyse flash du trihydroxyde d'aluminium $Al(OH)_3$ qui conduit a un produit de composition approximative de Al_2O_3, *0,5* H_2O, possèdent une structure poreuse résultant de départ de molécules d'eau.la surface des pores est couverte de groupements *Al-OH*, et l'adsorption se fait préférentiellement par liaison hydrogène. Les Alumines activées sont des adsorbants amorphes, moyennement polaires et hydrophiles.

I.5.2.3. Gels de silices

Le gel de silice est un polymère d'acide silicique préparé à partir des silicates de sodium. L'intérieure de chaque grain de silice est composé d'atomes de silicium reliés entre eux par des atomes d'oxygène. En surface, il reste des groupements *Si-OH* qui est responsables de la très forte polarité du gel de silice.

La présence de groupements hydroxyles confère une polarité à la surface ce qui fait que les molécules polaires telles que l'eau, les alcools, les phénols et les amines sont adsorbés préférentiellement par rapport aux molécules non polaires.

Les grains de gel de silice sont poreux et la taille des pores dépend fortement de la méthode De préparation utilisée. La structure du gel de silice possède une surface spécifique d'environ 300 à 800 m²/g, [Marsteau (2005)]. Sa surface interne se répartit en un nombre infini des pores microscopiques qui lui permettent d'adsorber jusqu'à 36% de son poids sans modification structurelle.

Le gel de silice est principalement utilisé comme phase stationnaire pour la chromatographie en phase liquide, il peut également être utilisé comme desséchant ou comme réactif.

I.6. Modélisation de la cinétique de l'adsorption

L'étude cinétique des processus d'adsorption fournit des informations relatives au mécanisme d'adsorption et sur le mode de transfert des solutés de la phase liquide à la phase solide. A l'instar des équilibres d'adsorption, la cinétique d'adsorption d'un matériau peut être modalisée. A cet effet, la littérature rapporte un certain nombre de modèles cinétique d'adsorption dépendants de la nature et de la complexité du matériau adsorbant. Trois cas de peuvent se présenter :

- ✓ le matériau solide adsorbant est non poreux et il aura adsorption rapide sur les surfaces qui sont directement accessibles.

- ✓ le matériau adsorbant est poreux et les surfaces adsorbants ne sont pas toutes également accessibles. La vitesse d'adsorption dépend de l'adsorption proprement dite et de la vitesse de diffusion dans les espaces poreux.
- ✓ le matériau poreux est complexe avec présence de pores de tailles différentes (micro- meso- macropores) ; la vitesse d'adsorption dépendra de plusieurs phénomènes dont la diffusion dans les micropores et la convection dispersion dans les méso et macrospores.

Permis les modèles de cinétique d'adsorption il ya basés sur :

1. Modèles bases sur la composition des milieux

a) Modèle de la cinétique du pseudo premier ordre

Il a été supposé que dans ce modèle la vitesse de sorption à instant t est proportionnelle à la déférence entre la quantité adsorbée à l'équilibre, q_c et la quantité q_t adsorbée à cet instant et que l'adsorption est réversible, [Calvet (2003)].

La constante de vitesse d'adsorption du premier ordre est déduite à partir du modèle établi par lagergreen, [Allen (1989)]. La loi de vitesse s'écrit :

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad (1)$$

Avec :

q_e: la quantité d'adsorbat à l'équilibre par gramme d'adsorbant *(mg g^{-1});*

t : le temps de contact *(min) ;*

k_1: la constante de vitesse d'adsorption pour le premier ordre *(g $mol^{-1}min^{-1}$)*;

L'intégration de l'équation donne :

$$Log(q_e - q_t) = logq_e - \frac{k_1}{2.303}t \quad (2)$$

*b) **Modèle de la cinétique du pseudo-second ordre***

L'équation du pseudo-second ordre est souvent utilisé avec pour décrire la cinétique de la réaction de fixation des polluants sur l'adsorbant, [Mckay (1998)]. Ce modèle du pseudo second ordre permet de caractériser la cinétique d'adsorption en prenant en compte à la fois le cas d'une fixation lente sur les sites d'énergie faible.

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad (3)$$

L'intégration de l'équation (4) donne :

$$t/q_t = 1/k_2 q_e^2 + t/q_e \quad (4)$$

avec :

k_2 : la constante de vitesse d'adsorption pour le modèle pseudo-second ordre *(g mol^{-1}min^{-1}) ;*

q_e : la quantité d'adsorbat à l'équilibre par gramme d'adsorbant *(mg g^{-1}) ;*

La quantité d'adsorption à l'équilibre (q_e) et la constante du pseudo seconde ordre taux k_2 peuvent être déterminées expérimentalement à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine de

t / q_t en fonction de *T*.

2. Modèle basé sur la diffusion moléculaire

a) Modèle de la diffusion intra particule

Le modèle de diffusion intra particule est proposé par Weber et Morris, [Wu et al. (2001)] (pore diffusion model (PDM)), [Chakravorti (1874)]. La molécule est supposée migrer par diffusion dans le liquide, et pénétrer dans les pores selon l'axe de ceux-ci. En cours de route elle se s'équilibre localement le long de la paroi du pore, par adsorption il est représenté par l'équation suivant :

$$q_t = K_{int} t^{1/2} \quad (5)$$

Ou :

K_{int} : la constante de la diffusion intraparticule en *(mg g^{-1} min$^{-1/2}$)*.

La constante k_{int} est déduite de la partie linéaire de l'équation représente ce modèle.

b) Modèle la diffusion homogène de surface

La molécule s'adsorbe dés l'entrée du pore, l'extérieur du grain, seul endroit ou soit supposé régner un équilibre d'adsorption. Ensuite la molécule adsorbée (rampe) Le long de la surface de pore, selon une loi diffusion on rencontre donc successivement deux résistance : la première est un

coefficient de transfert de masse dans le film liquide, et la seconde un coefficient de diffusion superficielle, [Crittenden et al. (1978), sontheimer et al. (1988)].

I.7. Facteurs influençant l'adsorption

L'équilibre d'adsorption entre un adsorbat, dépend de nombreux facteurs dont les principaux sont décrits ci-après :

- ***Température***

L'adsorption physique s'effectue à des basses températures (phénomène exothermique), alors que l'adsorption chimique demande des températures plus élevées (phénomène endothermique). Ce qui nécessite de fixer la température du processus dés le départ. En pratique, il n'y a pas de modification significative dans l'intervalle 5-20°C, [cardot (1999)].

- ***PH***

Le *pH* est un facteur important dans toute étude d'adsorption du fait qui 'il peut influencer à la fois la structure de l'adsorbant et de l'adsorbat ainsi que le mécanisme d'adsorption. Ce facteur dépend de l'origine des eaux à traiter et du procédé de leurs traitements (coagulation, floculation, oxydation …). Donc, il est judicieux de connaitre l'efficacité de l'adsorption à différents *pH*. Selon, [Bouchemal (2007)], l'élimination optimale de la tyrosine sur charbon actif en grains et en poudre est observée à des *pH* acides inférieurs à 6.

- ***Présence d'espèces compétitives***

En générale, la présence de la compétition diminue la capacité de chaque espèce sur l'adsorbant. Ferrandon et Bouabane 2001, ont étudié l'influence d'alcools aliphatiques sur l'adsorption d'acides aminés (phénylalanine et tyrosine) sur charbon actif en poudre. Cette étude a montré que les alcools ramifies provoquent l'inhibition de l'adsorption de ces acides aminés de l'ordre de 85%.

- ***Surface spécifique***

L'adsorption lui est proportionnelle, [Edline (1998)]. La dépendance de la cinétique d'adsorption à la dimension de la surface externe des particules est fondamentale pour l'utilisation d'un adsorbant. Cette surface spécifique externe ne représente pourtant qu'une portion minime de la surface totale disponible à l'adsorption. Cette surface totale peut être augmentée par un broyage de la masse solide qui multiplie encore sa porosité totale, [Masschelein (1996)].

Plus la surface spécifique est grande, plus on aura une meilleure adsorption, ceci a été montré dans l'étude d'adsorption de la tyrosine sur charbon actif, [Bouachemal (2007)].

- ***Masse de l'adsorbant***

La capacité d'adsorption est d'autant plus grande que la masse de l'adsorbant dans la solution est importante. De fait du cout élevé des adsorbants, le choix d'un rapport liquide-solide optimal est recommandé, [Riaz et al. (2002)].

I.8. Isothermes d'adsorption

Tous les systèmes adsorbant/adsorbât ne se comportent pas de la même manière. Les phénomènes d'adsorption sont souvent abordés par leur comportement isotherme. Les courbes isothermes décrivent la relation existante à l'équilibre d'adsorption entre la quantité adsorbée et la concentration en soluté dans un solvant donné à une température constante.

Plusieurs auteurs ont propose des modèles, Théorique ou empiriques, Pour décrire la relation entre la masse d'adsorbat fixée l'équilibre (q_e) et la concentration sous laquelle elle à lieu (C_e). Il s'agit de relations non cinétiques q_t=f (C_e), que l'on nomme isothermes, [Edeline (1998)].

En générale, la concentration de l'adsorbat retenue par l'adsorbant est calculée par la différence entre la concentration initiale du soluté C_0 et la concentration finale du soluté C. la quantité du soluté adsorbée à l'équilibre q_e est donnée par l'équation suivante, [Limousin (2007)] :

$$q_t=(C_0-C_e)\ V/m \qquad (6)$$

Avec :

q_t : la quantité adsorbée *(mg g^{-1}) ;*

V : le volume de la solution *(l) ;*

m : la masse d'absorbant *(g) ;*

C_0 : la concentration initiale de l'adsorbat *(mg l^{-1}) ;*

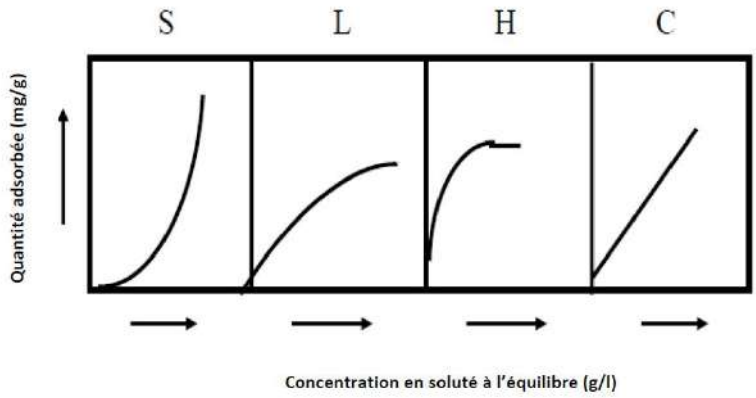
C_e : la concentration à l'équilibre de l'adsorbat *(mg l^{-1});*

I.9. Classification des isothermes d'adsorption

[Gilles et Coll (1974)] ont proposé les modèles d'adsorption, dont quatre types particuliers sont maintenant considérées comme les quatre formes principales d'isothermes généralement observées, [Limousin et al. (2007)]. Ces classes sont représentées sur la figure I.2. Le type d'isotherme obtenu permet de tirer des conclusions qualitatives sur les interactions, entre l'adsorbat, dont les plus importantes sont les suivantes, [Naib (2006)] :

- ✓ la forme de l'isotherme ;
- ✓ l'existence de paliers sur les isothermes ;
- ✓ le type d'adsorption (mono ou plolymoléculaire);
- ✓ L'orientation des molecules adsorbées.

Expérimentalement, on distingue quatre classes principales nommées: **S** (Sigmoïde), **L** (Langmuir), **H** (Haute affinité) et **C** (partition Constante). La figure I.2 illustre la forme de chaque type d'isothermes.



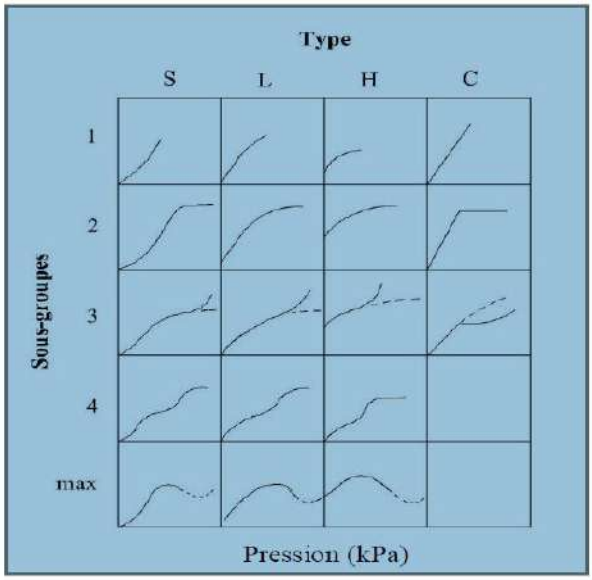


Figure I.2. Classification des isothermes d'adsorption d'après Giles et al par, [Naib (2006)].

Cette classification tient compte entre autre d'un certain nombre d'hypothèses, [Giles (1974)]:

- ✓ Le solvant s'adsorbe sur les mêmes sites que le soluté. Ceci implique l'existence d'une compétition d'adsorption entre le solvant et le soluté.
- ✓ Le nombre de sites susceptibles d'accueillir les molécules de soluté à la surface du solide diminue quand la quantité adsorbée augmente.
- ✓ L'orientation des molécules à la surface. On peut citer le cas où les molécules sont adsorbées verticalement ou horizontalement sur la surface.
- ✓ Enfin, les interactions attractives ou répulsives entre les molécules adsorbées se manifestent d'une façon notable dans le phénomène d'adsorption.

- ***Classe L***

Le modèle de Langmuir «standard», indique une adsorption à plat de molécules bifonctionnnelles, [Edeline (1998)]. Le rapport entre la concentration dans la solution aqueuse et adsorbée diminue lorsque la concentration du soluté augmente, décrivant ainsi une courbe concave, cette courbe suggérant une saturation progressive de l'adsorbant, [Limousin (2007)].

Les isothermes de classe L présentent, à faible concentration en solution, une concavité tournée vers le bas qui traduit une diminution des sites libres au fur et à mesure de la progression de l'adsorption. Ce phénomène se produit lorsque les forces d'attraction entre les molécules adsorbées sont faibles. Elle est souvent observée quand les molécules sont adsorbées horizontalement, ce qui minimise leur attraction latérale. Elle peut également apparaître quand les molécules sont adsorbées verticalement et lorsque la compétition d'adsorption entre le solvant et le soluté est faible. Dans ce

cas, l'adsorption des molécules isolées est assez forte pour rendre négligeable les interactions latérales.

- ***Classe S***

La courbe est sigmoïdale et elle présente un point d'inflexion. Ce type d'isotherme est toujours le résultat d'au moins deux mécanismes opposés. Les composés organiques non polaires sont un cas typique ; ils ont une basse affinité avec les argiles, mais dés qu'une surface d'argile est couverte par ces composés, d'autres molécules organiques sont adsorbées plus facilement ce phénomène est appelé l'adsorption coopérative, [Limousin (2007)].

Les isothermes de cette classe présentent, à faible concentration, une concavité tournée vers le haut. Les molécules adsorbées favorisent l'adsorption ultérieure d'autres molécules (adsorption coopérative). Ceci est dû aux molécules qui s'attirent par des forces de Van Der Waals, et se regroupent en îlots dans lesquels elles se tassent les unes contres les autres. Ce comportement est favorisé, d'une part, quand les molécules de soluté sont adsorbées verticalement comme c'est le cas des molécules possédant un seul groupe fonctionnel et d'autre part, quand les molécules se trouvent en compétition d'adsorption forte avec le solvant, [belmouden (2000)].

- ***Classe H***

La partie initiale de l'isotherme est presque verticale, la quantité adsorbée apparaît importante à concentration quasiment nulle du soluté dans la solution. Ce phénomène se produit lorsque les interactions entre les molécules adsorbées et la surface du solide sont très fortes. L'isotherme de classe H est aussi observée lors de l'adsorption de micelles ou de polymères formées à partir des molécules de soluté, [belmouden (2000)].

- ***Classe C***

Les isothermes de cette classe se caractérisent par une partition constante entre la solution et le substrat jusqu'à un palier. La linéarité montre que le nombre de sites libres reste constant au cours de l'adsorption. Ceci signifie que les sites sont crées au cours de l'adsorption. Ce qui implique que les isothermes de cette classe sont obtenues quand les molécules de soluté sont capables de modifier la texture du substrat en ouvrant des pores qui n'avaient pas été ouverts préalablement par le solvant, [belmouden (2000)].

I.9.1. Modélisation de l'équilibre d'adsorption

Plusieurs lois ont été proposées pour l'étude de l'adsorption. Elles expriment la relation entre la quantité adsorbée et la concentration en soluté dans un solvant à une température donnée. Nous rappellerons ci-dessous les principales lois utilisées.

- **Isotherme de Langmuir**

C'est le modèle le plus utilisé pour commenter les résultats trouvés au cours de l'adsorption des composés organiques en solution aqueuse. Nous résumons ci-dessous ses principales caractéristiques. A une température constante, la quantité adsorbée *Q* est liée à la capacité maximale d'adsorption Q_m, à la concentration à l'équilibre Ce du soluté et à la constante d'affinité *K* par l'équation:

$$\frac{Q}{Qm} = \frac{KCe}{1+KCe} \quad (7)$$

La transformée linéaire de ce modèle a pour équation, [Stumm et Morgan (1981)]:

$$\frac{1}{Q} = \frac{1}{Qm} + \frac{1}{K.Qm} * \frac{1}{Ce} \quad (8)$$

En portant *1/Q* en fonction de *1/*C_e on obtient une droite de pente *1/K*Q_m et d'ordonnée à l'origine *1/*Q_m, cela permet la détermination des deux paramètres d'équilibre de l'équation Q_m et K. Parmi les caractéristiques de l'isotherme de Langmuir, on peut citer sa simplicité et le fait que les paramètres Q_m et *K* qu'il permet d'évaluer, ont un sens physique. La valeur de *K* est liée à la force d'interaction entre la molécule adsorbée et la surface du solide; la valeur de Q_m exprime la quantité de soluté fixée par gramme de solide dont la surface est considérée comme totalement recouverte par une couche monomoléculaire. Cette simplicité est une conséquence des hypothèses restrictives qui permettent d'établir ce modèle, [Hiennenz (1986)]: l'équivalence de tous les sites d'adsorption et la non-dépendance de l'énergie d'adsorption avec le taux de couverture de la surface. Ceci se traduit par l'absence des interactions entre des espèces adsorbées et adjacents sur la surface.

- **Isotherme de Freundlich**

C'est une équation empirique largement utilisée pour la représentation pratique de l'équilibre d'adsorption. Elle ne repose sur aucune base théorique. Toutefois l'expérience montre qu'elle décrit bien les résultats d'adsorption des micropolluants par les solides tels que les charbons actifs, les sols et les argiles, [Calvet et al (1980)]. Elle se présente sous la forme:

$$Q=K_f C_e^{\,1/nf} \quad (9)$$

Q: Quantité adsorbée par gramme du solide.

C_e: Concentration de l'adsorbât à l'équilibre d'adsorption.

K_f et *1/nf*: constantes de Freundlich caractéristiques de l'efficacité d'un adsorbant donné vis-à-vis d'un soluté donné.

La transformée linéaire permettant de vérifier la validité de cette équation est obtenue par passage en échelle logarithmique, [Stumm et Morgan (1981)]:

$$Ln\ Q = Ln\ Kf + 1/nf\ Ln\ Ce \qquad (10)$$

En traçant *Ln Q* en fonction de *Ln Ce***,** on obtient une droite de pente *1/nf* et d'ordonnée à l'origine *Ln Kf*.

I.10. Utilisations de l'adsorption

Les principales utilisation de l'adsorption son:

- ✓ séparations gazeuses: cette opération permet la déshumidification de l'air ou d'autres gaz l'élimination d'odeurs ou d'impuretés sur de gaz la récupération des solvants et le fractionnement des hydrocarbures volatils.
- ✓ séparations liquides : cette opération conduit a l'élimination des traces d'humidité dans les essences le fractionnement des mélanges d'hydrocarbures la décoloration des produits pétroliers et des solutions aqueuses de sucre.
- ✓ traitement des eaux issues de différentes industries (agroalimentaires, textiles, ...etc.)

Conclusion

L'adsorption est un phénomène physique de fixation de molécules, de protéines sur la surface d'un solide. Ce phénomène est utilisé pour "récupérer" des molécules indésirables de fluide (liquides ou gazeuses) dispersées dans un solvant. La fixation provient de l'établissement, entre le solide et les molécules, les protéines, de liaisons de Van Der Waals (liaisons de type électrostatique de faible intensité, avec des énergies d'interaction entre 5 et 40 kJ/mol). On parle aussi d'adsorption physique, pour la différencier de l'adsorption chimique qui met en jeu des forces de plus grande intensité (du type liaison covalente), et qui modifie la structure moléculaire du soluté (contrairement à l'adsorption physique), ce qui rend en général le processus irréversible.

II.1. Introduction

Les protéines sont découvertes à la fin des années 1830 par un chimiste hollandais, Gerhard Mulder [Mulder (1839)]. Le terme «protéine» vient du grec «prôtos» qui signifie «premier, essentiel». En effet, ces macromolécules sont indispensables à la vie et elles sont très abondantes dans les organismes vivants : elles représentent la moitié du poids sec des cellules [Benhabilés et al. (2000)].

Sur le plan moléculaire, les protéines sont des polymères d'acides aminés. Ces derniers sont des molécules composées d'un squelette carboné et contenant une fonction amine et une fonction acide carboxylique.

Toutes les protéines, aussi différentes soient-elles, sont des polymères formés par combinaison de ces vingt acides aminés. Leurs caractéristiques sont donc déterminées par le nombre et l'ordre des acides aminés dans la chaîne. Ces paramètres sont codés dans l'ADN et constituent la structure primaire (ou séquence) de la protéine.

Les protéines sont utilisées par les organismes vivants pour effectuer une multitude de fonctions : Catalyse, Transport, Communication, Reconnaissance, Mobilité cellulaire, Structure.

II.2. Définition

Une protéine (ou protide) est un assemblage d'acides aminés. On parle généralement de protéine lorsque plus de 100 acides aminés sont liés au sein d'une chaîne. Il existe des protéines d'origine animale et des protéines d'origine végétale.

Les protéines sont des éléments essentiels de la vie de la cellule : elles peuvent jouer un rôle structurel (comme l'actine), un rôle dans la mobilité (comme la myosine), un rôle catalytique (les enzymes), un rôle de régulation de la compaction de l'ADN (les histones) ou d'expression des gènes (les facteurs de transcription)…etc. En somme, l'immense majorité des fonctions cellulaires est assurée par des protéines.

Une protéine est une macromolécule biologique composée d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques (chaine polypeptidique). En général, on parle de protéine lorsque la chaîne contient au moins 50 acides aminés, et de peptide pour des assemblages de plus petite taille, *[http://fr.wikipedia.org]*.

II.3. Fonctions des protéines

Les protéines sont impliquées dans quasiment toutes les fonctions mises en œuvre dans la cellule. Les principales classes fonctionnelles de protéines incluent [Lesk (2010)] :

- ✓ les protéines de structure, qui entrent dans la constitution des tissus ;
- ✓ les protéines enzymatiques, qui catalysent les réactions chimiques du métabolisme;
- ✓ les protéines de défense, comme les anticorps du système immunitaire ;
- ✓ les protéines régulatrices, telles que les facteurs de transcription qui contrôlent l'expression des gènes ;
- ✓ les protéines de signalisation, qui détectent les signaux extérieurs et les transmettent dans la cellule ;
- ✓ les protéines de transport, qui contrôlent le trafic à l'intérieur et à l'extérieur des cellules ;
- ✓ les protéines motrices, qui permettent aux cellules ou à certains éléments de se mouvoir.

II.4. Types de protéines

II.4.1. Protéines complètes

Renferment tous les acides aminés essentiels. Un régime riche en aliments d'origine animale a généralement des protéines complètes en abondance.

II.4.2. Protéines incomplètes

Carencées en un ou plusieurs acides aminés essentiels. On peut créer des protéines complètes en associant des protéines incomplètes complémentaires. Les protéines végétales sont généralement incomplètes, *[http://www.espace-musculation.com/proteines.html].*

II.5. Fabrication des protéines

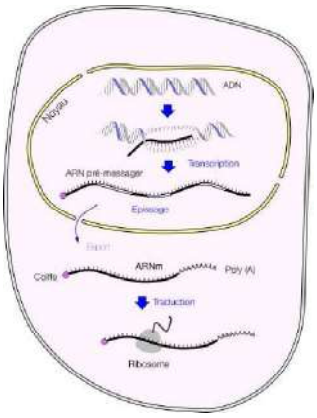
La synthèse d'une protéine se fait en plusieurs étapes (Figure II.1)

- ✓ **la transcription** où le gène, présent sur le brin codant de l'ADN, est transcrit en ARN messager (ARNm) ;
- ✓ **la maturation** où l'ARNm subit un ensemble de modifications post-transcriptionnelles. La plupart des ARNm sont modifiés post-transcriptionnellement, mais la nature des ARN modifiés et des modifications varient entre procaryotes et eucaryotes, et entre le noyau et les

organites chez les eucaryotes. Les modifications les plus courantes concernent ses extrémités (ajout d'une coiffe ou polyadénylation par exemple), sa séquence (épissage ou édition) ainsi que la nature chimique de ses atomes (méthylation, pseudouridylation, thiolation…etc.). Ces différentes modifications peuvent influer sur différentes caractéristiques de l'ARN, telle que sa stabilité, sa capacité à être traduit ou bien même modifier la séquence à traduire. Par exemple, un épissage alternatif conduit à la création d'ARN matures différents et donc de protéines distinctes à partir d'un même gène. La maturation des ARNm est donc une étape importante du contrôle de l'expression des gènes.

- ✓ **la traduction** où l'ARNm mature est traduit en protéine par le ribosome en fonction du code génétique : à chaque triplet de nucléotides (ou codon) correspond un acide aminé [Crick et al. (1961)]. L'assemblage d'une protéine se fait donc acide aminé par acide aminé, de manière séquentielle, par des liaisons peptidiques (covalentes) entre les fonctions carboxylique et amine des acides aminés successifs. Pour symboliser l'ordonnancement de cette séquence d'acides aminés, une protéine se lit de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale: N faisant référence à l'amine NH_2 restée libre du premier acide aminé, et C à l'acide carboxylique COOH non engagé dans une liaison peptidique du dernier acide aminé ; Une fois synthétisée, la protéine peut également subir des modifications dites post-traductionnelles.

  Une modification post-traductionnelle est une modification chimique d'une protéine (acétylation, phosphorylation, ubiquitination… etc.), réalisée le plus souvent par une enzyme, après sa synthèse ou au cours de sa vie dans la cellule. Cette modification entraîne généralement un changement de la fonction de la protéine considérée, que ce soit au niveau de son action, de sa demi-vie, ou de sa localisation cellulaire.



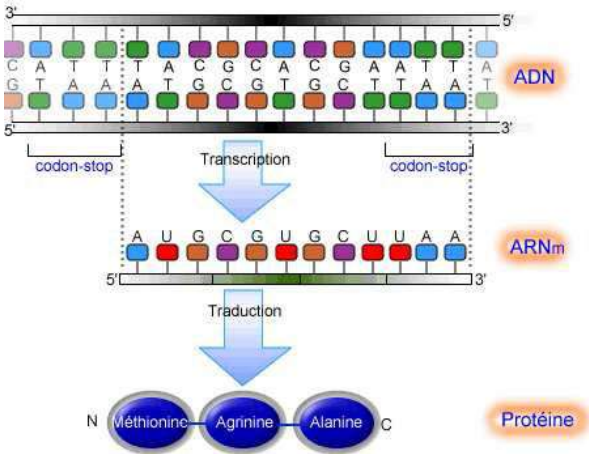


Figure II.1. Procédé général de la synthèse d'une protéine**.** À gauche, on trouve l'illustration des mécanismes de synthèse à travers les différentes localisations cellulaires dans une cellule eucaryote. À droite, on voit l'évolution de la séquence d'ADN d'un gène à la séquence d'acides aminés d'une protéine, lors de la traduction et de la transcription, *[http://www.futura-sciences.com]*.

II.6. Structure des protéines

Les protéines sont des macromolécules constituées d'un enchaînement d'acides aminés unis par des liaisons peptidiques. Cette structure qui ressemble à un chapelet de «perles» d'acides aminés, est le squelette de la molécule de protéine. Ce squelette se tord et se repli sur lui-même pour donner des niveaux d'organisation moléculaires plus complexes (structures secondaire, tertiaire et quaternaire).

II.6.1. Acides aminés et liaison peptidique

II.6.1.1. Acides aminés

Les protéines sont des polymères linéaires constitués de 20 types majeurs d'acides aminés différents. Ces molécules élémentaires sont constituées d'un carbone central, nommé carbone a, auquel sont attachés quatre substituant: un groupe amine basique (-NH2), un groupe carboxyle acide (-COOH), un atome d'hydrogène et un groupe nommé chaîne latérale (-R) (voir Figure 2).

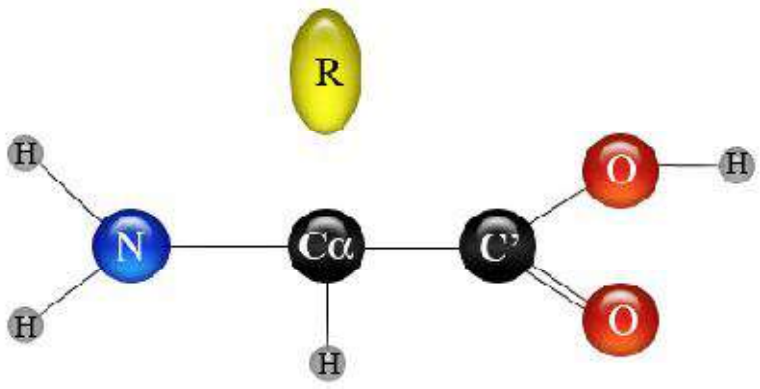


Figure II.2. Schéma de la structure d'un acide aminé.
Le radical R symbolise la chaîne latérale caractérisant chaque acide aminé.

A pH (potentiel Hydrogène) dit physiologique de 7,4 et observé globalement dans les cellules biologiques, le groupe aminé est protoné et le groupe carboxyle déprotoné. Ainsi, à ce pH, la plupart des acides aminés sont des ions amphotères ou zwitterions.

Par ailleurs, à l'exception de la glycine, les quatre groupements portés par le carbone a sont différents. Les acides aminés sont donc chiraux et existent sous deux formes non superposables L (Laevo/gauche) et D (Dextro/droite). Toutefois, la forme L uniquement est impliquée dans la composition des protéines. En effet, seule la forme L est reconnue par les enzymes responsables de la polymérisation des protéines [Rawn (1990)].

Chaque type d'acides aminés est associé à une chaîne latérale spécifique qui lui confère des propriétés physico-chimiques uniques. Le diagramme de Venn, présenté en Figure 3, propose une classification des acides aminés en fonction de ces propriétés [Taylor (1986)]. Ainsi, les acides aminés sont principalement caractérisés par leur hydrophobicité, leur hydrophilie et leur caractère acide ou basique. Ces propriétés sont essentielles pour l'architecture des protéines. En effet, les acides aminés chargés et hydrophiles sont majoritairement situés à la surface alors que les acides aminés hydrophobes sont généralement enfouis au cœur des protéines.

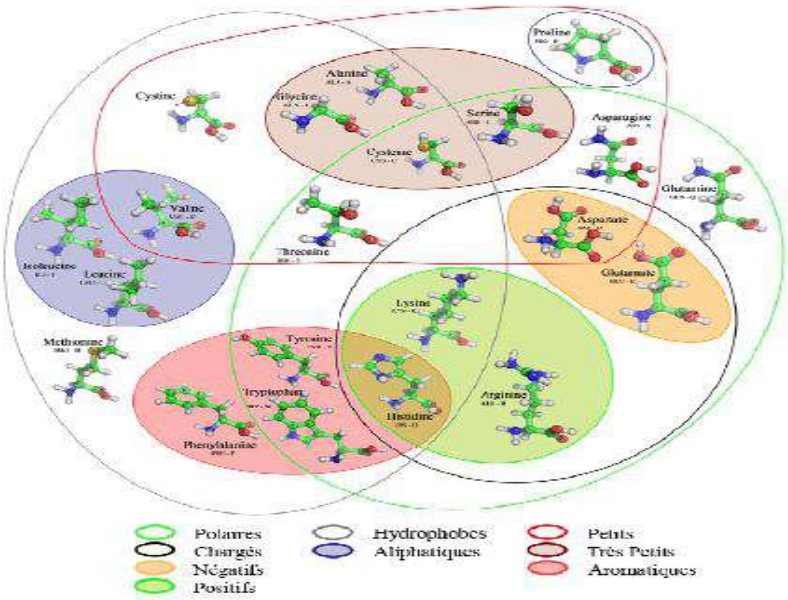


Figure II.3. Diagramme de Venn regroupant les acides aminés en fonction de leurs propriétés physicochimiques.

Cette représentation est une adaptation du diagramme proposé par Taylor [Taylor (1986)]. Figure adaptée de [Faure et al. (2008)].

II.6.1.2. La liaison peptidique

La liaison entre deux acides aminés, appelée liaison peptidique, est représentée sur la figure II.4. Elle se forme par une réaction de condensation entre le groupe α-carboxyle d'un acide aminé et le groupe α-amine d'un autre acide aminé donnant lieu à une liaison amide. Il en résulte une chaîne

d'acides aminés constituant des peptides ou des protéines suivant le nombre d'acides aminés impliqués. Le terme protéine désigne les chaînes polypeptidiques dont le nombre de résidus est supérieur à 100. Lorsque le nombre de résidus est inférieur à 50, on parle de peptides, entre 50 et 100, on parle indifféremment de peptides, de petites protéines ou de polypeptides. Les groupes libres situés aux extrémités opposées d'une chaîne peptidique sont appelés le groupe N-terminal pour le groupe amine et le groupe C-terminal pour le groupe carboxyle.

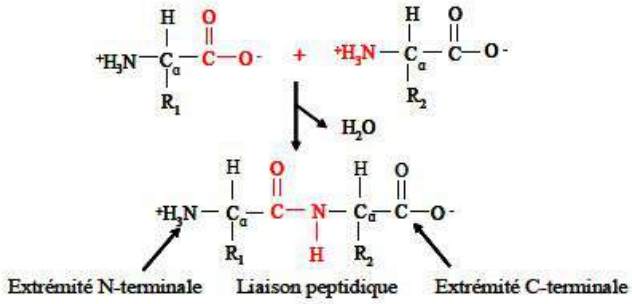


Figure II.4. Formation d'une liaison peptidique, [Cingöz (2009)].

Il est convenu de numéroter les acides aminés d'une chaîne peptidique en allant de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale. Du fait de la présence de nombreux groupements acido-basiques, la charge globale portée par une protéine dépend donc du nombre de résidus acides et de résidus basiques ainsi que du pH de la solution dans laquelle elle se trouve. Le pH pour lequel la protéine ne possède aucune charge nette correspond au point isoélectrique (pI) de la protéine, [Cingöz (2009)].

II.6.2. Structure primaire

En biochimie, la structure primaire d'une biomolécule non-ramifiée comme un brin d'ADN, d'ARN ou une protéine, est la séquence de nucléotides ou d'acides aminés du début à la fin de la molécule. Autrement dit, la structure primaire identifie l'exacte composition chimique et la séquence de ses sous-unités monomériques.

La structure primaire d'un polymère biologique détermine largement la forme tridimensionnelle connue sous le nom de structure tertiaire. Cependant le repliement des acides nucléiques et des protéines est si complexe que souvent même en connaissant la structure primaire cela n'aide pas à en déduire la forme ou de prédire la structure secondaire, telle que la formation de

feuillets ou d'hélices. Pourtant, connaissant la structure d'une séquence homologue similaire (par exemple un membre de la même famille de protéine) permet sans ambiguïté d'identifier la structure tertiaire d'une séquence donnée. Des familles de séquences sont souvent déterminées par clustering de séquence, et par les projets structuraux de génomique qui visent à produire un ensemble de structures représentatives pour couvrir l'espace séquentiel de possible séquence non-redondante, *[http://fr.wikipedia.org/wiki/Structure_primaire]*.

II.6.3. Structure tridimensionnelle des protéines

II.6.3.1. Structure secondaire

La structure secondaire décrit le repliement de segments courts de la structure primaire. Ce sont des structures locales, stabilisées par des liaisons hydrogènes entre les groupements amide (-NH) et carbonyle (-CO) du squelette peptidique [Pauling et al. (1951)]. L'existence de structures secondaires vient du fait que les repliements énergétiquement favorables de la séquence protéique sont limités et que seules certaines conformations sont possibles. Les principaux types de structures secondaires régulières sont les hélices α et les feuillets β.

- **Hélice α**

Les structures secondaires les plus répandues dans les protéines sont les hélices α (Fig. II.5a). Dans ces structures, les liaisons hydrogènes sont créées entre l'oxygène du groupe carboxyle du résidu N et l'hydrogène du groupe amide du résidu N+4. Ces liaisons confèrent à la chaîne polypeptidique une structure en hélice avec 3,6 résidus par tour.

On peut expliquer l'abondance des hélices α dans les protéines par le fait que les résidus impliqués dans les liaisons hydrogènes sont très proches dans la séquence de la protéine (3 résidus entre les résidus impliqués dans les liaisons hydrogènes). Ce n'est pas le cas pour les feuillets β.

- **Feuillets β**

Les feuillets β (Fig. II.5b et c) sont aussi des structures secondaires très répandues. Les feuillets β sont composés de brins β qui sont des portions de la chaîne polypeptidique, généralement d'une longueur comprise entre 5 et 10 résidus, dans une configuration étendue. Ces brins β sont reliés entre eux et donc stabilisés par des liaisons hydrogènes. On parle de feuillets β parallèles (Fig. II.5c) lorsque les brins qui composent le feuillet ont la même orientation. Le feuillet β est dit antiparallèle (Fig. II.5b) lorsque l'orientation des brins est alternée. Les feuillets antiparallèles sont les plus répandus. Dans ce cas, les liaisons hydrogènes sont dans le plan du feuillet, ce qui stabilise la structure.

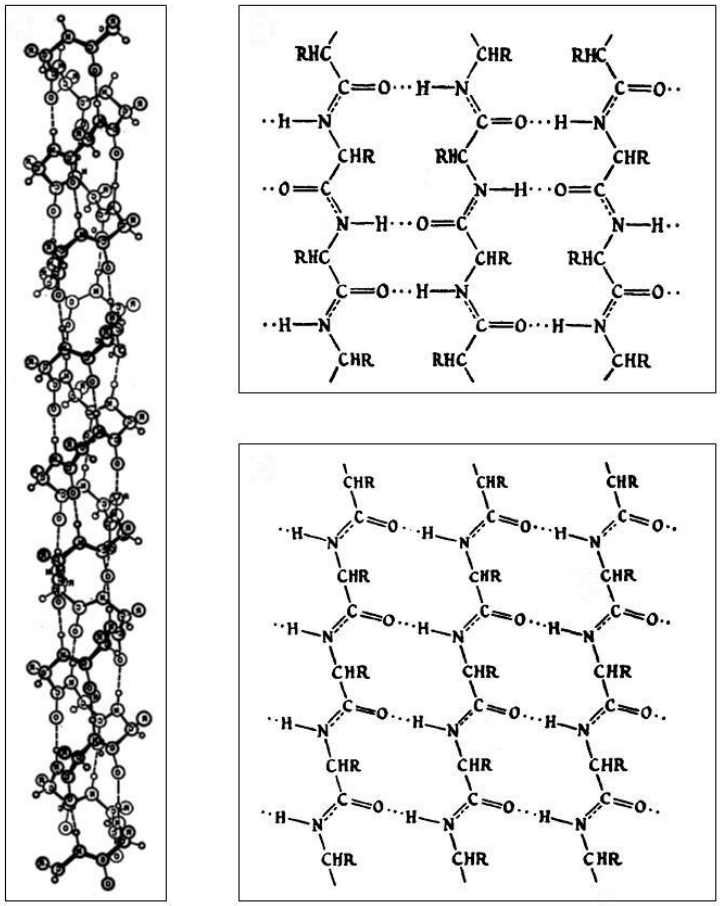


Fig. II.5. Structures secondaires formées par la chaîne polypeptidique, [Pauling et al. (1951)].
a. Hélices α
b. Feuillets β anti-parallèles
c. Feuillets β parallèles

II.6.3.2. Structures tertiaire

La structure tertiaire d'une protéine correspond au repliement de la séquence protéique dans l'espace. On parle plus couramment de structure 3D ou structure tridimensionnelle.

La fonction d'une protéine est intimement liée à sa structure 3D. Lorsque cette structure est cassée par l'emploi d'un agent dénaturant ou autre (température, ou pression par exemple), la protéine perd sa fonction [Sela et al. (1957)].

La structure tertiaire d'une protéine dépend principalement de sa structure primaire [Anfinsen (1973)]. Ainsi, deux protéines homologues 2 ayant une forte similarité de leur séquence primaire auront également des structures très proches et donc des fonctions semblables. Il n'existe pas de règles simples qui permettraient de déduire la structure 3D à partir de la séquence d'acides aminés.

II.6.3.3. Structures quaternaire

La structure quaternaire d'une protéine multimérique est la manière dont sont agencées les différentes chaînes protéiques, ou sous-unités, à l'état natif les unes par rapport aux autres. Ce qualificatif ne s'applique qu'aux protéines multimériques, c'est-à-dire ne contenant pas qu'une seule sous unité. Ainsi on distingue les dimères (deux sous-unités), les trimères (trois sous-unités), les tétramères (quatre sous-unités)… etc.

De manière générale, la structure quaternaire confère à la protéine sa fonction, mais il existe des exemples de protéines actives en dehors de leur complexe quaternaire. L'agencement des sous-unités peut conférer au complexe quaternaire un axe ou point de symétrie, mais ce n'est pas nécessaire.

Le principal élément de stabilisation des structures quaternaires est l'interaction hydrophobe entre les acides aminés non polaires : les parties hydrophobes des monomères s'agglutinent de manière à minimiser leur surface exposée au solvant (attraction hydrophobe). Des forces électrostatiques peuvent aussi stabiliser la structure ainsi que des liaisons hydrogène, *[http://fr.wikipedia.org/wiki/Structure_quaternaire]*.

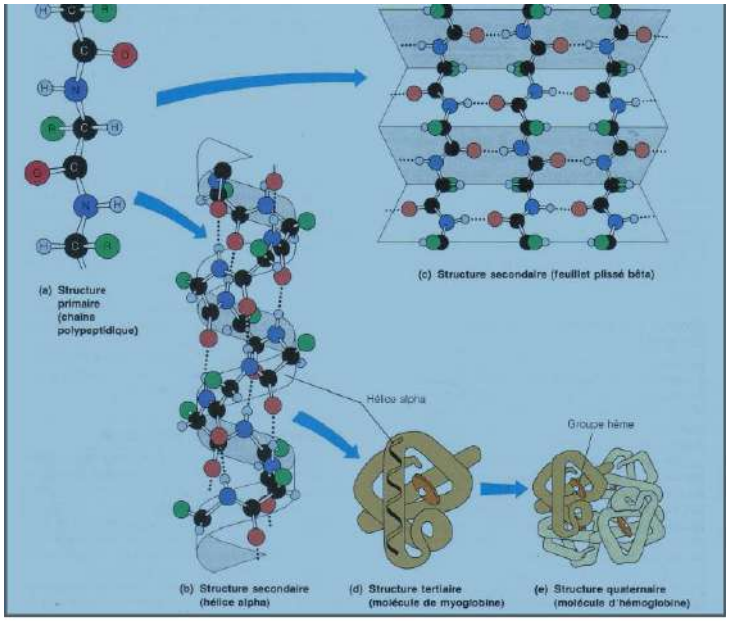


Figure II.6. Niveaux d'organisation structurale des protéines.

II.7. Classification des protéines

Il existe différentes classification :

- **Classification en fonction de la forme des molécules**

a) Protéines fibreuses : Les scléroprotéines sont constituées de fibres ou fibrilles insolubles (fibroïne de la soie, collagènes du tissu conjonctif, du cartilage et des tendons et kératine de la peau et des phanères.

b) Protéines globulaires : Les sphéroprotéines sont de forme sphérique ou ovoïde. Elles sont en générale plus facilement solubles (albumines et globulines).

- **Classification en fonction de la solubilité**

a) Les albumines : Elles précipitent par addition de sulfate d'ammonium entre 70 et 100% de la saturation. Leur point isoélectrique est inférieur à 7. Elles ont donc un caractère acide.

b) Les globulines : Elles sont insolubles dans l'eau pure mais solubles dans les solutions salines diluées. Elles précipitent par addition de sulfate d'ammonium à 50% de saturation. Ce sont souvent des glycoprotéines ou des lipoprotéines.

c) Les histones : Ce sont des protéines solubles à caractère basique dû à la présence de forte proportion de lysine et d'arginine, ce qui leur confère un point isoélectrique élevé.

On les trouve liées aux acides désoxyribonucléiques dans les noyaux des cellules.

d) Les globines : Elles constituent la partie protéique des hémoglobines et des myoglobines. Elles ont une teneur élevée en histidine.

e) Les prolamines et glutélines : Protéines végétales, insolubles dans l'eau.

f) Les scléroprotéines : Insolubles dans l'eau.

g) Les protéines fibrillaires solubles : Protéines constituant les cellules musculaires (myosine, actine, troponine, tubuline).

- **Classification en fonction de la composition**

On distingue 2 groupes :

- ✓ Les holoprotéines : constituées uniquement d'acides aminés.
- ✓ Les hétéroprotéines : constituées d'une chaîne polypeptidique et d'un groupement prosthétique lié de manière covalente. Les phosphoprotéines, les glycoprotéines et les chromoprotéines font parties de ce groupe.

II.8. Rôles physiologiques

La structure tridimensionnelle de la protéine lui confère ses propriétés distinctes et dicte sa fonction biologique. Habituellement, on classe les protéines en deux catégories suivant leur forme

générale: protéines fibreuses et protéines globulaires. Un chapitre est consacré aux protéines bactériennes.

II.8.1. Protéines fibreuses

Les protéines fibreuses sont appelées protéines structurales car elles constituent le principal matériau de construction chez les Vertébrés. Elles sont linéaires, insolubles dans l'eau et d'une grande stabilité (support mécanique aux tissus et résistance à la traction).

Les principales protéines fibreuses sont le collagène, la kératine, le fibrinogène et les protéines musculaires.

II.8.1.1. Le collagène

Le collagène se trouve dans les os, la peau, les tendons et les cartilages. Sa triple hélice formée de trois chaînes polypeptidiques, d'environ mille acides aminés chacune, lui donne l'apparence d'un gros câble (fig. 7). Lorsque des fibrilles de collagène sont dégradées par chauffage intense, leurs chaînes se raccourcissent pour former la gélatine.

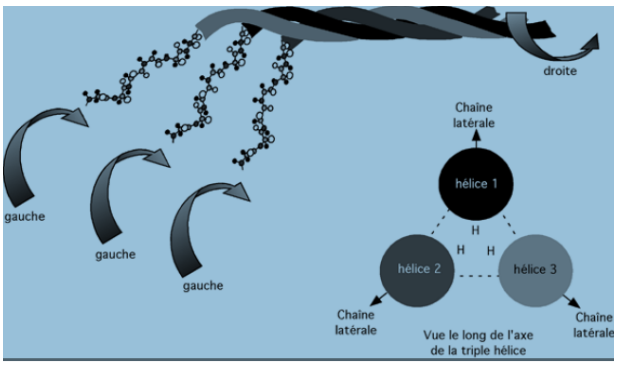


Figure II.7. Organisation structurale de la triple hélice du collagène.

II.8.1.2. La kératine

La kératine, présente dans les couches supérieures de l'épiderme, dans les cheveux, les ongles, les écailles, les sabots et les plumes, s'enroule en une torsade régulière appelée «hélice alpha». Chargée de protéger l'organisme contre l'environnement extérieur, la kératine est totalement insoluble dans l'eau. Ses nombreuses liaisons disulfures en font une protéine extrêmement stable, capable de résister à l'action des enzymes protéolytiques.

II.8.1.3. Le fibrinogène

Le fibrinogène est une protéine plasmatique sanguine responsable de la coagulation du sang. Grâce à l'action de la thrombine, le fibrinogène est converti en molécules de fibrine, une protéine insoluble, qui s'agglutine pour former un caillot protecteur contre les hémorragies.

II.8.2. Protéines globulaires

Contrairement aux protéines fibreuses, les protéines globulaires sont sphériques et hautement solubles. Elles jouent un rôle important dans le métabolisme. Les albumines, les globulines, la caséine et les hormones protéiques sont des protéines globulaires. Les albumines et les globulines sont abondantes dans les cellules animales, le sérum sanguin, le lait et les œufs. Nous décrivons ci dessous les principales fonctions des protéines globulaires chez l'homme.

II.8.2.1. La catalyse

Les enzymes sont essentielles à presque toutes les réactions biochimiques de l'organisme; elles multiplient par au moins un million la vitesse des réactions chimiques. Citons l'amylase salivaire (dans la salive), qui catalyse la dégradation des amidons, et les oxydases, qui permettent l'oxydation des combustibles alimentaires.

II.8.2.2. Le transport

L'hémoglobine transporte l'oxygène dans le sang; les lipoprotéines transportent les lipides et le cholestérol. Le sang contient d'autres protéines de transport pour le fer, les hormones stéroïdes et d'autres substances.

II.8.3. La régulation du pH

Un grand nombre de protéines plasmatiques, notamment l'albumine, peuvent servir d'acide ou de base dans un système tampon. Elles empêchent les variations excessives du pH sanguin en captant ou en libérant des protons H^+.

II.8.4. La régulation du métabolisme

Les hormones polypeptidiques et les hormones protéiques contribuent à régler l'activité métabolique, la croissance et le développement. Ainsi, l'hormone de croissance est une hormone anabolique nécessaire pour une croissance optimale; l'insuline aide à régler le taux de glucose sanguin.

II.8.5. La défense de l'organisme

Les anticorps (fig. II.8) sont des protéines très spécialisées qui reconnaissent et inactivent les bactéries, les toxines et certains virus. Ils participent à la réponse immunitaire, qui contribue à protéger l'organisme contre les substances étrangères et les microorganismes. Les protéines du

complément, en circulation dans le sang, améliorent l'activité du système immunitaire et stimulent la réaction inflammatoire, un mécanisme de résistance non spécifique de l'organisme.

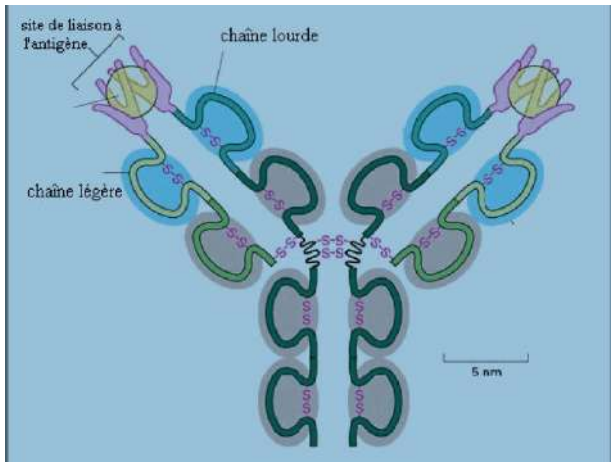


Figure II. 8. Immunoglobuline avec 2 sites de fixation de l'antigène.

II.9. Propriétés des protéines

II.9.1 Propriétés physico-chimiques

- **Dénaturation**

Une protéine est dénaturée lorsque sa conformation tridimensionnelle spécifique est changée par rupture de certaines liaisons sans atteinte de sa structure primaire. Il peut s'agir, par exemple, de la désorganisation de zones en hélice α. La dénaturation peut être réversible ou irréversible. Elle entraîne une perte totale ou partielle de l'activité biologique. Elle produit très souvent un changement de solubilité de la protéine.

Les agents de dénaturation sont nombreux :

- agents physiques : température, radiations, pH ;
- agents chimiques: solution d'urée qui forme de nouvelles liaisons hydrogène dans la protéine, solvants organiques, détergents.

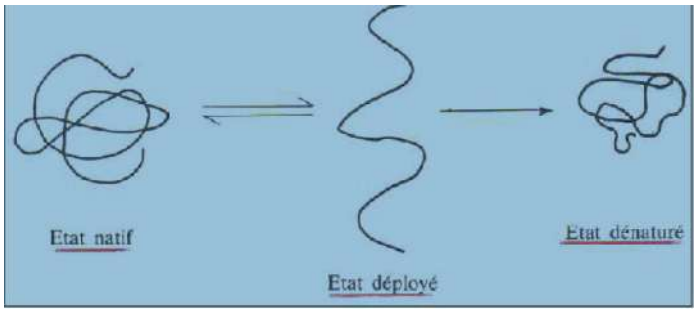


Figure II.9. Dénaturation réversible et irréversible d'une protéine.

II.9.2. Solubilité des protéines

Les relations des protéines avec l'eau sont complexes. La structure secondaire des protéines dépend dans une large mesure de l'interaction des liaisons peptidiques avec l'eau par l'intermédiaire de liaisons hydrogène. Des liaisons hydrogène se forment également soit entre radicaux de la protéine (structures alpha et bêta) soit entre ses radicaux hydrophiles libres et l'eau. Les protéines riches en pelote statique sont donc a priori plus solubles que les structures hélicoïdales. Au niveau de la structure tertiaire, l'eau provoque l'orientation des chaînes et radicaux hydrophiles vers l'extérieur de la molécule, alors que les chaînes et radicaux hydrophobes ont tendance à réagir entre eux à l'intérieur de la molécule (effet hydrophobe). La solubilité des protéines dans une solution aqueuse contenant des sels dépend de deux effets antagonistes liés d'une part aux interactions électrostatiques ("salting in" ou effet dissolvant), et d'autre part aux interactions hydrophobes ("salting out" ou effet relargant).

A basse force ionique, la solubilité des protéines augmente lorsque la concentration en sels croit, jusqu'à un certain seuil. Au delà, elle diminue avec l'addition de sels. L'augmentation de solubilité (salting in) est lié à l'action des forces électrostatiques la diminution de solubilité ("salting out") est attribuée à différentes interactions rassemblées sous le nom "d'interactions hydrophobes", sans que ce terme implique un mécanisme précis.

II.9.3. Propriétés électriques

- ***Caractère amphotère***

La liaison peptidique n'est pas chargée aux pH présentant un intérêt physiologique. En effet à de tels pH la formation de peptides à partir de leurs acides aminés constitutifs s'accompagne d'une perte nette d'une charge positive et d'une charge négative par liaison peptidique formée. Cependant, les peptides sont des molécules porteuses de charges au pH physiologique à cause des charges sur

les groupements C et N terminaux et sur les groupements fonctionnels des carbones alphas des acides aminés polaires.

- ***Mobilité électrophorétique - électrophorèse - électrofocalisation***

Soumises à un champ électrique, les protéines se déplacent plus ou moins suivant leur charge : c'est la mobilité électrophorétique qui permettra donc, s'il y a un mélange de protéines de les séparer par électrophorèse. C'est un procédé très classique de fractionnement des protéines qui peut être soit seulement analytique soit aussi préparatif. Elle est généralement réalisée sur des supports : acétate de cellulose, gel de gélose, gel de polyacrylamide. L'électrophorèse de zone est très couramment utilisée en biologie clinique pour séparer les protéines du sérum sanguin.

L'isoélectrofocalisation (IEF) repose sur la propriété des molécules amphotères comme les protéines d'être chargées positivement si le pH est plus acide que leur pHi, négativement si le pH est plus basique que leur pHi. On peut appliquer au support porteur du gradient de pH un champ électrique tel que le pôle + ou anode sont à la borne acide et le pôle - ou cathode à la borne basique. Si la molécule amphotère est neutre, elle restera immobile.

[http://fr.wikipedia.org/wiki/Propri%C3%A9t%C3%A9s_physicochimiques_des_prot%C3%A9ine].

II.10. Le repliement des protéines

La compréhension du mécanisme de repliement des protéines est importante. Le bon repliement de protéines est un processus essentiel à la vie parce que c'est ce repliement qui assure les fonctions des protéines dans l'organisme. Ainsi, les défauts de repliement de protéines causent des maladies graves telles que la fibrose kystique, l'emphysème juvénile, certains types d'hémophilie, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Kreutzfeld-Jakob et la maladie de Parkinson. D'autre part, la connaissance du mécanisme de repliement (c'est-à-dire les différentes étapes qui le définissent) permet de prédire la structure tridimensionnelle d'une protéine à partir de sa séquence primaire. Pour l'instant, bien que les facteurs physico-chimiques entrant en jeu soient clairs, les règles qui permettent à une séquence d'acides aminés de se replier en une structure tridimensionnelle sont inconnues. Les phénomènes de repliement se déroulent à l'échelle de temps de la milliseconde mais certains peuvent se produire en quelques microsecondes [Baldwin (1996)], voire en moins d'une microseconde pour des protéines qui se replient de façon ultra-rapide, [Mayor, et al. (2003)]. Leur étude expérimentale est difficile et nécessite un grand nombre d'approches par

des techniques de biophysique pour récolter suffisamment d'indices sur les mécanismes de repliement [Plaxco et Dobson (1996), Radford (2000)].

II.11.Conclusion

Les protéines, découvertes en 1838 nom généralement donné à toute substance polymère complexe et biologiquement importante, composée d'aminoacides liés par des liaisons peptides. D'autres types de liaisons sont responsables de la création d'une structure tridimensionnelle caractéristique des protéines qui peut être fibreuse, globulaire ou plissée. Les protéines sont essentielles pour tous les organismes vivants. Sous forme d'enzymes, elles régulent tous les aspects du métabolisme. Les protéines structurelles telles que la kératine et le collagéne fabriquent la peau, les griffes, les os, les tendons et les ligaments ; les protéines des muscles produisent le mouvement ; l'hémoglobine transporte l'oxygène ; et les protéines des membranes régulent le mouvement de substances à travers les cellules.

III.1. Introduction

«Nanotechnologie» est un terme générique qui décrit des applications dans de nombreux domaines scientifiques mais recouvre d'une manière générale la recherche sur les principes et propriétés existant à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire au niveau des atomes et des molécules. L'objectif des nanotechnologies consiste à produire des objets ou matériaux inférieurs à 100 nanomètres. Ces nanomatériaux sont composés de nanoparticules qui, contrairement aux particules très fines d'origine naturelle ou provenant d'une combustion, sont produites intentionnellement. Les nanomatériaux peuvent être des métaux, céramiques, carbones, polymères ou encore des silicates qui présentent l'intérêt d'avoir des caractéristiques spécifiques par rapport aux mêmes matériaux à l'échelle macroscopique. L'acquisition de ces nouvelles propriétés physico-chimiques ouvre ainsi un immense champ de recherches fondamentales et appliquées regroupées sous l'appellation de «nanosciences»,[*http://www.actuenvironnement.com/ae/dictionnaire_environnement/definition/nanomateriaux*].

III.2. Historique

L'utilisation des nanoparticules par l'humanité remonte au début des temps civilisés. En effet, de façon inconsciente, certaines civilisations ont eu du succès dans divers domaines (métallurgie et médecine), à l'aide des nanomatériaux. C'est d'abord par l'optimisation empirique de certaines technologies, sur plusieurs décennies, à travers un système d'artisan et d'apprenti, qu'ils ont mis à profit des nanostructures. Le succès des médecines traditionnelles chinoises, ou encore la production des aciers de Damas n'est rien de moins que l'œuvre d'un changement dans la matière à l'échelle nanométrique, [Vajtai (2012)] En effet, à titre d'exemple illustrant ces faits, des nanofils encapsulés dans des nanotubes ont été identifiés dans une épée originale du 17^{e} siècle, identifiée comme étant faite de cet acier mythique. Les méthodes de fabrication avaient été modulées par les artisans de l'époque, jusqu'à la production d'acier qui avait des propriétés bien supérieures à celles de la cémentite, [Reibold et al. (2006)].

Philosophiquement, ce n'est que récemment qu'une civilisation ait jeté les bases scientifiques des nanotechnologies. En effet, c'est dans les années 1950, que Richard Feynman, qui a, par ses présentations de «Plenty of room at the bottom», établi qu'il est théoriquement possible de construire atome par atome, des structures avec des propriétés spécifiques. Avec la découverte par Richard Smalley du fullerène, une nanosphère de carbone *(C_{60})*, ainsi que la possibilité technique de les caractériser et de les fabriquer, les nanomatériaux étaient devenus une réalité qui avait le

potentiel de révolutionner toutes les sphères de la science, [Papazoglou et Parthasarathy (2007)]. Avec la découverte de l'ADN, l'humanité allait devoir se doter d'outils et de techniques pour pouvoir construire, créer et modifier ce type de structure fondamentale. La conception d'instruments tels que le microscope à force atomique, le microscope à balayage électronique et la spectrométrie à diffraction de rayon x, combiné à leur amélioration, ont permis de faire progresser rapidement la recherche dans les nanomatériaux. Les microscopes à force atomiques et les microscopes à balayage électronique ont permis aux scientifiques de «voir» et de constater un univers nanologique de la même façon que les microbiologistes du 17^{e} siècle ont découvert les mécanismes intimes des cellules avec le développement du microscope optique.

L'accélération de la recherche dans les méthodes de synthèses et l'augmentation de la disponibilité des nanoparticules de toute sorte, ont permis à l'humanité de ce qui sera possiblement rapporté dans le futur comme le début de l'âge du «nano». [Vajtai (2012)] Aujourd'hui, c'est le caractère multidisciplinaire des nanotechnologies qui intéresse des chercheurs dans des domaines visant à trouver des solutions aux grands problèmes énergétiques, aux problèmes de santé, à l'optimisation de technologies existante et les promesses de ce contrôle intime de la matière sont nombreuses, [*http://fr.wikipedia.org/wiki/Nanomatréiau*].

III.3. Définition

Les nanomatériaux sont des matériaux dans lesquels un paramètre au moins de la microstructure est de l'ordre du nanomètre (inférieur à 100 nm) [Suryanarayana (2008), Siegel et al. (1992)]. La limite à 100 nm repose sur le fait que dans un matériau massif, la fraction volumique des atomes dans les joints de grains devient non négligeable à partir de cette limite [Suryanarayana (1995)]. Ainsi, la grande fraction des atomes d'un nanomatériau est présente dans les joints de grains [Tjong et Chen (2004)]. Alors, les nanomatériaux représentent une classe de matériaux avec propriétés spécifiques par rapport à celles des matériaux conventionnels.

Les nanomatériaux peuvent se présenter sous forme de phases cristallines (monophasées ou polyphasées), quasi-cristallines ou amorphes. Ils peuvent être aussi des métaux, des céramiques, des polymères ou des composites. Plusieurs applications ont immergé pour ces matériaux à titre d'exemples : les revêtements résistants à la corrosion, les catalyseurs, les convertisseurs, les têtes d'enregistrement et de lecture magnétique, les couches géantes magnétorésistantes, les composants des micro-ordinateurs et aussi en secteur biomédical.

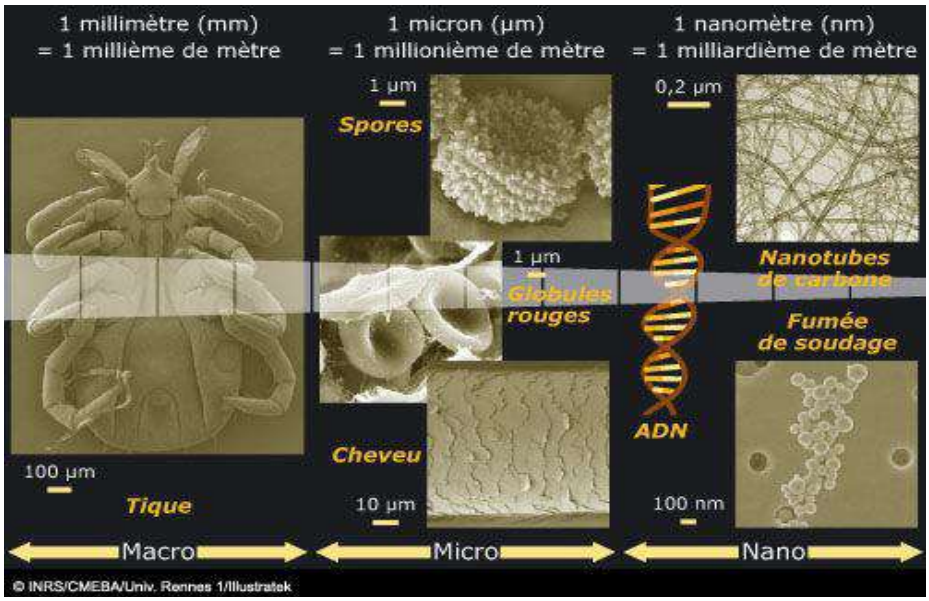


Figure III.1 : Extrait du dossier les nanomatériaux de l'INRS.
[http://fr.wikipedia.org/wiki/Nanomatréiau]

III.4. Echelles

C'est ainsi que «Santé Canada» (ministère de la santé au Canada) introduit une définition provisoire des nanomatériaux**.** «Tout produit manufacturé, matériaux, substance, dispositif, système ou structure» doit être considéré comme nanomatériaux :

- ✓ s'il est à l'échelle nanométrique, ou dans les limites de celle-ci, dans au moins une dimension spatiale,
- ✓ s'il est plus petit ou plus grand que l'échelle nanométrique dans toutes les dimensions spatiales et affiche un phénomène ou plus à l'échelle nanométrique.

«Santé Canada» précise que l'échelle nanométrique» signifie 1 à 100 nanomètres, c'est-à-dire la préconisation de l'ISO. Deux concepts spécifiques sont par contre ajoutés. Tout d'abord celui de «phénomènes à l'échelle nanométrique» qui sont liés à la taille et sont distincts des propriétés chimiques ou physiques des atomes, molécules et matériaux particuliers. D'autre part, «Santé Canada» distingue les produits manufacturés en précisant «le terme «manufacturé» comprend les processus techniques et les contrôles de la matière et des processus à l'échelle nanométrique».

De même, le NICNAS (autorité australienne qui régit la règlementation) définit le champ nano pour une entrée en application au premier janvier 2014 «matériaux industriels intentionnellement produits, fabriqués, modifiés pour avoir des propriétés uniques ou une structure spécifiques à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire entre 1 et 100 nanomètres, et qui est soit un nano-objet (c'est-à-dire confiné à cette échelle dans une, deux ou trois dimensions) soit nanostructuré (c'est-à-dire avec

une structure interne ou de surface à cette échelle)». On y retrouve l'échelle de 1-100 nm préconisée par l'ISO et les mêmes préoccupations que Santé-Canada, [Gaffet (2010)].

III.5. Structure et classification des nanomatériaux

L'une des caractéristiques importantes des nanomatériaux est le grand rapport atomique surface/volume. Cette large fraction d'atomes et leurs fines tailles et formes leurs confèrent des propriétés différentes de celles des matériaux conventionnels [Tjong et Chen (2004)]. Dans les joints de grains, les atomes sont très peu organisés contrairement aux matériaux à grains micrométriques où les atomes obéissent à une organisation cristallographique bien défini. Le nombre d'interfaces orientées aléatoirement dans un matériau nanocristallin de taille égale à 10 nm est de l'ordre de $6.10^{25}/m^3$ et par conséquent, une fraction considérable des atomes se trouve confinée dans ces interfaces. la diminution du diamètre des particules conduit à une augmentation du fraction volumique dans les joints de grains qui peut atteindre des valeurs de l'ordre de 50, 30 et 3% pour des tailles de grains de 5, 10 et 100 nm respectivement [Suryanarayana (2001)]. Plusieurs travaux ont été réalisés sur les joints de grains pour comprendre et améliorer les diverses propriétés des matériaux [Yoshizawa et al. (1994), Hono et al. (1992)] et ceci par le contrôle des interfaces présente dans le matériau polycristallin et par l'augmentation de la fraction d'interfaces dans le matériau par la réduction de la taille des grains [Gleiter (1989)].

Les nanomatériaux peuvent être classés en quatre familles selon leurs formes d'utilisation [Siegel (1993)]:

- ***Matériaux de dimension 0*** : les clusters d'atomes sous forme dispersée, aléatoire ou organisée.
- ***Matériaux de dimension 1*** : matériaux avec une structure lamellaire comme les nanofils ou les nanotubes.
- ***Matériaux de dimension 2*** : matériaux sous forme de couche mince, comme dans les dépôts d'agrégats ou de revêtements épais obtenus par projection plasma ou voie électrochimique.
- ***Matériaux de dimension 3*** : matériauxsous forme compacte comme dans les céramiques et les métaux nanostructurés.

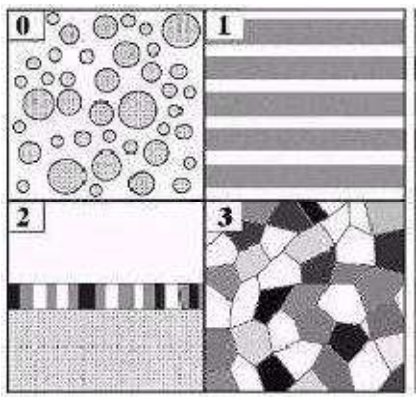


Fig. III.2. Différentes classe des nanomatériaux.

On peut également, classer les nanomatériaux selon leurs compositions chimiques et les dimensions, en quatre familles : dans la première famille, toutes les cristallites et les régions interfaciales ont la même composition chimique. La seconde famille est constituée de cristallites de composition chimiques différentes. Quand la composition chimique des cristallites et des joints des grains est différentes, le nanomatériau est classé dans la troisième famille. Dans ce cas, un des atomes tend à ségréger préférentiellement dans la région intergranulaire. La quatrième famille est formée par des cristallites nanométriques sont dispersées dans une matrice de composition chimique différente [Tjong et Chen (2004)].

III.6.Type des nanomatériaux

Un nanomatériau est constitué de nano-objets dont la taille est comprise entre (1et 10 nm) qui présente des propriétés spécifiques de l`échelle nanométrique. Ces matériaux peuvent être regroupés selon trois familles de produits, [Charlac'h et Hemery (2004)].

- ***Matériaux nanochargés ou nanorenforcés***

Les nano-objets sont incorporés ou produits dans une matrice pour apporter une nouvelle fonctionnalité ou modifier des propriétés mécaniques, optiques, magnétiques ou thermiques (dans des produits cosmétiques, dans des vernis, peintures, béton, encre d'imprimerie…etc.). Les composites chargés en nano-tubes de carbone en sont un bon exemple.
Ces nano-objets sont déjà utilisés dans de nombreuses applications industrielles.
Par exemple:

- ✓ les fumées de silice dans le béton, pour améliorer sa fluidité et ses propriétés mécaniques,
- ✓ l'alumine ultra fine destinée au polissage des wafers et disques durs en microélectronique,

- ✓ le noir de carbone utilisé dans les encres d'imprimante et les pneumatiques,
- ✓ les pigments colorés organiques et minéraux pour les peintures et vernis,
- ✓ les nano-particules de dioxyde de titane comme protection au rayonnement ultraviolet dans les crèmes solaires.

Cette catégorie de nanomatériaux inclut également les nano-charges naturelles telles que par exemple l'argile, la cellulose, le mica ou encore le calcaire, [Carlac'h (2004)].

- ***Matériaux nano-structurés en surface***

La réalisation d'un revêtement à partir de nano-couches élémentaires ou de multi nanocouches permet de doter la surface de propriétés préalablement déterminées (résistance à l'érosion, résistance à l'oxydation, revêtements hydrophobes, résistance à l'abrasion…etc.) ou de lui conférer de nouvelles fonctionnalités en termes :

- ✓ d'aspect,
- ✓ de dureté,
- ✓ d'adhérence (tribologie),
- ✓ de résistance à la corrosion,
- ✓ de propriétés optiques et/ou électroniques.

Les procédés de fabrication s'appuient sur des principes de dépôt physique (PVD, faisceau d'électrons, ablation laser…) ou chimique (CVD, épitaxie, sol-gel,…). Ce dernier procédé d'élaboration se prête particulièrement bien à la fabrication de ce type de revêtements.
Actuellement, le développement de cette catégorie de nanomatériaux est en phase d'industrialisation, [Carlac'h (2004)].

- ***Matériaux nano-structurés en volume***

Ce sont des matériaux qui, par leur structure intrinsèque nanométrique (porosité, microstructure) bénéficient de propriétés physiques particulières (céramique plus ductile par exemple, propriétés optiques, diélectriques améliorées) et parfois d'une grande surface d'échange (céramiques mésoporeuses par ex.). Le raffinement de la microstucture, jusqu'à obtenir une nanostructure, peut être obtenu par forte déformation du matériau. Les deux principaux verrous technologiques qui peuvent limiter aujourd'hui leur développement et leur usage sont la stabilité de la nano-structure à haute température et les procédés de fabrication.

Les matériaux de type biomimétiques (ailes de papillon, en ce qui concerne les propriétés optiques sélectives en fréquence, les coraux ou la nacre pour les propriétés mécaniques...etc.) et les

matériaux obtenus par auto-assemblage moléculaire font également partie de cette catégorie, [Carlac'h (2004)].

III.7. Propriétés des nanomatériaux

Les nanomatériaux, comme cela est décrit dans le rapport «les nanomatériaux : effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement » AFSSET (2006), présentent de nombreuses propriétés particulières dont les principales sont les suivantes :

- ***Propriétés mécaniques***

L'effet de la nanostructure peut se traduire par un phénomène de superplasticité. Les nanomatériaux peuvent ainsi permettre d'améliorer la résistance des matériaux sans compromettre leur ductilité, car la taille des nanoparticules limite les concentrations de contraintes. Il faut également noter l'effet de renfort dans les composites (absorption d'énergie, déviation des fissures, …etc.).

- ***Propriétés électriques***

L'introduction de nanoparticules et/ou de nanotubes peut modifier de façon drastique la conductivité électrique de matériaux réputés isolants, et ce à des taux de charges extrêmement faible, notamment lors de l'utilisation de nanotubes de carbone (NTC).

- ***Propriétés optiques : résonance de plasmon localisée***

Une propriété majeure des métaux à l'échelle nanométrique est qu'ils présentent une résonance de plasmon localisée (figue3). [Ghsh et Pal (2007), Pluchery et Carriére (2010)] Lorsqu'ils sont excités par une onde électromagnétique de longueur d'onde adaptée (longueur d'onde λ beaucoup plus grande que la taille des particules), une polarisation induite parait suite à la déformation du nuage électronique et il ya apparition de charges nettes à la surface (figure 4). Ces charges du métal se mettent à osciller collectivement, et en phase. Un phénomène de résonance des plasmons de surface se produit, si la fréquence de l'onde incidente correspond à la fréquence propre de ces oscillations.

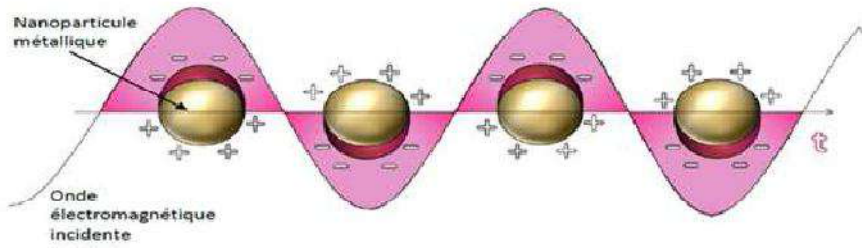


Figure III.3. Résonance des plasmon localisé [Ghsh et Pal (2007)].

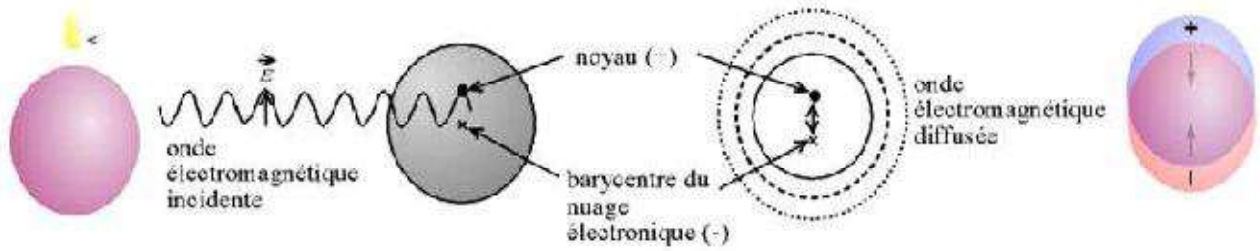


Figure III.4. Nanoparticule excitée par une onde électromagnétique ; polarisation de la nanoparticule, [Pluchery et Carriére (2010)].

- ***Propriétés de transfert thermique***

L'ajout de nanoparticules peut permettre d'améliorer certaines propriétés avec de faibles fractions volumiques. Par exemple, l'ajout de nanoparticules d'alumine ou d'oxyde de zinc peut modifier la conductivité thermique de fluides caloporteurs (nanofluides).

- ***Propriétés de barrière***

Dans les nano-composites à matrice polymère, l'incorporation d'argile augmente les propriétés de barrière vis-à-vis de l'eau et des gaz du fait de l'augmentation de la distance à parcourir pour les molécules qui diffusent.

- ***Inflammabilité***

L'introduction de lamelles d'argile de taille nanométrique dans une matrice polymère retarde sa dégradation et permet la formation d'une couche superficielle carbonisée qui ne se fracture pas mais forme une nanostructure multicouche de silicate améliorant les propriétés de barrière et de résistance, jouant le rôle d'un isolant et réduisant les émissions de produits volatils issus de la combustion.

- ***Propriétés magnétiques***

L'influence de la dimension des domaines cristallins a un effet très important sur le comportement magnétique des matériaux.

- ***Propriétés catalytiques***

Vu que les réactions chimiques sont des réactions de surface. En diminuant la taille des particules, le pourcentage d'atomes à la surface augmente (figure 5) .ce qui augmente la cinétique des réactions chimiques, d'où un caractère catalyseur des nanoparticules [Lehoux (2012), Belloni (2006)].

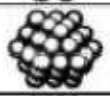
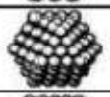
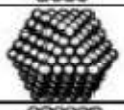
		Nombre total d'atomes	Atomes en surface (%)
Un motif		13	92
Deux motifs		55	76
Trois motifs		147	63
Quatre motifs		309	52
Cinq motifs		561	45
Sept motifs		1415	35

Figure III.5. Evolution du pourcentage d'atomes situés en surface en fonction du nombre d'atomes constituant la nanoparticule (Afsset, 2006) [Lehoux (2012)].

III.8. Morphologies de nanomatériaux actuellement étudiés ou exploités

Les plus souvent évoqués sont :

- ✓ Nanotubes de carbone ou de nitrure de bore.
- ✓ Nanoparticules métalliques : sphères métalliques de taille nanométrique. Ces nano-objets peuvent être synthétisés par voie chimique (croissance) ou physique (jets moléculaires). ex : Nanoargent désinfectant ou désodorisant dans les chaussettes et autres vêtements, ciment autonettoyant au dioxyde de titane ; crème solaire au dioxyde de titane… etc.

- ✓ Nanopoudres de céramique (silicates ou oxyde de titane) : obtenus en vaporisant des précurseurs métalliques et/ou organiques dans une flamme à très haute température. Ces nanopoudres ont des propriétés dans le traitement de surface de matériaux (durcissement), les matériaux bio-compatibles (implants osseux) et les polymères conducteurs notamment.
- ✓ Nanofibre, notamment de carbone : ces matériaux ont des propriétés qui intéressent le domaine de la conductivité électrique, de la résistance mécanique et des implants biocompatibles (muscles artificiels). Elles peuvent également servir à stocker efficacement l'hydrogène.
- ✓ Nanofeuille de verre : leur usage est envisagé dans le domaine des disques optiques. La densité d'informations pourrait être multipliée par 4 par ce procédé, mettant en œuvre le dépôt d'oxyde de cobalt sur la surface du disque. Des procédés mettant en œuvre du chrome, du zirconium et du cobalt laissent espérer des densités encore plus importantes.
- ✓ Nanofilm d'ADN : ces films ont des propriétés filtrantes, exploitables notamment dans le domaine environnemental.
- ✓ Nanocristal : par exemple, diamant artificiel ayant des propriétés électriques permettant de fabriquer de nouveaux microprocesseurs. Les cristaux naturels, comme l'opale ou le saphir sont soumis à des recherches. nanocristaux de semi-conducteurs fluorescents…etc.
- ✓ Nanocomposites : des matériaux composites ayant des propriétés de dureté et de résistance à l'usure. Nanoproduits pour l'alimentation ; antiagglomérant pour sucre de table à la silice (avis réservé de l'AFSSA en France qui demande un étiquetage spécifique).

III.9. Procèdes de fabrication de nano-objets et de nanomatériaux

Les nano-objets et les nanomatériaux manufacturés et destinés à des usages industriels peuvent être synthétisés selon deux approches différentes.

On différencie la méthode dite «ascendante» (en anglais Botton-up) de la méthode dite «descendante» (top-down)"Figure.III.6". L'approche «ascendante» vient des laboratoires de recherche et des nanosciences. Elle consiste à construire les nano-objets et les nanomatériaux atome par atome, molécule par molécule ou agrégat par agrégat.

L'assemblage ou le positionnement des atomes, des molécules ou des agrégats s'effectue de façon précise, contrôlée et exponentielle, permettant ainsi l'élaboration de matériaux fonctionnels dont la structure est complètement maîtrisée. L'approche «descendante» est issue de la microélectronique. Elle consiste à réduire et plus précisément à miniaturiser les systèmes actuels en

optimisant les technologies industrielles existantes. Les dispositifs où les structures sont ainsi graduellement sous dimensionnés ou fractionnés jusqu'à atteindre des dimensions nanométriques.

Les procédés actuels, permettant la fabrication de nano-objets ou de nanomatériaux, sont classés en trois grandes catégories : procédé par voie physique, par voie chimique et par voie mécanique.

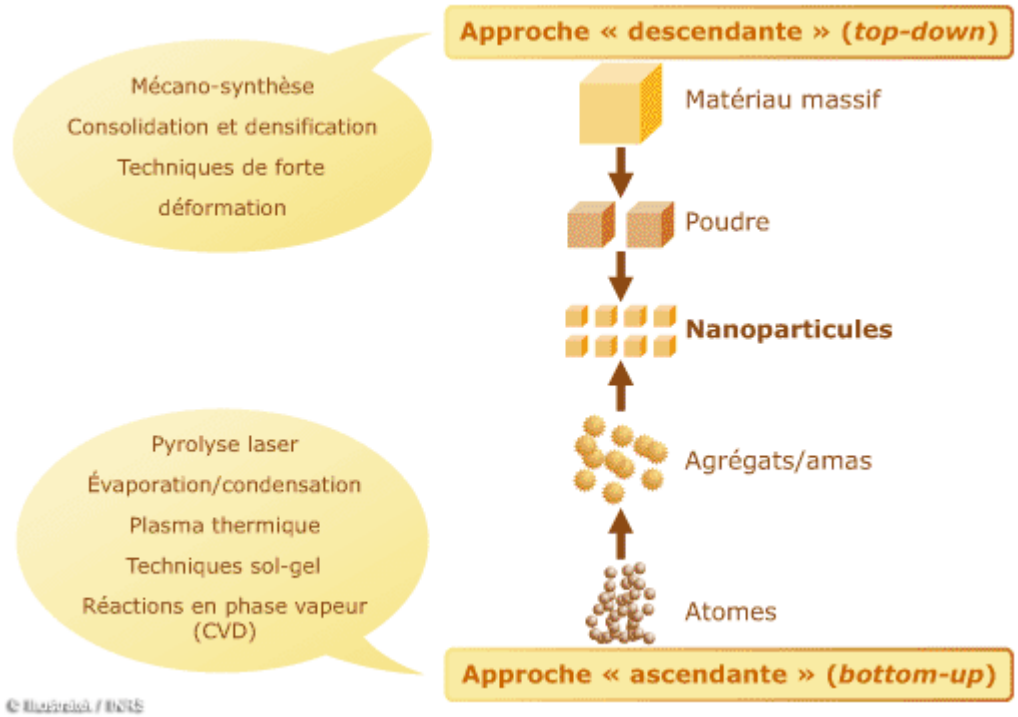


Figure III.6 : Approche ascendante et approche descendante, [Charles et al. (2003)].

III.9.1. Procédés par voie physique

- ***Laser pulsé***

Cette méthode a été utilisée dans la synthèse des nanoparticules d'argent. Une solution $AgNO_3$ et un agent réducteur sont mélangés à l'aide d'un dispositif mélangeur «blenderlike», dans lequel y a un disque solide en rotation dans la solution. Ce disque est soumis aux impulsions d'un faisceau laser. Sous l'effet de ces impulsions, le nitrate d'argent et l'agent réducteur réagissent dans les zones de surfaces du disque irradiées donnant des particules d'argent qui peuvent être séparées de la solution par centrifugation. La taille des particules est contrôlée par l'énergie du laser et la vitesse de rotation du disque. Cette méthode peut donner de 2 à 3 g/mn, [Charles et al. (2003)].

- ***Ablation laser***

La technique PLD (Pulsed Laser Deposition) a permis d'obtenir des films minces de bonne qualité dans divers matériaux. L'énergie utilisée pour l'ablation est apportée par l'impact d'un

faisceau laser de puissance élevée, généralement un laser UV impulsionnel (laser excimère). L'interaction laser-cible se traduit par une éjection brutale de la matière sous forme d'un panache de plasma de différentes espèces qui se condensent et se déposent sur un substrat chauffé placé face à la cible. Il se forme alors sur le substrat un film amorphe, polycristallin ou épitaxié selon les énergies des espèces, la température et la nature du substrat. Les mécanismes mis en jeu lors de l'ablation des matériaux ont été largement étudiés et discutés de manière détaillée dans la littérature, [Chrisey et Hubler (1994), Bäuerle (2000)].

Cette technique présente l'inconvénient d'être très directive, ce qui impose de travailler avec des échantillons de petites dimensions.

- ***Implantation ionique***

Elle est utilisée pour implanter les ions d'un matériau dans un autre solide, changeant de ce fait les propriétés physiques de ce solide. L'implantation ionique est utilisée dans la fabrication des dispositifs à semi-conducteurs, pour le traitement de surface des métaux, ainsi que pour la recherche en science des matériaux. Les ions permettent à la fois de changer les propriétés chimiques de la cible, mais également les propriétés structurales car la structure cristalline de la cible peut être abîmée ou même détruite. Plusieurs éléments ont été implantés dans une matrice de silice ou de verre tels que *(Si, Co, Ni, Zn)*, [D'orleans (2003)].

- ***Pyrolyse laser***

Elle repose sur l'interaction en jets croisés entre un faisceau laser infrarouge CO_2 et un flux de réactifs dans un réacteur sous atmosphère contrôlée. Le transfert d'énergie provoque une élévation de température dans la zone de réaction, les précurseurs sont dissociés, une flamme apparaît dans laquelle des nanoparticules sont formées sans interaction avec les parois du réacteur. Les précurseurs peuvent être gazeux ou liquides.

Dans le cas d'un liquide, le précurseur est injecté dans le réacteur sous forme d'aérosol.

Des nano-objets de différents matériaux ont été synthétisés par cette méthode de même que des nanoparticules de métaux nobles tels que l'argent, [Cai et al. (1997)] et l'or, [Maya et al. (1996)] ainsi que de semi-conducteurs tels que TiO_2 [Depero et al. (1994)], et *ZnS*, [Okuyama et al. (1997)].

III.9.2. Procédés par voie chimique

Les techniques de fabrication par voie chimique les plus couramment utilisées sont :

- ***Voie Sol-gel***

Le terme sol-gel correspond à l'abréviation «solution-gélification». Brièvement, un «sol» est une suspension colloïdale d'oligomères dont le diamètre est de quelques nanomètres seulement. Par la suite, on peut faire évoluer ce «sol», par le biais de réactions chimiques, en un réseau à viscosité infinie, appelé «gel».

Le principe de base du procédé sol-gel est donc le suivant : une solution à base de précurseurs en phase liquide se transforme en un solide par un ensemble de réactions chimiques (hydrolyse et condensation), le plus souvent à température ambiante, d'où le terme de chimie «douce».

La méthode sol-gel permet l'élaboration d'une grande variété d'oxydes sous différentes configurations (monolithes, films minces, fibres, poudres). Cette grande diversité, tant du côté des matériaux que de la mise en forme, a rendu ce procédé très attractif dans des domaines technologiques tels que l'optique, l'électronique, les biomatériaux, les senseurs (détection), les supports de séparation (chromatographie). Elle présente, en outre, l'avantage d'utiliser une chimie douce et de pouvoir conduire à des matériaux très purs ou dopés selon l'application visée, [Collingnon (2008)].

- ***Dépôt chimique en phase vapeur***

Le dépôt-vapeur ou CVD (Chemical Vapor Deposition) est une méthode de dépôt de films minces, à partir de précurseurs gazeux. La CVD est un procédé utilisé pour produire des matériaux solides de haute performance, et de grande pureté. Ce procédé est souvent utilisé dans l'industrie du semi-conducteur pour produire des couches minces. Dans un procédé CVD typique, le substrat est exposé à un ou plusieurs précurseurs en phase gazeuse, qui réagissent et/ou se décomposent à la surface du substrat pour générer le dépôt désiré. Fréquemment, des sous-produits de réactions, eux-mêmes en phase gazeuse, sont produits et évacués par le flux gazeux qui traverse en continu la chambre de réaction. Les expériences effectuées par cette technique ont permis la synthèse d'un grand nombre de nano-objets de diverses formes, tels que les nanofils de *Si*, [Yu et al. (2008)], et de bâtonnets de *ZnO*, [Gao et al. (2003)].

II.9.3. Procédé par voie mécanique

- ***Mécanosynthèse***

La technique dite de mécanosynthèse consiste généralement à broyer des poudres micrométriques (1 à 30 μm) de plusieurs alliages pour les incorporer.

La caractéristique essentielle de cette technique est de permettre l'obtention de nanoprécipités ou nano-objets dispersés de façon homogène au sein de la matrice.

Elle est par ailleurs adaptée à la production de matériaux en quantité qui s'expriment en kilogrammes, voire en tonnes, contrairement aux autres techniques.

- ***Consolidation et densification***

Lors d'un travail mécanique intense (métaux et intermétalliques uniquement), le processus qui permet de convertir un matériau pulvérulent en une pièce massive comporte deux étapes : une opération de compactage mécanique et une opération de frittage, libre ou sous charge.

- ✓ compactage à froid : Opération qui peut s'effectuer soit par pressage à sec, soit, dans les cas difficiles, par addition d'un lubrifiant ou par pressage humide. Le compactage humide est bien adapté aux céramiques et surtout aux oxydes. Avantage du compactage humide : gain considérable sur la température ou le temps de frittage.
- ✓ frittage : opération qui permet, par diffusion atomique à chaud, d'établir des ponts de matière entre les grains et ensuite de réduire la porosité.
- ✓ par Compression Isostatique à Chaud: on réalise ainsi les deux opérations ci-dessus en une seule étape.
- ✓ croissance des grains pendant la densification : l'enjeu le plus important pour les procédés de frittage des nanomatériaux est d'éviter la croissance des grains pendant la densification.

- ***Forte déformation***

La forte déformation d'un matériau cristallin (métal, céramique) provoque un raffinement de sa structure jusqu'à obtenir une taille de grains de quelques dizaines de nm.

Différentes techniques peuvent être utilisées (par torsion, extrusion…).

Ce raffinement permet généralement d'améliorer les propriétés de ténacité et de ductilité du matériau, [Charlac'h (2004)].

III.10. Utilisation

Aujourd'hui, les nanomatériaux sont présents en masse dans des domaines divers et variés. Le tableau suivant présente les principaux secteurs d'activités dans lesquels on retrouve les nanomatériaux ainsi que quelques exemples d'utilisation actuelle, [Davoust (2009)].

Tableau .III.1 : Les principaux secteurs d'activités dans lesquels on retrouve les nanomatériaux, [Davoust (2009)].

Secteur d'activité.	**Exemples d'utilisation.**
Automobile et aéronautique	✓ Matériaux renforcés et plus légers. ✓ Peintures anti-rayures/salissures/corrosion ✓ Aditifs pour diesel permettant une meilleure combustion. ✓ Pneumatique plus durable et recyclable.
Électronique et communication	✓ Mémoires hautes densités ✓ Processeurs miniaturisés. ✓ Ordinateurs rapides. ✓ Technologies sans fil. ✓ Écrans plats
Chimie et matériaux	✓ Vitres autonettoyantes ✓ Textiles antibactériens et ultra-résistants ✓ Isolation thermique
Santé	✓ Destruction de tumeurs par chauffages ✓ Thérapie génique : nano vecteurs pour transfert de gènes ✓ Microchirurgie : nano-implants et prothèses
Défense	✓ Systèmes de surveillance miniaturisés ✓ Système de guidage plus précis

III.11. Conclusion

Les nanomatériaux concernent le monde de l'infiniment petit. Ce domaine est en plein développement et suscite de nombreuses interrogations. La synthèse de l'état actuel des connaissances sur les nanomatériaux a permis de mettre en évidence que le risque d'explosion est avéré et fait l'objet d'études approfondies. Les nanoparticules sont très réactives et nécessitent une énergie minimale d'inflammation très faible. Le risque toxique, plus préoccupant et dimensionnant vis-à-vis de la population qu'il pourrait impacter, n'est pas totalement avéré à ce jour. Aucune conclusion d'études épidémiologiques n'est disponible. Aucune valeur limite d'exposition professionnelle n'est définie. On sait néanmoins que les nanoparticules peuvent atteindre les organes nobles du corps humain.

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

IV.1.1. Les premières études

L'étude de l'adsorption des protéines sur les surfaces débute dès le début du 20ème siècle sur des systèmes modèles dans lesquels une protéine purifiée interagit avec un solide. Nelson et Griffin montrent dès 1916 que l'invertase, une protéine qui hydrolyse le saccharose, s'adsorbe sur le charbon, [Nelson et al. (1916)] puis Willstatter et Schneider observent en 1924 une diminution de l'activité enzymatique de l'invertase adsorbée sur un minéral argileux, la kaolinite, [Willstatter et al. (1924)]. Les études réalisés dans les années1950 mesurent l'adsorption et l'activité de quelques protéines modèles, telles que la trypsine, le lysozyme, l'invertase, l'albumine, sur différents types de matériaux, et s'intéressent en particulier à l'effet du *pH*, de la salinité et des ions présents lors de l'adsorption. Hifchcock démontre ainsi en 1925 que l'adsorption de l'ovalbumine sur une membrane de collodion (matériau à base de nitrocellulose utilisé pour les pansements et de nombreuses autres applications (est *pH* dépendante, [Hifchcock (1925)] et peut être décrite par l'isotherme de Langmuir, développée quelques années plus tôt pour l'adsorption de molécules de gaz sur une surface, [Langmuir (1918)].

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

- ✓ la biochimie des sols, où l'adsorption des enzymes sur les minéraux argileux est étudiée pour évaluer l'influence de la perte d'activité enzymatique sur la dégradation de la matière organique dans les sols et la formation d'humus, [kiss (1958)]. Mclaren étudie l'activité de différentes enzymes adsorbées sur la kaolinite et la montmorillonite [Mclaren (1954,1957)] , et propose même d'utiliser l'adsorption des enzymes dans l'espace inteteuill et des phylosilicates pour évaluer la taille des protéines, [Mclaren (1961)] ;
- ✓ la purification des protéines par chromatographie, où l'adsorption des protéines sur les résines est centrale, [Shepard et Tiselius (1949)] , par exemple sur la silice pour la chromatographie d'adsorption. Zittle a notamment étudié l'effet de l'adsorption sur la résine sur l'activité des enzymes, [Zittle (1953)]. L'adsorption des protéines sur minéraux argileux est aussi utilisée pour la purification des protéines, [Bleuart (2005)] ;
- ✓ les conditions d'étude des protéines au laboratoire, car à partir de solutions diluées en protéines, leur adsorption sur la verrerie de laboratoire a été mise en évidence et s'accompagne d'une modification de l'activité des protéines adsorbées, [Bull (1956)] , [Bixler et Niemann (1959)] ce qui peut biaiser une analyse de l'activité d'enzymes diluées.

Ce phénomène nous conduit encore aujourd'hui à passiver les surfaces pour de nombreux tests biologiques, par adsorption du sérum albumine par exemple, [Sweryda-Krawiec et al. (2004)] , mais aussi pour des applications en médecine, [Mulvihill (1990)].

IV.1.2 De nouvelles questions sur les nanomatériaux : quelle toxicité?

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

Une des premières études de l'adsorption des protéines sur la silice colloïdale est réalisée par Bixler en 1959, [Bixler et Niemann (1959)]. Vroman montre en 1969 qu'un effet de compétition entre protéines s'opère lors de l'adsorption : les protéines de plus grande affinité "déplacent" les protéines de plus faible affinité sur la surface, [Vroman et Adams (1969)].

Les premières études de la toxicité des nanoparticules sont sans doute celles des particules ultrafines issues de la combustion du diesel réalisées dans les 1980-1990, on peut citer notamment le travail d'oberdoerster, [Oberdoerster et al. (1990)] , [Oberdoerster et al. (2005)]. La petite taille et l'utilisation croissante des nanomatériaux pose le problème de leur toxicité, puisque celle-ci diffère des matériaux de même nature mais de taille micrométrique et n'est donc pas connue, [Oberdoerster et al. (2005) , Warheit et al. (2008)]. L'étude de la nanotoxicologie, qui nécessite de nouveaux outils aussi bien de mesure que d'analyse, s'est ainsi développée ces dernières années, [Napierska et al. (2010) , Wijnhoven et al. (2009)].

L'utilisation croissante des NP dans des produits de consommation courante suscite inquiétude et questions du grand public quant aux risques liés spécifiquement aux nanomatériaux, car les nanotechnologies se sont développées et ont été utilisées avant que la toxicité des nanomatériaux ne soit étudiée ou totalement écartée, [Geai (2010) , Sarkar (2011)]. En effet, la réglementation était jusqu'à présent basée sur la nature des produits utilisés (Directive REACH pour l'Union Européenne) : les nanoparticules de silice, de dioxyde de titane ou d'argent pouvaient être utilisées car SiO_2 est inerte, TiO_2 est utilisé comme contrôle négatif en toxicologie et Ag est un bactéricide bien connu. Le risque "nano" n'était pas étudié pour ces matériaux et n'apparaissait pas dans la législation.

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

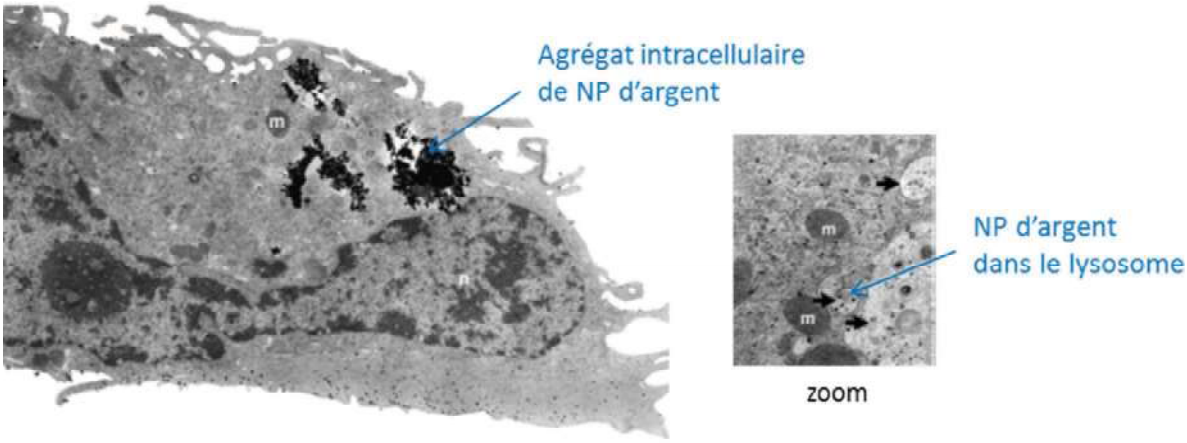


Figure. IV.1: Image par microscopie électronique à transmission d'un macrophage après exposition à des nanoparticules d'argent recouvertes d'un peptide : les nanoparticules d'argent sont présentes à la fois sous forme d'agrégats de grande taille dans le cytoplasme. (à gauche) et de particule dans les lysosomes (zoom) (m : mitochondrie, n : noyau), [Haase et al. (2011)].

IV.1.3. Mécanismes de toxicité intracellulaire

Lorsque les nanoparticules sont internalisées, elles peuvent se trouver dans une vésicule, libres dans le cytoplasme ou dans le lysosome (figure. IV.1). Elles sont plus rarement localisées dans le noyau. Leur distribution subcellulaire, notamment au niveau des autres organelles, est assez mal connue et dépend à nouveau du type de nanoparticule et de cellule. Par contre, différents effets cytotoxiques ont pu être identifiés, comme une altération des mitochondries, qui montre que des nanoparticules d'oxyde de cérium peuvent interagir avec celles-ci, [Hussain et al. (2012)].

Les principaux effets cytotoxiques identifiés des nanoparticules sont la dissolution des métaux et la libération d'ions toxiques, des dommages aux membranes et un stress oxydant, [Nel et al. (2009)]. Des effets écotoxiques plus rares ont été observés par dommage à l'ADN, par exemple avec des nanoparticules d'oxyde de cuivre et d'oxyde de titane.

En réalité les mécanismes moléculaires de toxicité des NP sont encore mal connus et différentes voies de signalisation pourraient être impliquées, [Marano et al. (2011)].

L'effet cytotoxique des nanoparticules dépend également des protéines et molécules adsorbées à leur surface. La cytotoxicité des nanoparticules de titane est plus faible lorsque des protéines du sérum sont adsorbées en surface, malgré une plus grande quantité de nanoparticules internalisées, [Tedja et al. (2012)]. Cela montre que la simple mise en suspension des nanoparticules dans un milieu de culture avant de réaliser un test in vitro n'est pas suffisante: les protéines présentes et adsorbées à la surface des nanoparticules étudiées doivent être identifiées et caractérisées, elles doivent également être représentatives du milieu dans lequel vont "baigner" les nanoparticules avant d'être exposées aux cellules.

IV.1.4. Un risque de toxicité par adsorption des protéines

L'adsorption des protéines pourrait elle-même générer une toxicité directe, à l'échelle moléculaire, par la modification de la structure et de l'activité des protéines adsorbées (Figure. IV.2).

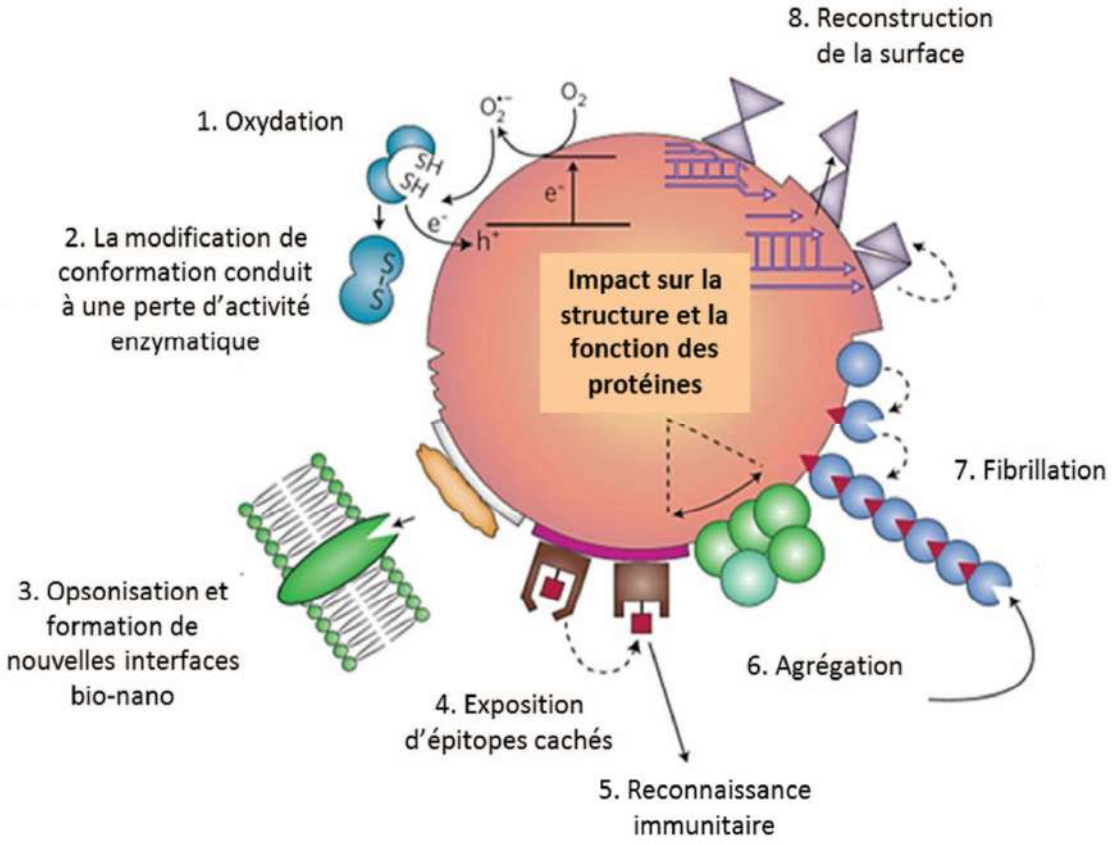


Figure. IV.2:Toxicité potentielle due à l'interaction directe entre protéine et nanoparticule d'après Nel, [Nel et al. (2009)]. Dans le modèle de Nel, la reconstruction de la surface libère de l'énergie qui permet la modification de structure des protéines adsorbées. La numérotation n'est pas chronologique.

L'opsonisation par l'adsorption d'immunoglobulines, de protéines du complément ou d'autres protéines (n°3 sur fig. IV.2) peut conduire à l'adsorption de plaquettes dans le sang, à la phagocytose dans les alvéoles pulmonaires, ce qui crée un nouveau contact entre nanoparticules et cellules.

Plusieurs hypothèses sont proposées et basées sur l'observation d'une modification de la structure des protéines adsorbées. Les risques possibles de toxicité à l'échelle moléculaire sont la plus grande sensibilité à l'oxydation de la protéine adsorbée, [Nelson et Griffin(1916)] , la modification de sa structure et la perte d'activité enzymatique, [Willstatter et Schneider (1924)]. La modification de la structure de la protéine pourrait conduire à l'exposition de nouveaux

épitropes, [Langmuir (1918)] , déclenchant une réaction immunitaire contre une protéine du soi, similaire à une réaction auto-immune, [Kiss (1958)]. L'exposition de nouveaux épitropes peut elle conduire à des réactions inflammatoires, de type allergie, par exemple lorsque les nanoparticules sont présentes dans l'alimentation (nanoparticules de silice + cacahuète)?

L'adsorption pourrait également provoquer l'agrégation [Mclaren (1954)] et la fibrillation des protéines [Mclaren et Estermann (1957)] , associée notamment à un risque de maladies neurodégénératives en cas d'entrée des nanoparticules dans le cerveau. Quelques études ont rapporté l'agrégation de protéines en présence de nanoparticules in vitro: Linse a montré que la tibrillation de la β2-microglobuline pouvait être déclenchée par des nanotubes de carbone, des quanta dots et des nanoparticules d'oxyde de cérium, même si rien ne prouve qu'un tel processus puisse avoir lieu en milieu biologique [Linse et al. (2007)]. Chen a montré, cette fois sur des cellules, que des nanoparticules de silice pouvaient pénétrer dans le noyau de la cellule et provoquer l'agrégation de protéines nucléaires, notamment de la topoisomérase, ce qui conduit à l'arrêt de la réplication, de la transcription et de la division cellulaire [Chen et von Mikecz (2005)]. L'adsorption de certaines protéines plus sensibles à l'agrégation pourrait donc avoir des conséquences graves sur la cellule.

L'adsorption de certaines protéines pourrait au contraire diminuer la toxicité cellulaire des nanoparticules: c'est le cas lors de l'adsorption préalable de la glutathionne transférase sur les nanoparticules de silice [Shi et al. (2012)]. Comment l'adsorption de deux protéines pourrait elle conduire dans un cas à la tibrillation, dans un autre à un effet protecteur?

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

Les raisons choisi pour l'étude de l'adsorption des protéines sur les nanomatériaux sont, [Devineau (2009)] :

- ✓ un risque de toxicité des nanoparticules qui dépend de la couronne de protéines adsorbées à leur surface et des modifications des protéines adsorbées [Cedervall et al. (2007)], [Walczyk et al. (2010)]. Une meilleure connaissance des interactions entre protéines et nanomatériaux est nécessaire pour mieux comprendre leurs effets biologiques ;
- ✓ de nouvelles applications, parmi lesquelles des applications médicales où le phénomène d'adsorption des protéines est essentiel, et des applications industrielles où l'adsorption d'enzymes sur un nouveau type de support peuvent être recherchée ;

- ✓ des spécificités : les nanomatériaux présentent des géométries (courbure) et des propriétés (réactivité) différentes de celles des surfaces planes, permettant d'étudier l'influence de nouveaux paramètres sur l'adsorption. De plus, les plus petites nanoparticules ont une taille équivalente aux protéines de grande taille, ce qui change complètement le rapport d'échelle entre protéine et surface ;
- ✓ une très grande surface spécifique qui permet d'utiliser de nouvelles techniques d'analyse pour étudier les protéines adsorbées (comme la diffusion de neutrons).

IV.2. Les modèles d'adsorption des protéines

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

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

Si le modèle de Langmuir, qui décrit l'adsorption des gaz sur les surfaces, est utilisé très tôt pour décrire les isothermes d'adsorption des protéines sur les surfaces [Hitchkock (1925)] , l'adsorption des protéines est toutefois rapidement rapprochée de celle des polymères, qui comme les protéines sont des macromolécules susceptibles d'interagir en plusieurs points avec la surface, à la différence des petites molécules étudiées jusqu'alors [James et Augenste (1966) , Koral et al. (1958)]. A la manière d'un velcro, un polymère est adsorbé sur la surface par plusieurs "pattes", si une ou deux "pattes" se décollent, il en reste toujours plusieurs autres pour maintenir le polymère adsorbé, [Frantz et Granick (1991) , Hugel et al. (2001)] (fig.IV.3).

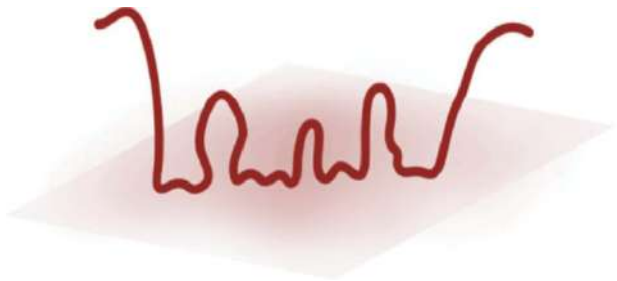


Figure. IV.3 : Adsorption d'un polymère flexible sur une surface par plusieurs points d'ancrape, d'après [Norde (2008)].

Les polymères formés de très longues chaînes, branchés ou non, sont flexibles et peuvent se mouvoir avec un grand nombre de degrés de liberté en solution. Les interactions entre polymères et surface sont favorisées par des interactions spécifiques, qui peuvent être des interactions électrostatiques dans le cas des polyélecfrolytes de charge opposée à la surface, et seraient défavorisées par la perte d'entropie associée à une conformation [Norde (2008)]. Comme pour les polymères poly amphotères, l'adsorption des protéines sur la surface serait maximum à leur point isoélectrique [Hitchcock (1925)], [Shepard et Tiselius (1949)] grâce aux interactions électrostatiques avec la surface [Norde et Lyclema (1978)]. Toutefois, polymères et protéines peuvent s'adsorber sur une surface malgré un effet de répulsion électrostatique, d'autres mécanismes sont donc impliqués, [Norde (2008)].

De plus, une hétérogénéité de conformation des polymères adsorbés est observée. Par exemple, lors de l'adsorption du polystyrène sur une surface de silice, les premières chaines s'adsorbent avec un grand nombre de points de contact avec la surface, tandis que les chaines adsorbées plus tardivement sont moins fortement adsorbées et présentent une conformation différente, [Douglas et al. (1997)]. Il y a donc un étalement des polymères sur la surface lorsque la surface disponible est grande. Or la structure des protéines adsorbées évolue, comme pour les polymères [Frantz et Granick (1991)] , avec le temps de résidence à la surface et avec la surface disponible : les protéines adsorbées pour les temps de contact les plus longs et à faible concentration sont celles qui se désorbent le moins [Soderquist et Walton (1980)]. Selon un processus similaire, les protéines adsorbant sur la surface au cours du temps, ce qui maximiserait les forces d'interaction avec la surface, [Andrade et Hlady (1986)] , [Ven der Ween et al. (2007)].

Le modèle d'adsorption des protéines de Norde

A partir de l'élude de l'adsorption de protéines modèles en fonction du type de surface et des conditions physico-chimiques, Norde propose un modèle d'adsorption des protéines qui explicite les mécanismes sous-jacents à l'adsorption et qui vise à prédire l'adsorption ou la non adsorption des protéines sur une surface [Norde (2008) , Norde et Lyclema (1979)]. Le modèle de Norde a été largement utilisé et repris dans les études d'adsorption des protéines [Andrade et [Hlady (1979)], [Haynes et al. (1994)]. D'après le modèle de Norde, l'adsorption des protéines dépendent du point isoélectrique et de la stabilité de la structure de la protéine d'une part, de la charge et de l'hydrophobicité de la surface d'autre part (tableau IV.1). La stabilité est définie dans ce modèle par rapport aux modifications structurales des protéines adsorbées : Norde définit des protéines "dures" qui subissent peu de modifications structurales lors de l'adsorption, et des

protéines "molles" qui perdent une partie de leur structure lors de l'adsorption, [Lyklema et Norde (1996)].

Tableau. IV.1: Conditions d'adsorption des protéines sur la surface selon le modèle de Norde [Norde (2008)] en fonction de la stabilité structurale de la protéine (protéine "dure", protéine "molle"), de son point isoélectrique (charge globale de la protéine), de la charge et de l'hydrophobicité de la surface. Prédiction de l'adsorption (A) ou du non adsorption (NA) de la protéine sur la surface.

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

On constate que dans la plupart des cas les protéines s'adsorbent sur les différentes surfaces selon ce modèle, la non adsorption restant une exception. Pour Norde, l'adsorption des protéines sur les surfaces hydrophobes est toujours favorable quelles que soient la charge globale de la surface et de les protéines s'étalent sur la surface et augmentent leur surface d'interaction. Norde conclut de façon plus générale en disant que toute protéine s'adsorbe sur une surface hydrophobe et que l'adsorption des protéines augmente avec l'hydrophobicité de la surface.

La modification de la structure de la protéine adsorbée correspondrait à une perte de structure ordonnée et serait associée à un gain important d'entropie conformation elle à l'origine de l'adsorption. Les protéines "dures" dont la structure ne serait pas modifiée ne pourraient pas s'adsorber.

Les mécanismes d'adsorption des protéines revus par [Czeslik (2003)]

Pour déterminer si une protéine est "dure" ou "molle" et prédire son adsorption, la stabilité structurale des protéines sont supposée équivalente à la stabilité en température : les protéines "dures" sont les protéines qui ont une température de dénaturation élevée et les protéines "molles" celles qui ont une température de dénaturation plus faible, [Czeslik *et al.* (2003)].

Dans une revue récente, Czeslik complète le modèle d'adsorption de Norde par des données thermodynamiques de l'adsorption des protéines, [Czeslik (2004)]. Il reprend les mécanismes d'adsorption suivants :

- ✓ Interactions de van der Waals : une contribution favorable mais de faible amplitude à l'énergie d'adsorption des protéines

- ✓ Interactions électrostatiques : une contribution importante de l'adsorption
- ✓ Interactions hydrophobes: la contribution majeure de l'adsorption, par déshydratation des chaînes latérales hydrophobes et de la surface
- ✓ Modification de la conformation et gain d'entropie : la modification de conformation de la protéine adsorbée n'est pas nécessairement associée à une augmentation du nombre de degrés de liberté, cette interprétation est discutée

Czeslik montre bien qu'il n'y a pas de mesure expérimentale du gain d'entropie associé à la modification de la conformation des protéines adsorbées, mais il estime dans un premier temps que ce mécanisme est probable car très favorable (une contribution très favorable est nécessaire dans le modèle de Norde pour expliquer l'adsorption des protéines de même charge globale que la surface) et qu'il explique selon lui la plus grande adsorption des protéines de faible stabilité structurale [Czeslik (2004)]. Pourtant, il rapporte dans un autre article une diminution de la mobilité des résidus tryptophane de protéines adsorbées sur la silice, ce qui correspond à une perte d'entropie lors de l'adsorption [Czeslik et al. (2003)]. Czeslik conclut finalement que pour ce système, le gain d'entropie par perte de structure est peu probable, et propose une augmentation des interactions avec la surface lors de l'étalement de la protéine pour explique l'adsorption.

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

1. Quelle l'hétérogénéité de conformation des protéines adsorbées?

L'adsorption des polymères sur une surface conduit à une grande hétérogénéité de conformations [Lwakura et al. (2001)] et il a été montré que la structure des protéines adsorbée évoluait au cours du temps, depuis un premier contact jusqu'à l'étalement de la protéine sur la surface [ven der Veen et al. (2007)]. Une fois l'équilibre atteint, l'analyse de la structure par dichroïsme circulaire ou par spectroscopie infrarouge, ne donne qu'une mesure moyenne de la structure des protéines adsorbées. Existe-t-il cependant une hétérogénéité de structure des protéines adsorbées?

2. Quelle dynamique des protéines adsorbées?

La modification de la structure de la protéine adsorbée s'accompagne-t-elle d'une augmentation ou d'une diminution de sa dynamique? très peu de données existent dans la littérature sur la dynamique des protéines adsorbées [Czeslik et al. (2003)]. A l'aide de deux

mesures très différentes, RMN du solide et anisotropie de fluorescence, deux études montrent cependant que l'adsorption pourrait conduire à une diminution de la dynamique des protéines [Devineau (2009)].

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

Alors qu'une modification de la structure des protéines adsorbées est observée pour de nombreux systèmes, à quelques exceptions (une protéase sécrétée, pagne en hélicité) lorsqu'elle est adsorbée sur le Téflon [Lyclema et Norde (1996)] , les variations d'activité des protéines adsorbées sont nettement plus diverses : la conservation, la diminution ou l'augmentation de l'activité de la protéine adsorbée semblent dépendre de chaque protéine [Zoungrana et al. (1997)], [Fischer et al. (2002) , Welsch et al. (2012)].

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

La plupart des études sont réalisées sur une protéine purifiée isolée adsorbée sur une surface. La prédiction de l'adsorption d'une protéine isolée ne s'applique pas ou peu à l'adsorption des protéines à partir d'un milieu complexe riche en protéines, par exemple lorsqu'un biomatériau est en contact le sang. En effet, la composition en protéines adsorbée diffère de celle du milieu environnant : en fonction de leur abondance et de leur affinité, certaines protéines sont préférentiellement adsorbées à l'interface [Chon et al. (1995)] , [Vromn et Adams (1969), Jung et al. (2003)]. Or les critères définis jusqu'à présent, point isoélectrique et stabilité structurale, ne permettent pas de déterminer l'affinité d'une protéine pour une surface et de prédire l'adsorption des protéines lorsque celles-ci sont en compétition.

Certaines études ont permis de mettre en évidence pour un système donné la zone d'interaction de la protéine avec la surface [Negadom et al. (1993), Aizawa et al. (1998)] , ou de souligner le et lysine jouent rôle de certains acides aminés dans l'adsorption : par exemple, les résidus arginine un rôle important lors de l'adsorption du lysozyme sur l'hydroxyapatite [Aizawa et al. (1998)]. Ce type d'observation est il généralisable à d'autres systèmes ou reste-t-il spécifique d'une interaction protéine/surface donnée? Pourrait-on utiliser des critères moléculaires pour prédire l'adsorption des protéines sur une surface?

[Devineau (2009)] Au-delà de la prédiction de l'adsorption, le contrôle de l'adsorption, de la structure et de l'activité des protéines adsorbées est une étape clé pour de nombreuses applications. Dans ce travail, nous essaierons de mieux comprendre les mécanismes d'adsorption des protéines sur les surfaces et leurs conséquences en termes de structure, d'activité et de

dynamique des protéines adsorbées. De plus, nous nous intéressons à un système à l'équilibre, l'aspect cinétique de l'adsorption des protéines n'est donc pas étudié.

IV.3. Choix des protéines et des nanomatériaux étudiés

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

Deux approches ont été développées : nous allons exposer les résultats de [Devineau (2009)], qui concerne d'une part l'adsorption de protéines modèles purifiées sur la silice nanostructure, ce qui permet d'analyser la structure, la dynamique et l'activité des protéines adsorbées, et d'autre part l'adsorption des protéines à partir d'un milieu complexe, un extrait cellulaire de levure, contenant plusieurs milliers de protéines susceptibles d'interagir avec la surface. Leur adsorption a été caractérisée par [Devineau (2009)] afin d'identifier de possibles déterminants de l'adsorption des protéines sur la surface de silice.

Silice nanostructurée

L'adsorption des protéines sur la silice, [Devineau (2009)] peut se développer sur la silice présente naturellement dans l'environnement : cristaux de quartz et cristobalite pour la silice cristalline, Chalcédoine et thèque des diatomées pour la silice amorphe par exemple, ou sur des matériaux manufacturés, de façon intentionnelle ou par exposition accidentelle.

Voici quelques exemples de situations réelles (ou possibles) d'adsorption de protéines sur la silice, en particulier sur la silice nanostructurée, [Devineau (2009)] :

- ✓ Silice biogénique : les silattines sont des protéines impliquées dans la biominéralisaion des trusfules de diatomées [Hildebrand (2008)].
- ✓ Biomatériau : une céramique à base de silice est étudiée comme matrice pour la reconstruction du tissu osseux [Mesuger et al. (2008)].
- ✓ Pharmacologie : les nanoparticules de silice mésoporeuses sont étudiées comme vecteurs possibles de médicaments [Slowing et al. (2007)]

- ✓ Support d'enzyme immobilisée : dans l'industrie agroalimentaire, la silice poreuse est utilisée comme support pour l'immobilisation de la lactase qui catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose [Klibanov (1983) , Betzelbauer et al. (2002)]
- ✓ Biocapteurs : une micropuce en silice est utilisée pour immobiliser des anticorps et réaliser un test immunologique directement à partir du sang [Yakovleva et al. (2002)] ; un biocapteur pour la mesure de la concentration en urée est réalisé en immobilisant une uréase sur une silice poreuse [Limbut et al. (2004)]

Les matériaux représentés sont tous siliceux mais ont des géométries, tailles et cristallinité différentes (fig. IV.4). Dans l'étude de [Devineau (2009)]

Afin de ne pas se limiter à un seul type de matériau, l'auteur a étudié différents types de silice amorphe nanostructurée : les nanoparticules de silice de 7 et 20 nm de diamètre d'une part, les verres de silice de porosité 8 et 50 nm d'autre part.

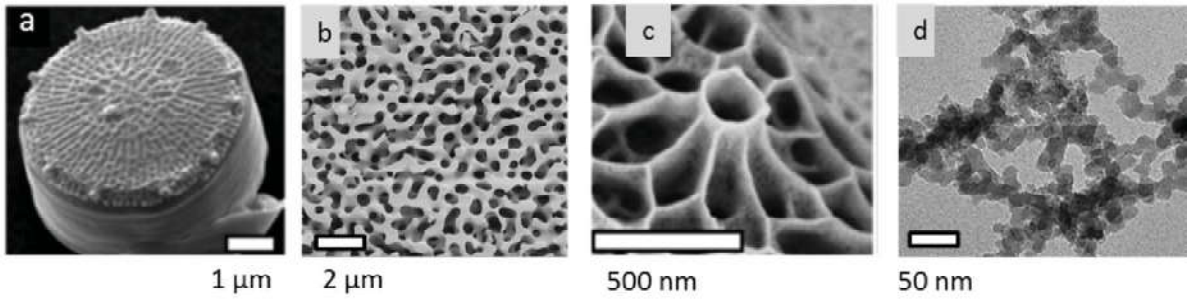


Figure. IV.4 : Exemple de silice amorphe micro et nanostructurées, biogénique et synthétique crustules de diatomées :(a) frustule de thalassiosira pseudonana, (c) défaille de la frustule de thalassiosira weissflogii, d'après [Heldebran (2008)]. Silice synthétique :(b) verre de silice poreuse(CPG), (d) nanoparticules de silice(Sigma)

Les nanoparticules de silice étudiées par, [Devineau (2009)] sont représentatives des nanoparticules produites industriellement. Le choix s'est porté vers des nanoparticules produites à grande échelle et disponibles en grandes quantités plutôt que vers une synthèse en laboratoire, qui fournirait en petite quantité un produit peu comparable à ceux utilisés par l'industrie.

Protéines modèles pour l'étude de l'adsorption

Les protéines modèles choisies pour l'étude par [Devineau (2009)] sont la myoglobine, l'hémoglobine et le sérum albumine. Ces protéines peuvent être disponibles en grandes quantités et leurs caractéristiques biochimiques et structurales sont bien connues. De plus, elles sont

différentes selon les deux critères définis par Norde pour l'adsorption des protéines sur les surfaces hydrophiles : *point isoélectrique et stabilité structurale*.

IV.4. Caractérisation des nanomatériaux

Les nanomatériaux sont définis comme les matériaux ayant au moins une dimension inférieure à 100 nm. Ils sont séparés des matériaux micrométriques car leur petite taille leur confère des propriétés originales, comme une plus grande résistance mécanique (nanotubes de carbone) ou de nouvelles propriétés de fluorescence (quantum dots) et une plus grande réactivité grâce à un rapport surface/volume important, d'où leur utilisation pour la création de nouveaux catalyseurs ou biocapteurs de glus grande efficacité [Gupta et al. (2011)]. Du point de vue biologique, leur petite taille pourrait conduire à leur incorporation et à leur internalisation après inhalation, ingestion ou contact, et leur grande réactivité peut induire des dommages aux cellules [Warheit et al. (2007), Lundqvist et al. (2008)].

Cette nouvelle classe des nanomatériaux regroupe cependant des objets qui peuvent être très différents : une nanoparticule d'or, un quantum dot et une fibre de silice sont autant de nanomatériaux aux propriétés distinctes. Il existe des différences de géométrie : fibres (*une dimension < 100 nm*) , feuillets et nanotubes (*deux dimensions < 100 nm*) et nanoparticules (*trois dimensions < 100 nm*) ; de taille : de 1 *à* 100 nm, de chimie : métaux, oxydes, polymères, lipides… ; ou encore de forme cristalline : carbone et diamant, anatase et rutile... Compte tenu de leur diversité, il est important de caractériser au mieux les nanomatériaux étudiés, pour comprendre l'effet d'un paramètre en particulier, comme la surface ou la chimie, et permettre la comparaison des études entre elles [Auffan et al. (2009), Thomassen et al. (2010)].

IV.4.1. Quels critères pour caractériser les nanomatériaux?

Pour étudier les interactions entre protéines et silice nanostructurée, [Devineau (2009)] a travaillé sur des nanoparticules de silice produites industriellement et dans une moindre mesure sur des verres de silice nanoporeuse. Avant d'étudier les interactions protéine-silice, [Devineau (2009)] à caractériser les nanomatériaux, mais selon quels critères? La taille, la surface et la chimie sont-elles suffisantes ?

Tableau. IV.2.a : Liste des critères de caractérisation des nanomatériaux définie par l'OCDE. Les critères connus ou mesurés sur les NP silice sont indiqués en italique

Liste des critères	Caractérisation des nanomatériaux
Information sur nanomatériau, Identification	*- Nom* *- Numéro CAS* *- Formule structurelle/structure moléculaire* *- Composition du nanomatériau testé* *- Morphologie de base* *- Description de la chimie de surface* *- Principales utilisations commerciales* *- Activité catalytique connue* *- Méthode de production* *- Image(s) représentative(s) obtenue(s) par microscopie électronique à transmission* *- Surface spécifique* *- Potentiel zéta(charge de surface)* *- Chimie de surface* - Activité photo catalytique *- Densité brute* *- Porosité* - Coefficient de partage octanol-eau,s'il Ya lieu - Potentiel de réduction – oxydation - Potentiel de formation de radicaux - Autres informations pertinentes
Sureté du matériau	*- Inflammabilité* *- Explosivité* - Incompatibilité
Propriétés physico-chimique et caractérisation du matériau	- Agglomération /agrégation *- Solubilité dans l'eau* *- Phase cristalline* - Pulvérulence - Taille des cristallites - Hydrolyse, pour les nanomatériaux à surface modifiée - Adsorption-désorption - Adsorption dans les sols ou les sédiments - Potentiel de bioaccumulation - Autres informations pertinentes

Tableau. IV.2.b (Suite) **:** Liste des critères de caractérisation des nanomatériaux définie par l'OCDE
Les critères connus ou mesurés sur les NP silice sont indiqués en italique

Liste des critères	Caractérisation des nanomatériaux
Toxicologie environnementale	- Effets sur les espèces pélagiques (à cout terme /à long terme) - Effets sur les espèces sédimentaires (à cout terme /à long terme) - Effets sur les espèces pédologiques (à cout terme /à long terme) - Effets sur les espèces terrestres - Effets sur les espèces microorganismes - Autres informations pertinentes
Devenir dans l'environnement	- *Stabilité de la dispersion dans l'eau* - Dégradabilité biotique - Biodégradabilité facile - Essai de simulation sur la dégradation ultime dans les eaux de surface - Essai de simulation pour les sols - Essai de simulation pour sidéments - Essai de simulation pour eaux usées - Identification du (des) produit (s) de dégradation - Autres essais concernant le (les) produit (s) de dégradation si nécessaire - Dégradabilité abiotique et devenir
Toxicologie pour les mammifères	- Pharmacocinétique (ADME) - Toxicité aigue - Toxicité à doses répétées dans les limites information - Toxicité chronique - Toxicité pour la reproduction - Toxicité pour le développement - Toxicité génétique - Expérience acquise concernant l'exposition humaine - Autre données d'essai pertinentes

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

IV.4.2. Nanoparticules de silice

Deux types de nanoparticules ont été utilisés par [Devineau (2013)] afin de ne pas limiter l'analyse à un seul cas particulier. [Devineau (2013)] a étudié les fumées de silice, de taille 7 nm et produites par Sigma *(référence S5130)* , et les nanoparticules de silice de 20 nm, également produites par Sigma *(référence 637238).* Les fumées de silice sont produites par la combustion à 1800˚C du tétrachlorure de silicium. Les nanoparticules de silice de 20 nm sont synthétisées par la méthode sol-gel selon le procédé de stober, élaboré en 1968 et couramment employé pour la synthèse de particules de silice [Stober (1967)]. La réaction est basée sur l'hydrolyse à température ambiante de tétraalkoxysilane (par exemple $Si(OCH_3)_4$ ou $Si(OC_2H_5)_4$ avec un groupement éthyle ou méthyle (réalisée dans une solution d'alcool et catalysée par l'ammoniaque.

Les procédés de synthèse sont différents et bien que toutes deux amorphes, les nanoparticules de silice sont hydrophiles en surface tandis que les fumées de silice sont en principe hydrophobes (siloxane *Si-O-Si* en surface).

IV.4.2.1 Chimie de la silice colloïdale

La silice est un matériau qui a été largement étudié, aussi bien sous sa forme macroscopique que colloïdale, et de nombreuses données sont disponibles dans la littérature [Iler (1979)]. Les informations qui me paraissent les plus importantes pour notre système, la cristallinité, la solubilité, la chimie de surface et la réactivité.

Cristallinité

Les nanoparticules de silice représentent simplement les plus petites particules de silice colloïdale, qui regroupe l'ensemble des particules de silice amorphe en suspension dans une solution, synthétisées dès le début du 20ème siècle. Le caractère amorphe des NP de silice est lié à leur taille et aux procédés de synthèse. La silice amorphe en solution est très stable et aucune cristallisation n'a été observée à température ambiante sur des solutions au bout de 25 ans, [Iler (1979)].

Solubilité

La forme soluble de la silice est $Si(OH)_4$, cependant, la silice est connue pour avoir une très faible solubilité dans l'eau. La solubilité du quartz, une des formes cristallines de la silice, est seulement de 11 ppm à 25˚C, [Iler (1979)]. La dissolution complète d'un cristal requiert des conditions très agressives, soit par fusion alcaline à *pH* basique et haute température, soit par ajout d'acide fluorhydrique concentré. Toutefois, la solubilité de la silice amorphe dans l'eau est

plus élevée et comprise entre 70 et 150 ppm à 25˚C selon les études de [Iler (1979)]. Des autres critères, tels que la taille, la température et le *pH* de la solution peuvent également favoriser une plus grande solubilité des NP de silice (Fig.4.5).

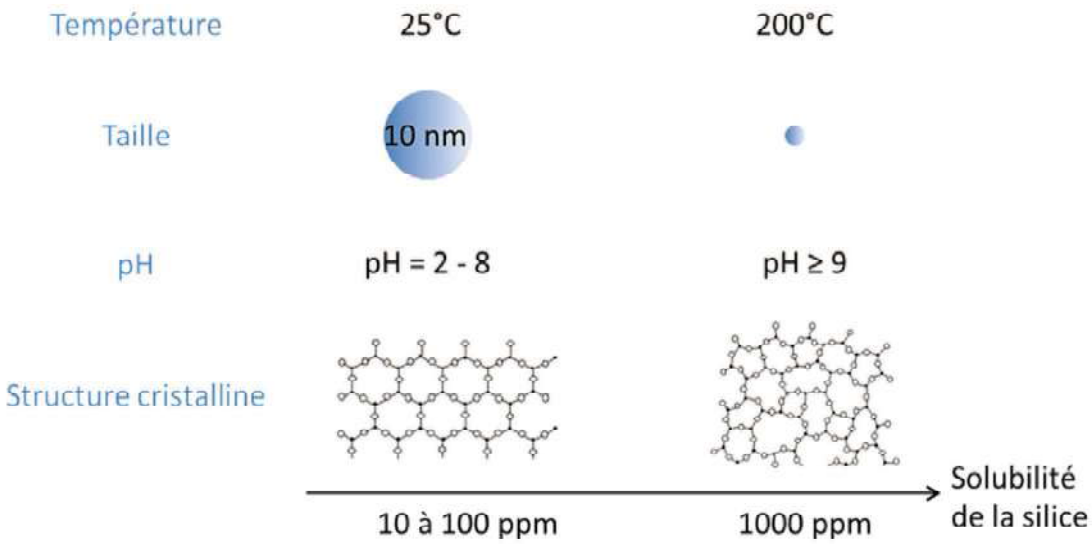


Figure. IV.5: Principaux paramètres influençant la solubilité de la silice dans l'eau, [Devineau (2013)].

La solubilité de la silice amorphe dépend du *pH* : constante de *pH* 2 à *pH* 8 autour de 100 ppm, elle augmente rapidement jusqu'à 1000 ppm à *pH* 11 [Iler (1979)]. L'augmentation de la solubilité de la silice à *pH* basique s'accompagne de la déprotonation de $Si(OH)_4$ en $H_3\,Sio_4^-$ *(pKa = 9,75)* (eq.1)

$$Si(OH)_4 + H_2O = H_3SiO_4^- + H_3O^+ \quad (1)$$

D'après, [Devineau (2013)] Les NP de silice ne seront toutefois pas mises en solution à un *pH* supérieur à 9, ce qui devrait limiter l'augmentation de solubilité liée au *pH*.

IV.5. Mécanismes d'adsorption des protéines

Deux approches complémentaires ont été développées pour caractériser l'adsorption des protéines et comprendre les mécanismes d'interactions entre protéines et surface de silice : Devineau (2009)] tout d'abord étudié les caractéristiques physico-chimiques de l'adsorption de protéines modèles sur la silice nanostructurée, puis nous avons étudié l'adsorption des protéines sur la silice à partir d'un extrait cellulaire de levure, contenant plusieurs milliers de protéines susceptibles d'interagir avec la surface.

D'après le modèle de Norde, l'adsorption des protéines sur une surface hydrophile est déterminée par la charge globale de la protéine et la charge de surface ainsi que par la stabilité interne des protéines, qui sont classées soit comme protéines «molles» et s'adsorbent dans

toutes les conditions, soit comme protéines «dures» et ne s'adsorbent que lorsque les charges de la protéine et de la surface sont de signe opposé, [Norde (2008)].

IV.5.1. Isothermes d'adsorption

L'étude expérimentale de l'adsorption des protéines sur la silice nanostructurée est présentée dans ce paragraphe à partir de trois exemples, [Devineau (2013)] : adsorption de l'hémoglobine et de la myoglobine sur les NP de silice et adsorption du sérum albumine sur la silice nanoporeuse.

Avant toute approche quantitative, [Devineau (2013)] note que l'adsorption des hémoprotéines est un phénomène facilement observable à l'œil nu. L'hémoglobine est mise en contact avec les NP de silice dans deux solutions tamponnées à *pH* 6 et à *pH* 9. Après agitation et centrifugation, le surnageant est coloré s.il y a des protéines libre en solution et le culot n'est coloré que s'il y a des protéines adsorbées aux NP (Fig.IV.6).



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

Figure. IV.6 : Photographie de solutions contenant hémoglobine (50 µM) et nanoparticules de silice 20 nm en tampon Tris-HCl 100 mM à pH 9 (en haut) et BisTris-HCl 100 mM à pH 6 (en bas) après centrifugation, [Devineau (2013)].

Cette première observation montre très clairement que l'hémoglobine ne s'adsorbe pas ou peu sur les NP de silice 20 nm à pH 9 en tampon Tris-HCl et au contraire s'adsorbe totalement ou presque sur les NP à pH 6 en tampon BisTris-HCl puisque la solution devient incolore après centrifugation. De la même façon, l'adsorption de la myoglobine sur la silice nanoporeuse CPG 8 nm peut être facilement observée après décantation des particules (Fig. IV.7).

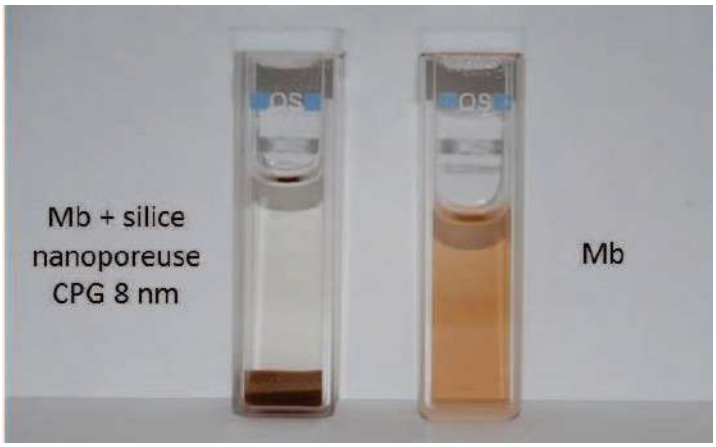


Figure. IV.7 : Photographie d'une solution de myoglobine libre (C_{Mb} = 40 µM) (à droite) et en présence de silice nanoporeuse CPG 8 nm (m =150 mg) (à gauche) en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 après décantation des particules, [Devineau (2013)].

Pour quantifier l'adsorption des protéines sur la silice, les isothermes d'adsorption de la myoglobine, de l'hémoglobine et du sérum albumine sur la silice nanostructurée ont été mesurées à l'équilibre par [Devineau (2013)]

Pour déterminer le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre, la quantité d'hémoglobine et de myoglobine adsorbée sur les NP de silice 7 et 20 nm a été mesurée par [Devineau (2013)] pour des temps de contact de 1h, 4h et 16h en fonction de la concentration en NP. Les résultats de [Devineau (2013)] sont présentés pour l'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice 7 nm en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 (Fig. IV.8). La quantité d'hémoglobine adsorbée est exprimée en pourcentage par rapport à la quantité en solution.

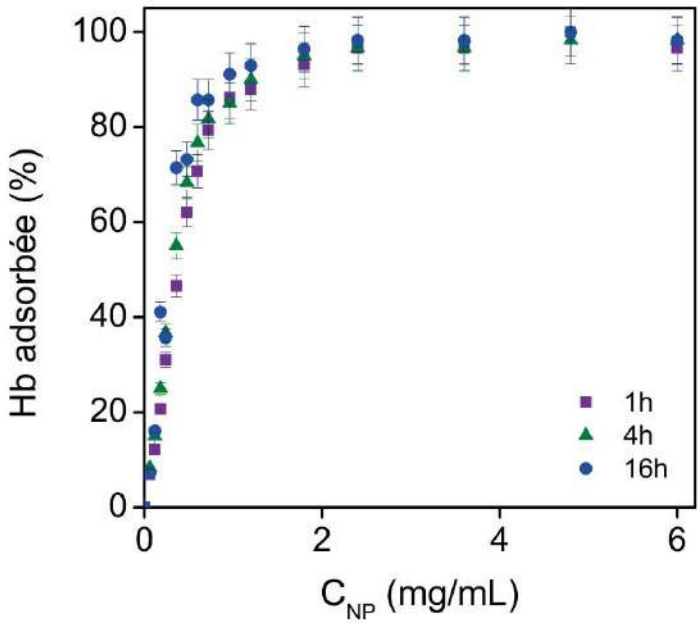


Figure. IV.8: Pourcentage d'hémoglobine adsorbée (C_{Mb} = 3,8 µM) sur les nanoparticules de silice 7 nm en fonction de la concentration en NP et du temps de contact : 1h (■), 4h (▲), 16h (●), en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4, [Devineau (2013)].

Aucune différence d'adsorption de l'hémoglobine n'est visible entre un temps de contact de 1h à 16h, quelle que soit la concentration en NP. [Devineau (2009)] choisi un temps de 4h avant la mesure des isothermes pour assurer l'équilibre des différents systèmes étudiés.

Les isothermes d'adsorption représentent la quantité de protéine adsorbée en fonction de la concentration en protéine libre en solution. Un exemple typique est présenté pour l'hémoglobine (Fig. IV.9), la myoglobine (Fig. IV.10) et le sérum albumine (Fig. IV.11).

La quantité de protéine adsorbée est exprimée en mg/m² plutôt que par gramme de silice, [Devineau (2013)].

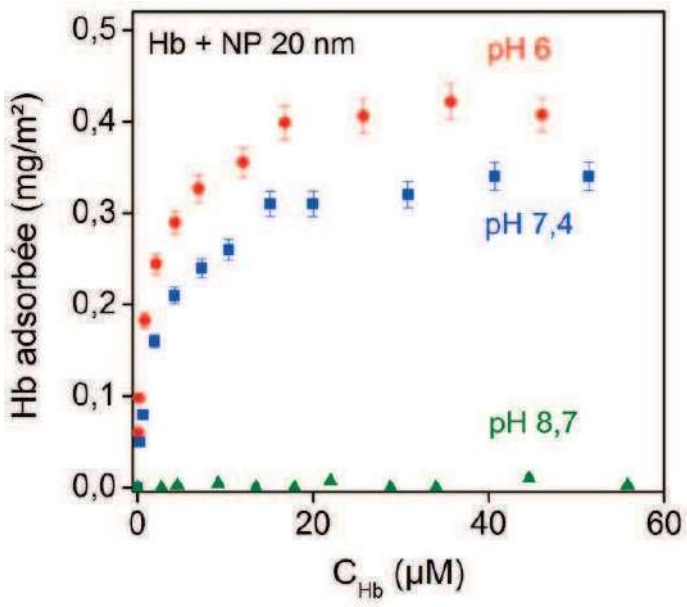


Figure. IV.9: Isothermes d'adsorption de l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice 20 nm (C_{NP} = 4,5 mg/ml) à 25°C en tampon 100 mM BisTris-HCl à pH 6), à Phosphate à pH 7,4 et Tris-HCl à pH 8,7) [Devineau (2013)]

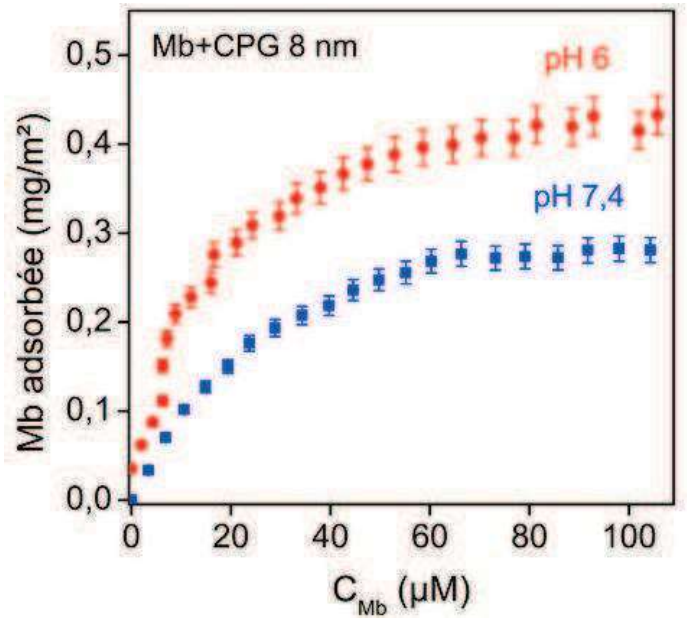


Figure. IV.10 : Isothermes d'adsorption de la myoglobine sur la silice nanoporeuse CPG 8 nm en tampon 100 mM BisTris-HCl à pH 6) et Phosphate à pH 7,4 [Devineau (2013)].

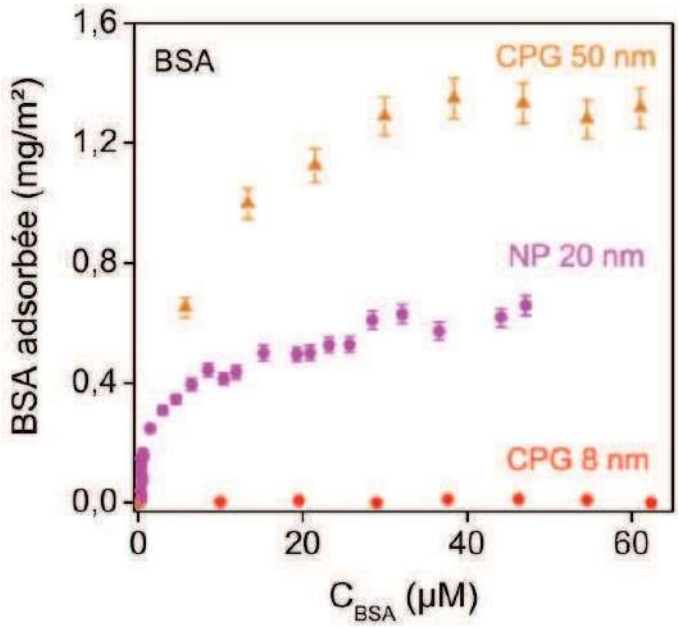


Figure. IV.11: Isothermes d'adsorption de la BSA sur la silice nanoporeuse CPG 8 nm (●), CPG 50 nm (●) et nanoparticules de silice 20 nm (▲) en tampon BisTris-HCl 100 mM à pH 6, [Devineau (2013)].

La quantité de protéine adsorbée à saturation peut être lue directement sur l'isotherme au niveau du plateau. De grandes différences selon [Devineau (2013)] ont observées entre protéines : la sérum albumine s'adsorbe en quantité plus importante que l'hémoglobine sur les NP de silice 20 nm à pH 6 par exemple, mais aussi pour une même protéine en fonction du type de silice : la sérum albumine s'adsorbe fortement sur les CPG 50 nm et ne s'adsorbe pas sur les CPG 8 nm, et en fonction du pH de la solution, [Devineau (2013)] : L'hémoglobine ne s'adsorbe par sur les NP de silice 20 nm en tampon Tris-HCl 100 mM à pH 8,7. Les modèles les plus couramment utilisés sont présentés dans le paragraphe suivant, puis le modèle le plus adapté sera utilisé pour analyser les isothermes d'adsorption mesurées, [Devineau (2013)].

IV.5.2. Modèles d'isothermes appliqués à l'adsorption des protéines

L'adsorption des protéines sur une surface est le plus souvent représentée par le modèle de Langmuir [Topoglidis et al. (2001), Felsovalyi et al. (2011)], développé initialement pour l'adsorption de molécules de gaz, bien que toutes les hypothèses du modèle initial ne soient pas toujours vérifiées, d'après [Devineau (2013)]: l'adsorption est irréversible dans de nombreux cas et les interactions latérales entre protéines ne peuvent pas être exclues. D'autres modèles d'adsorption sont rarement testés.

Les modèles testés par [Devineau (2013)] se répartissent en trois grandes catégories : modèle d'adsorption en monocouche (isothermes de Langmuir et de Jovanovic), modèle d'adsorption en

multicouche (isothermes de Freundlich et de Halsey) et modèle d'adsorption basé sur l'échange d'énergie entre molécule et surface (isothermes de Temkin-Pyzhev et de Dubinin-Radushkevic).

Les modèles utilisés le plus couramment pour décrire l'adsorption des protéines sur une surface d'après [Devineau (2013)] sont le modèle de Langmuir qui peut être appliqué à l'adsorption de molécules à partir d'une solution diluée [Adamson (1990)] et l'isotherme de Freundlich qui décrit de façon empirique l'adsorption de molécules lorsque différents sites de fixation sont impliqués. Le modèle de Temkin-Pyzhev semble également bien s'ajuster aux isothermes d'adsorption des protéines sur une surface [Johnson et Arnold (1995)].

Le modèle de Langmuir d'après [Devineau (2013)] présente le cas idéal de l'adsorption réversible d'une monocouche de molécules sans interactions entre elles sur des sites de fixation identiques (Fig. IV.12).

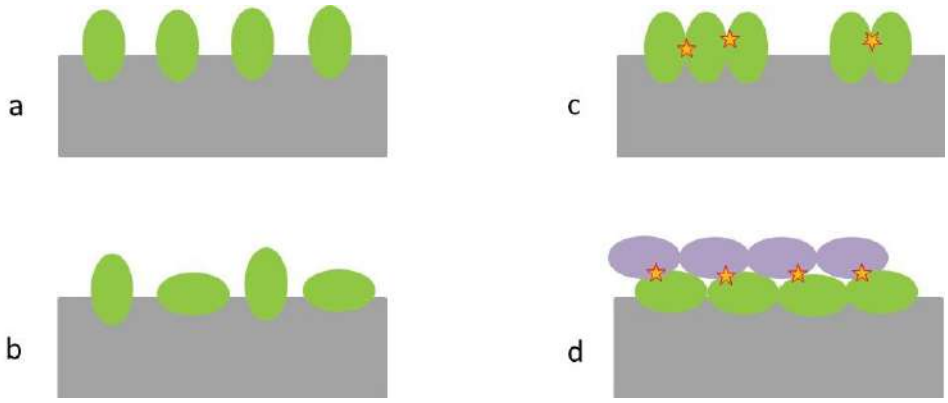


Figure. IV.12: Schéma de l'adsorption de molécules sur une surface plane : (a) cas idéal d'une adsorption monocouche sur une surface homogène (isothermes de Langmuir et de Jovanovic), (b) adsorption monocouche sur une surface hétérogène (isothermes de Freundlich, de emkin-Pyzhev et de Dubinin-Radushkevic), (c) adsorption avec interactions latérales et regroupement des molécules sur la surface, (d) adsorption multicouche (isotherme de Halsey), d'après [Devineau (2013)]

L'expression mathématique du modèle de Langmuir est donnée par l'équation 2 .

$$n_{ads} = \frac{m_{\infty} * K_{ads} * C}{1 + K_{ads} * C} \quad (2)$$

Avec *C* la concentration en protéine libre à l'équilibre *(mol/L)*, n_{ads} la quantité de protéine adsorbée par gramme de solide *(mol/g_{NP})*, n_{∞} la quantité maximale de protéine adsorbée par gramme de solide et K_{ads} la constante d'adsorption du modèle *(L/mol)*. K_{ads} n'est donc pas formellement une constante d'équilibre.

Les relations associées à chaque modèle d'isotherme sous leur forme massique sont présentées ci-dessous (tableau. IV.3).

Tableau. IV.3: Modèles d'isothermes à deux paramètres étudiés et expression mathématique pour une concentration massique en molécule adsorbée, d'après [Devineau (2013)].

Isothermes	Expression
Langmuir [Langmuir (1918)]	$m_{ads}=\frac{m_\infty * K_{ads} * C}{1+K_{ads} * C}$
Freundlich [Freundlich (1906)]	$m_{ads}=a.C^{1/n}$
Jovanovic [Jovanovic (1969)]	$m_{ads}=m_\infty(1-e^{-Kj*C})$
Temkin-Pyzhev [Temkin et Pyzhev (1939)]	$m_{ads}=\frac{RT}{b_T} ln\ (K_T\ C)$
Dubinin-Radushkevic [Dubinin (1960)]	$m_{ads}=m_D\ .exp\ [-b_D\ .\ (RT * ln\ (1\ +\ 1/C))^2]$
Halsey [Halsey (1948)]	$m_{ads}=(\frac{K_H}{C})^{1/n}$

D'après [Devineau (2013)], les isothermes de Temkin-Pyzhev et de Dubinin-Radushkevic sont toutes deux basées sur la variation d'énergie lors de l'adsorption de molécules sur une surface et dépendent de la température. Alors que les autres modèles dépendent de la quantité de molécules adsorbées et de la constante d'adsorption.

IV.5.3. Caractérisation de l'adsorption des protéines sur la silice nanostructurée

Les isothermes d'adsorption de la myoglobine, l'apomyoglobine, l'hémoglobine et le sérum albumine sur la silice nanostructurée ont été analysées par [Devineau (2009)] à l'aide du modèle de Langmuir afin de déterminer la quantité de protéine adsorbée à saturation et la constante d'adsorption K_{ads} pour chaque système.

Plusieurs paramètres qui peuvent influencer l'adsorption des protéines ont été étudiés par [Devineau (2013)] :

1. Effet du matériau
2. Effet de la protéine
3. Effet du pH et du tampon

La quantité de protéine adsorbée à saturation et la constante d'adsorption de la myoglobine, l'apomyoglobine, l'hémoglobine et la sérum albumine sur la silice nanostructurée dans différentes conditions sont présentées ci-dessous (tableau. IV.4), d'après [Devineau (2013)].

Tableau. IV.4: Caractéristiques de l'adsorption de la myoglobine, l'apomyoglobine, l'hémoglobine et le sérum albumine sur la silice nanostructurée dans différentes conditions de pH et de tampon 100 Mm à 25°C. L'isotherme d'adsorption de l'apomyoglobine, instable à température ambiante, a été mesurée à 4°C, d'après [Devineau (2013)].

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

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

Sérum albumine			
Silice	**Tampon et pH**	$\mathbf{m_{ads}(mg/m^2)}$	$\mathbf{K_{ads}(M^{-1})}$
Np 7 nm	Bis Tris-HCl pH 6	*0,66 ± 0,03*	$3{,}6 \pm 0{,}4.10^5$
CPG 8 nm	Bis Tris-HCl pH 6	*0*	-
CPG 50 nm	Bis Tris-HCl pH 6	*1,3±0,08*	$1{,}2 \pm 0{,}1.10^5$

IV.5.3.1. Effet du matériau

Selon [Devineau (2013)] la quantité de myoglobine adsorbée sur la silice nanostructurée varie du simple au double en fonction du matériau, la quantité de myoglobine adsorbée augmente légèrement avec la taille des NP. L'affinité de la myoglobine pour les NP de silice 7 et 20nm est proche. Un facteur 2 de différence est par contre observé entre CPG 50 nm (K_{ads}= 1,0 ± $0{,}1.10^5\ M^{-1}$) et CPG 8nm (K_{ads} = 5,5 ± $0{,}6.10^4 M^{-1}$) ; L'hémoglobine s'adsorbe en quantité plus importante sur les NP 7nm (M_{ads} = 0,52 mg/m²) comparées aux NP 20 nm (M_{ads} = 0,43 mg/m²)

en tampon BisTris-HCl à pH6. Son affinité est par contre plus grande pour les NP 20nm (K_{ads} = 7,3 ± 0,8.$10^5 M^{-1}$) que pour les NP 7nm (K_{ads}= 4,6 ± 0,5.$10^5 M^{-1}$) ; L'adsorption du sérum albumine à pH6 est maximale sur les CPG 50nm (M_{ads}= 1,3 mg/m²), intermédiaire sur les NP 20nm (M_{ads}= 0,66 mg/m²) et nulle sur les CPG 8 nm. Le diamètre d.une molécule de BSA est de 6,2nm pour un monomère [Valstar et al. (2000)] et de 12, nm si la protéine s'organise sous la forme d'un dimère [Okubo (1990)]. Puisque la BSA a une forte affinité pour les CPG 50nm (K_{ads}=1,2 ± 0,1.$10^5 M^{-1}$). L'adsorption en plus faible quantité sur les NP comparées aux CPG est similaire pour la BSA et la myoglobine.

IV.5.3.2. Effet de la protéine

Selon [Devineau (2013)] l'adsorption des protéines sur les NP de silice 20nm en tampon BisTris-HCl à pH6 peut être classée selon chaque critère pour comparer leur adsorption :

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

Les différences ne sont pas négligeables puisque la quantité de protéine adsorbée varie de 0,30 à 0,81 mg/m² et la constante d'adsorption de 7.$10^4 M^{-1}$ à 7,3.$10^5 M^{-1}$, ce qui montre des différences d'affinité importantes entre protéines pour une même surface.

La protéine ayant la plus faible affinité est la myoglobine, dont la quantité adsorbée est également la plus faible. La protéine qui s'adsorbe en plus grande quantité *(ApoMb*) n'est pas celle qui a la plus grande affinité (*Hb*).

IV.5.3.3. Effet du pH et du tampon

D'une façon générale, selon [Devineau (2013)], la quantité de protéine adsorbée est plus importante à pH6 qu'à *pH* 7,4 ; et plus importante en tampon Phosphate plutôt qu'en tampon BisTris-HCl.

Selon [Devineau (2013)] le pH et le tampon jouent sur la charge de la protéine, la charge de la surface, la force ionique du milieu et la nature des espèces en solution.

Selon [Devineau (2013)] si les interactions électrostatiques interviennent dans le mécanisme d'adsorption de la myoglobine et de l'hémoglobine sur la silice, alors une adsorption plus faible devrait être observée à pH basique, lorsque les résidus basiques de la protéine sont déprotonés.

IV.6. Energie d'adsorption de la myoglobine sur les nanoparticules de Silice

Pour élucider les mécanismes d'adsorption des protéines sur les nanoparticules, selon [Devineau (2013)] il est nécessaire de connaître les paramètres thermodynamiques de l'adsorption, c'est-à-dire la variation d'énergie de Gibbs ΔH_{ads}, la contribution enthalpique ΔH_{ads}, la contribution entropique ($-T.\ \Delta H_{ads}$) et la constante d'équilibre associée K (eq. 3).

Il est utile d'exprimer la réaction d'adsorption sous une forme qui fait apparaître les molécules d'eau initialement adsorbées sur la surface (eq. 4) car la désolvatation de la surface par la protéine peut contribuer à la variation d'enthalpie et d'entropie du système (eq.5, 6).

$$Mb_{solution} + H_2O_{adsorbée} = Mb_{adsorbée} + H_2O_{solution} \quad (4)$$

$$\Delta G_{ads} = \Delta H_{adS} - T.\Delta S_{ads} \quad (3)$$

$$\Delta H_{ads} = \Delta H_{protéine} + \Delta H_{eau} \quad (5)$$

$$\Delta S_{ads} = \Delta S_{protéine} + \Delta S_{eau} \quad (6)$$

Sans être exhaustif, la principale contribution enthalpique et entropiques associées à l'adsorption peuvent être décrites ainsi [De et al. (2007), Andrade et Hlady (1986), Lyklema (1984)] :

- ✓ Réaction exothermique = contribution enthalpique favorable ($\Delta H_{ads} < 0$) : par formation de nouvelles liaisons, liaisons hydrogène ou interactions coulombiennes entre protéine et surface, par interaction spécifique.
- ✓ Réaction endothermique = contribution enthalpique défavorable ($\Delta H_{ads} > 0$) : par rupture de liaisons hydrogène intramoléculaires si la protéine adsorbée perd une partie de sa structure.
- ✓ Gain d'entropie = contribution entropique favorable ($-T.\Delta S_{ads} < 0$) : par déstructuration de la protéine, par libération de molécules d.eau (interaction hydrophobe)
- ✓ Perte d'entropie = contribution entropique défavorable ($-T.\Delta S_{ads} > 0$) : par formation de complexes, par immobilisation des chaînes latérales des résidus, par immobilisation de molécules d'eau

Pour déterminer les paramètres thermodynamiques de l'adsorption sur les NP de silice, la variation de chaleur lors de l'adsorption de la myoglobine sur les NP a été mesurée par ITC.

IV.7. Echelle d'affinité des protéines pour les nanoparticules de silice

L'étude de l'adsorption des protéines réalisée jusqu'ici par, [Devineau (2013)] s'appliquait à une protéine purifiée mise en contact avec les nanoparticules de silice dans une solution tampon. Ces mesures permettent une étude approfondie des mécanismes d'adsorption d'une protéine et ont montré qu'il existait des différences d'affinité entre myoglobine, hémoglobine, apomyoglobine et sérum albumine pour une surface de silice. Certaines protéines bactériennes ont également été identifiées comme ayant une plus forte affinité pour des surfaces de silice, [Taniguchi et al. (2007)].

IV.7.1 Compétition entre hémoglobine et sérum albumine

[Devineau (2013)] a étudié le cas simple d'une compétition entre une protéine initialement adsorbée, le sérum albumine bovine, qui est couramment utilisée pour passiver des surfaces, et une seconde protéine susceptible de s'adsorber à son tour et de plus grande affinité, l'hémoglobine. L'isotherme d'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice a été mesurée pour différentes concentrations initiales en BSA jusqu'à une concentration identique en BSA et en hémoglobine de 50 µM (Fig. IV.13).

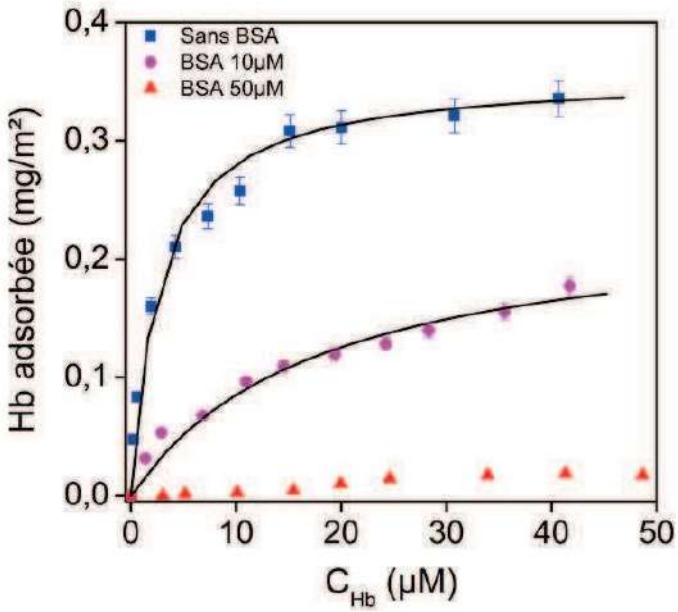


Figure. IV.13: Isothermes d'adsorption de l'hémoglobine sur les NP de silice 20 nm en tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4 pour différentes concentrations initiales en BSA : 0(■) 10 µM(●) et 50(▲) µM) ; modèle de Langmuir (en noir). Les NP sont mises en contact avec la BSA puis l'hémoglobine est ajoutée à la solution contenant BSA et NP (CNP = 4,5 mg/mL*)* d'après [Devineau (2013)].

La quantité d'hémoglobine adsorbée diminue fortement lorsque la BSA est initialement adsorbée sur les NP de silice. Lorsque la surface est saturée par la BSA (C_{BSA} = 50 µM), la quantité d'hémoglobine adsorbée est divisée par 20 et devient quasi nulle (M_{ads} = 0,02 mg/m²). Ces résultats

[Devineau (2009)] montrent d'une part que l'hémoglobine ne peut pas déplacer la BSA initialement adsorbée par effet Vroman, bien que son affinité soit supérieure, d'autre part que l'hémoglobine ne peut pas s'adsorber en seconde couronne sur la BSA *via* des interactions protéine-protéine.

IV.7.2. Adsorption de protéines à partir d'un extrait cellulaire de levure

Pour expliquer cette différence, plusieurs hypothèses peuvent être proposées, [Devineau (2013)] :

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

Cette dernière hypothèse rejoindrait l'image d'une couronne «dure» et «molle» lors de l'adsorption de protéines sur des NP à partir d'un milieu biologique développée dans la littérature, [Milani et al. (2012), Lynch et Dawson (2008)].

IV.8. Critères structuraux d'adsorption des protéines de levure sur les nanoparticules de silice

Identifier un grand nombre de protéines de levure adsorbées et non adsorbées sur les NP de silice permet de comparer leurs caractéristiques : composition en acides aminés, structure et dynamique pour identifier les déterminants physico-chimiques de l'affinité et donc de l'adsorption des protéines sur une surface de silice. Le premier critère de comparaison et le plus simple à observer est la masse et la charge globale par migration en électrophorèse 2D des protéines adsorbées et non adsorbées, [Devineau (2013)].

IV.8.1. Analyse statistique de la séquence primaire

Une première analyse à partir de la séquence primaire des protéines adsorbées et non adsorbées a été réalisée par [Devineau (2013)] à l'aide du programme Profeat, *[Profeat. http:// jing.cz3.nus.edu.sg/cgi-bin/prof/prof.cgi.]*: 432 critères (ou descripteurs) sont calculés pour chaque protéine, puis moyennés pour l'ensemble des protéines adsorbées d'une part, non adsorbées d'autre part. Chaque critère est ensuite analysé pour déterminer s'il présente une différence significative entre protéines adsorbées et non adsorbées. Une première analyse qualitative peut être réalisée en comparant directement la différence mesurée pour chaque critère (Fig. IV.14).

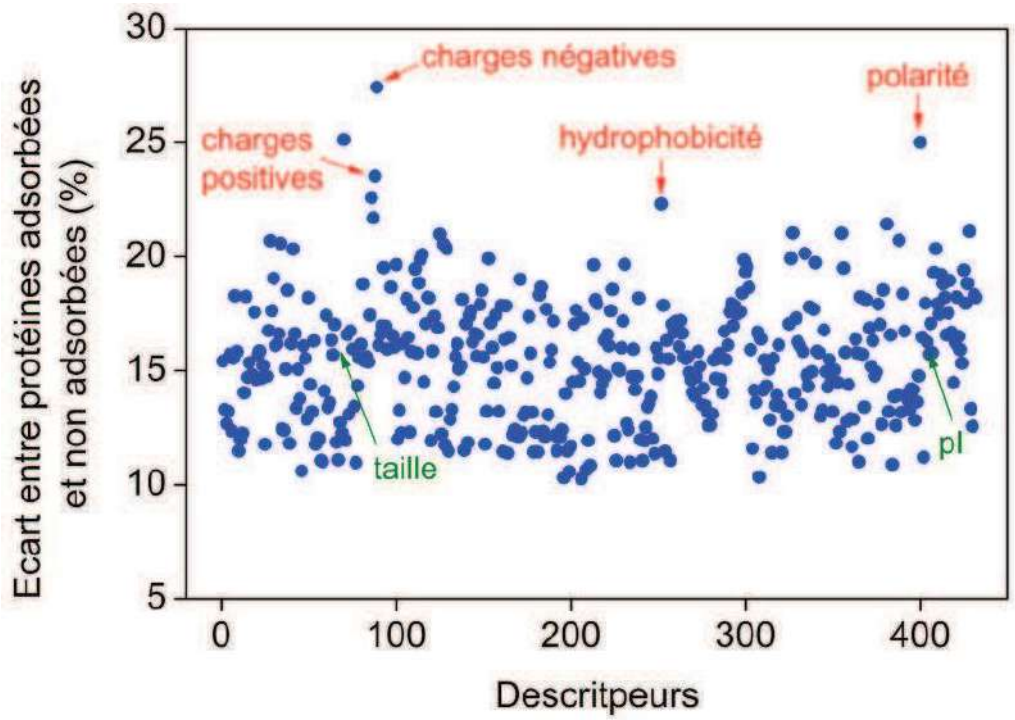


Figure. IV.14: Ecart entre la valeur moyenne de chacun des 432 critères testés par le programme Profeat, *[Profeat. http://jing.cz3.nus.edu.sg/cgi-bin/prof/prof.cgi.]* entre protéines de levure adsorbées et non adsorbées (%). La différence est exprimée en valeur absolue et reflète aussi bien un enrichissement qu'un appauvrissement dans les protéines adsorbées par rapport aux non adsorbées. Quelques exemples de critères différents (en rouge) et semblables (en vert) entre les deux groupes sont donnés.

Une analyse statistique plus approfondie des différences entre les deux populations a été réalisée à partir d'un nombre plus restreint de critères les plus importants (et sans redondance) : 45 critères sont calculés à partir de la séquence primaire des protéines, tels que la composition en acides aminés, l'hydrophobicité, la taille ou la polarité [Mathé et al. (2013)] ;

Le test de Brunner-Munzel (qui ne fait pas d'hypothèse sur la forme des distributions, car celles-ci ne sont pas nécessairement gaussiennes) est appliqué aux analyses pour déterminer si la différence calculée sur un critère donné est significative ou non [Brunner et (2000)] ;

IV.8.3. Flexibilité des protéines adsorbées et non adsorbées

Pour tester cette hypothèse, les différents types d'interactions possibles au sein des protéines adsorbées et non adsorbées : hydrophobes, ioniques, π-π et cation-π, ont été quantifiées à partir des structures connues (soit 10 protéines adsorbées et 10 protéines non adsorbées), [Mathé et al. (2013)] ; (tableau. IV.5).

Tableau. IV.5 : Pourcentages d'augmentation des interactions des protéines non adsorbées par rapport aux protéines adsorbées calculés à partir des structures 3D de10 protéines adsorbées et 10 protéines non adsorbées [Pin (1994)] ;

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

L'augmentation très importante des interactions π-π dans les protéines non adsorbées confirme l'hypothèse du rôle stabilisateur et de renforcement de la structure des protéines par les acides aminés aromatiques. Une augmentation des interactions cation-π est aussi observée, alors que les protéines non adsorbées sont appauvries en acides aminés chargés positivement.

pour évaluer la flexibilité des protéines adsorbées et non adsorbées (avant adsorption), le déplacement carré moyen (RMSD) des protéines, qui représente l'évolution de la structure de la protéine au cours du temps .

IV.9. Structure des protéines adsorbées

De nombreux outils permettent de sonder la structure des protéines en fonction des informations recherchées, [Devineau (2013)] cherche d'abord à déterminer s'il y avait une modification de la structure secondaire de l'hémoglobine et de la myoglobine lors de leur adsorption sur les nanoparticules de silice [Norde (2008)]. L'approche classique de l'étude de la structure des protéines en solution par dichroïsme circulaire et spectroscopie infrarouge a été utilisée pour l'analyse des structures secondaires, [Devineau (2013)].

[Devineau (2013)] s'intéresse aussi à la structure du site actif de la myoglobine et de l'hémoglobine adsorbées sur les nanoparticules de silice. L'ensemble de ces mesures permet de mieux comprendre quelle est la structure de la myoglobine et de l'hémoglobine adsorbées sur les nanoparticules de silice en évaluant les modifications au niveau de la globine (structure globale) et du fer de l'hème (site actif).

La metmyoglobine adsorbée sur les NP de silice 7 nm, a été utilisé par [Devineau (2013)] pour étudier la dynamique de la protéine adsorbée par diffusion incohérente de neutrons. Nous avons choisi une taille de NP plus petite car nous avions besoin d'une plus grande surface disponible (et donc d'une plus grande quantité de protéine adsorbée) pour ce type d'expérience. Si certaines mesures ont été croisées et montrent une assez grande similarité, les structures des protéines adsorbées ont été étudiées indépendamment pour chacun de ces systèmes, par [Devineau (2013)].

IV.9.1. Surface occupée par la myoglobine et l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice

[Devineau (2013)] suppose que la surface occupée par une protéine à une interface est un premier indice de la forme de la protéine [Holt et al. (2000)]. La surface occupée par une protéine peut être calculée à partir de la quantité maximale de protéine adsorbée par unité de surface. Pour la myoglobine et l'hémoglobine, cela correspond à leur adsorption sur les NP de silice 20 nm en tampon Phosphate à pH 6, soit 0,45 mg/m2 de myoglobine et 0,50 mg/m^2 d'hémoglobine adsorbées a saturation. Cela correspond à une surface occupée d'environ 63 nm² pour une molécule de myoglobine et 55 nm² par monomère d'hémoglobine, si l'on fait l'hypothèse que toute la surface est occupée par les protéines, [Devineau (2013)].

Connaissant le rayon de giration de la myoglobine et de l'hémoglobine, la surface théorique qu'occuperait une protéine peut être calculée, soit par projection d'une sphère sur la surface ($A=\pi R^2$ avec R le rayon de giration de la protéine), soit par projection de la maille cristallographique sur la surface [Abdollah et al. (2011)], représentée par un carré pour une protéine globulaire ($A = 4R^2$), [Devineau (2013)].

La surface correspondante est approximativement de 9 nm² pour une molécule de myoglobine ou pour un monomère d'hémoglobine. Il apparait une différence très importante entre la surface théorique de 9 nm² occupée par une protéine et la surface de 60 nm² calculée à partir de la quantité de protéine adsorbée. Cependant, deux paramètres importants ne sont pas pris en compte : l'hétérogénéité de la surface d'une part [Scopelliti et al. (2010)], la modification de la structure de la protéine adsorbée d'autre part. (Fig. IV.15), [Devineau (2013)].

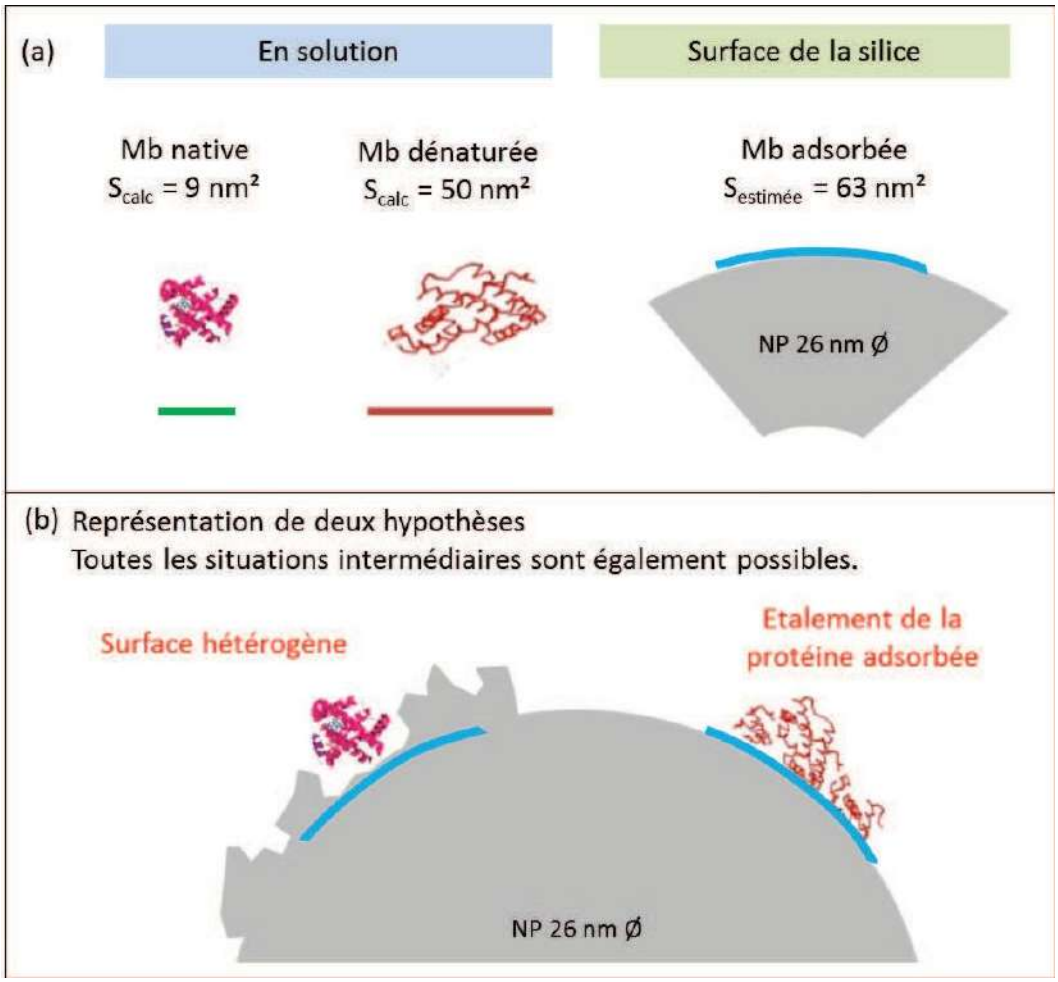


Figure. IV.15 : Surface occupée par la myoglobine sur les nanoparticules de silice 20 nm à pH 6 : (a) surface théorique occupée par une molécule de myoglobine native et dénaturée en solution (S_{calc}) comparée à la surface estimée à partir des isothermes d'adsorption si la surface est homogène et entièrement recouverte par la myoglobine ($S_{estimée}$), (b) hypothèses d'hétérogénéité de la surface et/ou d'étalement de la protéine adsorbée permettant d'expliquer la grande surface estimée [Devineau (2013)].

La surface est alors effectivement hétérogène à l'échelle des protéines, mais la rugosité peut aussi être bien plus petite que les protéines et de même ordre de grandeur que les molécules d'azote qui servent à mesurer la surface spécifique des NP par BET. D'autre part, si la protéine peut «s'étaler» sur la surface comme le suggèrent les modelés d'adsorption, alors la surface qu'elle occuperait serait plus grande que celle représentée par une protéine de structure native, en particulier pour des protéines globulaires relativement compactes comme la myoglobine et l'hémoglobine. Pour évaluer la dénaturation de la protéine adsorbée, [Devineau (2009)] analysé la structure secondaire de la myoglobine adsorbée sur les nanoparticules de silice, afin de déterminer si la surface estimée correspond à la surface occupée par une protéine entièrement dénaturée ou à un effet de rugosité et d'hétérogénéité de la surface.

IV.9.2. Structure secondaire des protéines adsorbées sur la silice

D'après [Devineau (2013)], la structure secondaire des protéines en solution peut être déterminée à l'aide de deux techniques, le dichroïsme circulaire et la spectroscopie infrarouge, dont les incertitudes sont dues à la combinaison des incertitudes expérimentales puis de la déconvolution des spectres à partir de structures de protéines connues [Chen et al. (1974), Chang et al. (1978)]. De fait, les structures secondaires identifiées pour l'hémoglobine (tableau. IV.6) et la myoglobine (tableau. IV.7) varient en fonction de l'étude et de la méthode utilisée.

Tableau. IV.6 : Comparaison à partir de la littérature de la structure secondaire de l'hémoglobine (% de structure) déterminées par spectroscopie infrarouge, dichroïsme circulaire et cristallographie des rayons X

Technique(Hb)	Hélice	Feuillet	Coude	Désordonnée	Références
Infrarouge	78	12	10	<5	[Dong et al. (1990)]
Dichroïsme	68-75	1-4	15-20	9-16	[Hennessey et Johnson (1981), Manavalan et Johnson (1987)]
Cristallographie	87	0	7	6	[Levitt et Greer (1977)]

Tableau. IV.7 : Comparaison à partir de la littérature de la structure secondaire de la myoglobine (% de structure) déterminées par spectroscopie infrarouge, dichroïsme circulaire et cristallographie des rayons X

Technique(Mb)	Hélice	Feuillet	Coude	Désordonnée	Références
Infrarouge	85	7	8	<5	[Dong et al. (1990)]
Dichroïsme	67-86	0-13	0-6	11-13	[Chen et al. (1947), Chang et al. (1978), Hennessey et Johnson (1981), Manavalan et Johnson (1987), Greenfield et Fasman (1969), Provencher et Glockner (1981)]
Cristallographie	85	0	8	7	[Levitt et Greer (1977)]

D'après [Devineau (2013)], les pourcentages d'hélicité, de coudes et de structure désordonnée déterminée par dichroïsme circulaire sur l'hémoglobine et la myoglobine en solution sont proches des valeurs déterminées par cristallographie, mais entachés d'une assez grande incertitude, [Hennessey et Johnson (1981), Manavalan et Johnson (1987)].

Selon [Devineau (2009)], une première étude de la structure secondaire de la myoglobine libre et adsorbée sur les NP de silice a été réalisée par spectroscopie infrarouge, après mise en solution de la protéine dans D_2O, puis ces données ont été complétées par l'analyse par dichroïsme circulaire des structures secondaires de la myoglobine et de l'hémoglobine libre adsorbées sur les

NP de silice. L'auteur présente tout d'abord l'analyse de la structure de l'hémoglobine adsorbée par dichroïsme circulaire, puis celle de la myoglobine adsorbée.

IV.9.2.1. Hémoglobine et nanoparticules de silice 20 nm

D'après [Devineau (2013)], le spectre de l'hémoglobine libre est caractéristique d'une protéine structurée majoritairement en hélices avec un maximum à 192 nm et deux minima à 208 et 222 nm. Comme il a déjà été rapporté, la structure secondaire de l'hémoglobine est identique a pH 6, pH 7,4 et pH 8,7 dans les trois tampons utilisés [Antonini (1971)].

La concentration en hémoglobine adaptée aux mesures par dichroïsme circulaire est de 10 µM dans une solution tampon 10 mM pour limiter l'absorption dans l'UV. La quantité d'hémoglobine adsorbée a été mesurée dans ces conditions pour différentes concentrations massiques en NP (tableau. IV.8), [Devineau (2013)],

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

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

A une concentration en NP de 2 mg/ml, l'hémoglobine n'est adsorbée que partiellement a pH6 (76%) et a pH 7,4 (44%) tandis qu'a une concentration de 6 mg/ml, la contribution de l'hémoglobine libre est largement réduite avec 99% d'hémoglobine adsorbée a pH 6 et 86% d'hémoglobine adsorbée a pH 7,4. A pH 8,7 la quantité d'hémoglobine adsorbée reste inferieure à 1%, ce qui permet bien d'utiliser cette condition comme contrôle négatif, [Devineau (2009)].

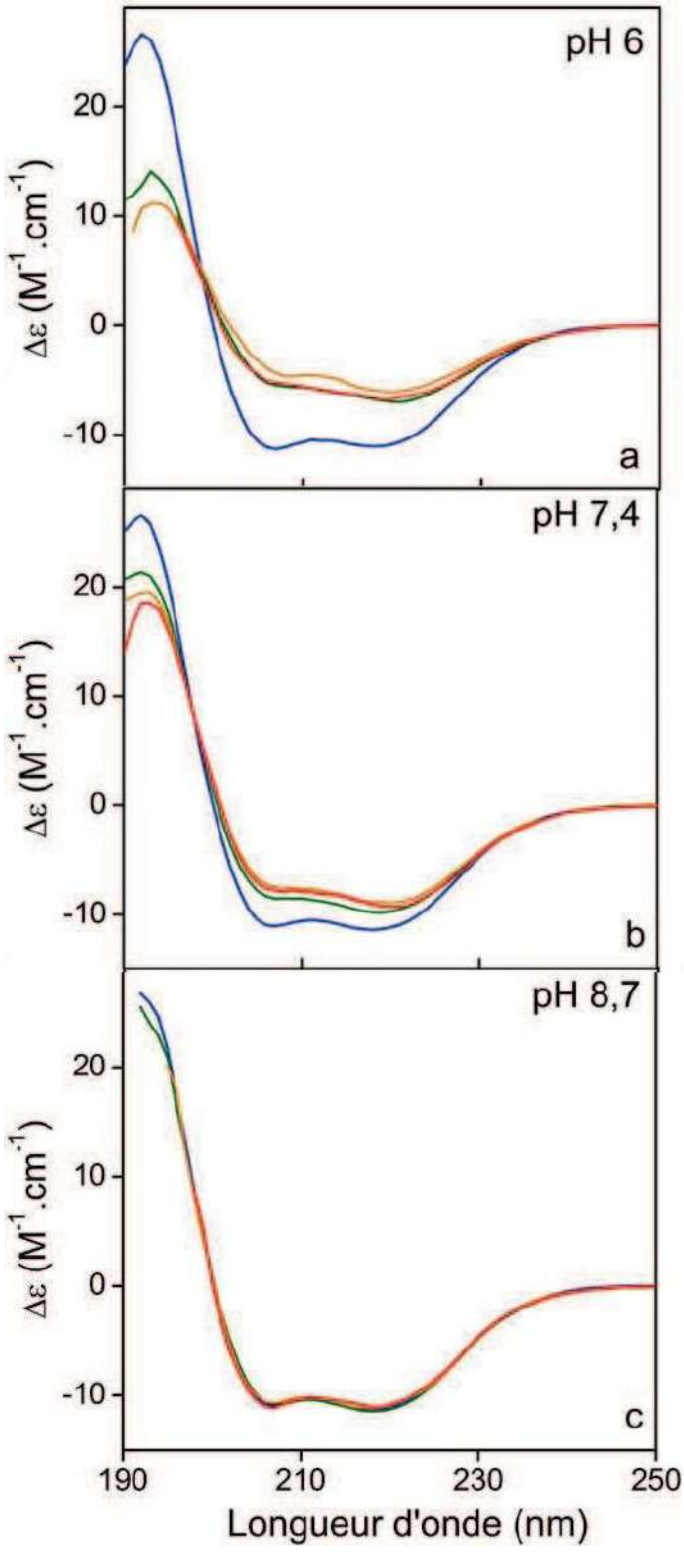


Figure. IV.16 : Spectres de dichroïsme circulaire de l'hémoglobine (C_{Hb} = 10 µM) en tampons 10 mM BisTris-HCl à pH 6 (a), Phosphate à pH 7,4 (b) et Tris-HCl à pH 8,7 (c) : Hb sans NP (en bleu) et en présence de NP de silice 20 nm à une concentration de 2 mg/ml (en vert), 4 mg/ml (en orange) et 6 mg/ml (en rouge). L'hémoglobine est partiellement à totalement adsorbée à pH 6 et pH 7,4 et non adsorbée à pH 8,7, [Devineau (2013)].

Toute différence entre le spectre de l'hémoglobine en solution et de l'hémoglobine en solution en présence de NP serait alors due à la diffusion de la lumière par les NP. Aucune modification des spectres n'est observée à pH 8,7 en présence de NP et sans adsorption de l'hémoglobine. Cela montre que la présence des NP en solution n'induit pas de diminution de l'intensité du signal ni de la valeur de $\Delta\varepsilon$ mesurée. Les spectres en dichroïsme circulaire de l'hemoglobine adsorbée à pH 6 et à pH 7,4 sur les NP de silice 20 nm présentent une diminution de $|\Delta\varepsilon|$ par rapport a la protéine libre en solution, ce qui montre une modification importante de la structure de l'hémoglobine adsorbée (Fig.4.16), [Devineau (2013)].

L'incertitude sur les spectres, qui augmente lorsque la concentration en NP augmente, ne permet cependant pas de conclure. La plus grande variation de $\Delta\varepsilon$ à pH 6 qu'a pH 7,4 peut être simplement due à une plus grande fraction de l'hémoglobine adsorbée à pH 6, [Devineau (2013)].

IV.10. Dynamique des protéines adsorbées

Alors que la structure des protéines adsorbées est beaucoup étudiée, leur dynamique reste en grande partie inconnue. Pourtant la dynamique des protéines peut être déterminante dans de nombreux processus biologiques, tels que l'activité des protéines [Yonetani et Kanaori(2013), Bhabha et al. (2011)], les interactions protéine-protéine et protéine-ligand [Dobbins et al. (2008)] et les processus d'agrégation [Valerio et al. (2005)]. Il est également suspecté depuis longtemps que l'augmentation de la stabilité des enzymes immobilisées soit directement liée à leur plus faible flexibilité [Haouz et al. (2001)].

La dynamique des protéines regroupe des processus biologiques bien différents, caractérisés par leur échelle de temps et d'espace qui varient du dixième d'angström au micromètre et de la femtoseconde à la seconde pour les processus à l'échelle moléculaire [Karplus et McCammon (1981)]. Il s'agit d'un paysage complexe qui regroupe des processus distincts (Fig. IV.17).

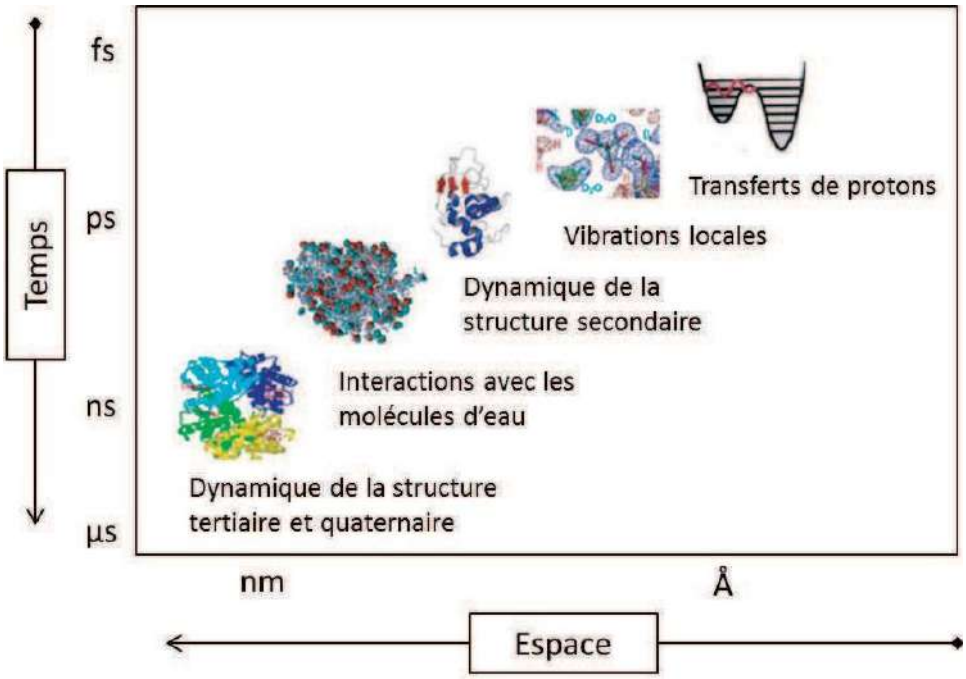


Figure. IV.17 : Principales échelle de temps et d'espace de la dynamique des protéines, D'après [Zanotti (2005)] modifié

Une protéine en solution présente à température ambiante une grande dynamique interne, depuis les fluctuations atomiques locales (Å) et très rapides (ps), la dynamique de la structure secondaire, les interactions avec le solvant par collision et diffusion, jusqu.aux mouvements de plus grande amplitude de la structure tertiaire et quaternaire [Karplus et McCammon (1981)]. Ces mouvements de domaines sont directement impliqués dans la fonction de certaines enzymes [Yon et al. (1998)]. Or les mouvements observés à une échelle plus large, qui permettent à la protéine d'assurer sa fonction, sont dus à un ensemble de mouvements locaux plus rapides [Frauenfelder et Petsko (1980), Jacrot et al. (1982)] : la dynamique locale et rapide donne à la protéine sa flexibilité et lui permet d'explorer des mouvements collectifs de grande amplitude [Karplus et McCammon (1981)] . Les mouvements observés sur des échelles de temps et d'espace très différentes sont donc liés.

Techniques d'étude de la dynamique des protéines

La dynamique des protéines peut être étudiée expérimentalement à différentes échelles de temps, localement ou globalement.

Les résidus tryptophane constituent une sonde locale qui peut être utilisée pour évaluer la dynamique globale de rotation de la protéine par anisotropie de fluorescence à l'échelle de la ns à la µs (mesure de la réorientation des cycles aromatiques des résidus) [Czeslik et al.(2003)]. La durée de vie de l'émission de fluorescence peut aussi être utilisée pour étudier les processus

d'extinction de fluorescence de l'échelle de la fs pour les techniques de spectroscopie ultra-rapide jusqu'à la ns [Haouz et al. (2001)]. Elle est sensible à la dynamique mais aussi aux modifications de structure de la protéine.

Autre sonde locale, l'atome de fer des hémoprotéines peut être sondé par spectroscopie Mössbauer pour étudier sa dynamique, ainsi que celle de l'hème et de son environnement proche, à l'échelle de la ps (mesure du déplacement carré moyen de l'atome de fer) [Parak et al. (1982)] Un autre moyen d'étudier spécifiquement la dynamique des hémoprotéines, cette-fois ci à l'échelle de la ns à la µs, est la photodissociation du *CO* par laser [Alpert et al (1979)] . Après photolyse, la vitesse et le taux derecombinaison géminée du CO sur le même atome de fer dépend de la dynamique de la protéine [Pin et al. (1986)].

La RMN est un outil d'étude plus global de la structure et de la dynamique des protéines sur des échelles de temps allant de la ps à la seconde [Mittermaier et Kay (2006) , Drobny et al. (2007)]. La cristallographie des rayons X en température peut également être utilisée pour mesurer le facteur B indicateur de la rigidité locale de la protéine et le déplacement carré moyen de tous les atomes sauf hydrogène à l'échelle de la picoseconde [Frauenfelder et Petsko (1980)].

Les cinétiques d'échange H/D des atomes d'hydrogène des amides donnent des informations à la fois sur la dynamique et sur la structure de la protéine [Johnson et Walsh (1994)]. La cinétique d'échange des atomes d'hydrogène des amides est beaucoup plus lente lorsque ceux-ci sont impliqués dans une liaison hydrogène, par exemple dans une hélice[Buijs et al. (2003)].

Les mouvements de vibration à l'échelle de la ps peuvent être sondés par spectroscopie infrarouge, Raman (mesure des modes de vibration) [Karplus et McCammon (1981)] ou par diffusion incohérente de neutrons (mesure du déplacement carré moyen des atomes d'hydrogène) [Doster et al. (1989)].

Conclusion générale

Pour finir cette étude, sur les protéines adsorbées sur les nanomatériaux, après avoir tout d'abord utilisé différentes méthodes classiques d'étude des protéines. La microcalorimétrie s'est révélée très intéressant amères thermodynamiques de l'adsorption des protéines sur les nanoparticules, toutefois l'analyse protéomique d'un grand nombre de protéines adsorbées et non adsorbées à partir d'un extrait cellulaire a permis d'une part d'identifier les protéines qui ont le plus d'affinité pour la surface et qui pourraient être adsorbées en condition réelles d'exposition, d'autre part de déterminer des critère physico-chimique d'adsorption des protéines pour un matériaux donné .

Cette technique pourrait être utilisée pour comparer l'adsorption à partir de protéines de différents milieux cellulaires ou extracellulaires sur d'autres surfaces.

De plus, les protéines adsorbés identifiées pourraient être étudiées spécifiquement car plus pertinenemtes du point de vue biologique que les protéines modèles choisies arbitrairement l'analyse des protéines adsorbés à une échelle très locale sera certainement une des clés pour mieux définir l'état des protéines adsorbées. L'analyse neutronique est une mesure expérimentale de la dynamique des protéines adsorbés qui a permis de mettre en évidence une diminution de la flexibilité et de l'entropie vibrationnelle d'une protéine adsorbée sur la silice.

D'abord Les nanomatériaux posent de nouvelles questions en termes de toxicologie humaine et environnementale et représentent une nouvelle interface avec le milieu biologique aux propriétés spécifiques. Lorsqu'elles entrent en contact avec le milieu biologique, les nanoparticules se couvrent d'une couche de protéines adsorbées. Celle-ci leur confère une nouvelle «identité biologique» qui contrôle la réponse cellulaire et leur devenir au sein de l'organisme.

De plus, le résultat remet en cause le modèle d'adsorption du Norde dans lequel la déstructuration des protéines adsorbées s'accompagne d'une augmentation de leur dynamique et d'un gain d'entropie.

D'une manière plus général, il semble possible de créer une base de données de l'adsorption des protéines sur les nanomatériaux partir d'une analyse protéomique à haut débit d'un très grand Nombre de protéines et d'un très grande nombre de nanomatériaux. L'adsorption de la myoglobine et de l'hémoglobine sur les nanoparticules de silice, s'accompagne, d'une perte importante de structure et d'une diminution de la stabilité en température.

Référence bibliographiques

Abdollahpour N., Asoodeh A., Saberi M. R., Chamani J. (2011) Separate and simultaneous binding effects of aspirin and amlodipine to human serum albumin based on fluorescence spectroscopic and molecular modeling characterizations: A mechanistic insight for determining usage drugs doses, Journal of Luminescence 131, 1885-1899.

Adamson A. W. (1990) Physical chemistry of surfaces, 5th edition, Wiley, New York.

AFSSET. (2006) Les nanomatériaux : effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement. Maisons-Alfort: AFSSET. 248p.

Aizawa T., Koganesawa N., Kamakura A., Matsuura A., Nagadome H., Terada Y., Kawano K., Nitta K. (1998) Adsorption of human lysozyme onto hydroxyapatite : identification of its adsorbing site using site-directed mutagenesis, FEBS Letters 422, 175-178.

Allen S.J., Mchey G., Khander K.Y.H. (1989) Equilibrium adsorption for basic dyes into lignite. J.Chemical Technology and Biotechnol. vol 45.pp 291-302.

Alpert B., Elmohsni S., Lindqvist L., Tfibel F. (1979) Transient effects in the nanosecond laser photolysis of carboxyhemoglobin - Cage recombination and spectral evolution of the protein, Chemical Physics Letters 64, 11-16.

Andrade J. D., Hlady V. (1986) Protein adsorption and materials biocompatibility-a tutoralial review and suggested hypotheses, Advances in polymer Science 79, 1-63.

Antonini E. (1971) Hemoglobin and Myoglobin in their interactions with ligands, Vol. 21, New York.

Auffan M., Rose J., Bottero J. Y., Lowry G. V., Jolivet J. P., Wiesner M. R. (2009) Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective, Nat. Nanotechnol. 4, 634-641.

Belmouden M. (2000) Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences d'Agadir.

Baldwin R. L. (1996) why is protein folding so fast? Proc Natl Acad Sci U S A. 93(7): 2627-8.

Bhabha G., Lee J., Ekiert D. C., Gam J., Wilson I. A., Dyson H. J., Benkovic S. J., Wright P. E. (2011) A Dynamic Knockout Reveals That Conformational Fluctuations Influence the Chemical Step of Enzyme Catalysis, Science 332, 234-238.

Bixler R. L., Niemann C. (1959) Surface effects in α-chymotrypsin-catalyzed hydrolyses, Journal of the American Chemical Society 81, 1412-1417.

Bleuart S. (2005) proteins from complex media and purified proteins obtained thereby, France.

Bouchemal F., Achour S. (2007) Essais d'adsorption de la tyrosine sur charbon actif en poudre et en grain (laboratoire de recherche en hydraulique souterraine et de surface. Laryss Journal n°6, 81-89.

Brunner E., Munzel U. (2000) the nonparametric Behrens-Fisher problem: asymptotic theory and a Small-sample approximation, Biometrical Journal 42, 17-25.

Buijs J., Ramström M., Danfelter M., Larsericsdotter H., Håkansson P., Oscarsson S. (2003) Localized changes in the structural stability of myoglobin upon adsorption onto silica particles, as studied with hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, Journal of Colloid and Interface Science 263, 441-448.

Bull H. B. (1956) Adsorption of bovine serum albumin on glass, Biochimica et Biophisica Acta 19,464-471.

Cai W, Zhang L., Phys J. (1997) Condensed Matter, 9, 7257

Calvet R., Terce M., Arvieu J.C. (1980) Ann. Argon 31 ,239-257.

Calvet R. (2003) Le sol propriétés et fonction-tome 1 : Constitution, Structure Phénomènes aux interfaces, Edition France Agricole.

Calvet R., Terce M., Arvieu J.C. (1980) Ann. Agron 31, 385-427.

Calvet R., Terce M., Arvieu J.C. (1980) Ann. Agron. 31, 33-62.

Cardot C. (1999) Génie de l'environnement, les traitements de l'eau procédés physico-chimique et biologiques, cours et problèmes résolus, Edition Ellipses.

Chakravorti R. (1974) Pore and solid Diffusion Models for Fixed Bed Adsorbers. Amer. Inst. Chem. Engng, 20:228-238.

Chang C. T., Wu C. S. C., Yang J. T. (1978) Circular dichroic analysis of protein conformation - Inclusion of beta-turns, Analytical Biochemistry 91, 13-31.

Charlac'h D., Hemery Y. (2004) Etude prospective sur les nanomatériaux, DIGITIP synthèse, France.

Charlac'h D. (2004) Etude prospective sur les nanomatériaux, DIGITIP synthèse, France.

Chen M., Von Mikecz A. (2005) Formation of nucleoplasme protien aggregates impairs nuclear function in response to sio_2 nanoparticles, Experimental cell research 305, 51-62.

Chen Y. H., Yang J. T., Chau K. H. (1974) Determination of helix and beta-form of proteins in aqueous solution by circular dichroism, Biochemistry 13, 3350-3359.

Chitour C.E. (2004) Physicochimique des surfaces. Office des publications universitaires p : 87-100.

Chonn A., Semple S. C., Cullis P. R. (1995) β2-glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes in vivo, Suggesting a significant role in the immune clearance of ″non-self″ particales, Journal of Biological Chemistry 270, 25845-25849.

Chrisey.D. Hubler G. (1994) "Pulsed Laser Deposition of Thin Films", John Wiley & Sons,New York.

Collingnon F. (2008) Cahier technologique sol-gel, Centre de ressources technologiques en chimie. Belgium.

Crittenden J.C., Waber W.J. (1978) Apredictive Model for Desing of Fixed-Bed Adsorbers: Journal of Environmental Engineering, V.104, pp. 185-197.

Czeslik C. (2004) Factors ruling protein adsorption, Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-I nternationel Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics 218, 771-801.

Czeslik C., Royer C., Hazlett T., Mantulin W. (2003) Reorientational dynamics of enzymes adsorbed on quartz: A temperature-dependent time-resolved TIRF anisotropy study, Biophysical Journal 84, 2533-2541.

Davoust P. (2009) Les nanomatériaux, Département Hygiène Sécurité Environnement.

De M., You C. C., Srivastava S., Rotello V. M. (2007) Biomimetic interactions of proteins with Functionalized: A thermodynamic study, J. Am. Chem. Soc. 129, 10747-10753.

Depero L. E, Bonzi P., Musci M., Casale C. J. (1994) Solid State Chem, 111, 247.

Devineau S. (2013) Thèse de doctorat, Adsorption des protéines sur les nanomatériaux : Biochimie et physico-chimie d'un nouveau stress, Universite paris-sud, Ecole doctorale Chimie Paris Sud

Dobbins S. E., Lesk V. I., Sternberg M. J. E. (2008) Insights into protein flexibility: The relationship between normal modes and conformational change upon protein-protein docking, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 10390-10395.

Dong A., Huang P., Caughey W. S. (1990) Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra, Biochemistry 29, 3303-3308.

D'orleans D. (2003) Thèse de Doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg 1.

Douglas J. F., Gchneider H. M., Frantz P., Lipman R., Granick S. (1997) the origin and charaterization of conformationl heterogeneity in adsorbed polymer layers, Journal of physics- condensed 9, 7699-7718.

Doster W., Cusack S., Petry W. (1989) Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron Scattering, Nature 337, 754-756.

Drobny G. P., Long J. R., Shaw W. J., Cotten M., Stayton P. S. (2007) Structure and Dynamics of Proteins Adsorbed to Biomaterial Interfaces, in eMagRes, John Wiley & Sons, Ltd.

Dubinin M. M. (1960) The potential theory of adsorption of gases and vapors for adsorbents with energetically nonuniform surfaces, Chemical Reviews 60, 235-241.

Edeline F. (1992) L'épuration physiqo-chemique des eaux : Théorie et technologie. Edition cebedoc, lavoisier.

Felsovalyi F., Mangiagalli P., Bureau C., Kumar S. K., Banta S. (2011) Reversibility of the adsorption of lysozyme on silica, Langmuir 27, 11873-11882.

Ferro-Garcia M.A., Rivera-Utrilla J., Bantista-Toledd I., Moreno-Castilla A.C. (1998) Langmuir 14, 1880-1886.

Frantz P., Granick S. (1991) Kinetics of polymer adsorption and desorption, physical review letters 66, 899-902.

Frauenfelder H., Petsko G. A. (1980) Structural dynamics of liganded myoglobin, Biophysical Journal 32, 465-483.

Freundlich H. Z. (1906) over the adsorption in solution, J. Phys. Chem. 57A, 385-470.

Gaffet E. (2010) Nanomaterials Research Group – UMR CNRS 5060.

Gao L. M., Ding Y., Wang Z. L. (2003) Nano Lett, 3, 1315.

Geai J. P. (2010) Nanoparticules: entre grande peur et immenses espoirs, UFC que Choisir 480, 3.

Giles C.H., Mceman T.H., Nakhwa S.N., Smith D. (1960) Studies in adsorption .XI.A system of classification of solution adsorption isotherm and it suses in diagnosis of adsorption mechanism and measurement of specific surface area of solide. Journal of chemical society, 3972-3993.

Giles C.H., Smith. (1974) Colloid Interf. Sci. 47, 755-765.

Gottfried D. S., Kagan A., Hoffman B. M., Friedman J. M. (1999) Impeded rotation of a protein in a sol-gel matrix, Journal of Physical Chemistry B 103, 2803-2807.

Greenfield N., Fasman G. D. (1969) Computed circular dichroism spectra for evaluation of protein conformation, Biochemistry 8, 4108-4116.

Gupta M. N., Kaloti M., Kpoor M., Solanki K. (2011) Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization, Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol. 39, 98-109.

Haase A., Arlinghaus H. F., Tentxhert J., Goetz M. E., Masic A., Meier W., Thunemann A. F., Taubert A., Luch A. (2011) Application of laser postionization secondary neutral mass spectrometry / time-of-flight secondary ion mass spectrometry in nanotoxicoligy : visualization of nanosilver in humain macrophages and cellular responses, Acs Nano 5, 3059-3068.

Hagen S. J., Hofrichter J., Eaton W. A. (1996) geminate rebinding and conformational dynamics of myoglobin embedded in a glass at room temperature, Journal of Physical Chemistry 100, 12008-12021.

Haller W. (1965) Chromatography on Glass of Controlled pore Size, Nature 206, 693-696.

Haouz A., Glandières J. M., Alpert B. (2001) Involvement of protein dynamics in enzyme stability: The case of glucose oxidase, FEBS Letters 506, 216-220.

Haruta M., Kobayashi T., Sano H. et al. (1987) Novel Gold Catalysts for the Oxidation of Carbon Monoxide at a Temperature far below 0 °C. Chem. Lett.; 16(2):405-8.

Haynes C. A., Lewinsky E., Norde W. (1994) Structural and electrostatic properties of globular proteins at a polystyrene water interface, Journal of Colloid and Interface Science 164, 394-409.

Hennessey J. P., Johnson W. C. (1981) Information content in the circular dichroism of proteins, Biochemistry 20, 1085-1094.

Hiemenz P.C. (1986) in: principales of colloid and surface chemistry, Ed., Marcel Dekker, New York, 353-419.

Hildebrand M. (2008) Diatoms, biominiralization processes, and genomics, Chemical Reviews 108, 4855-4874.

Hitchcoch D. I. (1925) protéine films on collodion membranes, THE journal of general physiology 8, 61-74.

Ho Y.S., Mckay G. (1998) Sorption of dye from aqueous solution by peat, Chem. Eng. J. 70 (2), pp. 115-124.

Holt S. A., McGillivray D. J., Poon S., White J. W. (2000) Protein deformation and surfactancy at an interface, Journal of Physical Chemistry B 104, 7431-7438.

Hugel T., Grosholz M., Clauusen- schauman H., pfau A., Gaub H., Seitz M. (2011) Elastcity of single polyelectrolyte chains and their desorption from solid supports studied by AFM based single molecule Force spectroscopy, macromolecules 34, 1039-1047.

Hussain S., Al-Nsour F., Rice A. B., Marshburn J., Ymgling B., Ji Z., Zink J. I., Walker N. J., Garantziotis S. (2012) Cerium dioxide nanoparticles induce apoptosis and antophagy in human perpheral blood monocytes, ACS Nano 6, 5820-5829.

http://www.actuenvironnement.com/ae/dictionnaire_environnement/definition/nanomateriaux

http://fr.wikipedia.org/wiki/Nanomatréiau

http://fr.wikipedia.org]

http://www.espace-musculation.com/proteines.html

http://www.futura-sciences.com

Iler R. K. (1979) The Chemistry of Silica, John Wiley & Sons, New York.

Iwakura M., Nakamura D., Takenawa T., Mitsuishi Y. (2001) An apprroach for protein to be completely reversible to thermal denaturation even at autoclave temperatures, protein Engineering 14, 583-589.

Isabelle soury-lavergne navizet(2004) thèse de doctorat de modélisation et analyse des propriétés mécaniques des protéines, l'université paris 6

Jacrot B., Cusack S., Dianoux A. J., Engelman D. M. (1982) Inelastic neutron scattering analysis of hexakinase dynamics and its modification on binding of glucose, Nature 300, 84-86.

James L. K., Augenste L. G. (1966) Adsorption of enzymes at interfaces – Film formation and effect on activity, Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular biology 28, 1-40.

Jelly M., Lurgi (1997) Le charbon actif en grain dans le traitement des eaux résiduaires et des eaux potables et sa regeneration. Information chemique n°166.

Johnson R. D., Arnold F. H. (1995) The Temkin isotherm describes heterogeneous protein adsorption.

Johnson R. S., Walsh K. A. (1994) Mass spectrometric measurement of protein amide hydrogen exchange rates of apo- and holo-myoglobin, Protein Science 3, 2411-2418.

Jovanovic D. S. (1969) Physical adsorption of gases. I. Isotherms for monolayer and multilayer adsorption, Kolloid-Zeitschrift and Zeitschrift Fur Polymere 235, 1203-1213.

Karplus M., McCammon J. A. (1981) The internal dynamics of globular proteins, Crc Critical Reviews in Biochemistry 9, 293-349.

Khan S.U. (1980) Fundamental aspects of pollution control and environmental science 5, Elsevier, New York.

Kiss I. (1958) Invertase activity in clay mineral-soil mixtures, Nature 182,203-204.

Klibanov A. M. (1983) Immobilized enzymes and cells as practical catalysrs, Scince 219, 722-727.

Koral J., Ullman R., Eirich F. R. (1958) The adsorption of polyrinyl acetate, the Journal of physical chemistry 62, 541-550.

Langmuir I. (1918) The adsorption of gases on plane surface of the American Chemical Society 40,1361-1403.

Levitt M., Greer J. (1977) Automatic identification of secondary structure in globular proteins, Journal of Molecular Biology 114, 181-239.

Limbut W., Thavarungkul P., Kanatharana P., Asawatreratanakul P., Limsakul C., Wongkittisuksa B. (2004) Comparative study of controlled pore glass, silica gel and poraver for the immobilization of urease to determine urea in a flow injection conductimetric biosensor system, Biosens Bioelectron 19, 813-821.

Limousin G., Gaudet J.P., Charlet L., Szenknet S., Barthéses V., Krimissa M. (2007) Sorption isotherms : a revienw on physical bases, modelling and measurement, Applid Geochemistry, vol. 22, pp. 294-275.

Linse S., cabaleiro-lagoC., Xue W. FI., lindman S., Thulin E., Radford S.E., Dawson K.A. (2007) Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles, proceedings of the national Academy of sciences of theUnited States of America 104, 8691-8696.

Lyklema J., Norde W. (1996) Interfacial behaviour of biomacromolecules, (Jacobasch, H., Ed.), pp 9-17, Springer Berlin /Heidelberg.

Lyklema J. (1984) Proteins at soli liquide interfaces - A colloid chemical review, Colloids and Surfaces 10, 33-42.
Lynch I., Dawson K. A. (2008) Protein-nanoparticle interactions, Nano Today 3, 40-47.

Manavalan P., Johnson W. C. (1987) Variable selectrion methods improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra, Analytical Biochemistry 167, 76-85.

Marano F., Hussain S., Rodrignes-lima F., Baeza-Squiban A., Bolands S. (2011) Nanoparticles : molecular targets and cell signalling of toxiclogy 85, 733-741.

Marsteau S. (2005) Traitement des gaz dangereaux captés sur les lieux de travail (Institut national de recherche et de sécurité inrs), Département Ingénierie des procédés.

Masschelein W.J. (1996) Processus unitaires du traitement de l'eau potable .Ed. CEBEDOC Sprl, Liége. (nb de pages).

Mathé C., Devineau S., Aude J.-C., Lagniel G., Chédin S., Legros V., Mathon M. H., Renault J. P., Pin S., Boulard Y., Labarre J. (2013) Structural determinants for protein adsorption/non-adsorption to silica surface, Submitted.

Mayor U., Johnson C. M., Daggett V., Fersht A. R. (2000) Protein folding and unfolding in microseconds to nanoseconds by experiment and simulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 97(25): 13518-22.

Mclaren A. D. (1954) The adsorption and reactions of enzymes and proteins on kaolinite, Journal of physical Chemistry 58,129-137.

Mclaren A. D., Esterman E.F. (1957) Influence of pH on the activity of chymotrypsin at a solid-liquid interface, Archives of biochemistry and biophysics 68,157-160.

Mclaren A. D., Peterson G.H. (1961) Montmorillonite as a caliper for size of protein molecules, Nature 192, 960-961.

Meseguer-Olmo L., Bernabeu-Esclapez A., Ros-Martiner E., Sancher-Salcedo S., Padilla S., Martin A. I.,Vallet-Regi M., Clavel-Sainz M., Lopez-Prats F., Meseguer-Ortiz C. L. (2008) In vitro behaviour of adult mesenchymal stem cells seeded on a bioactive glass ceramic in the SiO_2 –CaO-P_2O_5 system, Acta Biomaterialia 4, 1104-1113.

Milani S., Baldelli Bombelli F., Pitek A. S., Dawson K. A., Rädler J. (2012) Reversible versus irreversible binding of transferrin to polystyrene nanoparticles: soft and hard corona, Acs Nano, 2532-2541.

Mittermaier A., Kay L. E. (2006) New tools provide new insights in NMR studies of protein dynamics, Science 312, 224-228.

Montgomery Y.J.M. (1985) Consulting engineers, INS: Water traitement principales and design, Ed. J. Wiley & Sons, New York.

Mulvihill J. N., Faradji A., Oberling F., Cazenave J. P. (1990) Surface passivation by humain albumin of plasmaperesis circuites reduces platelet accumulation and thrombus formation. Experimental and chimical studies, Journal of Biomedical Materials Research 24,155-163.

Naib N. (2006) Etude du procédé d'adsorption du phénol sur du charbon actif à base de grignon d'olive, modilisation par les plans d'expérience, Mémoire de Magister, Université M'Hamed Bougara, Boumerdes.

Napierska D., Thomassen L. C. J., Lison D., Martens J. A., Hoet P. H. (2010) the nanosilica hazard: another variable entity, part. Fibre toxicol. 7.

Nel A. E., Madler L., Velegol D., Xia T., Hoek E. M. V., Somasundaran P., Klaessing F., Castranova V., Thompson M. (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface, Nat Mather 8,543-557.

Nelson J. M., Griffin E.G. (1916) Adsorption of invertase, J. Am. Chem. Soc.38, 1109-1115.

Nord W., Lyklema J. (1978) Adsorption of human plasma albumin and borine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surface.1.Adsorption isotherme. Effects of charge, ionic strength and temperature,journal of colloid and Interface sciences 66,257-265.

Norde W., Lyklema J. (1979) Thermodynamics of protein adsorption –Theory with special reference to the adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at polystyrene surfaces, Journal of Colloid and Interface Science 71, 350-366.

Norde W. (2008) My voyage of discovery to proteins in flatland …and beyond, Colloids and Surface B-Biointerfaces 61, 1-9.

Oberdoerster G., Ferin J., Finkelstein J., Wade P., Crson N. (1990) Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles ?, J.Aerosol science 21, 381-387.

Oberdoerster G., Oberdorster E., Oberdosster J. (2005) Nanotoxicology : Au emerging dixipline evolving from studies of ultrafine particles, Environ. Health perspect. 113,823-839.

Okuyama K., Lenggoro I. W., Tagami N., Mater J. (1997) Sci, 32, 1229.

Papazoglou E. S., Parthasarathy A. (2007) Synthesis Lectures on Biomedical Engineering, 2, 1.

Parak F., Knapp E. W., Kucheida D. (1982) Protein dynamics: Mössbauer spectroscopy on deoxymyoglobin crystals, Journal of Molecular Biology 161, 177-194.

Pastor I., Ferrer M. L., Lillo M. P., Gomez J., Mateo C. R. (2007) Structure and dynamics of lysozyme encapsulated in a silica sol-gel matrix, Journal of Physical Chemistry B 111, 11603-11610.

Petzelbauer I., Kuhn B., Splechtna B., Kulbe K. D., Nidetzky B. (2002) Developement of an ultrahigh-temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose. IV. Immobilization of two thermostable beta-glycosidases and optimization of a packed-bed reactor for lactose conversion, Biotechnol Bioeng 77,619-631.

Pin S., Valat P., Tourbez H., Alpert B. (1986) CO cage recombination in hemoglobin - Picosecond photolysis and nanosecond observation, Chemical Physics Letters 128, 79-83.

Plaxco K. W., Dobson C. M. (1996) Time-resolved biophysical methods in the study of protein folding. Curr Opin Struct Biol. 6(5): 630-6.

Profeat. http://jing.cz3.nus.edu.sg/cgi-bin/prof/prof.cgi.

Provencher S. W., Glockner J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism, Biochemistry 20, 33-37.

Radford S. E. (2000) Protein folding: progress made and promises ahead. Trends Biochem Sci. 25(12): 611-8.

Ramesh A., Lee D.J., Wong J.W. (2005) Thermodynamic parameters for adsorption equilibrium of heavy metals and dyes from wastewater with low-cost adsorbents, Journal of Colloid and Intreface Sience, 291.pp.588-592.

Reibold M., Paufler P., Levin A. A., Kochmann W., Pätzke N., Meyer D. C., (2006) Nature**,** 444, 286.

Riaz Q., Abdul Hameed R. (2002) A study of adsorption of phénol by activated carbon from aqueous solutions. Turk J Chem. 26, pp.357-361.

Robel L. (1989) Operation unitaire (Adsorption). Technique d'ingénieur; J2. J2730.

Said B. (2009) Les proteines : structure, proprietes et applications technologiques, PLP biotechnologies.

Sarkar D. (2011) Des nanoparticules altérent la barriére protégeant le Cerveau, Le monde.fr.

Senesi N., Chen Y., Mingelgrin U., Yaron B. (1989) Editors, Springer-Verlag, Berlin, pp. 37–90.

Shepard C.C., Tiselius A. (1949) The chromatography of proteins-the effect of salt concentration and pH on the adsorption of proteins to silica gel, Discussions of the Faraday Society, 257-285.

Shi J., Karlsson H. L., Johansson K., Gogverdze V., Xioo Li J., Burks T., Garacia-Bennett A., uheida A., Muhammed M., Mthur S., Morgenstrem R., Kagan V. E, Fadeel B. (2012) Microsomal glutathione trasferase 1 portects against toxicty induced by silica nanoparticles but not by Zinc oxide nanoparticles, Acs nano.

Slowing I. I., Trewyn B. G., Giri S., Lin V. S. Y. (2007) Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications, Advanced Functional Materials 17, 1225-1236.

Soderquist M. E., Walton A. G. (1980) structural changes in protien adsobed on polymer surface, Journal of colloid and Interface science 75, 386-397.

Sontheimer H., Crittenden J.C., Summer R.S. (1988) Activated Carbon for Water Treatment : nd édition, Karlsruhe, DVGW-Forschungsstelle.

Stober W. (1967) Formation of silicic acid in aqueous suspensions of different silica modifications, Advances in Chemistry Series, 161-182.

Stumm W., Morgan J.J (1981) Aquatic chemistry, Ed.2, Wiley inter-science J., Wiley & sons.

Sun L.M., Meunier F. (2007) Adsorption : aspects théoriques. Techniques de l'ingénieur, J 2730.

Sweryda-Krawiec B., Devaraj H., Jacob G., Hickman J. J. (2004) Anew interpretation of serum albumin surface passivation, Langmuir 20, 2054-2056.

Taniguchi K., Nomura K., Hata Y., Nishimura T., Ksami Y., Kuroda A. (2007) The Si-Tag for immobilizing proteins on a silica surface, Biotechnol. Bioeng. 96, 1023-1029.

Tchobanoglous G., Burton F., Stensel H. D. (2002) Wastewater Engineering : Treatment and Reuse Metcalf Eddy, Inc. Fourth edition, 1848 page.

Tedja R., lim M., Amal R., Marquis C. (2012) Effects of serum adsorption on cellular uptake profil and consequent impact of titanium dioxide nanoparticule on human lungcellline ACS Nano.

Temkin M., Pyzhev V. (1939) Kinetics of the synthesis of ammonia on promoted iron catalysts, J. Phys. Chem. 13, 851.

Thomassen L. C. J., Aerts A., Rabolli V., Lison D., Gonzalez L., Kirsch-Volders M., Napierska D., Hoet P. H., Kirschohock C. E. A., Martens J. A. (2010) Synthesis and characterization of stable monodisperse silica nanoparticle sols for in vitro cytotoxicity testing, Langmuir 26, 328-335.

Topoglidis E., Campbell C. J., Cass A. E. G., Durrant J. R. (2001) Factors that affect protein adsorption on nanostructured titania films. A novel spectroelectrochemical application to sensing, Langmuir 17, 7899-7906.
Ubago-Perez R., Carrasco-Marin F., Fairen-Jimenez D., Moreno-Castilla., Granular C. (2006) and monolithic actived carbons from KOH-activation of olive stones. Microporous and Mesoporous Materials, Vol. 92, pp.64-70.

Yu D. P., Sun X. S., Lee C. S., Bello I., Tang Y. H., Zhou G. W., Bai Z. G., Zhang Z., Feng S. Q. (1998) Solid State. Commun, 105, 403.

Vajtai R. (2012) Springer Handbook of Nanomaterials; Springer.

Valerio M., Colosimo A., Conti F., Giuliani A., Grottesi A., Manetti C., Zbilut J. P. (2005) Early events in protein aggregation: Molecular flexibility and hydrophobicity/charge interaction in amyloid peptides as studied by molecular dynamics simulations, Proteins-Structure Function and Bioinformatics 58, 110-118.

Valstar A., Almgren M., Brown W., Vasilescu M. (2000) The interaction of bovine serum albumin with surfactants studied by light scattering, Langmuir 16, 922-927.

Van der veen M., Stuart M. C., Norde W. (2007) Spreading of proteins and its effect on adsorption and desoption kinetics, colloids and surface B-Biointer ces 54,136-142.

Vroman L., Adams A. L. (1969) Findings with recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/ solid interfaces, Surface science 16,438.

Warheit D. B., Webb T. R., Colvin V. L., Reed K. L., Sayes C. M. (2007) Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine quartz particles in rats : toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics, Toxicological Sciences 95, 270-280.

Warheit D. B., Sayes C. M., Reed K. L., Swain K. A. (2008) Health effects related to nanoparticle exposures : Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks, pharmacol. Ther. 120, 35-42.

Weber W.J. Jr., Ginley P.M. Mc., Katz L.E. (1991) Water Res, 25, 499-528.

Wijnhoven S. W. P., Peijnenburg W. J. G. M., Herberts C. A., Hegens W. I., Oomen A. G., Hengens E. H. W., Roszek B., Bisschops J., Gosens I., Van de Meent D., DEKKERS S., DEJONG W. H., Van Zijverden M., Sips A. J. A. M., Geertsma R. E. (2009) Nano-silver-a revien of available data and knowledge gaps in humain and environemental risk assessnent , Nanotoxcicology 3,109-U178.

Willstatter R., Schneider K. (1924) Z. physiol. Chem.133, 193.

Yakovleva J., Davidsson R., Lobanova A., Bengtsson M., Eremin S., Laurell T., Emnéus J. (2002) Microfluidic enzyme immunoassay using silicon microchip with immobilized antibodies and chemiluminescence detection, Analytical Chemistry 74, 2994-3004.

Yon J. M., Perahia D., Ghélis C. (1998) Conformational dynamics and enzyme activity, Biochimie 80, 33-42.

Yonetani T., Kanaori K. (2013) how does hemoglobin generate such diverse functionality of physiological relevance?, Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics.

Zanotti J.-M. (2005) Vibrations et relaxations dans les molécules biologiques. Apports de la diffusion incohérente inélastique de neutrons, J. Phys. 130, 87-113.

Zittle C. A. (1953) Adsorption studies of enzymes and other proteins, Advances in Enzymology and Related Sybjects of biochemistry 14, 319-374.

Zougrana T., Findenegg G. H., Norde W. (1997) Structure, stability, and activity of adsorbed enzymes, Journal of Colloid and Interface Science 190, 437-448.