

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CONTRÔLE DE NO, O₂, H₂S À L'INTERFACE DE CLUSTER [4Fe-4S] : L'EFFET DE L'ENVIRONNEMENT
REDOX SUR LA NITROSYLATION DE LA PROTÉINE AVEC LE CLUSTER [4Fe-4S]

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

À LA MAITRISE EN CHIMIE
PAR

AHMAD BENHLIMA

Février 2024

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

Remerciement

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers tous ceux qui ont contribué à sa réalisation et à la réussite de mon parcours académique. La recherche et la rédaction de ce mémoire ont été un voyage enrichissant, et cela n'aurait pas été possible sans le soutien inestimable et les encouragements de nombreuses personnes.

Je remercie sincèrement ma directrice de recherche Professeure Erin Dodd pour m'avoir donné cette immense opportunité de faire mes preuves avec ce projet de recherche. Votre expertise, votre patience et vos conseils éclairés ont été essentiels pour la réalisation de ce mémoire. Je tiens également à adresser mes remerciements à tous les enseignants qui m'ont inspiré et qui ont généreusement partagé leurs connaissances et leurs matériels pour soutenir mes recherches. Votre contribution a été d'une valeur inestimable pour la réussite de ce travail.

Je profite de cette occasion pour adresser mes profonds remerciements au corps professoral et administratif du département de Chimie pour la richesse et la qualité de leurs enseignements; qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Mes remerciements vont également à mes collègues de laboratoire Khali Assala et Zomblewou, Rébecca et à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à cette recherche. Vos idées, discussions et encouragements ont enrichi mon travail et ont contribué à son succès.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers mes parents et mes sœurs qui ont toujours été là pour moi votre amour, votre soutien inconditionnel et vos encouragements ont été les piliers de ma réussite académique. Merci pour votre confiance en moi et pour avoir cru en mes rêves.

Enfin, je remercie l'Université du Québec à Montréal (UQAM) pour avoir mis à ma disposition les ressources nécessaires pour mener à bien cette recherche.

Ce mémoire n'aurait pas été possible sans l'aide et le soutien de chacun d'entre vous. Merci du fond du cœur.

Table des matières

Remerciement	ii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xi
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xiii
RÉSUMÉ	xv
ABSTRACT	xvi
Chapitre 1 : Généralité	1
1.1 Les protéines Fer-Soufre.....	1
1.1.1 La structure [2Fe-2S].....	2
1.1.2 La structure [3Fe-4S].....	3
1.1.3 La Structure [4Fe-4S].....	4
1.2 Cluster [4Fe-4S] comme catalyseur (Aconitase).....	5
1.3 La réaction de [4Fe-4S] avec NO.....	7
1.3.1 La molécule de NO.....	7
1.3.2 Interaction des clusters [Fe-S] avec NO.....	8
1.4 Comment l’oxygène affecte la réaction des clusters Fe-S avec NO ?.....	11
1.4.1 Le cluster [2Fe-2S] avec NO en présence et en absence d’oxygène.....	11
1.4.2 Le cluster [4Fe-4S] avec NO en présence et en absence d’oxygène.....	12
1.5 La réaction du cluster [Fe-S] avec le NO et la production de H ₂ S.....	13
1.6 Les techniques utilisées.....	15
1.6.1 HPLC.....	15
1.6.2 La Spectroscopie UV-Visible.....	17
1.6.3 La Spectroscopie de fluorescence.....	19
Objectif.....	21

Chapitre 2	22
L'expression de la protéine d'AvHiPIP [4Fe-4S]	22
Matériel et méthode	23
2.1 Choix de la protéine :	24
2.2 Développement d'un protocole pour l'expression de la protéine HiPIP [4Fe-4S]	25
2.2.1 Plasmide utilisé.....	25
2.2.2 Préparation des cellules compétente <i>E. coli</i> BL21 (DE3) et la transformation de plasmide dans les cellules.....	26
2.2.3 L'expression de la protéine HiPIP [4Fe-4S].....	27
2.2.4 La purification.....	29
2.2.5 Vérification de la masse de la protéine par la spectrométrie de masse	32
2.3 Détermination du coefficient d'extinction de la protéine HiPIP [4Fe-4S]	35
Chapitre 3	39
Nitrosylation de HiPIP [4Fe-4S], l'impact de la cinétique de la réaction de nitrosylation sur le choix du NONOate, et la preuve de la libération de H₂S pendant la réaction.	39
Matériel et méthode	40
3.1 La réactivité de la protéine HiPIP avec l'oxyde nitrique et ses dérivés	41
3.1.1 Dipropylentriamine NONOate (DPTA NONOate)	41
3.1.2 PROLI NONOate :	42
3.1.3 Diéthylamine NONOate (DEA NONOate)	44
3.1.4 Réaction de HiPIP avec NO ⁻ et NO ⁺ suivie par UV visible	47
3.1.5 RPE de la HiPIP [4Fe-4S] nitrosylé	49
3.2 Preuve de la libération de H ₂ S pendant la réaction en utilisant les capteurs fluorogènes de H ₂ S C-7Az et SF7-AM	51
3.2.1 Réaction de la protéine HiPIP avec NO à la présence de C-7Az :	53
3.2.2 Réaction de la protéine HiPIP avec NO à la présence de SF7-AM.....	55

Conclusion 63

Perspectives..... 65

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Représentation schématique des différents types des clusters fer-soufre trouvés en biologie, cluster [2Fe – 2S], cluster [3Fe – 4S] et cluster [4Fe – 4S]	2
Figure 1.2 Changement d'état d'oxydation des clusters [4Fe–4S]	4
Figure 1.3 a) Schéma de fonctionnement de la nitrogénase, b) Schéma de fonctionnement de la NADH déshydrogénase, c) Schéma de fonctionnement de l'hydrogénase [NiFe] et de l'hydrogénase [FeFe]	5
Figure 1.4 Schéma qui montre la libération de Fe alpha après la réaction des oxydants anioniques tels que le radical superoxyde, le peroxydinitrite et le radical carbonate ainsi que la catalyse de citrate en isocitrate	6
Figure 1.5 Structure de Lewis de L'oxyde nitrique les tirets sur l'atome d'oxygène et d'azote représentent des doublets d'électrons	7
Figure 1.6 Structure des produits résultant de la nitrosylation du cluster [4Fe-4S]. a) DNIC (Dinitrosyl Iron Complex), b) RRE (Roussin's Red Ester) /rRRE (Roussin's Red Ester réduit), c) RBS (Roussin's Black Salt)	11
Figure 1.7 Modèle de l'interaction entre les résidus Histidine (His tag) et l'ion métallique Ni ²⁺	16
Figure 1.8 Schéma de l'agencement optique d'un spectrophotomètre UV-Vis monochromatique	18
Figure 1.9 Diagramme Jablonski-Perrin	20
Figure 2.1 Structure de la protéine d' <i>Allochro matium vinosum</i> HiPIP [4Fe–4S]	24
Figure 2.2 a) La carte du plasmide pET-21d (+), le gène d'AvHiPIP est situé entre Nco I et Hind III alors que le His-Tag se trouve directement à côté de la partie qui contient Hind III, b) la séquence d'ADN et de la protéine HiPIP d' <i>Allochro matium vinosum</i>	26
Figure 2.3 a) Les résultats de la purification d'AvHiPIP par SDS-page, b) Les colonnes de nickel lors de la purification d'AvHiPIP, c) La coloration de la protéine HiPIP après concentration	31

Figure 2.4 Les résultats de la spectrométrie de masse pour la protéine Holo HiPIP [4Fe–4S]. Chaque pic dans l'image représente l'holoprotéine avec une charge spécifique, indiquée dans tableau ci-dessous, la masse molaire de chaque pic est indiqué dans le tableau et calculée sur la base de la charge attribuée. La masse réelle de la protéine Holo, est d'environ $\approx 11\ 313$ Da 33

Figure 2.5 Les résultats de la spectrométrie de masse pour la protéine Apo. Chaque pic dans l'image représente l'apoprotéine avec une charge spécifique, indiquée dans le tableau ci-dessous, ainsi que la masse molaire de chaque pic est indiqué dans le tableau et calculée sur la base de la charge attribuée. La masse réelle de la protéine Apo, qui est d'environ $\approx 10\ 962$ Da. Noter que cette figure est un zoom de la figure (2.4) pour montrer les petits pics de la protéine Apo 34

Figure 2.6 Courbe d'étalonnage de fer avec les différentes concentrations après l'ajoute de ferene 37

Figure 2.7 a) Les spectres de UV-Visible de la protéine HiPIP [4Fe–4S] avec les différentes concentrations, b) Courbe d'une série de dilution de HiPIP [4Fe–4S] ave. Les concentrations utilisées pour tracé cette courbe sont celles que nous avons obtenues en utilisant le "Test Ferene pour la dosage du fer" 38

Figure 3.1 a) Spectres UV-visibles de 30 μ M de HiPIP après leur réaction avec NO libéré à partir de DPTA NONOate b) la molécule de DPTA NONOate. La réaction a été fait dans une cuvette en quartz de UV-Vis à bouchon à vis hermétique, contenant 3 mL de Tris pH=7,4 41

Figure 3.2 a) Spectres UV-visibles de 30 μ M de HiPIP après leur réaction avec NO libéré à partir de PROLI NONOate. b) la molécule de PROLI NONOate. La réaction a été fait dans une cuvette en quartz de UV-Vis à bouchon à vis hermétique, contenant 3 mL de Tris pH=7,4 43

Figure 3.3 a) Spectres UV-visibles de 30 μ M de HiPIP après leur réaction avec NO libéré à partir de DEA NONOate. b) la molécule de DEA NONOate. La réaction a été fait dans une cuvette en quartz de UV-Vis à bouchon à vis hermétique, contenant 3 mL de Tris pH=7,4. La courbe violet en gras représente la bande de HiPIP, la courbe bleue représente le produit formé après 40 min de l'ajoute de DEA NONOate 44

Figure 3.4 Spectres UV-visibles de 30 μ M de HiPIP après leur réaction avec un excès de NO libéré à partir de DEA NONOate. La réaction a été fait dans une cuvette en quartz de UV-Vis à bouchon à vis hermétique, contenant 3 mL de Tris pH=7,4 46

Figure 3.5 a) Spectres UV-visibles de 30 μ M de HiPIP après leur réaction avec NO⁺ libéré à partir de SNAP, en haut à droit la structure de S-Nitroso-N-Acetyl-D, L-Penicillamine (SNAP). b) Spectres UV-visibles de 30 μ M de HiPIP après leur réaction avec NO⁻ libéré à partir de Angeli's Salt, en haut à droit la structure de Angeli's Salt. Les réactions ont été fait dans une cuvette en quartz de UV-Vis à bouchon à vis hermétique, contenant 3 mL de Tris pH=7,4 48

Figure 3.6 Spectres RPE à 115 K de 0,6 μ mol de HiPIP exposé à NO libéré à partir de PROLI-NONOate pendant la nuit 50

Figure 3.7 Un schéma démonstratif qui explique l'ajoute des sondes de fluorescence durant la réaction de HiPIP et NO 52

Figure 3.8 À gauche, vous trouverez la structure non fluorescente du C-7Az. Lorsqu'il réagit avec le H₂S, une réaction de réduction se produit entre l'azote du C-7Az et le H₂S, conduisant à la formation d'une amine représentée dans la structure fluorescente du C-7Az à droite 53

Figure 3.9 a) Spectre UV-Visible de la réaction de HiPIP avec DEA NONOate à la présence de C-7Az b) Spectre de fluorescence de la réaction de HiPIP avec DEA NONOate à la présence de C-7Az 54

Figure 3.10 À gauche, vous trouverez la structure non fluorescente du SF7-AM. Lorsqu'il réagit avec le H₂S, une réaction de réduction se produit entre les deux azotes du SF7-AM et le H₂S, conduisant à la formation de deux amines représentées dans la structure fluorescente du SF7-AM à droite 56

Figure 3.11 Suivi de l'évolution du H₂S généré par la nitrosylation de [4Fe-4S] AvHiPIP. A : Absorbance : diminution de la bande [4Fe-4S] montre la perte de cluster due à la nitrosylation ; B : Absorbance : aucune variation de la bande [4Fe-4S] en l'absence de NO ; C : Émission de fluorescence (excitation à 498 nm) augmente lorsque la HiPIP est exposée au NO en présence de SF7-AM ; D : Réponses d'émission de fluorescence de SF7-AM (excitation à 498 nm) pour HIPIP + NO par rapport à celles pour le NO seul ou la HiPIP seule, corrigées pour la fluorescence de base de SF7-AM et normalisées pour [SF7-AM] 57

Figure 3.12 Suivi de l'évolution du H₂S généré par la nitrosylation de [4Fe-4S] AvHiPIP pendant 90min 60

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 <i>Les changements effectués pour augmenter la quantité de la protéine HiPIP [4Fe–4S]</i>	28
Tableau 2.2 Préparations des standards pour la quantification du fer dans la protéine HiPIP [4Fe– 4S].....	37

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

FeS	Les clusters fer soufre
HiPIP	High Potential Iron Protein
DNIC	Dinitrosyl Iron Complex
RRE	Roussin's red ester
rRRE	Roussin's Red Ester réduit
RBA	Roussin's black anion
MNIC	Complexes Nitrosyles de Fer Mononucléaires
IR	La spectroscopie infrarouge
RPE	Résonance paramagnétique électronique
UV-VIS	La spectroscopie UV-visible
UV	La lumière ultraviolette
NRVS	La spectroscopie vibrationnelle par résonance nucléaire
CD	Dichroïsme circulaire
C-7Az	7-azido-4-méthylcoumarine
Fd	La ferrédoxine

FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
LB	Luria-Bertani broth
SDS-PAGE	L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

UA	Unité arbitraire
e ⁻	Électron
g	Gramme
C	Concentration
s	Seconde
min	Minute
h	Heure
°C	Degré Celsius
M	mol/L
mM	Millimolaire (10 ⁻³ M)
μM	Micromolaire (10 ⁻⁶ M)
%	Pourcentage
mg	Milligramme
nm	Nanomètre
RPM	Rotation par minute

kDa	kilodalton
mmol	Millimole
μmol	Micromole
L	Litre
mL	Mili litre
μL	Micro litre
Da	Dalton

RÉSUMÉ

Les interactions entre le monoxyde d'azote (NO) et les espèces réactives à base de soufre de petite taille commencent à être reconnues comme un aspect vital de la manière dont le NO est perçu, stocké et finalement contrôlé dans les systèmes biologiques. La biologie du NO est intrinsèquement liée à la régulation redox biologique, notamment par l'interaction avec les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la génération de molécules de signalisation en aval basées sur l'azote, le soufre et l'oxygène. Les bactéries pathogènes doivent également faire face aux ERO générées par les cellules immunitaires de l'hôte, et l'effet de cela sur les mécanismes de défense d'une espèce bactérienne pathogène contre le stress nitrosatif est d'un grand intérêt. Les protéines contenant le cofacteur à cluster fer-soufre [4Fe-4S] sont connues pour agir comme des capteurs de NO dans la réponse au stress nitrosatif cytoprotecteur des bactéries, grâce à la sensibilité du cofacteur à la nitrosylation. La nitrosylation des clusters FeS biologiques dépend de la redox et est également une source potentielle du gazotransmetteur H₂S, qui à son tour est responsable d'une large gamme de mécanismes bactériens, y compris la pathogénicité et l'évasion immunitaire de l'hôte. Les aspects fondamentaux de cette chimie restent mal compris. Les différences mécanistiques dans la réactivité des clusters FeS avec le NO dans des conditions oxydantes ou réductrices contribuent à la manière dont les organismes réagissent au stress nitrosatif et oxydatif combiné. Des résultats antérieurs ont montré que le contrôle mécanistique au niveau du cofacteur [4Fe-4S] diverge dans des conditions oxydantes par rapport à des conditions redox-neutres, entraînant la formation de produits nitrosylés de fer différent. Ici, nous rapportons les premières preuves directes de la génération de H₂S à partir de la nitrosylation d'une protéine modèle bien définie [4Fe-4S] dans des conditions aqueuses, et notre exploration de l'effet de l'environnement redox sur cette réactivité.

Mots clés: AvHiPIP, Les clusters [4Fe-4S], Monoxyde d'azote (NO), sulfure d'hydrogène (H₂S).

ABSTRACT

The interactions between nitric oxide (NO) and small-sized sulfur-reactive species are beginning to be recognized as a vital aspect of how NO is perceived, stored, and ultimately controlled in biological systems. The biology of NO is inherently linked to biological redox regulation, notably through interaction with reactive oxygen species (ROS) and the generation of downstream signaling molecules based on nitrogen, sulfur, and oxygen. Pathogenic bacteria must also contend with ROS generated by host immune cells, and the impact of this on the defense mechanisms of a pathogenic bacterial species against nitrosative stress is of great interest. Proteins containing the [4Fe-4S] iron-sulfur cluster cofactor are known to act as NO sensors in bacteria's cytoprotective response to nitrosative stress, owing to the cofactor's sensitivity to nitrosylation. Nitrosylation of biological FeS clusters depends on redox and is also a potential source of the gasotransmitter H₂S, which in turn is responsible for a wide range of bacterial mechanisms, including pathogenicity and host immune evasion. The fundamental aspects of this chemistry remain poorly understood. Mechanistic differences in the reactivity of FeS clusters with NO under oxidizing or reducing conditions contribute to how organisms respond to combined nitrosative and oxidative stress. Previous findings have shown that mechanistic control at the [4Fe-4S] cofactor level diverges under oxidizing conditions compared to redox-neutral conditions, leading to the formation of different iron nitrosylated products. Here, we report the first direct evidence of H₂S generation from the nitrosylation of a well-defined model protein [4Fe-4S] under aqueous conditions, and our exploration of the effect of the redox environment on this reactivity.

Keywords: AvHiPIP, [4Fe-4S] clusters, Nitric oxide (NO), Hydrogen sulfide (H₂S)

Chapitre 1 : Généralité

1.1 Les protéines Fer-Soufre

Les clusters de fer-soufre «FeS » sont des assemblages poly-nucléaires constitués d'ions de fer et de soufre, et ils font partie des cofacteurs les plus fréquemment rencontrés dans la nature. Ils forment la plus grande classe de métalloprotéines multifonctionnelles. Ces clusters peuvent être synthétisés par des bactéries et des eucaryotes sous différentes formes telles que [2Fe-2S], [3Fe-4S] et [4Fe-4S] (Figure1.1), grâce à des machineries multi-protéiques spécialisées. Par la suite, ces clusters sont insérées dans les protéines cibles.¹

Les protéines sont des macromolécules biologiques constituées d'acides aminés, les unités de base liées par des liaisons peptidiques. Elles sont fondamentales pour la vie et exercent une multitude de fonctions biologiques cruciales dans les cellules et les organismes, ils adoptent des structures tridimensionnelles complexes, souvent caractérisées par des arrangements spécifiques d'éléments tels que les hélices alpha et les feuillets bêta. Cette conformation tridimensionnelle est cruciale pour la fonction de la protéine, car elle détermine les sites actifs, les domaines d'interaction, et les spécificités de liaison.²

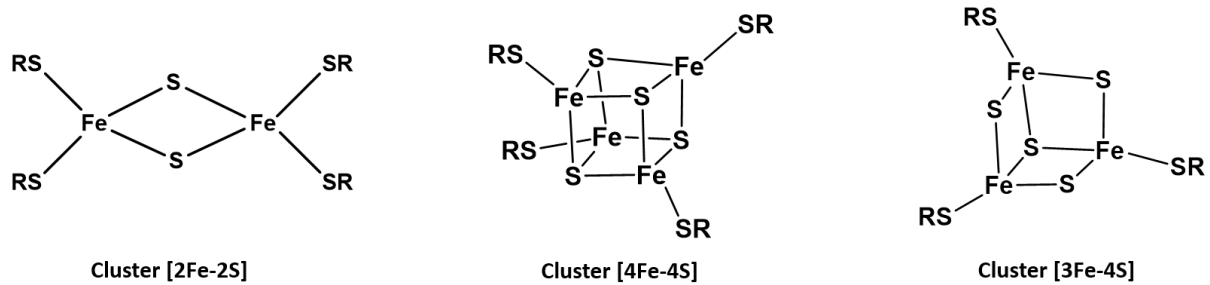


Figure 1.1 Représentation schématique des différents types des clusters fer-soufre trouvés en biologie, cluster [2Fe – 2S], cluster [3Fe – 4S] et cluster [4Fe – 4S]

1.1.1 La structure [2Fe-2S]

Les clusters [2Fe-2S] font partie des clusters fer-soufre les plus élémentaires, et ils exercent un rôle essentiel dans diverses fonctions physiologiques. Ils sont impliqués dans des processus tels que les systèmes respiratoires aérobie et photosynthétiques,³ ainsi que dans le transfert d'électrons.⁴ Ils ont la capacité de s'associer pour créer des structures en cubane [4Fe-4S], qui à leur tour peuvent se lier davantage pour générer des clusters de noyaux encore plus complexes.⁵ Ils peuvent également jouer un rôle dans le fonctionnement de diverses enzymes. Par exemple, dans la biotine synthase (BS), le radical carboné C9 du dethiobiotin (DTB) attaque le sulfure pontant du cluster [2Fe-2S], qui se trouve à une distance d'environ 4-5 Å de la déthiobiotine. Cette interaction conduit à la formation du cycle tétra thiophène de la biotine.⁶

Ils se composent de deux atomes de fer et de deux atomes de soufre. Dans le cas des ferrédoxines, chaque atome de fer est lié à deux résidus de cystéine.⁷ Cependant, dans les protéines Rieske, un des deux atomes de fer du noyau [2Fe-2S] est coordonné à deux cystéines, tandis que l'autre site Fe est relié de manière covalente à des liaisons Fe-N, formant ainsi des liaisons avec deux résidus d'histidine.⁸ Ce type de cluster revêt une importance cruciale au sein de diverses protéines, comme dans le cas de l'activation de la protéine SoxR en réponse aux stress oxydatif et nitrosatif.

Lorsque la bactérie est confrontée à des situations stressantes, telles que l'exposition à des espèces réactives de l'oxygène ou à des composés azotés réactifs tels que le monoxyde d'azote (NO), le cluster [2Fe-2S] présent dans la protéine SoxR subit des modifications chimiques. Ces modifications jouent un rôle essentiel en aidant la cellule à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène et d'azote, et Cela contribue ensuite à prévenir les dommages causés par le stress oxydatif et nitrosatif.⁹

1.1.2 La structure [3Fe-4S]

Les clusters [3Fe-4S] sont constitués de trois atomes de fer et quatre atomes de soufre, avec chaque atome de fer lié au soufre d'un résidu de cystéine.¹⁰ La première observation d'un cluster linéaire [3Fe-4S] a été faite dans l'aconitase de cœur de bœuf à un pH élevé, entraînant une perturbation de la structure de la protéine.¹¹ Ce type de cluster est fréquent dans de nombreuses protéines et contribue significativement à leur fonctionnement. Ces clusters ont principalement pour rôle le transfert d'électrons. Par exemple, les hydrogénases [NiFe] sont des métalloenzymes composées de deux sous-unités. La grande sous-unité (sous-unité α), d'environ 60 kDa, abrite le site actif bimétallique constitué d'un atome de fer et d'un atome de nickel, reliés par deux sulfures et coordonnés par trois ligands non protéiques (2 CN et 1 CO). La petite sous-unité (sous-unité β), d'environ 30 kDa, héberge quant à elle trois clusters fer-soufre, dont un cluster [3Fe-4S] situé entre deux clusters [4Fe-4S]. Ces clusters sont responsables du transfert d'électrons vers le site actif, catalysant la conversion du dihydrogène en protons ($H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$).^{12 13, 14}

1.1.3 La Structure [4Fe-4S]

Le complexe [4Fe-4S] se compose de deux tétraèdres d'ions fer (sous forme de Fe^{3+} ou Fe^{2+}) et d'ions sulfure (S^{2-}) qui s'entrelacent pour former un cube. Ce cube est lié à la structure protéique par quatre résidus d'acides aminés situés aux sommets d'un tétraèdre. Généralement, les atomes de fer composant les clusters [4Fe-4S] sont liés aux atomes de soufre de résidus de cystéine. Ce type de cluster a la capacité de moduler son état d'oxydation, se classant en deux catégories distinctes : les "Ferrédoxines classiques" à potentiel redox relativement bas, compris entre -0,3 et -0,7 V, et les "HiPIP" (Protéine fer-soufre à haut potentiel) à potentiel redox variant de 0,4 à 0,1 V (Figure 1.2).¹⁵

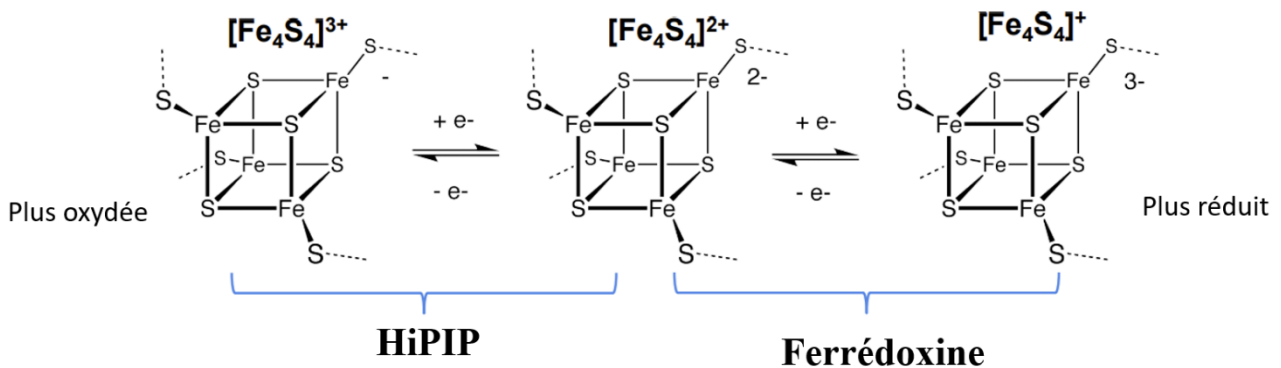


Figure 1.2 Changement d'état d'oxydation des clusters [4Fe-4S]¹⁶

Les clusters [4Fe-4S] peuvent remplir divers rôles au sein des systèmes biologiques. Ils participent notamment au transfert d'électrons dans de nombreuses protéines, comme la nitrogénase, qui est composée de deux partenaires catalytiques : la protéine MoFe, qui abrite le cofacteur FeMo responsable de la réduction du N_2 en NH_3 , et la protéine Fe, contenant un

cluster [4Fe-4S], ce dernier transfère les électrons vers la protéine MoFe dans le cadre d'une série d'événements appelés collectivement le « cycle de la protéine MoFe » (Figure 1.3, a).¹⁷

Il convient également de mentionner la NADH-déshydrogénase, qui comporte une sous-unité renfermant huit clusters fer-soufre, dont six clusters [4Fe-4S] sont disposés en ligne pour faciliter le transfert d'électrons du NADH vers la coenzyme Q10 (Figure 1.3, b).^{15, 18} Finalement les hydrogénases [NiFe] contiennent aussi deux clusters [4Fe-4S] et un cluster [3Fe-4S], tandis que les hydrogénases [FeFe] abritent trois clusters [4Fe-4S] et un cluster [2Fe-2S], ces clusters servent de transporter les électrons vers le cofacteur, ce qui permet de générer ou de dégrader la molécule de H₂ selon la réaction suivante : $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_2$.¹⁹

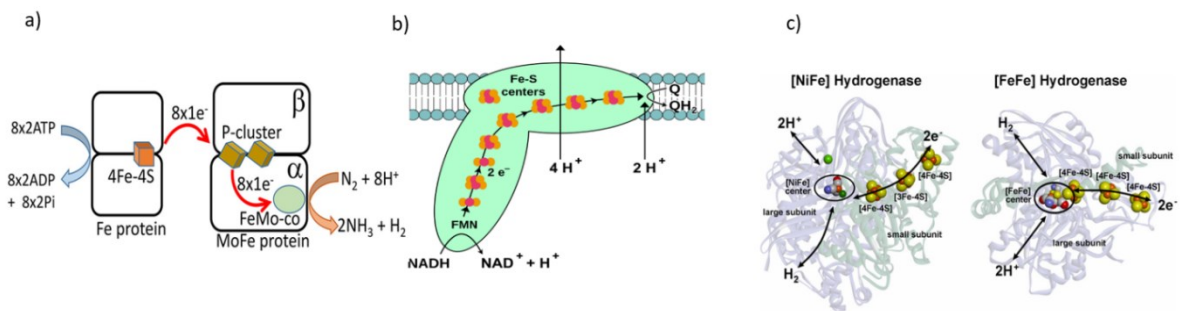


Figure 1.3 a) Schéma de fonctionnement de la nitrogénase, b) Schéma de fonctionnement de la NADH déshydrogénase, c) Schéma de fonctionnement de l'hydrogénase [NiFe] et de l'hydrogénase [FeFe]

1.2 Cluster [4Fe-4S] comme catalyseur (Aconitase)

Dans la plupart de temps les clusters [Fe-S] jouent un rôle dans le transfert des électrons mais parfois ils jouent un rôle direct dans la catalyse des réactions comme dans le cas de la protéine

aconitase qui contiennent un groupe prothétique $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ dans lequel 3 fers du cluster se coordonnent aux cystéines et aux sulfures inorganiques alors que l'un des fers n'est pas lié à un résidu protéique et ne se coordonne qu'avec les sulfures inorganiques, ce fer est appelé alpha (Fe_α).^{20, 21}

L'aconitase utilise le cluster $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ pour catalyser la réaction stéréospécifique de citrate en isocitrate,²⁰ ce protéine est capable aussi de catalyser d'autres réactions (O_2 en H_2O_2),²² (NO_3^- en $\cdot\text{NO}_2$) et ($\text{CO}_3^{\cdot-}$ en HCO_3^-) et ces réactions conduisent à l'inactivation de la cluster $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ et la libération Fe_α sous forme de Fe^{2+} (Figure 1.4).²³

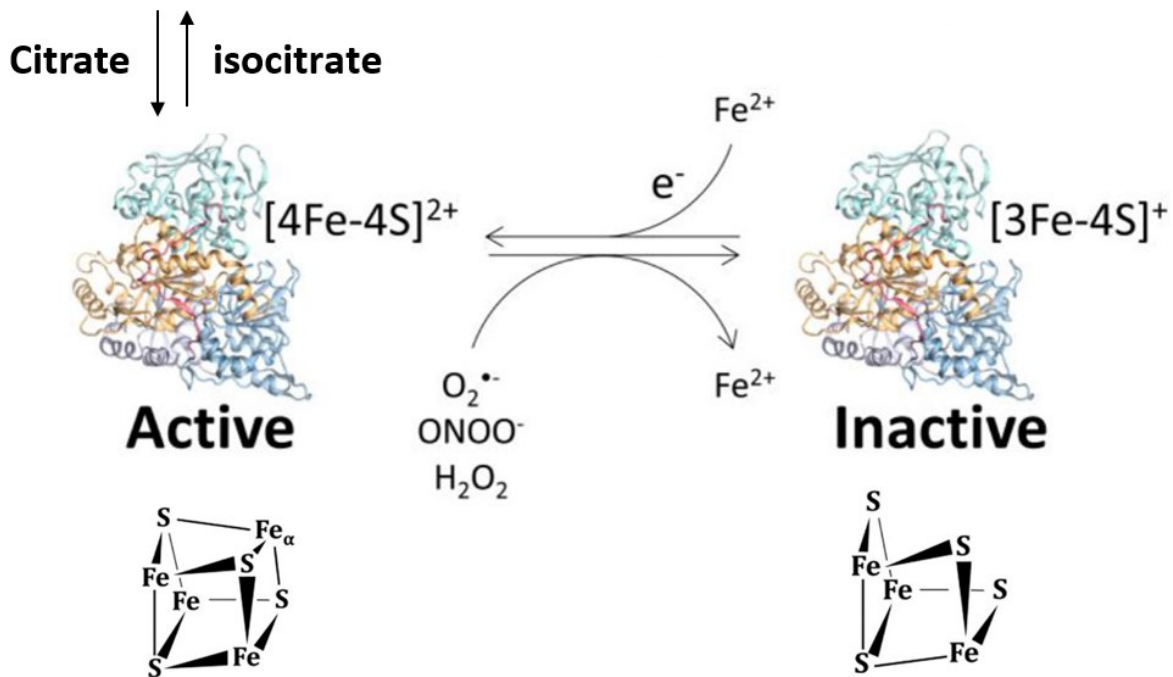


Figure 1.4 Schéma qui montre la libération de Fe alpha après la réaction des oxydants anioniques tels que le radical superoxyde, le peroxyntrite et le radical carbonate ainsi que la catalyse de citrate en isocitrate

1.3 La réaction de [4Fe-4S] avec NO

1.3.1 La molécule de NO

L'oxyde nitrique (NO) (Figure 1.5) était considéré à l'origine comme un simple gaz toxique,²⁴ Cependant, des recherches ultérieures ont révélé que l'oxyde nitrique joue un rôle beaucoup plus complexe et important dans divers processus biologiques et physiologiques dans le système biologique .

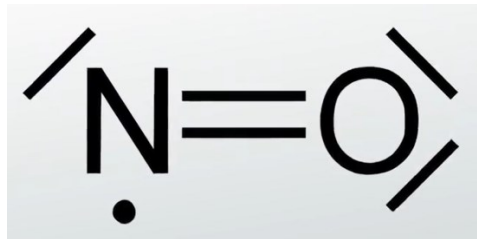


Figure 1.5 Structure de Lewis de L'oxyde nitrique les tirets sur l'atome d'oxygène et d'azote représentent des doublets d'électrons

Aujourd'hui, l'oxyde nitrique est reconnu comme une molécule essentielle pour le fonctionnement normal d'un système biologique qui jouant un rôle important dans la réponse immunitaire,²⁵ ou dans la communication entre les cellules.²⁶ Malgré l'effet bénéfique de NO, lorsque les cellules sont exposées à des niveaux élevés d'oxyde nitrique, cela peut entraîner des effets toxiques sur les composants cellulaires sensibles ce qui cause le stress nitrosatif.²⁷

Le cluster [2Fe-2S] et [4Fe-4S] est particulièrement sensible au monoxyde d'azote (NO), et les bactéries exploitent cette sensibilité pour éviter les effets néfastes du NO en utilisant des protéines contenant des clusters [4Fe-4S] comme NsrR.²⁸ Ces protéines permettent de détecter le NO, ce qui entraîne des modifications dans l'activité des protéines, permettant ainsi de réguler la réponse de l'organisme au stress nitrosatif.²⁹

1.3.2 Interaction des clusters [Fe-S] avec NO

Les clusters fer-soufre interagissent avec le monoxyde d'azote (NO) pour moduler les niveaux de fer intracellulaire et répondre au stress nitrosatif. Ce processus implique la dégradation de ces clusters, ce qui conduit ensuite à la formation de complexes de dinitrosylfer liés aux protéines ou de faible poids moléculaire comme DNIC (Dinitrosyl Iron Complex, Figure 1.6, a).³⁰ Ces DNIC proviennent de la dégradation des clusters [2Fe-2S] et [4Fe-4S].³¹

Outre le DNIC, la dégradation des clusters [FeS] peut donner lieu à d'autres produits résultant de l'interaction entre les clusters [FeS] et le monoxyde d'azote (NO), comme, Roussin's red ester (RRE), Roussin's black anion (RBA), les complexes de fer dinitrosyle (DNIC) et complexes nitrosyles de Fer mononucléaires (MNIC).³²

Diverses techniques ont été utilisées pour détecter les produits issus de la réaction des clusters [FeS] avec le NO. En effet, l'utilisation de la spectroscopie infrarouge (IR), de la résonance paramagnétique électronique (RPE), de la spectroscopie UV-visible, de la spectroscopie vibrationnelle par résonance nucléaire (NRVS) ainsi que de données cristallographiques a permis d'obtenir des informations structurales détaillées.

En général, la chimie du NO sur ces sites entraîne la dissociation du cluster fer-soufre et la formation de complexes de fer dinitrosyle DNIC.³³ La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique est une méthode de longue date utilisée pour détecter les espèces radicalaires présentes dans les échantillons de tissus biologiques,³⁴ et est devenue une méthode standard pour identifier les DNIC liés au thiolate dans les protéines.³⁵

Les complexes de fer dinitrosyle (DNIC) (Figure 1.6, a) se forment aisément à la suite de la réaction des clusters [2Fe-2S] et [4Fe-4S] avec le monoxyde d'azote (NO) dans différentes protéines comme les protéines SoxR, NsrR et FNR.^{36,37}

En plus des complexes de fer dinitrosyle, d'autres produits peuvent également être détectés par RPE, tels que les espèces rRRE (Roussin's Red Ester réduit) (Figure 1.6, b), qui sont une version réduite de RRE et peuvent être aisément identifiées par spectroscopie RPE.³⁸

Cependant, la majorité des produits résultant de la nitrosylation des protéines contenant des clusters fer-soufre ne peuvent pas être détectés par RPE, car cette technique est limitée aux espèces paramagnétiques.³⁹

RRE (Figure 1.6, b) est un produit qui vient de la nitrosylation des clusters [2Fe-2S] et [4Fe-4S]. Ce produit est diamagnétique et c'est impossible de le détecter par RPE. C'est pourquoi d'autres techniques plus récentes ont été utilisées pour le détecter. Des études ont révélé que les clusters [4Fe-4S] des protéines Wbl, jouant un rôle dans l'induction de la sporulation chez *Streptomyces* et l'expression des gènes de virulence chez les mycobactéries, la combinaison des techniques suivant, dichroïsme circulaire (CD) et UV-visible montre qu'il y a formation de deux équivalents d'ester rouge de Roussin lors de la réaction de cluster [4Fe-4S] avec NO.³¹

Dans d'autres études, la spectroscopie vibrationnelle par résonance nucléaire ainsi que la spectroscopie infrarouge ont été utilisées pour une distinction directe des produits finaux des réactions du monoxyde d'azote (NO) avec les clusters fer-soufre liés aux protéines. Grâce à la NRVS, il a été démontré qu'une protéine Rieske [2Fe-2S] formait principalement le RRE comme produit majeur de la nitrosylation.⁴⁰

Le RBS (Roussin's Black Salt) ou sel noir de Roussin (Figure 1.6, c), est un composé qui se forme principalement lors de la réaction de nitrosylation impliquant le cluster [4Fe-4S]. Ce produit est un assemblage de quatre atomes de fer et 3 atomes de soufre. Lorsque le cluster [4Fe-4S] réagit avec le dioxyde d'azote (NO₂), le RBS peut se former en tant que produit majeur de cette réaction.

En raison de sa nature diamagnétique, il ne peut pas être détecté par la technique de résonance paramagnétique électronique. Cependant, d'autres techniques spectroscopiques se sont révélées essentielles pour la détection et l'identification des produits résultant de la nitrosylation des clusters fer-soufre comme le RBS. Ces techniques permettent d'obtenir des informations détaillées sur les modifications induites par la nitrosylation, et elles jouent un rôle clé dans la compréhension des mécanismes biologiques impliquant ces réactions complexes.

Les premières détections du RBS ont été réalisées en utilisant des réactions entre divers clusters [4Fe-4S] synthétiques et du gaz NO. Une combinaison de cristallographie par rayons X, UV-vis, et de spectroscopie infrarouge a clairement démontré la formation du RBS après la réaction du cluster [4Fe-4S] avec le NO. Cette formation est caractérisée par un spectre IR présentant deux bandes ν_{NO} larges à 1745 et 1708 cm^{-1} , ainsi qu'un petit pic à 1800 cm^{-1} .^{41, 42}

Le RBS a été identifié non seulement à partir de modèles synthétiques de clusters [4Fe-4S], mais également à partir de la nitrosylation d'un cluster [4Fe-4S] lié à une protéine. Cette découverte a été rapportée pour la première fois en 2010 par le groupe de recherche dirigé par Stephen J. Lippard. Ils ont étudié la réaction de la protéine *Pyrococcus furiosus* ferredoxin [4Fe-4S] (*P. furiosus* Fd) avec de l'oxyde nitrique. Grâce à leur travail, ils ont pu déterminer les premiers spectres de spectroscopie vibrationnelle par résonance nucléaire pour le RBS formé dans cette réaction.³⁹

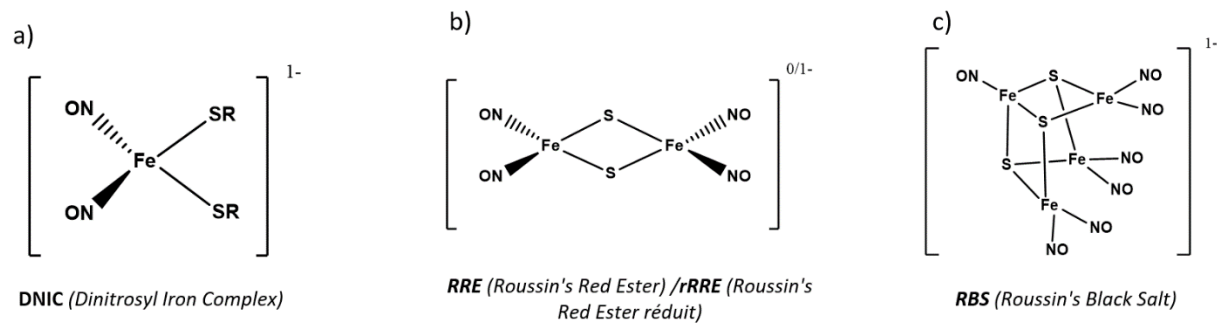


Figure 1.6 Structure des produits résultant de la nitrosylation du cluster [4Fe-4S]. a) DNIC (Dinitrosyl Iron Complex), b) RRE (Roussin's Red Ester) /rRRE (Roussin's Red Ester réduit), c) RBS (Roussin's Black Salt)

1.4 Comment l'oxygène affecte la réaction des clusters Fe-S avec NO ?

1.4.1 Le cluster [2Fe-2S] avec NO en présence et en absence d'oxygène

La nitrosylation du cluster [2Fe-2S] peut conduire à des produits différents en présence ou en l'absence d'oxygène.⁴³ En l'absence d'oxygène, le produit prédominant est le DNIC, tandis que dans un environnement aérobie, le RRE a été principalement observé.

La spectroscopie d'infrarouge a été utilisée principalement par le groupe de Kylie A. Vincent en 2014, pour découvrir le rôle de l'oxygène et son impact sur la nitrosylation du cluster [2Fe-2S] de la ferrédoxine I d'épinard. La ferrédoxine I (Fd) d'épinard utilisée dans cette étude contient un cluster [2Fe-2S] sous sa forme oxydée [2Fe-2S]²⁺, lié à quatre cystéines. Après l'exposition de Fd [2Fe-2S] à 10 % de NO dans des conditions anaérobies (sans oxygène) à un pH de 6,0, un spectre IR enregistré a révélé des pics distincts à 1762 et 1726 cm⁻¹, similaires aux positions maximales signalées pour les clusters de DNIC.⁴⁴ L'utilisation conjointe de la spectroscopie infrarouge et de

la résonance paramagnétique électronique (RPE) a confirmé que l'ajout de traces d'oxygène à l'échantillon Fd déjà exposé au NO à pH 6,0 a conduit à l'apparition d'un nouveau pic à 1783 cm⁻¹. Ce pic indique la conversion du DNIC en RRE.⁴³

1.4.2 Le cluster [4Fe-4S] avec NO en présence et en absence d'oxygène

L'étude qui a été faite à Oxford par le groupe de Kylie A. Vincent et publiée en 2019,⁴⁵ propose que le composé prédominant résultant de la nitrosylation du cluster [4Fe-4S] en présence d'oxygène soit le RRE. Cependant, lors de la réaction du cluster [4Fe-4S] avec le NO dans des conditions anaérobiques, le produit majeur observé est le RBS.

Une combinaison de la spectroscopie infrarouge, la résonance paramagnétique électronique et de la spectroscopie UV-visible a été employée pour investiguer la réactivité de la protéine fer-soufre à haut potentiel (HiPIP) d'*Acidithiobacillus ferrooxidans*. Cette protéine renferme un cluster [4Fe-4S] et a été soumise à l'action du gaz NO dans des conditions aérobiques (en présence d'oxygène) et anaérobiques (en l'absence d'oxygène), afin d'étudier les produits majeurs formés dans chaque contexte. L'utilisation du HiPIP s'est avérée pertinente, principalement en raison de sa résistance à l'oxygène et de sa stabilité face à l'interaction avec le NO en présence d'oxygène.

L'exposition de la protéine HiPIP [4Fe-4S] à une concentration de 10% de NO dans des conditions anaérobiques, suivie d'une analyse par spectroscopie infrarouge, a révélé la présence d'un pic intense dans la région des groupements nitrosyle du spectre, à une position de 1744 cm⁻¹, accompagné d'un épaulement à 1758 cm⁻¹ et d'un pic de très faible intensité à 1784 cm⁻¹. Cependant, lors de l'exposition de la protéine HiPIP [4Fe-4S] au même taux de NO mais dans des conditions aérobiques, l'analyse par spectroscopie infrarouge a montré la présence de deux pics bien définis à 1783 cm⁻¹ et 1758 cm⁻¹.

L'introduction de traces d'oxygène dans la réaction de la protéine HiPIP [4Fe-4S] avec le NO dans des conditions anaérobiques a entraîné une diminution de l'intensité du pic à 1744 cm^{-1} , tout en provoquant simultanément une augmentation des intensités des deux pics à 1783 cm^{-1} et 1758 cm^{-1} .

Les sels de l'anion RBS synthétique se distinguent par leur absorption intense à 1745 cm^{-1} ,³² tandis que les espèces RRE se caractérisent dans les spectres IR par des pics présentant une intensité pratiquement équivalente à 1758 cm^{-1} et 1783 cm^{-1} .⁴³

Cela démontre que le produit prédominant lors de la réaction entre la protéine HiPIP [4Fe-4S] et le NO, dans des conditions totalement anaérobiques, est le RBS. En revanche, en présence d'oxygène, le produit principal est le RRE. De plus, l'introduction d'oxygène dans la réaction de HiPIP [4Fe-4S] avec le NO entraîne la conversion du RBS en RRE. Les techniques RPE (Résonance Paramagnétique Électronique) et la spectroscopie UV-visible ont été employées pour confirmer de plus ses résultats.⁴⁵

1.5 La réaction du cluster [Fe-S] avec le NO et la production de H₂S

Afin de développer une compréhension approfondie du mécanisme des protéines à base de fer-soufre en présence de monoxyde d'azote (NO), il est essentiel de saisir la manière dont le sulfure d'hydrogène (H₂S) interagit au sein de la réaction.

Les modèles synthétiques de clusters [Fe-S] sont des modèles qui ne contiennent pas de protéines. Ils ont été employés pour faciliter l'analyse de l'interaction réactive entre ces clusters et de petites molécules gazeuses telles que O₂, NO et H₂S. Dans ce contexte, le groupe de Eunsuk Kim et ses collaborateurs ont travaillé sur les modèles synthétiques des clusters [2Fe-2S] et [4Fe-4S] afin de mieux comprendre leurs interactions avec O₂, NO et H₂S.

Il a été établi que les deux ponts sulfure dans les agrégats synthétiques modélisant [2Fe-2S] peuvent être relâchés sous forme de H₂S lorsqu'une nitrosylation se produit, à condition que l'environnement puisse fournir un équivalent d'électron e⁻ ou d'un proton H⁺ provenant de donneurs tels que les thiols et les phénols, entre autres.⁴⁶ Ces constatations ont suscité l'hypothèse que les clusters [2Fe-2S] pourraient fonctionner comme un point de connexion directe entre le NO et le H₂S, permettant ainsi une interaction entre les deux. Une autre étude a été faite sur les modèles synthétique de cluster de type [4Fe-4S]. Dans laquelle ils ont étudié la réactivité de cluster [4Fe-4S] avec NO et la génération de H₂S en présence et en absence de thiol.⁴⁷

Un papier d'acétate de plomb a été employé pour une détection qualitative du H₂S (démontrée par un changement de couleur en brun du papier lors de sa réaction avec le H₂S). Dans le contexte de la réaction du cluster [4Fe-4S] avec NO, aucun changement colorimétrique n'a été observé sur le papier d'acétate de plomb en l'absence d'une source externe de thiol. Cependant, en présence d'une source de thiol, une réaction a été constatée, conduisant au brunissement du papier. En plus, pour confirmer ses résultats, une sonde fluorescente sensibles à H₂S, 7-azido-4-méthylcoumarine (C-7Az)⁴⁸ a été utilisé. En présence de H₂S, le groupe azido de C-7Az peut subir une conversion en un groupe amino, ce qui conduit à une amélioration du signal d'émission fluorescente à $\lambda = 434$ nm.⁴⁸

La nitrosylation de cluster [4Fe-4S] a été fait dans une cuvette contenant une solution d'acétonitrile de C-7Az à la présence et à l'absence de thiol. En absence de thiol la réaction de [4Fe-4S] plus NO n'induit aucun signal de fluorescence. Cependant la même réaction et à la présence de thiol a conduit à une hausse significative de la fluorescence à 434 nm. Ce qui montre clairement que la génération de H₂S est liée à la dégradation du cluster [4Fe-4S] après leur réaction avec NO en présence d'une source de thiol qui puisse fournir un équivalent d'électron e⁻ ou d'un proton H⁺.⁴⁷

1.6 Les techniques utilisées

1.6.1 HPLC

La HPLC, ou Chromatographie Liquide à Haute Performance, est une technique essentielle en biochimie et en biologie moléculaire utilisée pour la purification et l'analyse de protéines. Elle repose sur la séparation des molécules biologiques en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, telles que la taille, la charge et l'affinité.

Le processus de HPLC implique le passage d'un échantillon contenant des protéines à travers une colonne remplie d'un matériau de séparation. Les protéines se déplacent à des vitesses différentes à travers la colonne en fonction de leurs interactions avec le matériau de séparation et les conditions de chromatographie. Les protéines sont ensuite collectées en fractions distinctes en fonction de leur temps de rétention.

La HPLC offre plusieurs modes de séparation, notamment l'échange d'ions, l'exclusion de taille, l'affinité et l'hydrophobicité, permettant ainsi la purification et l'isolement ciblés de protéines spécifiques.

Dans cette étude on a utilisé type de chromatographie IMAC (Chromatographie d'Affinité sur Métal Immobilisé), pour la purification de notre protéine. Le processus de ce type de chromatographie consiste à faire passer un échantillon contenant des protéines avec des résidus histidines à travers une colonne chromatographique remplie des particules qui ont été préalablement fonctionnalisées avec des ions métalliques, généralement des ions de cuivre (Cu^{2+}), de nickel (Ni^{2+}), ou de zinc (Zn^{2+}). Ces ions métalliques ont une forte affinité pour les résidus d'histidine. Dans ce travail on a utilisé les colonnes de nickel (Ni^{2+}).

Lorsque l'échantillon est introduit dans la colonne de nickel (Ni^{2+}), les protéines qui possèdent des résidus d'histidine capables de former des complexes stables avec les ions de nickel s'adsorbent sur la matrice de la colonne (Figure 1.7). Les autres composants de l'échantillon, qui n'ont pas d'affinité pour Ni^{2+} , sont rapidement élués. Ensuite, les protéines liées peuvent être éluées en ajustant les conditions chromatographiques en remplaçant les ions nickel liés aux histidines par l'imidazole.

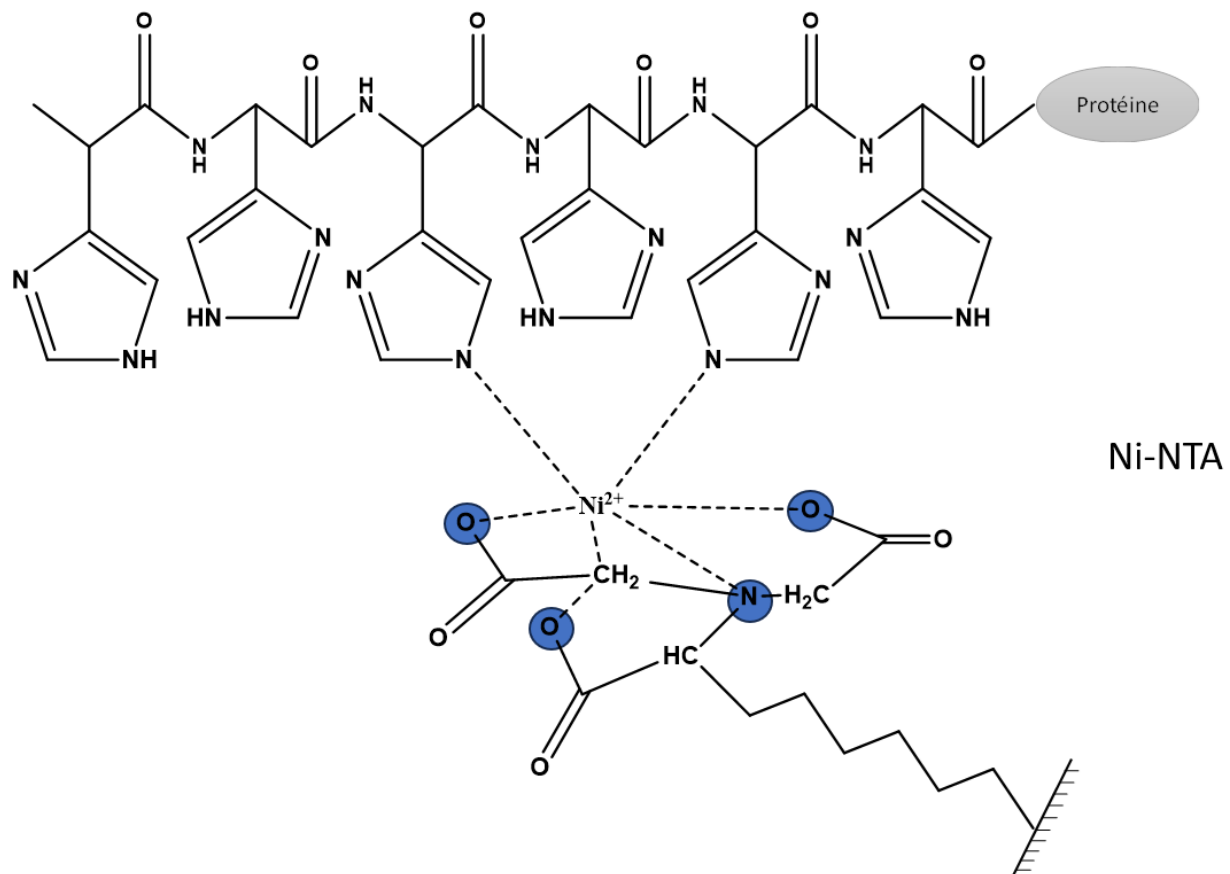


Figure 1.7 Modèle de l'interaction entre les résidus Histidine (His tag) et l'ion métallique Ni^{2+} .⁴⁹

1.6.2 La Spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie UV-visible, également connue sous le nom de spectroscopie ultraviolette-visible, est une technique d'analyse chimique qui consiste à mesurer l'absorption de la lumière des composés chimiques dans la plage des ultraviolets (UV) et du visible. Cette technique expose un échantillon à des rayons électromagnétiques de différentes longueurs d'onde dans les domaines de l'ultraviolet (UV) et du visible (VIS). Lors de cette interaction, l'échantillon absorbe sélectivement certaines longueurs d'onde, que ce soit dans les UV ou la plage de lumière visible. La lumière restante, qui n'a pas été absorbée, est ensuite enregistrée en fonction de la longueur d'onde par un détecteur spécialisé, qui peut créer par la suite le spectre d'absorption unique de l'échantillon, couramment appelé spectre UV-VIS (Figure 1.8).

Cette technique est largement utilisée en chimie, en biochimie, en physique et dans d'autres domaines scientifiques pour déterminer la concentration d'une substance dans une solution, étudier les transitions électroniques des molécules, et caractériser la structure chimique des composés. Elle repose sur le principe que les électrons dans une molécule peuvent absorber l'énergie de la lumière, provoquant ainsi des transitions électroniques, ce qui se traduit par une absorption de lumière à des longueurs d'onde spécifiques.⁵⁰

Dans cette étude, la spectroscopie UV-VIS a été utilisée pour accomplir plusieurs objectifs essentiels. Tout d'abord, elle a été employée pour caractériser la structure chimique du cluster fer-soufre[4Fe-4S] en comparant le spectre obtenu à partir de notre protéine HiPIP avec ceux d'autres protéines [4Fe-4S] déjà répertoriées dans la littérature et sont caractérisés par un pic d'absorption à 380 nm. Deuxièmement, elle a été exploitée pour déterminer la concentration de ce cluster ainsi que son coefficient d'extinction en appliquant la loi de Beer Lambert, $A = \epsilon Cl$.

A : représente l'absorbance de la lumière par la solution.

ϵ : (epsilon) est le coefficient d'absorption molaire de la substance absorbante.

C : est la concentration de la substance en solution.

l : est la longueur du trajet optique traversé par la lumière à travers la solution.

Et en se basant sur la courbe d'étalonnage de fer, $Y = aX + b$. Avec Y représente l'absorbance et X représente la concentration.

Par la suite, on a utilisé la spectroscopie UV-VIS pour surveiller leur réaction avec le NO.

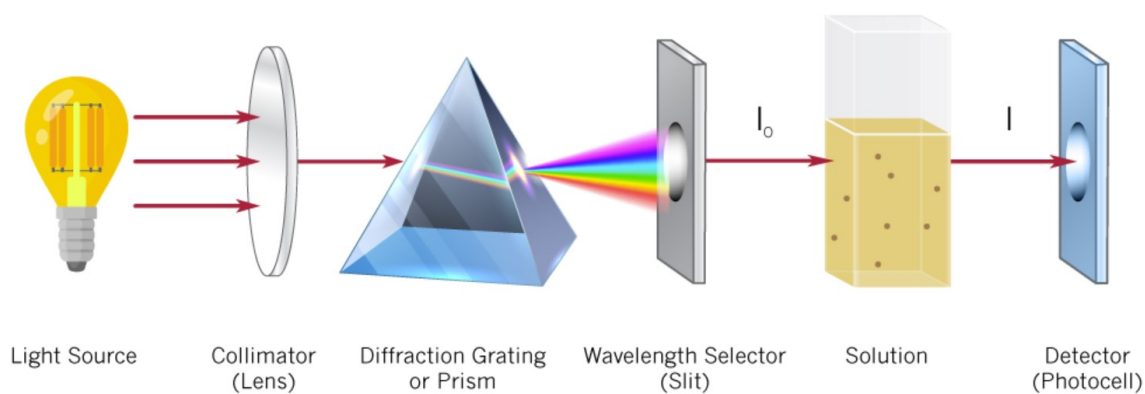


Figure 1.8 Schéma de l'agencement optique d'un spectrophotomètre UV-Vis monochromatique⁵¹

1.6.3 La Spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence, parfois nommée fluorométrie ou spectrofluorométrie, constitue une branche de la spectroscopie électromagnétique orientée sur l'analyse de la lumière fluorescente émise par un échantillon. Elle repose sur l'application d'un faisceau lumineux, généralement composé de lumière ultraviolette, visant à exciter les électrons au sein de molécules spécifiques. Par la suite cette excitation provoque l'émission ultérieure d'une lumière de moindre énergie (Figure 1.9).

Dans ce type de spectroscopie, les espèces sont initialement élevées de leur état de base vers l'un des niveaux vibrationnels des niveaux électroniques supérieurs par l'absorption d'un photon. Au cours de leur excitation, ces molécules peuvent perdre de l'énergie vibrationnelle lors de collisions avec d'autres molécules, finissant par atteindre le niveau vibrationnel le plus bas de l'état électronique excité. Ensuite, la molécule revient à un des niveaux vibrationnels de son état fondamental en émettant un photon dans ce processus. Au cours de cette émission, les photons peuvent avoir diverses énergies, ce qui se traduit par différentes fréquences. En analysant ces fréquences en spectroscopie de fluorescence, il est possible de déterminer la structure des différents niveaux de vibration. Cette approche permet d'obtenir des informations cruciales sur les propriétés des molécules étudiées.⁵²

La fluorescence varie de manière linéaire en fonction de la longueur du trajet optique et de la concentration. Ce qui est particulièrement remarquable, c'est la relation directe entre l'intensité de la fluorescence et la puissance de l'analyte (concentration de l'analyte). Il est évident que plus la concentration de l'analyte est élevée, plus il y a de particules qui absorbent des photons, se trouvent excitées et émettent alors un rayonnement de fluorescence. Les intensités de fluorescence des molécules de fluorophore de la même nature, on anticipe un rendement quantique équivalent, à condition que l'échantillon soit dilué de façon adéquate pour prévenir l'auto-quenching dans la fluorescence de l'échantillon.

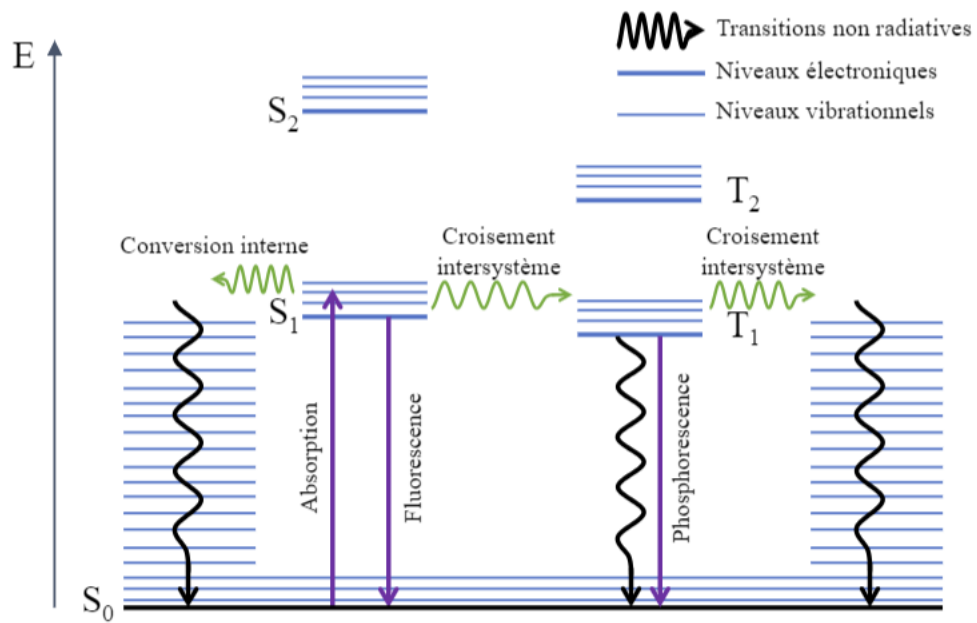


Figure 1.9 Diagramme Jablonski-Perrin⁵³

Objectif

Toutes les recherches qu'il ont été fait pour la détection de la génération de H₂S à partir de la réaction des cluster [Fe-S] avec NO , ils ont été fait à partir des modèles synthétique des clusters [4Fe-4S] et [2Fe-2S] vu que les clusters modèles synthétiques permettre d'étudier plus facilement la réactivité chimique et les mécanismes, alors que pour étudier la réactivité des clusters [Fe-S] dans leur environnement natif c'est plus compliquer à cause des contraintes structurelles imposées par les grands squelettes protéiques qui entoure le cluster ce qui mettre plus difficile de suivre la réactivité des clusters avec le NO.

L'objectif de cette étude est d'explorer la réactivité d'une protéine contenant le cluster [4Fe-4S] dans leur environnement naturel envers le NO, ainsi que de détecter la production de H₂S sans recourir à l'ajout d'une source de thiol. À fin d'enrichir la compréhension des mécanismes des protéines fer-soufre et en particulier les protéines [4Fe-4S].

Donc notre but premièrement est de produire une protéine HiPIP d'*Allochromatium vinosum* contenant un cluster [4Fe-4S] avec une très grande concentration et une bonne pureté et de voir leur réactivité avec l'oxyde nitrique, par la suite nous chercherons à détecter la génération de H₂S en utilisant principalement des sondes fluorescentes.

Chapitre 2

L'expression de la protéine d'AvHiPIP [4Fe-4S]

L'expression de la protéine AvHiPIP constitue une étape cruciale dans ce projet, étant un préalable nécessaire pour poursuivre les étapes suivantes.

Afin de modéliser la nitrosylation d'une protéine contenant un cluster [4Fe-4S] et comprendre son mécanisme, il est impératif de préparer une protéine présentant une concentration élevée et une pureté substantielle.

Notre objectif était d'obtenir une protéine utilisable pour l'étude de la réaction de nitrosylation. Mais à l'époque, nous ne disposions pas d'une boîte à gants fonctionnelle. Par conséquent, nous avons besoin d'une protéine stable à l'air, préparable en quantité et concentration suffisantes pour permettre les réactions ultérieures avec le NO.

Matériel et méthode

Tous les produits chimiques ont été achetés chez Fisher Scientific, Millipore Sigma et Cayman Chemicals et préparé dans l'eau ultrapure sauf le milieu de culture (LB) Broth acheté sous forme de poudre pré-mélangée auprès de Fisher (10 g/L de peptone, 5 g/L d'extrait de levure et 10 g/L de NaCl), qui été préparé dans l'eau distillé et stérilisé dans une autoclave (LSS 275) avant l'utilisation. Le plasmide pET-21d (+) a été acheté chez Genscript. Les cellules BL21(DE3) d'*Escherichia coli*s ont été fournis par un collègue de notre département. L'eau ultrapure a été obtenue en utilisant un système de purification d'eau (Thermo scientific). La grow up des cellules a été réalisé dans un incubateur à agitation (INNOVA 44). Centrifugation de milieu de culture contenant les cellules a été fait par un centrifuge (Benchmark). L'amplification du plasmide par un kit Miniprep (Invitrogen™ PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit) acheté chez Fisher, puis le plasmide a été quantifié à l'aide d'un nanodrop (Thermo Scientific). La sonication a été effectué à l'aide d'un sonicateur à pointe (BRANSON, SONIFIER 450), réglé à 50% pour le cycle de travail (Duty cycle) et à 30% pour la puissance, avec un cycle de 5 fois (2 minutes ON ; 2 minutes OFF). La purification des protéines a été réalisée à l'aide de la FPLC (ÄKTA start) en utilisant des colonnes de chromatographie d'affinité nickel (Cytiva, IMAC "Immobilized Metal Affinity Chromatography"). Par la suite les filtres centrifuges Amicron (3 kDa) ont été utilisé pour concentrer les protéines.

2.1 Choix de la protéine :

Notre choix de la protéine contenant le cluster [4Fe-4S] a été basé sur des caractères spécifiques, parmi ses caractéristiques : Pas sensible à l'air, une protéine qui est bien connue avec une structure cristalline connue, peut-être exprimé en BL21 (DE3) et peut-être exprimé avec une étiquette poly-histidine pour faciliter leur purification.

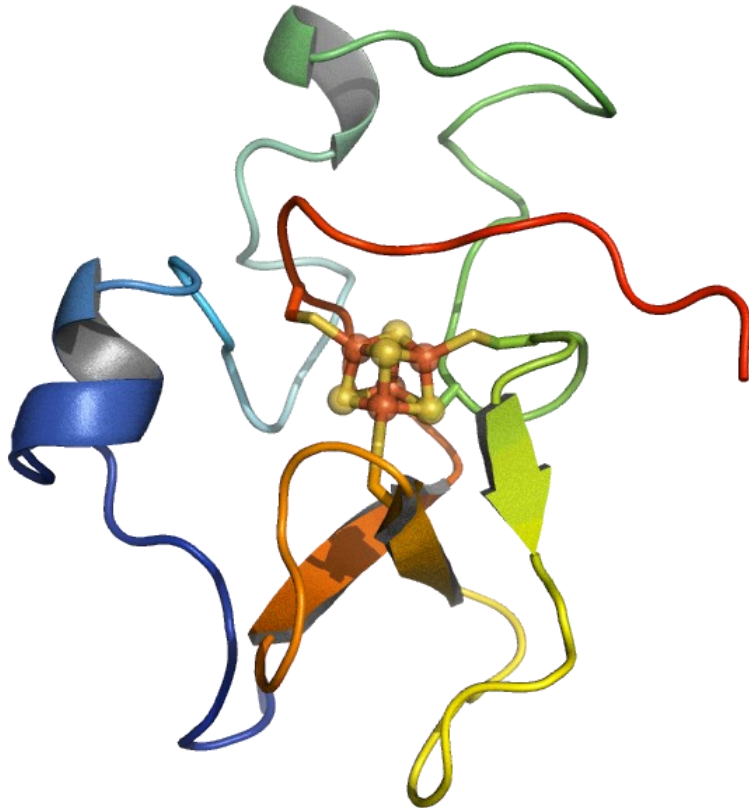


Figure 2.1 Structure de la protéine d'*Allochromatium vinosum* HiPIP [4Fe-4S]⁵⁴

Les protéines high-potentiel iron protein (HiPIP) d'*Allochrochromatium vinosum* sont des protéines contenant un cluster avec 4 atomes de fer et 4 atomes de soufre [4Fe-4S], entouré par une structure secondaire des protéines contrôlée par les forces de Van der Waals du noyau extrêmement hydrophobe autour de cluster [4Fe-4S], et chaque fer est lié à la protéine par le soufre d'une cystéine. L'expression de cette protéine a été réalisée de manière biologique plutôt que par synthèse chimique, car nous nous intéressons à comprendre l'interaction de la protéine avec le NO dans le système biologique.

La protéine AvHiPIP est utilisée comme un modèle pratique pour faciliter la compréhension de l'interaction entre les clusters [4Fe-4S] et le NO. Cette protéine est généralement choisie dans les recherches en raison de ses caractéristiques spécifiques qui la rendent utile pour simuler des processus biologiques plus complexes.

2.2 Développement d'un protocole pour l'expression de la protéine HiPIP [4Fe-4S]

2.2.1 Plasmide utilisé

Le plasmide pET-21d (+) HiPIP d'*Allochrochromatium vinosum* a été acheté construit sur mesure et transformé dans la souche *E. coli* BL21 (DE3).⁵⁵ Le gène d'HiPIP a été inséré dans le plasmide au niveau des sites NcoI/HindIII. Le plasmide contient un promoteur T7 ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline (AmpR), comme illustré dans la figure (2.2).

La Figure 2.2, b montre la séquence de la protéine HiPIP d'*Allochrochromatium vinosum*. Les quatre cystéines, qui sont les sites de fixation du cluster [4Fe-4S], sont indiquées en rouge. De plus, une étiquette poly-histidine a été insérée à l'extrémité C-terminale du gène de la protéine pour faciliter la purification.

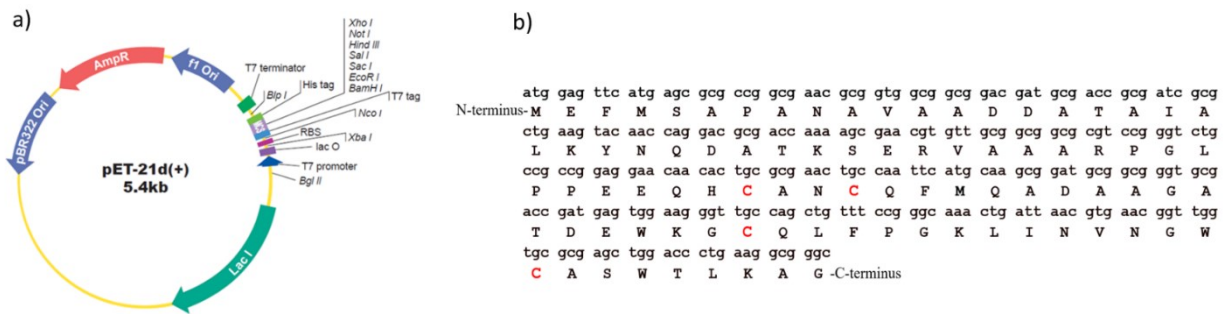


Figure 2.2 a) La carte du plasmide pET-21d (+), le gène d'AvHiPIP est situé entre Nco I et Hind III alors que le His-Tag se trouve directement à côté de la partie qui contient Hind III,⁵⁶ b) la séquence d'ADN et de la protéine HiPIP d'*Allochromatium vinosum*.

2.2.2 Préparation des cellules compétente *E. coli* BL21 (DE3) et la transformation de plasmide dans les cellules

Les cellules d'*E. coli* ont été cultivées dans un milieu de culture Luria-Bertani (LB) broth préparé en ajoutant 25 g/L à de l'eau distillée. Le mélange a ensuite été incubé à 37°C dans un incubateur, avec une rotation à une vitesse de 200 RPM, jusqu'à ce que la densité optique atteigne D=0,6 à longueur d'onde 600 nm. La séparation des cellules et du milieu de culture LB broth a été réalisée par centrifugation à 6000 RPM et à 4°C pendant 20 minutes, en utilisant un centrifuge. Ensuite, le surnageant a été éliminé, et le culot a été suspendu dans 100 mM de CaCl₂ avant d'être centrifugé à 6000 RPM et à 4°C pendant 20 minutes. Par la suite, le surnageant a été éliminé, et 1 mL d'une solution de 100 mM de CaCl₂ et 15% de glycérol a été ajouté au culot pour obtenir des cellules d'*E. coli* compétentes. Ces cellules ont été stockées dans un congélateur à -80°C.

Avant de procéder à l'expression de la protéine, une amplification du plasmide a été effectuée et purifier à l'aide d'un kit Miniprep, puis le plasmide a été quantifié à l'aide d'un nanodrop. Ensuite, la transformation du plasmide dans les cellules a été réalisée par choc thermique (heat shock). Après une incubation du mélange de 100 µL bactéries compétentes avec 2 µL d'ADN sur de la

glace pendant 40min, le mélange a été exposé à 42°C pendant 1,5 minute (choc thermique), puis remis sur de la glace pendant 5min. Ensuite la production et l'expression de la protéine a été fait aérobiquement dans un milieu de LB-broth avec ampicilline comme antibiotique.

2.2.3 L'expression de la protéine HiPIP [4Fe-4S]

Plusieurs essais ont été réalisés pour trouver les bonnes conditions d'expression de la protéine HiPIP [4Fe-4S] (Tableau 2.1). Dans un premier temps, les cellules transformées ont été incubées dans le milieu de culture LB contenant de l'ampicilline, avec une concentration finale $C_f=0,1\text{mg/mL}$, dans un incubateur shaker à une température de 37°C et à 200 RPM pendant environ 5 heures, jusqu'à atteindre une densité optique à 600nm comprise entre 0,6 et 0,8. Ensuite, les erlenmeyers ont été retirés et placés sur de la glace pendant 20 minutes pour arrêter la croissance des cellules, tandis que l'incubateur se refroidissait à 30°C.

Après cela, nous avons ajouté de l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pour atteindre une concentration finale de $C_f=15\ \mu\text{M}$ (essai 9), puis nous avons remis les erlenmeyers contenant les cellules dans l'incubateur shaker, maintenu à 30°C et à 125 RPM, pendant une durée d'une heure. Au bout d'une heure, les erlenmeyers ont été retirés de l'incubateur, et une quantité adéquate de citrate d'ammonium ferrique et de L-méthionine, préalablement dissous dans de l'eau doublement purifiée, a été ajoutée pour obtenir une concentration finale de $\text{Fe}^{3+} 200\ \mu\text{M}$ (et de L-méthionine 50 μM). Par la suite, les erlenmeyers ont été remis dans l'incubateur pendant une période de 6 heures à 30°C et à 125 RPM (essai 9).

L'ampicilline a été ajoutée en premier lieu au milieu de culture pour sélectionner les cellules contenant le plasmide pET-21d (+). Ensuite, les cellules ont été incubées dans un incubateur shaker à une vitesse de rotation de 200 RPM à 37°C, afin de créer un environnement favorable et

de permettre aux cellules de se multiplier. L'IPTG a été ajoutée pour activer la transcription et induire la production de la protéine HiPIP [4Fe–4S]. Ensuite, une quantité adéquate de Fe³⁺ et de méthionine a été incorporée, et les milieux de culture ont été remis dans l'incubateur avec une rotation douce et une durée suffisante, afin de favoriser l'incorporation du cluster [4Fe–4S] dans la protéine tout en évitant leur dénaturation, dans le but d'obtenir une grande quantité de la protéine HiPIP [4Fe–4S].

Le même jour, les cellules renfermant les protéines HiPIP [4Fe–4S] ont été récupérées grâce à une centrifugation à 6000 RPM, à une température de 4°C, pendant une durée de 20 minutes. Les cellules ainsi collectées ont été ensuite conservées dans un congélateur à -20°C.

Tableau 2.1 Les changements effectués pour augmenter la quantité de la protéine HiPIP [4Fe–4S]

Essai	volume de milieu de culture (L)	temps(h)		temperature (°C)		RPM		[IPTG] (uM)	Rendement après purification	
		Avant IPTG	Après IPTG	avant IPTG	Après IPTG	Avant IPTG	Après IPTG		volume final (ml) ≈	[HiPIP] (mM) ≈
1	2	3	3	37	37	200	200	10	***	***
2	2	3	4	37	37	200	200	10	***	***
3	2	4	4	37	37	200	200	10	***	***
4	6	5	4	37	37	200	200	10	0,2	1,5
5	6	6	4	37	30	200	200	10	0,2	1,5
6	6	5	5	37	30	200	200	20	1	2
7	6	5	6	37	30	200	180	20	1	3,5
8	6	5	6	37	30	200	150	15	1	7,3
9	6	5	6	37	30	200	125	15	2,5	7,3

2.2.4 La purification

La purification des protéines a été réalisée à l'aide de la FPLC (chromatographie liquide rapide de protéines) en utilisant des colonnes de chromatographie d'affinité nickel (IMAC HP (Cytiva), 5 mL, chargé en nickel). Chaque 5 mL de culots cellulaires, contenant les protéines, a été resuspendu dans 35 mL de tampon Tris 20 mM, pH=7,4, auquel ont été ajoutés de la lysozyme (0,4 mg/mL) et du PMSF (2 mM) pour inhiber l'activité des protéases lors de la lyse cellulaire.

Par la suite, la rupture des membranes cellulaires du mélange a été effectuée par sonication à l'aide d'un sonicateur à pointe (BRANSON, SONIFIER 450) et le mélange est resté sur glace durant toute la période de sonication.

Ensuite, le mélange a été centrifugé à 18 000 RPM à une température de 4°C pendant 40 minutes pour séparer les débris (la phase solide) du surnageant (la phase liquide). La phase solide, ou le culot, a été éliminée, tandis que le surnageant contenant les protéines a été conservé sur de la glace pendant toute la procédure de purification. Cette mesure visait à inhiber la majeure partie de l'activité des protéases afin d'éviter la dégradation des protéines.

Avant de faire passer le surnageant à travers la colonne de nickel, le système de FPLC a été préalablement rincé avec un tampon A (20 mM TRIS préparé dans de l'eau ultrapure et ajusté à pH=7,4). Ensuite, le surnageant contenant les protéines HiPIP [4Fe-4S] a été introduit dans une colonne de nickel de 5 mL avec un débit de 1 mL/min. Ce débit a été choisi de manière à permettre à la majorité des protéines HiPIP de se lier aux ions de nickel Ni^{2+} en raison de la présence de résidus d'histidine (His Tag) dans leur structure, créant ainsi un complexe stable avec les ions de nickel, comme illustré dans la figure (1.7). En revanche, les autres impuretés ont été éliminées de la colonne vers les déchets.

Par la suite, pour détacher les protéines contenant le cluster [4Fe-4S], un tampon B (20 mM de tris et 200 mM d'imidazole préparé dans de l'eau ultrapure et ajusté à pH=7,4) a été acheminé à

travers la colonne en utilisant un gradient de 50 % de tampon A et 50 % de tampon B, tout en maintenant le même débit de 1 mL/min.

Le problème que nous avons rencontré avec ces conditions de purification est que la protéine HiPIP [4Fe-4S] obtenue n'est pas pure et contient une quantité significative d'impuretés (Nous avons vérifié la pureté de la protéine en utilisant l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE)).

Afin d'améliorer cette situation, nous avons entrepris plusieurs approches. Tout d'abord, nous avons utilisé deux colonnes de nickel de 5 mL au lieu d'une seule pour obtenir une meilleure séparation. De plus, nous avons commencé avec des gradients très faibles qui ne dépassent pas 15 % de tampon B, et avons réduit le débit à 0,5 mL/min pour prolonger le temps de séparation. Après ces modifications nous avons constaté que la plupart des impuretés étaient éliminées avec un gradient de 15 % de tampon B, tandis que notre protéine était récupérée de manière très pure après avoir augmenté le gradient à 20 % ou plus. Les fractions contenant la HiPIP (couleur brune) ont été combinées, concentrées et échangées contre le tampon C (20 mM de TRIS, pH = 8,6) en utilisant des filtres centrifuges Amicon (3 kDa).

La figure 2.3, montre les résultats de SDS-Page pour les fractions qui représentent les impuretés qui sortent avec un gradient de 15 % de tampon B et les fractions de la protéine qui sortent après 20% ainsi que le Flow through (la partie de l'échantillon qui passe à travers la colonne chromatographique sans être retenue), Lysate (la solution biologique qui contient tous les composants cellulaires de cellules lysées) et Ladder fisher bioagents™ bp3603500 (l'échelle de poids moléculaire utilisée comme référence dans le processus d'électrophorèse en gel).

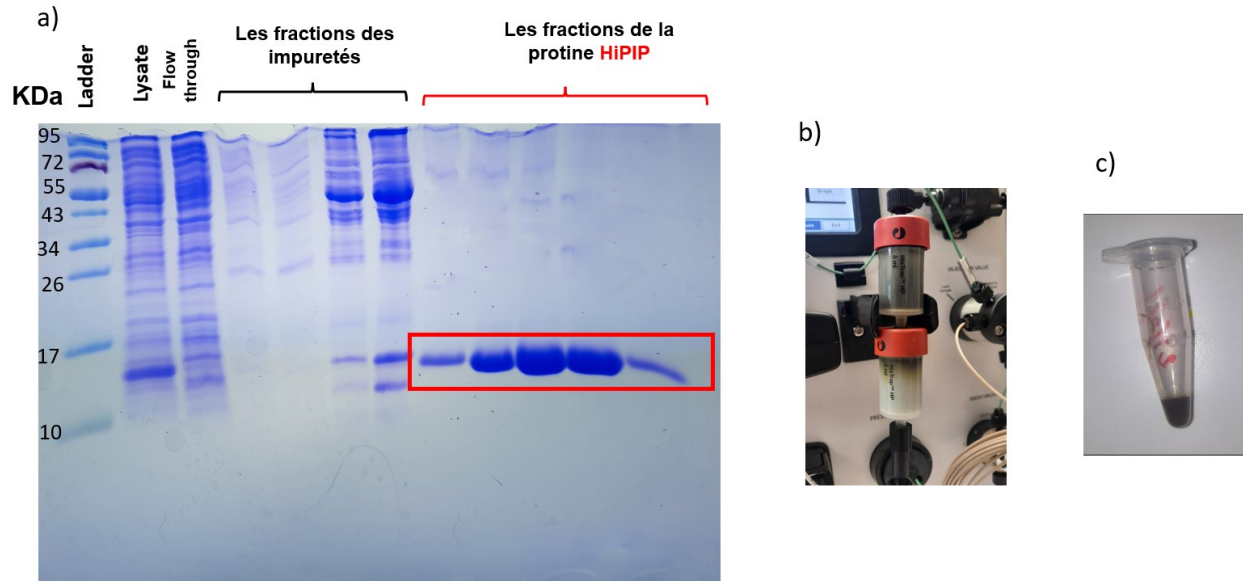


Figure 2.3 a) Les résultats de la purification d'AvHiPIP par SDS-page, b) Les colonnes de nickel lors de la purification d'HiPIP, c) La coloration de la protéine HiPIP après concentration

Les résultats de (SDS-PAGE) montrent que "le lysat" contient à la fois la protéine HiPIP et des impuretés. En revanche, le "flow through" ainsi que les fractions collectées avec un gradient de 15 % de tampon B contiennent principalement des impuretés. Cependant, ce qui est notable sur le gel de SDS-PAGE, c'est que les fractions collectées après avoir atteint un gradient de 20 % ou plus ne contiennent que la protéine HiPIP [4Fe-4S], et elles sont très pures, sans aucune impureté.

2.2.5 Vérification de la masse de la protéine par la spectrométrie de masse

La masse de la protéine Holo (la protéine avec cluster [4Fe-4S]) prévue est 11315 Da, et la masse de la protéine Apo (la protéine sans cluster [4Fe-4S]) prévue est 10956 Da, la masse de la protéine a été calculer par le logiciel EXPASY partir de la séquence de la protéine.

À partir des résultats obtenus grâce à SDS-PAGE, nous avons observé que la masse de la protéine HiPIP [4Fe-4S], en comparaison avec l'échelle de poids moléculaire (Ladder), est d'environ ≈ 15 KDa. Cette masse est plus élevée que celle calculée théoriquement. Afin d'éviter les problèmes potentiels liés à cette masse supérieure à celle attendue, nous avons pris la décision de vérifier la masse de la protéine en utilisant une autre méthode, à savoir la spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse est une technique analytique puissante utilisée pour étudier les protéines au niveau moléculaire. Elle permet de déterminer la masse des protéines et de caractériser leur structure, leur composition et leurs interactions, cette méthode consiste à ioniser (convertir en ions chargés) les protéines, à les séparer en fonction de leur rapport masse/charge (m/z), puis à mesurer leur masse/molécule charge (m/z) et leur abondance relative.

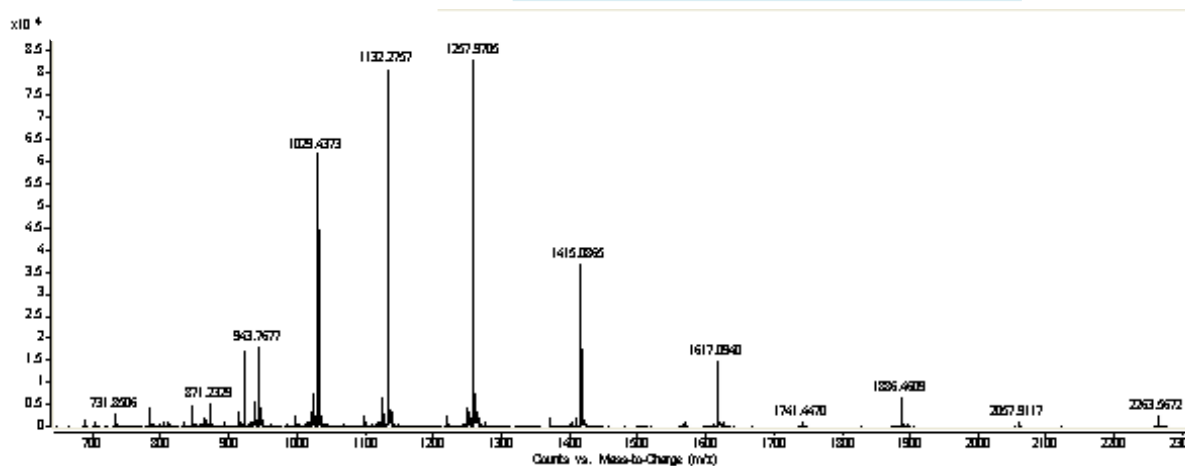
Effectivement, nous avons effectué des tests sur un échantillon de la protéine HiPIP [4Fe-4S] et nous avons confirmé la masse réelle de la protéine Holo, qui est d'environ $\approx 11\ 313$ Da, ainsi que la masse de la protéine Apo, qui est d'environ $\approx 10\ 962$ Da (voir les figures 2.4 et 2.5).

Essentiellement les petites protéines, en raison de leur taille réduite, peuvent être plus sensibles aux variations de composition en acides aminés. Ces variations peuvent influencer la manière dont le SDS interagit avec les protéines, ce qui peut entraîner des comportements migratoires différents sur le gel SDS-PAGE. Ainsi, des biais de composition dans la séquence des petites protéines peuvent conduire à des résultats de migration non conformes aux attentes basées uniquement sur leur poids moléculaire.

La vérification de la masse de la protéine par la spectrométrie de masse a été fait par Leanne Ohlund.

ESI positive mode, H⁺ ions
 Deconvoluted MW [Da]: 11312.738
 Standard deviation [Da]: 0.17581305

Holo protein
 C478 H729 N141 O143 S11 Fe4
 Calculated neutral mass: 11315Da



m/z	charge	MW [Da]	Error [Da]
943.7677	12+	11313.124	0.38599
1029.4373	11+	11312.729	-0.00871
1132.2757	10+	11312.683	-0.05462
1257.9705	9+	11312.668	-0.06973
1415.0865	8+	11312.633	-0.10484
1617.094	7+	11312.606	-0.13145
1886.4609	6+	11312.721	-0.01665

Figure 2.4 Les résultats de la spectrométrie de masse pour la protéine Holo HiPIP [4Fe–4S]. Chaque pic dans l'image représente l'holoprotéine avec une charge spécifique, indiquée dans tableau ci-dessous, la masse molaire de chaque pic est indiquée dans le tableau et calculée sur la base de la charge attribuée. La masse réelle de la protéine Holo, est d'environ $\approx 11\ 313$ Da

ESI positive mode, H⁺ ions
 Deconvoluted MW [Da]: 10962.74823
 Standard deviation [Da]: 0.0712881

Apo protein
 C478 H729 N141 O143 S7
 Calculated exact neutral mass: 10956.2152 Da

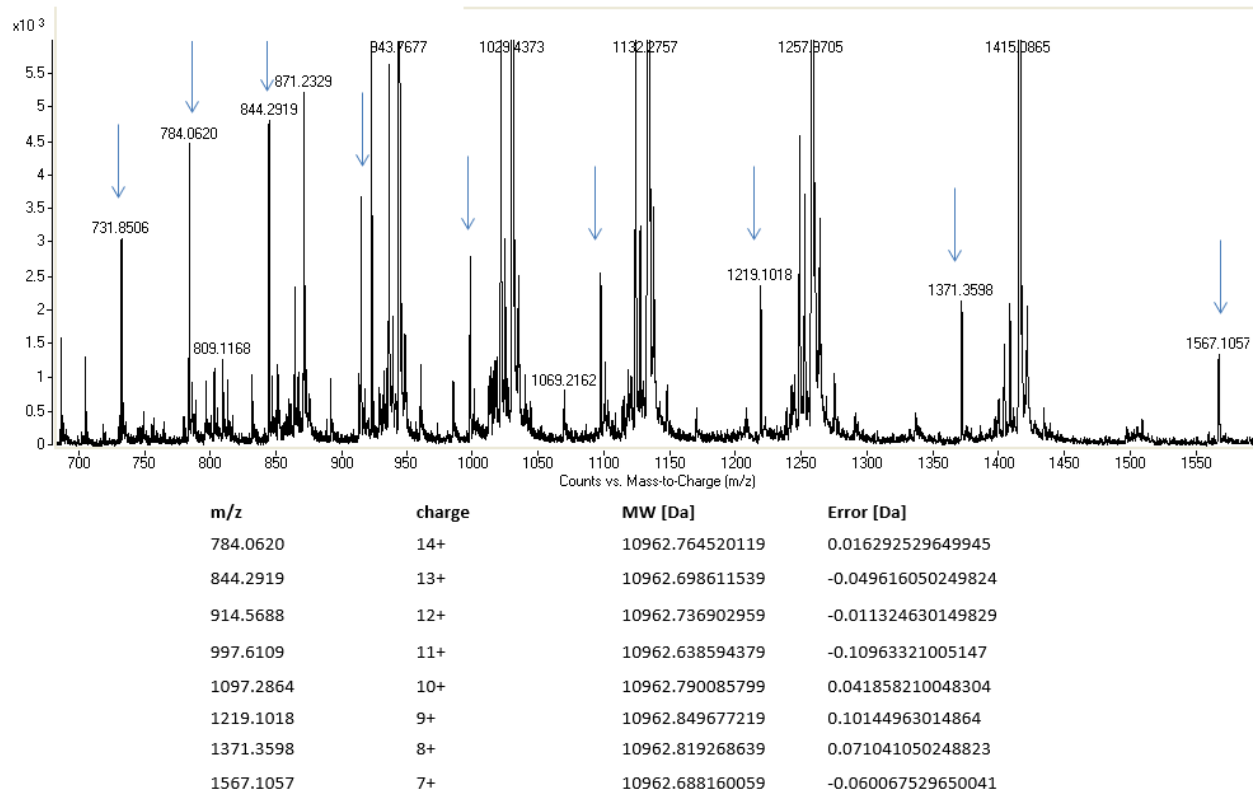


Figure 2.5 Les résultats de la spectrométrie de masse pour la protéine Apo. Chaque pic dans l'image représente l'apoprotéine avec une charge spécifique, indiquée dans le tableau ci-dessous, ainsi que la masse molaire de chaque pic est indiquée dans le tableau et calculée sur la base de la charge attribuée. La masse réelle de la protéine Apo, qui est d'environ $\approx 10\,962$ Da. Noter que cette figure est un zoom de la figure (2.4) pour montrer les petits pics de la protéine

Apo

2.3 Détermination du coefficient d'extinction de la protéine HiPIP [4Fe–4S]

Avant de commencer à tester la réactivité de la protéine avec les molécules de NO, il est essentiel de déterminer préalablement leur coefficient d'extinction. Cette étape est cruciale pour faciliter notre recherche et assurer des réactions bien contrôlées.

La première étape consiste à déterminer la concentration de fer dans les échantillons de la protéine HiPIP [4Fe–4S] obtenue. Pour ce faire, nous avons utilisé la spectroscopie UV-Visible avec le Ferene-S en tant que ligand. Le Ferene-S (N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)éthylènediamine-N,N'-diacétique), est une molécule organique capable de se lier spécifiquement aux ions Fe^{2+} , formant un complexe brun qui absorbe à 593 nm. Cette approche nous a permis de quantifier le fer présent dans le cluster des protéines HiPIP.⁵⁷

Tout d'abord des standards avec des concentrations bien connu ont été préparé selon la méthode suivante : À partir de la solution mère de Fe^{2+} (C=0,4 mM), des dilutions successives ont été réalisées (0,04 ; 0,08 ; 0,12 ; 0,16 ; 0,20 ; 0,24 ; 0,28 ; 0,32 ; 0,36 ; 0,40 mM). Ensuite, 100 μL de HNO_3 à 22 % ont été ajoutés à chaque tube Eppendorf et incubés à 95°C pendant 30 minutes. Après refroidissement du mélange à la température ambiante et une centrifugation rapide, 600 μL d'acétate d'ammonium à 7,5 % ont été ajoutés et mélangés par inversion. Ensuite, 100 μL d'acide ascorbique à 12,5 % ont été ajoutés et mélangés par inversion. À partir d'une solution de ferène de 10 mM, 100 μL ont été ajoutés à chaque tube Eppendorf et mélangés par inversion. Le mélange a été incubé à température ambiante. La même procédure a été appliquée avec 5 μL et 10 μL de HiPIP, chacun dilué à 100 μL avec de l'eau ultrapure, en duplicata (voir tableau 2.2). Pour les deux échantillons de Hipip avec 5 μL ont montré une absorbance moyenne de 0,39, tandis que pour les deux autres échantillons avec 10 μL ont montré une absorbance moyenne de 0,77.

Après qu'on a obtenu les spectres des standards ainsi que les spectres de la protéine avec les ligands de Ferène-S par la spectroscopie UV-Visible on a pu déterminer la concentration de fer

dans les échantillons en utilisant L'équation de l'étalonnage ($y = mx + b$), ainsi que la loi de Beer Lambert :

$$A = \epsilon C l$$

A : représente l'absorbance de la lumière par la solution.

ϵ :(epsilon) est le coefficient d'absorption molaire de la substance absorbante.

C : est la concentration de la substance en solution.

l : est la longueur du trajet optique traversé par la lumière à travers la solution.

Finalement, nous avons réussi à déterminer le coefficient d'extinction de HiPIP [4Fe-4S] en créant une courbe d'étalonnage couvrant des concentrations allant de 0,0046 mM à 0,1405 mM de la protéine. En utilisant la loi de Beer-Lambert et l'équation d'étalonnage, nous avons pu calculer le coefficient d'extinction à 384 nm pour le [4Fe-4S] AvHiPIP, qui s'élève à **3,283 mM⁻¹cm⁻¹**.

Tableau 2.2 Préparations des standards pour la quantification du fer dans la protéine HiPIP [4Fe–4S].

Concentration de Fe2+	Fe2+ (C=0,4 mM) (ul)	H2O (ul)	HNO3 à 22 % (ul)	Acétate d'ammonium à 7,5 % (ul)	Acide ascorbique à 12,5 % (ul)	Ferène (C= 10 Mm) (ul)
0	0	100	100	600	100	100
0,04	10	90	100	600	100	100
0,08	20	80	100	600	100	100
0,12	30	70	100	600	100	100
0,16	40	60	100	600	100	100
0,20	50	50	100	600	100	100
0,24	60	40	100	600	100	100
0,28	70	30	100	600	100	100
0,32	80	20	100	600	100	100
0,36	90	10	100	600	100	100
0,40	100	0	100	600	100	100
****	1-HiPIP(5ul)	95	100	600	100	100
****	2-HiPIP(5ul)	95	100	600	100	100
****	1-HiPIP(10ul)	90	100	600	100	100
****	2-HiPIP(10ul)	90	100	600	100	100

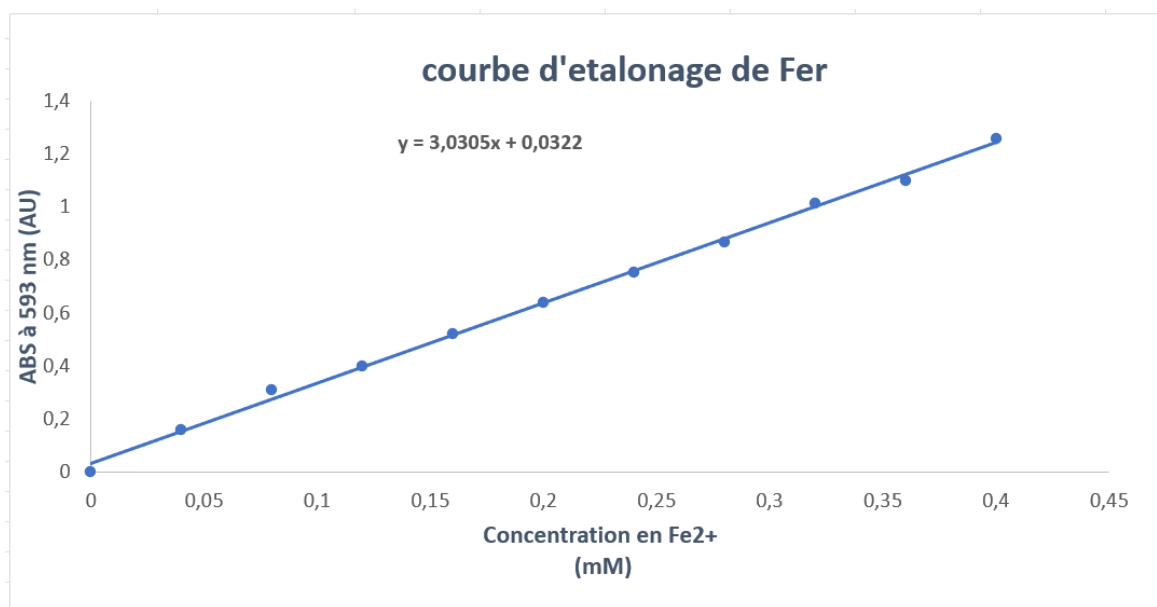


Figure 2.6 Courbe d'étalonnage de fer avec les différentes concentrations après l'ajoute de ferene.

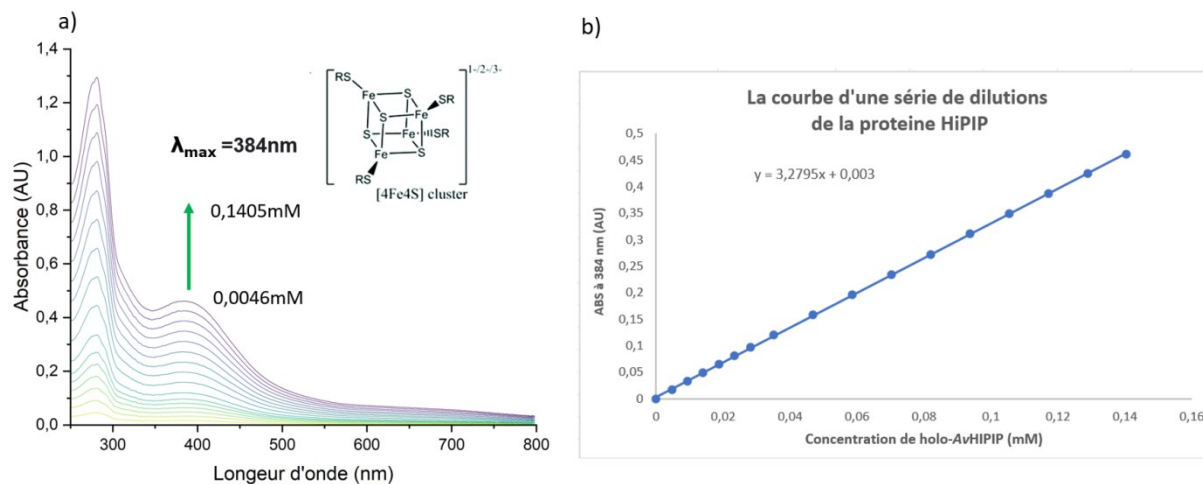


Figure 2.7 a) Les spectres de UV-Visible de la protéine HiPIP [4Fe-4S] avec les différentes concentrations, b) Courbe d'une série de dilution de HiPIP [4Fe-4S] ave. Les concentrations utilisées pour tracé cette courbe sont celles que nous avons obtenues en utilisant le Test Ferene pour le dosage du fer.

Chapitre 3

Nitrosylation de HiPIP [4Fe-4S], l'impact de la cinétique de la réaction de nitrosylation sur le choix du NONOate, et la preuve de la libération de H₂S pendant la réaction.

Après avoir réussi à obtenir la protéine HiPIP en grande quantité et avec une excellente pureté, nous avons entrepris de surveiller sa réaction avec l'oxyde nitrique (NO) et ses dérivés, en utilisant principalement la spectroscopie UV-Visible.

Afin de déterminer les conditions optimales de la réaction entre HiPIP et le NO, nous avons employé diverses molécules capables de générer du NO au fil du temps, en fonction du pH du milieu réactionnel et de la température. Ces molécules ont été utilisées en remplacement du NO sous forme gazeuse, ce qui nous a permis de contrôler la réaction au fil du temps et d'assurer une interaction directe entre le NO et le cluster de la protéine en solution.

Nous avons exploré différentes sources de NO pour déterminer laquelle était la plus appropriée. Parmi les sources générant la molécule de NO au fil du temps, nous avons testé le DPTA-NONOate, le DEA-NONOate et le PROLI NONOate, ce qui correspond respectivement à une libération lente, une libération rapide et une libération très rapide de NO. Ainsi que SNAP, GNSO et Angeli's Salt, ont été utilisés pour générer les dérivés du NO tel que NO⁻ et NO⁺.⁵⁹⁻⁶²

Après avoir établi les conditions optimales de la réaction de la protéine HiPIP avec l'oxyde nitrique, la prochaine étape a consisté à détecter la génération de H₂S en utilisant la spectroscopie de fluorescence. Nous avons employé des sondes fluorescentes telles que le 7-azido-4-méthylcoumarine (C-7Az),⁴⁸ et ester acétoxyméthyle de sulfurefluor-7 (SF7-AM),⁶³ qui sont capables de réagir spécifiquement avec les molécules de H₂S par une réaction redox.

Matériel et méthode

DEA-NONOate (Cayman Chemicals), DPTA-NONOate (Cayman Chemicals) et PROLI-NONOate (Cayman Chemicals) ont été préparé de manière anaérobie sous forme d'une solution à 96 mM dans une solution aqueuse de NaOH à 2 M dégazée, puis stocké dans un flacon hermétique à -20 °C. Alors que SF7-AM (Cayman Chemicals) et C-7Az (Cayman Chemicals) ont été préparé de manière anaérobie sous forme d'une solution à 3 mM dans du DMSO et stocké dans un flacon hermétique à -20 °C.

Pour le suivie des réactions de la protéine HiPIP [4Fe-4S] avec NO, les spectres d'absorbance UV-visible ont été obtenus dans la plage de 250 nm à 800 nm à l'aide de spectromètre (Lambda 750) UV-Visible. Pour la détection de H₂S par la spectroscopie de la fluorescence a été fait par Le fluorimètre (PE LS-45). Les mesures spectroscopiques (UV-visible et fluorescence) ont été effectuées successivement pour chaque échantillon à chaque instant. Les spectres d'absorbance UV-visible ont été obtenus dans la plage de 250 nm à 800 nm. Les spectres d'émission de fluorescence pour SF7-AM (excitation à 498 nm) ont été obtenus dans la plage de 518 nm à 700 nm. Alors que les spectres d'émission de fluorescence pour C-7Az (excitation à 340 nm) ont été obtenus dans la plage de 360 nm à 625 nm.

Les expériences de spectroscopie ont été réalisées de manière anaérobie dans une cuvette de fluorescence en quartz de 3 mL à bouchon à vis hermétique, équipée de septa en silicone (STARNA), en utilisant des solutions dégazées ou des solutions préparées dans une boîte à gants. Une cuvette en quartz équivalente contenant un tampon anaérobie a été utilisée comme cellule de référence dans le spectrophotomètre UV-Visible. Dans les expériences typiques, ses spectres d'absorbance et de fluorescence ont été obtenus pour un échantillon blanc de 3000 µL de tampon Tris 100 mM, pH=7,4 ou HEPES 100 mM, pH=7,4. Les spectres ultérieurs ont été réalisés après l'injection de volumes appropriés de réactif ou de protéine à l'aide des seringue Hamilton gastight de 10 µL, 100 µL, 250 µL, et 1000 µL, avec un mélange doux jusqu'à homogénéité.

3.1 La réactivité de la protéine HiPIP avec l'oxyde nitrique et ses dérivés

3.1.1 Dipropylenetriamine NONOate (DPTA NONOate)

La demi-vie du DPTA-NONOate est de 5 heures à 22°C à pH=7,4, au cours de laquelle il libère 2 molécules de NO par molécule de NONOate intacte. La réaction de HiPIP avec le DPTA-NONOate a été réalisée dans un tampon Tris (100 mM, pH 7.4) à température ambiante, avec une concentration initiale de DPTA-NONOate suffisante pour fournir 24 NO/[4Fe-4S] cluster à $t_{1/2}$. La réaction a été suivie durant le temps pendant 90min en observant les changements au niveau de la bande d'absorption classique [4Fe-4S] à 384 nm à l'aide de la spectroscopie UV-visible.

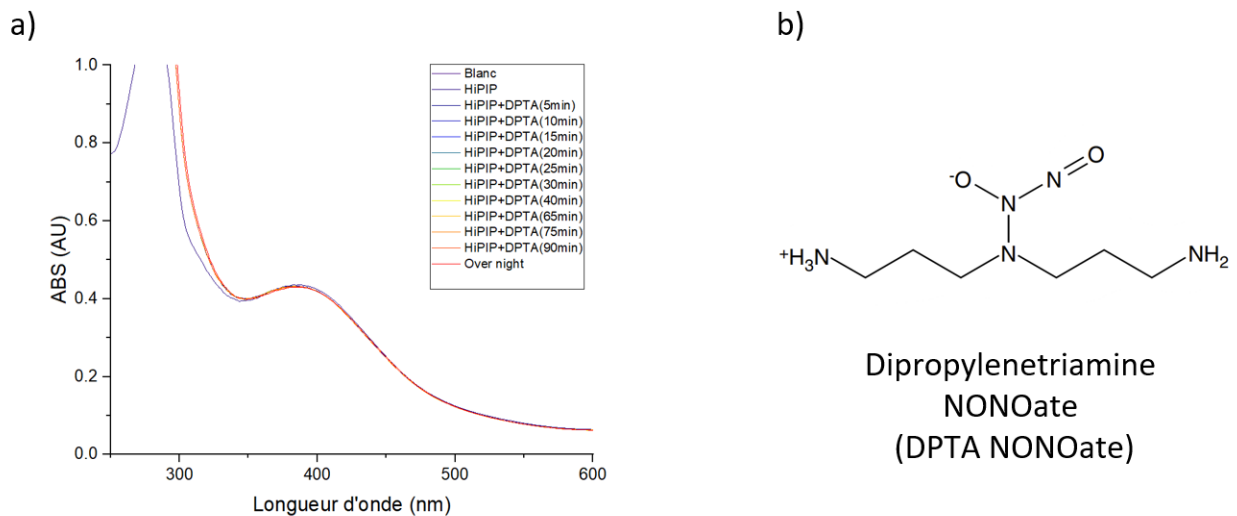


Figure 3.1 a) Spectres UV-visibles de 30 μ M de HiPIP après leur réaction avec NO libéré à partir de DPTA NONOate b) la molécule de DPTA NONOate. La réaction a été fait dans une cuvette en quartz de UV-Vis à bouchon à vis hermétique, contenant 3 mL de Tris pH=7,4

Aucun changement significatif de cette bande n'a été observé au cours des premières 90 minutes de réaction, et une modification minimale du spectre de HiPIP a été constatée après avoir laissé la réaction se poursuivre dans la cuvette hermétiquement scellée pendant la nuit. Il a donc été conclu que la réactivité de HiPIP avec le NO était suffisamment lente pour que l'utilisation d'un NONOate à libération lente ne soit pas idéale, et qu'un NONOate générant du NO à un rythme plus rapide serait nécessaire.

3.1.2 PROLI NONOate :

La source de NO à libération rapide, PROLI NONOate, a été testée en tant qu'alternative. Le PROLI-NONOate libère 2 molécules de NO par molécule de NONOate intact, avec une demi-vie de moins de 2 secondes à 37 °C à pH 7,4, et il n'est pas beaucoup plus lent à 25 °C. La réaction de nitrosylation de HiPIP en utilisant le PROLI-NONOate comme source de NO a été suivie expérimentalement dans un protocole similaire à celui utilisé pour la réaction avec le DPTA-NONOate.

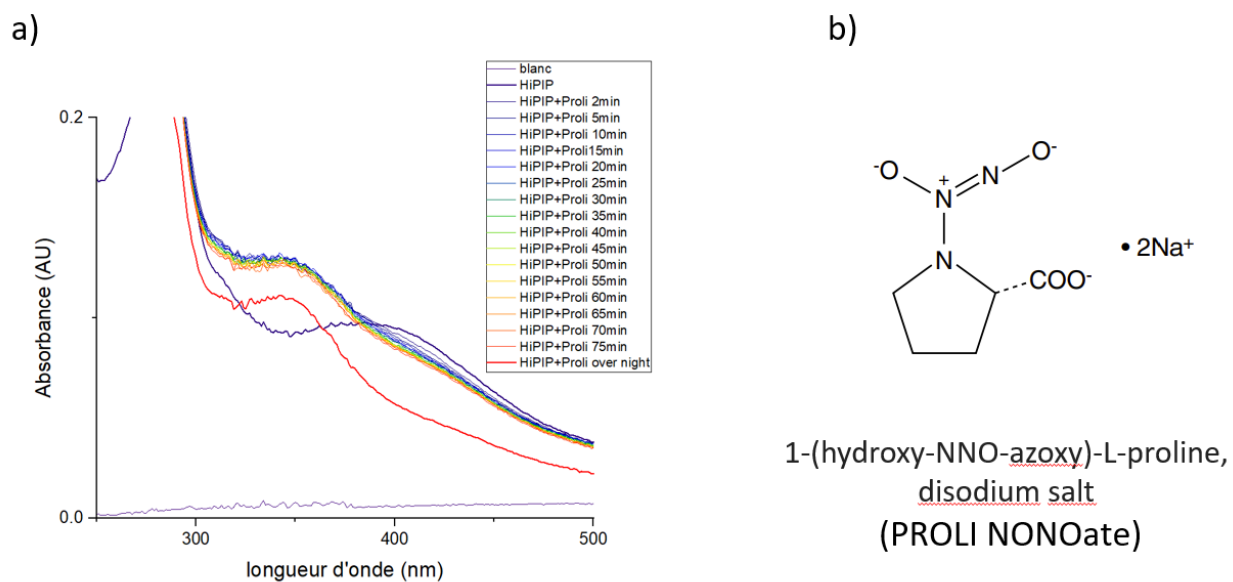


Figure 3.2 a) Spectres UV-visibles de 30 μM de HiPIP après leur réaction avec NO libéré à partir de PROLI NONOate. b) la molécule de PROLI NONOate. La réaction a été fait dans une cuvette en quartz de UV-Vis à bouchon à vis hermétique, contenant 3 mL de Tris pH=7,4

La courbe en violet montre le spectre d'absorbance initial de HiPIP [4Fe-4S] avec le λ_{max} habituel de 384 nm, caractéristique du cluster [4Fe-4S]. À la suite de l'ajout de PROLI-NONOate en quantité suffisante pour fournir l'équivalent de 24 NO/[4Fe-4S] cluster à $t_{1/2}$, une dégradation de la bande du cluster [4Fe-4S] à λ_{max} 384 nm ont été immédiatement observée, accompagnée de la formation concomitante d'une nouvelle bande à 340 nm. Avec l'augmentation du temps de réaction, la bande à 384 nm a continué de diminuer en intensité, et la nouvelle bande à 340 nm a également légèrement diminué après son augmentation initiale rapide dans les 75 premières minutes. Après que la réaction a été laissée reposer pendant la nuit dans une cuvette hermétiquement scellée, les deux bandes étaient significativement réduites (Avant chaque lecture par UV-Vis, nous mélangeons la cuvette avec précaution 3 à 4 fois).

3.1.3 Diethylamine NONOate (DEA NONOate)

DEA-NONOate est un autre NONOate à libération rapide, bien que légèrement plus lent que le PROLI-NONOate dans sa libération de NO. Il libère 1,5 molécules de NO par molécule de NONOate avec une demi-vie de 16 minutes à température ambiante à pH 7,4. La réaction de nitrosylation de HiPIP en utilisant le DEA-NONOate comme source de NO a été suivie expérimentalement dans un protocole similaire à celui utilisé pour les réactions avec le DPTA-NONOate ou le PROLI-NONOate.

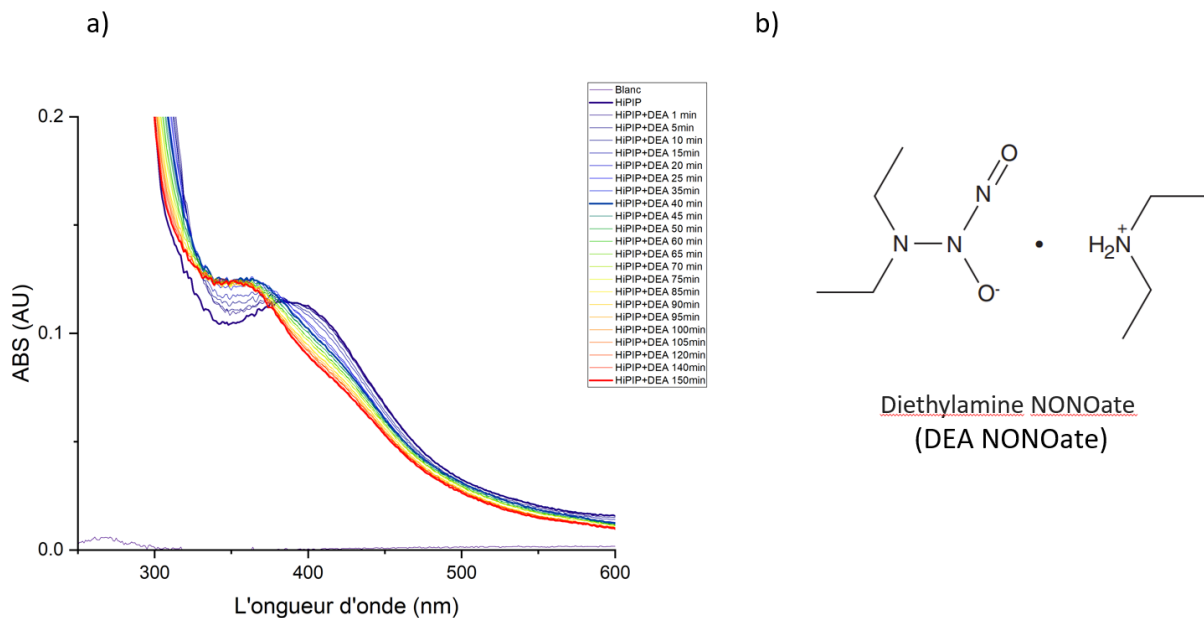


Figure 3.3 a) Spectres UV-visibles de 30 μM de HiPIP après leur réaction avec NO libéré à partir de DEA NONOate. b) la molécule de DEA NONOate. La réaction a été fait dans une cuvette en quartz de UV-Vis à bouchon à vis hermétique, contenant 3 mL de Tris pH=7,4. La courbe violet en gras représente la bande de HiPIP, la courbe bleue représente le produit formé après 40 min de l'ajoute de DEA NONOate³²

À la suite de l'ajout de PROLI-NONOate en quantité suffisante pour fournir l'équivalent de 24 NO/[4Fe-4S] cluster à $t_{1/2}$, il était évident, d'après les spectres d'absorbance obtenus, que ces conditions de réaction offraient les conditions les plus favorables pour observer les changements spectraux induits par la nitrosylation du cluster [4Fe-4S]. Bien qu'il ne soit pas réalisable d'observer la réaction complète du cluster dans ce laps de temps, la décomposition initiale du cluster [4Fe-4S] a été capturée en observant la diminution successive de l'intensité de la bande à 384 nm, ainsi que l'augmentation puis la diminution correspondante de l'intensité de la bande à 340 nm (Figure 3.3, a).

La courbe affichée en violet dans la Figure 3.3, a, montre le spectre d'absorbance initial de HiPIP [4Fe-4S] avec le λ_{\max} habituel de 384 nm, caractéristique du cluster [4Fe-4S]. À la suite de l'ajout de DEA-NONOate en quantité suffisante pour fournir l'équivalent de 24 NO/[4Fe-4S] cluster à $t_{1/2}$, une diminution progressive de l'intensité de la bande du cluster [4Fe-4S] à λ_{\max} 384 nm a été observée, accompagnée de l'émergence concomitante d'une nouvelle bande à 350 nm qui augmentait en intensité au fil du temps jusqu'à 40 minutes de réaction, puis a commencé à diminuer en intensité, ainsi que la bande à 384 nm.

Des résultats similaires ont été obtenus par le groupe de J. A. Cowan en 1999, lors de leur étude sur la réactivité de la protéine HiPIP [4Fe-4S] avec le NO, suivie par UV-Vis. Une bande d'absorbance à 388 nm, représentant la protéine seule, a été initialement observée. Après l'addition de DEANONOate en excès 20 fois, ils ont noté un déplacement de la bande de 388 nm à 360 nm, indiquant clairement la dégradation du cluster [Fe-S]. Un unique point isosbestique a été repéré dans la région visible à 379 nm, mais aucune autre réaction n'a été détectée après 30 minutes.³³

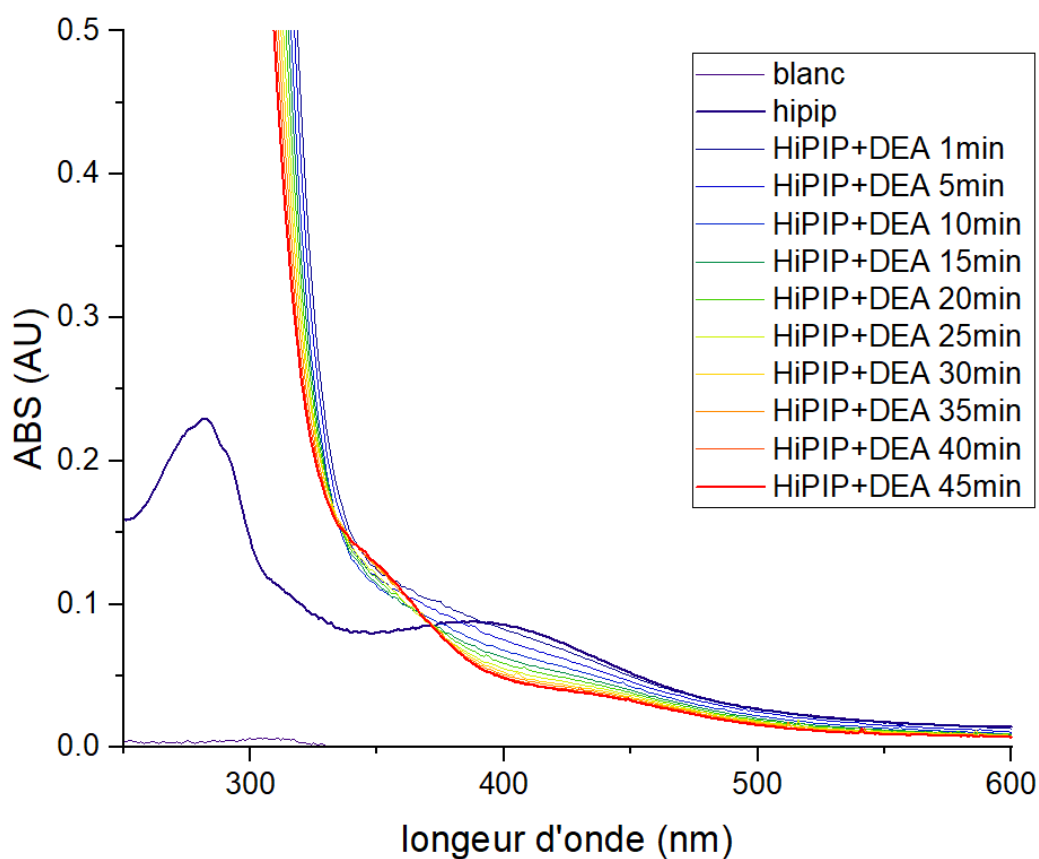


Figure 3.4 Spectres UV-visibles de 30 μM de HiPIP après leur réaction avec un excès de NO libéré à partir de DEA NONOate. La réaction a été faite dans une cuvette en quartz de UV-Vis à bouchon à vis hermétique, contenant 3 mL de Tris pH=7,4

Dans une tentative d'observer le point final de la nitrosylation de HiPIP en utilisant le DEA-NONOate, le protocole a été répété en utilisant un excès important de NONOate (l'équivalent de 500 NO par unité [4Fe-4S]). Avec un tel excès, on anticipait que la réaction de nitrosylation se déroulerait suffisamment rapidement pour permettre une meilleure observation des stades ultérieurs de la dégradation du [4Fe-4S]. Dans les 45 minutes qui ont suivi, une dégradation plus rapide du cluster a en effet été observée, mais elle n'était pas suffisante pour permettre la disparition complète des bandes à 384 nm et 350 nm dans ce laps de temps. (Figure 3.4)

Les expériences combinées avec des taux de libération de NO variables et des concentrations totales montrent que la réaction de l'AvHiPIP avec le NO est lente en comparaison avec celle d'autres ferrédoxines.^{64, 65}

3.1.4 Réaction de HiPIP avec NO⁻ et NO⁺ suivie par UV visible

Les protéines à base de fer-soufre ne sont pas seulement très réactives envers l'oxyde nitrique (NO), mais elles sont également hautement réactives envers les dérivés du NO. Étant donné la présence de plusieurs dérivés du NO dans un système biologique, tels que NO⁻, NO⁺, NO₂⁻, NO₃⁻, N₂O₃, nous avons pris la décision de sélectionner deux de ces dérivés, à savoir NO⁻ et NO⁺, afin d'étudier leur réactivité avec le cluster [4Fe-4S], et d'observer les produits potentiels qui résultent de cette réaction.

Après avoir terminé les essais de réaction entre HiPIP [4Fe-4S] et le NO, nous avons entrepris de répéter ces mêmes réactions avec les dérivés du NO, tels que le NO⁺ et le NO⁻. Nous avons suivi le même protocole que celui utilisé pour la génération de NO. Pour libérer les dérivés NO⁺, nous avons utilisé le S-Nitroso-N-Acetyl-D, L-Penicillamine (SNAP), tandis que pour les NO⁻, nous avons employé l'Angeli's Salt.

Le S-Nitroso-N-Acetyl-D, L-Penicillamine (SNAP) a été préparé en ajoutant 1M de HCl pour obtenir une concentration finale de 100 mM. Le SNAP appartient à la catégorie des S-nitrosothiols, des composés impliqués en tant que principaux régulateurs des protéines. Leur rôle est crucial dans la modulation de l'activité protéique, et ils agissent en tant que donneurs d'ions nitrosonium NO⁺.

Alors que l'Angeli's Salt, il a été préparé en ajoutant 2M de NaOH pour atteindre une concentration finale de 100 mM. La demi-vie de l'Angeli's Salt dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4, est de 2,3 minutes à 37 °C.⁵⁹

Cependant, nous avons rencontré un problème avec ces types de molécules qui libèrent les dérivés du NO (Figure 3.5) : ces molécules elles-mêmes absorbent à des longueurs d'onde proches de la longueur d'onde maximale de la protéine HiPIP [4Fe-4S], soit λ_{\max} à 384 nm. Ce qui met plus difficile pour nous de suivre la réaction de HiPIP avec les dérivés de NO.

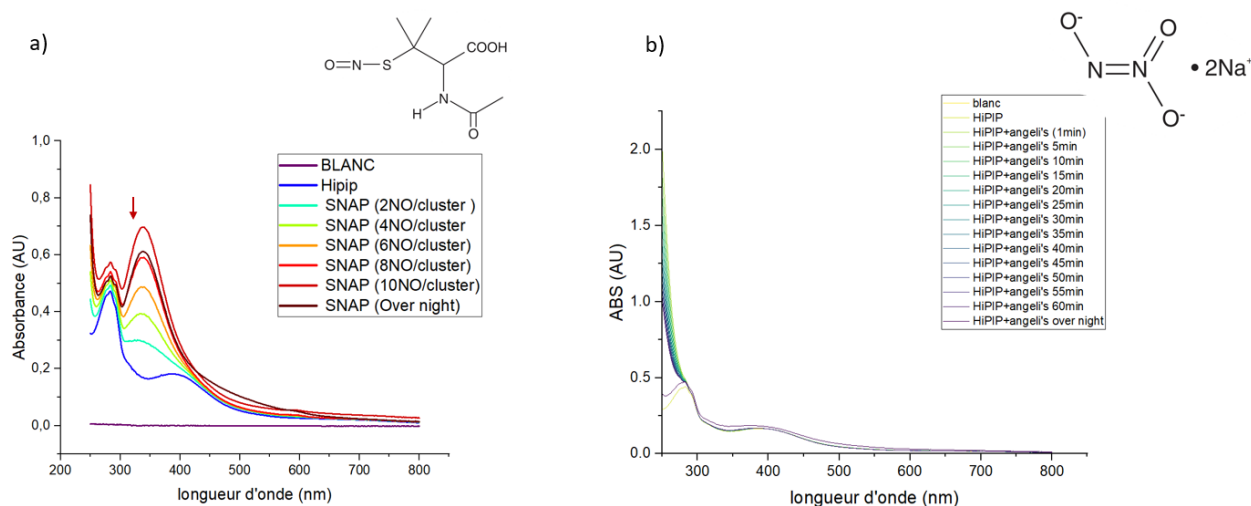


Figure 3.5 a) Spectres UV-visibles de 30 μM de HiPIP après leur réaction avec NO⁺ libéré à partir de SNAP, en haut à droit la structure de S-Nitroso-N-Acetyl-D, L-Penicillamine (SNAP). b) Spectres UV-visibles de 30 μM de HiPIP après leur réaction avec NO⁻ libéré à partir de Angeli's Salt, en haut à droit la structure de Angeli's Salt. Les réactions ont été fait dans une cuvette en quartz de UV-Vis à bouchon à vis hermétique, contenant 3 mL de Tris pH=7,4.

3.1.5 RPE de la HiPIP [4Fe-4S] nitrosylé

Les spectres RPE ont été enregistrés à la Facilité de Résonance Magnétique de McGill (MMRF) au sein du Département de Chimie de l'Université McGill. Les mesures en bande X ont été effectuées dans des conditions de non-saturation à l'aide d'un spectromètre RPE Bruker Elexsys E580 en bande X.

La protéine nitrosylée a été obtenue par l'addition anaérobie de PROLI-NONOate (23 μmol dans 100 mM de HEPES, pH 7,4) à l'AvHiPIP (0,6 μmol dans 100 mM de HEPES, pH 7,4) dans une fiole scellée par un septum, suivie d'une réaction nocturne à température ambiante, le tout réalisé dans une enceinte à atmosphère inerte. Pour l'échantillon RPE, la protéine nitrosylée (1,5 mM) a été préparée en ajoutant du glycérol en tant qu'agent vitrifiant (conditions finales : 75 mM de HEPES, 25 % de glycérol, pH 7,4), suivie d'une congélation douce dans de l'azote liquide. La caractéristique à 3420 G est un artefact également présent dans le spectre de fond. Les spectres RPE de la HiPIP nitrosylée ont été enregistrés à 115 K. Conditions de mesure RPE : puissance micro-onde de 0,2084 mW et fréquence micro-onde de 9,600492 GHz. Après la réaction de la protéine HiPIP avec NO pendant toute la nuit on a pu enregistrer le signal caractéristique des DNIC avec $g_1=2,03$ et $g_2=2,01$ (le facteur g : g_1 correspond au point d'inversion du signal axial à ~ 3370 G, et g_2 correspond au minimum du second signal à ~ 3405 G) (Figure 3.6)

La dégradation des protéines fer-soufre pour former des DNIC est désormais bien documentée. Le DNIC est un produit de la réaction de la protéine HiPIP avec le NO, qui est facilement détectable par RPE en raison de leur paramagnétisme. En particulier, le groupe de J.A. Cowan a réalisé la réaction de HiPIP avec le NO, en faisant réagir HiPIP natif à une concentration de 1 mM avec DEANO à une concentration de 20 mM pendant 60 minutes à température ambiante dans un tampon Hepes à 50 mM et à un pH de 7,4. Ils ont utilisé la RPE comme technique pour observer les produits résultant de cette réaction. Ils ont trouvé des résultats similaires à ceux que nous avons obtenus, avec un signal axial similaire $g_{av} = 2,03$, bien que les spectres aient été enregistrés à une température de 15 K.³³ Dans d'autres recherches, des résultats similaires ont été obtenus

par RPE avec un signal axial $g_{av} = 2,03$, alors que les spectres RPE ont été enregistrés à 15K ou 100K.⁴⁵

L'expérience a été réalisée par la professeure Erin Dodd et le Dr. Kirill Levin (gestionnaire des installations de RMN et de RPE de McGill).

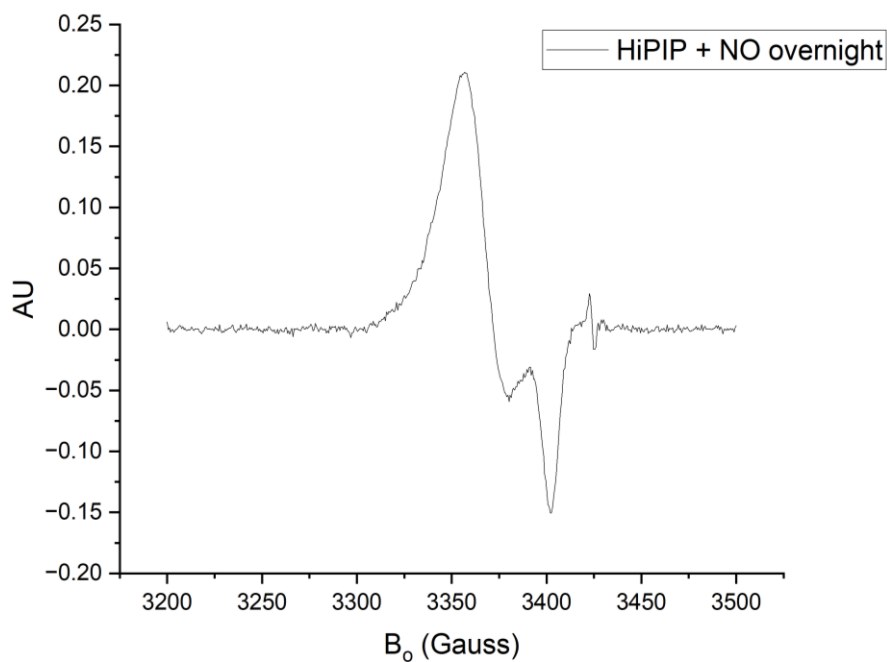


Figure 3.6 Spectres RPE à 115 K de 0,6 μ mol de HiPIP exposé à NO libéré à partir de PROLI-NONOate pendant la nuit.

3.2 Preuve de la libération de H₂S pendant la réaction en utilisant les capteurs fluorogènes de H₂S C-7Az et SF7-AM

Il est bien établi que la nitrosylation de molécules ou de protéines contenant le cluster [4Fe-4S] conduit à des produits nitrosylés du fer, parmi lesquels les plus courants sont l'ester rouge de Roussin, le sel noir de Roussin et les composés de fer dinitrosylés. La formation de produits RRE et/ou DNIC implique nécessairement la libération de 4 sulfures inorganiques par cluster, tandis qu'un sulfure inorganique par cluster est libéré lors de la formation de RBS.

Pour déterminer si ces sulfures libérés pouvaient être capturés et observés, nous avons effectué la réaction de nitrosylation en présence d'un capteur commercial à fluorescence pour le H₂S, basé sur le principe de l'activation de fluorescence (Figure 3.7). En présence de H₂S, HS⁻ ou du sulfure libre S₂⁻, la molécule capteur produirait une augmentation de l'intensité de fluorescence au fil du temps, plus élevée par rapport aux expériences témoins. Les sondes fluorogènes basées sur les azides produisent une augmentation quantitative de la fluorescence lorsque la forme azide non fluorescente du capteur est convertie en forme amine par une attaque nucléophile sélective du H₂S ou du sulfure, que sont des bons nucléophiles.

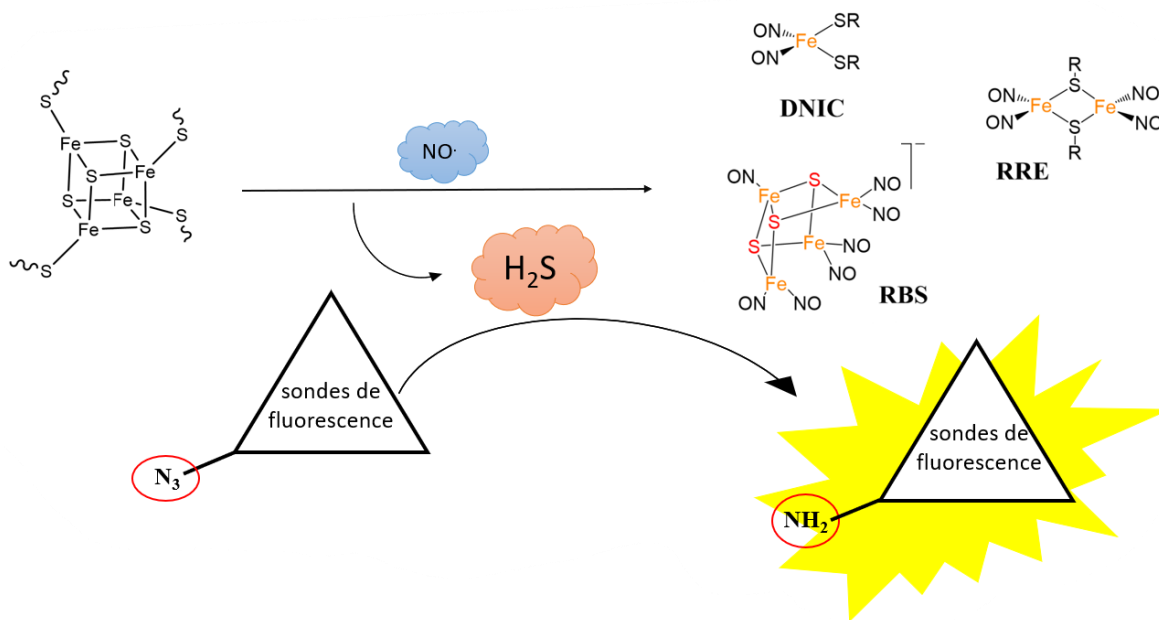


Figure 3.7 Un schéma démonstratif qui explique l'ajoute des sondes de fluorescence durant la réaction de HiPIP et NO.

Parmi les sondes fluorogènes réactives disponibles pour le H₂S, nous avons privilégié celles de ce type, car certaines d'entre elles avaient déjà montré une faible réponse d'activation par rapport au NO par rapport à la molécule cible, le H₂S. Cette spécificité était nécessaire dans notre cas, car les faibles concentrations de protéines et la lenteur de la réaction de nitrosylation de la HiPIP nécessitaient un fluorophore in-situ.

Dans ce travail on a essayé deux sondes fluorescente différents la premier est 7-azido- 4-méthylcoumarine (C-7Az)⁶⁶ alors que le deuxième est ester acétoxyméthylque de sulfurefluor-7 (SF7-AM).⁶³

3.2.1 Réaction de la protéine HiPIP avec NO à la présence de C-7Az :

La sonde 7-azido- 4- méthylcoumarine (C-7Az) est sondes fluorogènes basées sur les azides produisent une augmentation quantitative de la fluorescence lorsque la forme azide non fluorescente du capteur est convertie en forme amine. Les azides peuvent réagir selon une réaction de réduction avec H_2S et convertir en amine. Le C-7Az à une longueur d'onde d'excitation de 430nm et d'émission de 445 nm.

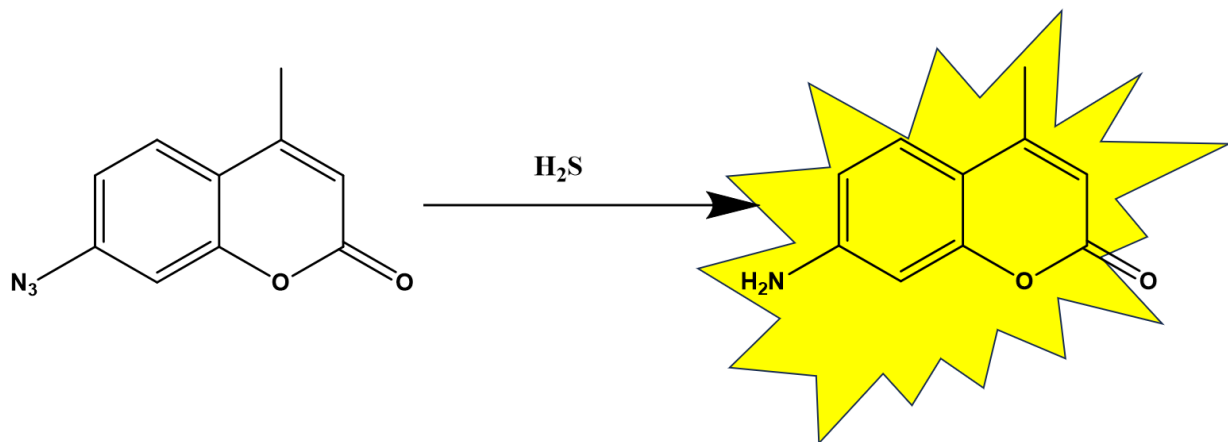


Figure 3.8 À gauche, vous trouverez la structure non fluorescente du C-7Az. Lorsqu'il réagit avec le H_2S , une réaction de réduction se produit entre l'azote du C-7Az et le H_2S , conduisant à la formation d'une amine représentée dans la structure fluorescente du C-7Az à droite.

Dans une cuvette en quartz de fluorescence de 3 mL de Tris (100 mM)+10% du glycérol (la 10 % de glycérol a été ajouté puisque la molécule de C-7Az est pas soluble dans le tampon Tris ou d'autres tampons tous seul, le glycérol aide de solubiliser la molécule de C-7Az dans le tampon), une quantité de C-7Az a été ajouté pour avoir une concentration final de 10 μM , ensuite la protéine HiPIP a été ajouté pour avoir une concentration final de 30 μM ainsi que DEA NONOate en quantité suffisante pour fournir l'équivalent de 24 NO/[4Fe-4S] cluster à $t_{1/2}$ et pour répéter les meilleurs qu'on a trouvé auparavant.

La réaction de HiPIP avec DEA NONOate à la présence de C-7Az a été suivi par la spectroscopie de fluorescence et UV-Visible en même temps pour s'assurer que C-7Az n'affecte pas la réaction de HiPIP avec NO.

Effectivement, comme le montre la figure 3.9, a, il est clair que le C-7Az n'affecte pas la réaction entre HiPIP et le NO puisque on peut constater qu'il y a un changement des spectres UV-Visible durant le temps. Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation significative de l'intensité de fluorescence au cours de la réaction. C'est seulement lorsque nous avons laissé la réaction se poursuivre toute la nuit que nous avons pu détecter une réponse significative, comme le montre la figure 3.9, b.

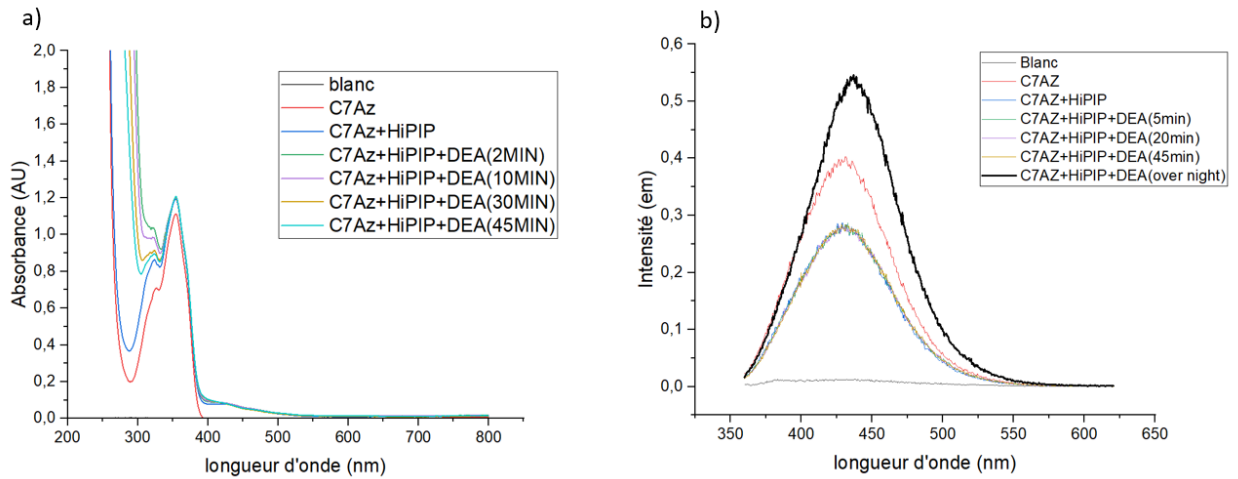


Figure 3.9 a) Spectre UV-Visible de la réaction de HiPIP avec DEA NONOate à la présence de C-7Az b) Spectre de fluorescence de la réaction de HiPIP avec DEA NONOate à la présence de C-7Az

Plusieurs inconvénients ont été identifiés lors de l'utilisation de C-7Az. Tout d'abord, il n'est pas soluble dans les tampons par lui-même, et il est nécessaire d'ajouter du glycérol pour le dissoudre. Deuxièmement, sa longueur d'onde d'absorption maximale est d'environ 370 nm, ce qui est très proche de la longueur d'onde d'absorption de la protéine HiPIP, ce qui rend difficile le suivi de la réaction de HiPIP avec le NO en présence de C-7Az. Troisièmement, il ne génère pas de réponse de fluorescence pendant la réaction, et il faut beaucoup de temps pour obtenir une réponse fluorescente. C'est pourquoi nous avons décidé de remplacer la sonde fluorescente C-7Az par SF7-AM.

3.2.2 Réaction de la protéine HiPIP avec NO à la présence de SF7-AM

Le composé commercial SF7-AM (Ester d'acétoxyméthyle du Sulfidefluor-7) est un autre capteur à activation de fluorescence pour une grande sélectivité pour le H₂S par rapport à d'autres thiols biologiquement pertinents. SF7-AM a une longueur d'onde d'excitation de $\lambda_{ex} = 498$ nm, qui est beaucoup plus élevée que la longueur d'onde des bandes d'absorption de l'un quelconque des composants de la réaction, et une longueur d'onde d'émission associée de $\lambda_{em} = 527$ nm. Contrairement à C-7Az, SF7-AM a été testé contre le NO et les composés apparentés, et il a été démontré qu'il a une faible réactivité avec le NO.⁶⁷

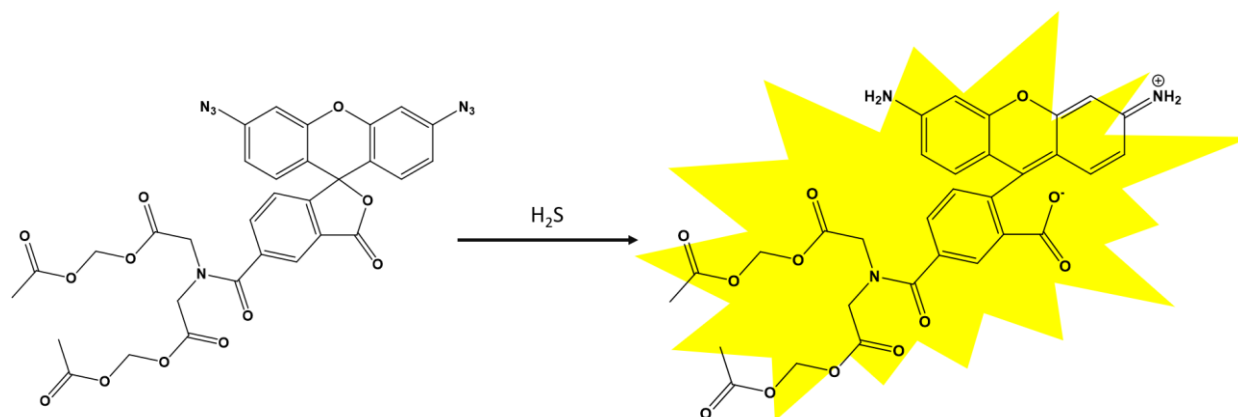


Figure 3.10 À gauche, vous trouverez la structure non fluorescente du SF7-AM. Lorsqu'il réagit avec le H_2S , une réaction de réduction se produit entre les deux azotes du SF7-AM et le H_2S , conduisant à la formation de deux amines représentées dans la structure fluorescente du SF7-AM à droite⁵⁶

Le concept expérimental était simple en pratique ; la réaction de nitrosylation entre la HiPIP et la DEA-NONOate a été initiée dans une cuvette contenant tampon de HEPES 20 mM comme décrit dans l'article original⁶⁷, et suivie au fil du temps. Dans ce cas, une solution mère de SF7-AM a été ajoutée pour atteindre une concentration de 10 μM dans la cuvette avant l'ajout de la HiPIP, puis de la NONOate, le début de la réaction de nitrosylation étant synchronisé avec l'ajout de la NONOate. Afin de suivre la réaction de manière spectroscopique, des spectres d'absorbance UV-visible et des spectres d'émission de fluorescence (avec une longueur d'onde d'excitation de 498 nm) ont été obtenus à chaque ajout de réactif et à chaque point temporel de la réaction chronométrée. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.11.

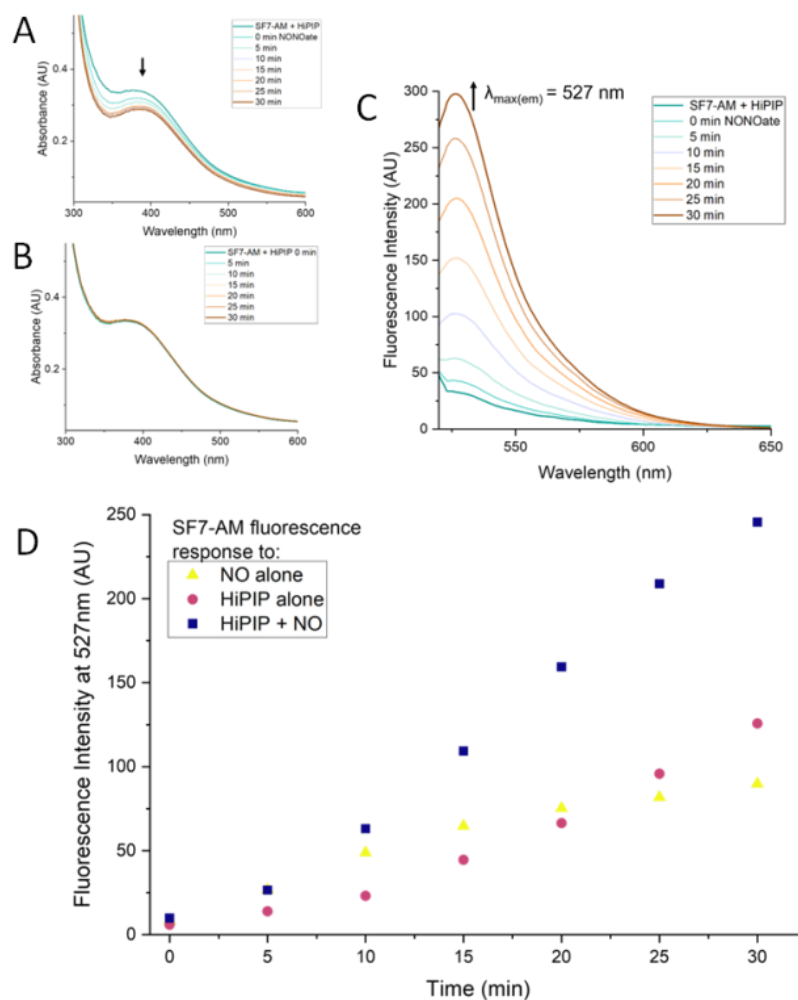


Figure 3.11 Suivi de l'évolution du H₂S généré par la nitrosylation de [4Fe-4S] AvHiPIP. A : Absorbance : diminution de la bande [4Fe-4S] montre la perte de cluster due à la nitrosylation ; B : Absorbance : aucune variation de la bande [4Fe-4S] en l'absence de NO ; C : Émission de fluorescence (excitation à 498 nm) augmente lorsque la HiPIP est exposée au NO en présence de SF7-AM ; D : Réponses d'émission de fluorescence de SF7-AM (excitation à 498 nm) pour HiPIP + NO par rapport à celles pour le NO seul ou la HiPIP seule, corrigées pour la fluorescence de base de SF7-AM et normalisées pour [SF7-AM]

Pour garantir que l'augmentation de l'intensité de fluorescence observée était significative par rapport à toute intensité de fluorescence de référence à $\lambda_{em} = 527$ nm qui augmente au fil du temps, des expériences de contrôle ont été réalisées. En utilisant des conditions de réaction identiques à celles de l'expérience, d'émission de fluorescence, ainsi que de l'absorbance UV-visible, ont été suivies au fil du temps pour le fluorophore en présence du contrôle. SF7-AM a été testé séparément contre HiPIP seul, DEA-NONOate seul et du tampon seul. De légères augmentations de l'intensité de fluorescence ont été observées même en présence de tampon seul. Des augmentations modérées de l'intensité de fluorescence ont été observées en présence de la protéine HiPIP ou de la DEA-NONOate, comme le montrent les résultats de la Figure 3.11, d. La Figure 3.11, d montre une comparaison des résultats des expériences de contrôle avec ceux de toutes les réactions en présence de tous les réactifs, en utilisant les intensités d'émission de fluorescence à $\lambda_{em} = 527$ nm, normalisées pour de légères différences de concentration et corrigées pour la fluorescence de base, qui est l'émission de fluorescence à $\lambda_{em} = 527$ nm du SF7-AM dans le tampon seul à un point temporel équivalent. Il ressort de la Figure 3.11, d que l'intensité de fluorescence du SF7-AM ne dépasse pas 125 UA après 30 minutes de réaction lorsque le SF7-AM était placé avec soit la HiPIP [4Fe-4S] seule, soit la DEA-NONOate seule, et en fait, le taux d'augmentation de la fluorescence en présence de la NONOate seule a également montré un modèle altéré avec un plateau dans l'augmentation de l'intensité qui est apparu après 20 minutes de réaction. Cependant, lorsque le SF7-AM a été combiné avec la HiPIP [4Fe-4S] et la DEA-NONOate ensemble, l'intensité de fluorescence du SF7-AM à $\lambda_{em} = 527$ nm ont approché 250 UA après 30 minutes de réaction. La réponse en fluorescence du SF7-AM pendant la réaction de la HiPIP [4Fe-4S] avec le NO par rapport à la HiPIP seule et à la DEA-NONOate seule montre clairement que lors de la réaction de la HiPIP [4Fe-4S] avec le NO, il y a libération de soufre inorganique sous forme de S^{2-} . Les augmentations d'intensité de fluorescence combinées induites par la HiPIP et la NONOate indépendamment n'étaient pas suffisantes pour expliquer l'augmentation beaucoup plus importante de l'intensité de fluorescence à $\lambda_{em} = 527$ nm observée lorsque le fluorophore était exposé à la HiPIP [4Fe-4S] et à la NONOate ensemble.

Étant donné que nous n'avons pas pu obtenir un spectre d'absorbance de HiPIP plus NO en présence de SF7-AM qui soit totalement similaire à celui de HiPIP plus NO seul, nous avons décidé

de répéter l'expérience en prolongeant le temps d'observation. Cependant, nous n'avons toujours pas obtenu le même spectre que celui de HiPIP plus NO seul. Après quelques vérifications, nous avons constaté que la concentration de 20 mM de HEPES n'était pas suffisante pour maintenir le même pH du milieu après l'ajout de DEA NONOate, qui est stocké dans une solution de NaOH 2 M. Par conséquent, nous avons augmenté la concentration de HEPES à 100 mM et avons répété les mêmes expériences qui avaient été réalisées avec 20 mM de HEPES (Figure 3.12).

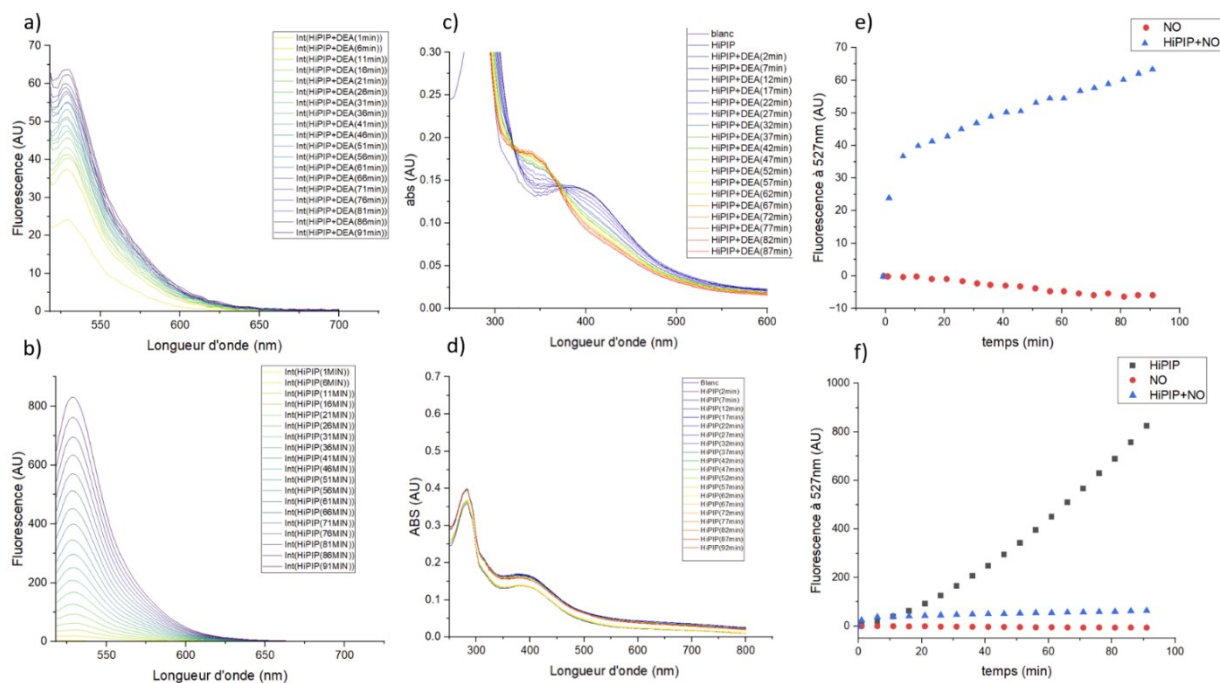


Figure 3.12 Suivi de l'évolution du H₂S généré par la nitrosylation de [4Fe-4S] AvHiPIP pendant 90min, a) Émission de fluorescence (excitation à 498 nm) lorsque la HiPIP est exposée au NO en présence de SF7-AM, b) Émission de fluorescence (excitation à 498 nm) lorsque la HiPIP est seul en présence de SF7-AM, c) Absorbance : diminution de la bande [4Fe-4S] montre la perte de cluster due à la nitrosylation, l'augmentation de la bande d'absorbance vers 360nm montre qu'il y a formation d'un autre produit même à la présence de SF7-AM, d) absorbance de HiPIP [4Fe-4S] seul à la présence de SF7-AM, e) comparaison directe de réponses d'émission de fluorescence de SF7-AM (excitation à 498 nm) pour HiPIP + NO par rapport à celles pour le NO seul f) réponses d'émission de fluorescence de SF7-AM (excitation à 498 nm) pour HiPIP + NO par rapport à celles pour le NO seul ou la HiPIP seule, corrigées pour la fluorescence de base de SF7-AM et normalisées pour [SF7-AM]

Les résultats obtenus après avoir modifié la concentration de HEPES présentent des différences significatives par rapport à nos observations précédentes. Comme illustré dans la Figure 3.12, a, lorsque nous avons augmenté la concentration de HEPES, l'intensité de fluorescence de SF7-AM lors de la réaction du HiPIP [4Fe-4S] avec le NO a augmenté avec le temps, atteignant jusqu'à 65 unités arbitraires (UA) après 91 minutes. En revanche, dans le même tampon avec une concentration de 20 mM de HEPES, nous avons observé une intensité d'environ 300 UA pendant une durée de 30 minutes. Cependant, lorsque le HiPIP était seul et en présence de SF7-AM dans le HEPES 100 mM, l'intensité de fluorescence a augmenté de manière inhabituelle jusqu'à 820 UA après 91 minutes, ce qui n'est pas conforme aux attentes (Figure 3.12, b). En comparaison, dans le HEPES 20 mM, l'intensité de fluorescence n'a pas dépassé 110 UA pendant 30 minutes (Figure 3.11, d).

En ce qui concerne l'absorbance, lors du suivi de la réaction du HiPIP [4Fe-4S] avec le NO dans le HEPES 100 mM en présence de SF7-AM, nous avons observé une réaction normale. Après l'ajout de DEA NONOate, une diminution de l'absorbance de HiPIP a été observée, tandis qu'une autre bande a commencé à se former vers 360 nm (Figure 3.12, c). En revanche, dans le HEPES 20 mM, nous n'avons pas pu obtenir une réaction complète (Figure 3.11, a), ce qui confirme que le SF7-AM n'affecte pas la nitrosylation du cluster [4Fe-4S]. Il semble simplement nécessaire d'effectuer la réaction dans un tampon à concentration élevée pour assurer la libération des molécules d'oxyde nitrique au fil du temps.

La Figure 3.12, e présente une comparaison directe de l'intensité de fluorescence de SF7-AM lors de la réaction du HiPIP avec le NO par rapport au NO seul. Il est clairement visible qu'il y a une augmentation de l'intensité de fluorescence sur une période de 91 minutes. En revanche, dans la même durée, une diminution de l'intensité de fluorescence a été observée lorsque le DEA NONOate était seul dans la solution de HEPES 100 mM. Cependant, une augmentation anormale de l'intensité de fluorescence jusqu'à 820 UA après 91 minutes a été observée lorsque le HiPIP était seul, comparativement à 65 UA après 91 minutes pour le HiPIP en présence de NO, tandis que le NO seul affichait -5 UA après la même durée de temps (Figure 3.12, f).

Les résultats obtenus nous ont poussé de refaire l'expérience plusieurs fois avec plus de précaution pour confirmer les résultats obtenus et pour éviter toute sorte de doute, et malheureusement les résultats ils sont reproductibles. Ainsi que le pH du milieu de la réaction a été vérifié à la fin de la réaction, et est resté constant à 7,4. De plus toutes les données obtenues dans la figure 3.12 ont été obtenues en conservant les mêmes conditions expérimentales et ont été normalisées par rapport à SF7-AM.

Conclusion

Les clusters de fer et de soufre [Fe-S] sont omniprésents dans les systèmes biologiques et jouent un rôle essentiel dans de nombreuses réactions biochimiques, notamment le transfert d'électrons, l'activation et la catalyse de substrats, ainsi que la réduction du stress oxydatif et nitrosatif.

Pour étudier la réactivité des clusters [Fe-S] face au monoxyde d'azote (NO), les chercheurs ont adopté deux principales approches. D'une part, ils ont utilisé des clusters [Fe-S] liés aux protéines pour examiner leur réactivité dans leur environnement naturel. D'autre part, ils ont employé des clusters [Fe-S] synthétiques en tant que modèles pour faciliter l'étude de leur réactivité chimique et pour comprendre les mécanismes impliqués.

Dans ce projet, notre objectif était d'analyser la réactivité des clusters [4Fe-4S] vis-à-vis du NO dans leur contexte naturel. Pour ce faire, nous avons réussi à produire de manière efficace une protéine HiPIP avec un cluster [4Fe-4S], présentant une concentration élevée et une pureté élevée. Ensuite, nous avons déterminé leurs coefficients d'extinction et avons confirmé la masse réelle de la protéine HiPIP [4Fe-4S].

Par la suite, nous avons suivi la réaction de la protéine HiPIP [4Fe-4S] avec le NO principalement grâce à la spectroscopie UV-Visible. Nous avons utilisé différentes sources susceptibles de libérer des molécules d'oxyde nitrique au fil du temps, notamment le DEA NONOate, le Proli NONOate et le DPTA NONOate, afin de déterminer la meilleure source de NO. Cependant, nous n'avons pas réussi à suivre la réaction de la protéine HiPIP [4Fe-4S] avec les dérivés du NO, tels que le NO^- et le NO^+ , en raison de l'absorbance élevée des molécules libérant ces dérivés, à savoir le SNAP et l'Angeli's Salt.

Nous avons également utilisé deux sondes fluorescentes, C-7Az et SF7-AM, pour détecter la libération de H_2S au cours de la réaction de la protéine HiPIP [4Fe-4S] avec le NO. Les deux sondes,

basées sur les azides, montrent une augmentation quantitative de la fluorescence lorsque la forme azide non fluorescente du capteur est convertie en une forme amine.

Nous avons initialement testé la réaction de HiPIP [4Fe-4S] avec le NO en utilisant C-7Az dans un tampon de tris + glycérol, mais nous n'avons pas observé d'augmentation significative de l'intensité de fluorescence au fil du temps. Cependant, après une réaction prolongée pendant toute une nuit, nous avons remarqué une légère augmentation de l'intensité de fluorescence.

Nous avons ensuite utilisé SF7-AM comme sonde pour détecter la libération de H₂S pendant la réaction de HiPIP avec le NO, en utilisant des tampons HEPES avec des concentrations de 20 mM et 100 mM. Dans le tampon HEPES 20 mM, nous avons obtenu une intensité de fluorescence atteignant 250 UA pendant la réaction de HiPIP avec SF7-AM sur une période de 30 minutes, alors que l'intensité de fluorescence n'a pas dépassé 150 UA pour HiPIP seul ou NO seul. Cependant, des résultats surprenants ont été obtenus lorsque les mêmes expériences ont été répétées dans un tampon HEPES avec une concentration de 100 mM. Dans ce cas, l'intensité de fluorescence n'a pas dépassé 65 UA pendant la réaction de HiPIP avec le NO sur une période de 91 minutes, tandis que l'intensité de fluorescence de HiPIP seul a dépassé 800 UA.

Perspectives

Plusieurs essais ont été entrepris pour détecter la libération de H₂S pendant la réaction du HiPIP [4Fe-4S] avec le NO. Malheureusement, la sonde C-7Az n'a pas produit les résultats escomptés, car aucune augmentation n'a été observée au fil du temps, et une réponse fluorescente nécessitait une attente toute la nuit.

De plus, la sonde SF7-AM n'a pas non plus fourni les résultats attendus lors de la nitrosylation du HiPIP [4Fe-4S]. Pour améliorer cette situation, notre plan pour l'avenir consiste à utiliser une autre sonde synthétisée dans notre labo, caractérisé par une grande sélectivité envers la molécule de H₂S et capable de fournir une réponse fluorescente élevée même en présence de faibles concentrations de H₂S. Nous envisageons également d'utiliser d'autres tampons pour éviter les problèmes rencontrés lors de l'augmentation de la concentration de HEPES à 100 mM.

De plus, nous prévoyons de tester la libération de H₂S lors de la réaction du HiPIP avec le NO en utilisant d'autres sources de libération de NO. En outre, nous envisageons d'utiliser d'autres techniques spectroscopiques telles que l'infrarouge et la résonance paramagnétique électronique (RPE) pour suivre la réaction du HiPIP avec le NO et ses dérivés. Cela nous permettra d'obtenir davantage d'informations sur les produits de la nitrosylation du HiPIP [4Fe-4S].

1. Read, A. D.; Bentley, R. E.; Archer, S. L.; Dunham-Snary, K. J., Mitochondrial iron-sulfur clusters: Structure, function, and an emerging role in vascular biology. *Redox biology* **2021**, *47*, 102164.
2. American Society for Cell, B. Molecular biology of the cell 1992. WorldCat.org.
3. Iwasaki, T.; Isogai, Y.; Iizuka, T.; Oshima, T., Sulredoxin: a novel iron-sulfur protein of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus* sp. strain 7 with a Rieske-type [2Fe-2S] center. *Journal of bacteriology* **1995**, *177* (9), 2576-2582.
4. Kolling, D. J.; Brunzelle, J. S.; Lhee, S.; Crofts, A. R.; Nair, S. K., Atomic Resolution Structures of Rieske Iron-Sulfur Protein: Role of Hydrogen Bonds in Tuning the Redox Potential of Iron-Sulfur Clusters. *Structure* **2007**, *15* (1), 29-38.
5. Holm, R. H.; Lo, W., Structural Conversions of Synthetic and Protein-Bound Iron-Sulfur Clusters. *Chemical reviews* **2016**, *116* (22), 13685-13713.
6. Lin, S.; Cronan, J. E., Closing in on complete pathways of biotin biosynthesis. *Molecular Biosystems* **2011**, *7* (6), 1811-1821.
7. Knoell, H.-E.; Knappe, J., Escherichia coli Ferredoxin, an Iron-Sulfur Protein of the Adrenodoxin Type. *European Journal of Biochemistry* **1974**, *50* (1), 245-252.
8. Ali, M. E.; Nair, N. N.; Retegan, M.; Neese, F.; Staemmler, V.; Marx, D., The iron-sulfur core in Rieske proteins is not symmetric. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **2014**, *19* (8), 1287-93.
9. Watanabe, S.; Kita, A.; Kobayashi, K.; Miki, K., Crystal structure of the [2Fe-2S] oxidative-stress sensor SoxR bound to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105* (11), 4121-4126.
10. Gomes, C. u. M.; Wittung-Stafshede, P., Protein folding and metal ions : mechanisms, biology and disease. CRC Press: Boca Raton, FL, 2011.
11. Jones, K.; Gomes, C. u. M.; Huber, H.; Teixeira, M.; Wittung-Stafshede, P., Formation of a linear [3Fe-4S] cluster in a seven-iron ferredoxin triggered by polypeptide unfolding. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2002**, *7* (4-5), 357-362.
12. Vignais, P. M.; Billoud, B., Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview. *ChemInform* **2007**, *38* (50).
13. Vignais, P. M.; Billoud, B., Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview. *Chemical reviews*. **2007**, *107* (10), 4206.
14. Ogata, H.; Hirota, S.; Nakahara, A.; Komori, H.; Shibata, N.; Kato, T.; Kano, K.; Higuchi, Y., Activation process of [NiFe] hydrogenase elucidated by high-resolution X-ray analyses: conversion of the ready to the unready state. *Structure (London, England : 1993)* **2005**, *13* (11), 1635-42.
15. wikipedia NADH déshydrogénase.
https://fr.wikipedia.org/wiki/NADH_d%C3%A9shydrog%C3%A9nase.
16. Baudin, B., Oligoéléments cofacteurs enzymatiques Oligo-elements as enzyme cofactors. *sciencedirect* **June 2021**, *2021* (533), 18-24.
17. Seefeldt, L. C.; Hoffman, B. M.; Peters, J. W.; Raugei, S.; Beratan, D. N.; Antony, E.; Dean, D. R.; Marquette Univ, M. W. I., Energy Transduction in Nitrogenase. *Accounts of Chemical Research* **2018**, *51* (9).
18. Ohnishi, S. T.; Salerno, J. C.; Ohnishi, T., Possible roles of two quinone molecules in direct and indirect proton pumps of bovine heart NADH-quinone oxidoreductase (complex I). *BBA - Bioenergetics* **2010**, *1797* (12), 1891-1893.
19. Shima, S.; Pilak, O.; Vogt, S.; Schick, M.; Stagni, M. S.; Meyer-Klaucke, W.; Warkentin, E.; Thauer, R. K.; Ermler, U., The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site. *Science (New York, N.Y.)* **2008**, *321* (5888), 572-5.

20. Lloyd, S. J.; Lauble, H.; Prasad, G. S.; Stout, C. D., The mechanism of aconitase: 1.8 Å resolution crystal structure of the S642A:citrate complex. *Protein Science* **1999**, *8* (12), 2655-2662.
21. Robbins, A. H.; Stout, C. D., Structure of Activated Aconitase: Formation of the [4Fe-4S] Cluster in the Crystal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, *86* (10), 3639-3643.
22. Flint, D. H.; Smyk-Randall, E.; Tuminello, J. F.; Draczynska-Lusiak, B.; Brown, O. R., The inactivation of dihydroxy-acid dehydratase in *Escherichia coli* treated with hyperbaric oxygen occurs because of the destruction of its Fe-S cluster, but the enzyme remains in the cell in a form that can be reactivated. *The Journal of biological chemistry* **1993**, *268* (34), 25547-52.
23. Castro, L.; Tórtora, V.; Mansilla, S.; Radi, R., Aconitases: Non-redox Iron-Sulfur Proteins Sensitive to Reactive Species. *Accounts of chemical research* **2019**, *52* (9), 2609-2619.
24. Culotta, E.; Koshland, D. E., Jr., NO news is good news. *Science (New York, N.Y.)* **1992**, *258* (5090), 1862-5.
25. MacMicking, J.; Xie, Q. W.; Nathan, C., Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology* **1997**, *15*, 323-50.
26. Steinert, J. R.; Chernova, T.; Forsythe, I. D., Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **2010**, *16* (4), 435-52.
27. Radi, R., Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101* (12), 4003-8.
28. Kommineni, S.; Yukl, E.; Hayashi, T.; Delepine, J.; Geng, H.; Moënné-Loccoz, P.; Nakano, M. M., Nitric oxide-sensitive and -insensitive interaction of *Bacillus subtilis* NsrR with a ResDE-controlled promoter. *Molecular Microbiology* **2010**, *78* (5), 1280-1293.
29. Crack, J. C.; Le Brun, N. E., Redox-Sensing Iron-Sulfur Cluster Regulators. *Antioxidants & redox signaling* **2018**, *29* (18), 1809-1829.
30. Drapier, J.-C., Interplay between NO and [Fe-S] Clusters: Relevance to Biological Systems. *Methods* **1997**, *11* (3), 319-329.
31. Crack, J. C.; Smith, L. J.; Stapleton, M. R.; Peck, J.; Watmough, N. J.; Buttner, M. J.; Buxton, R. S.; Green, J.; Oganessian, V. S.; Thomson, A. J.; Le Brun, N. E., Mechanistic insight into the nitrosylation of the [4Fe-4S] cluster of WhiB-like proteins. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (4), 1112-21.
32. Victor, E.; Lippard, S. J., A tetranitrosyl [4Fe-4S] cluster forms en route to Roussin's black anion: nitric oxide reactivity of [Fe₄S₄(LS₃)L']²⁻. *Inorganic chemistry* **2014**, *53* (10), 5311-20.
33. Foster, M. W.; Cowan, J. A., Chemistry of Nitric Oxide with Protein-Bound Iron Sulfur Centers. Insights on Physiological Reactivity. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (17), 4093-4100.
34. Commoner, B.; Ternberg, J. L., Free Radicals in Surviving Tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1961**, *47* (9), 1374-1384.
35. Woolum, J. C.; Tiezzi, E.; Commoner, B., Electron spin resonance of iron-nitric oxide complexes with amino acids, peptides and proteins. *BBA - Protein Structure* **1968**, *160* (3), 311-320.
36. Ding, H.; Demple, B., Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97* (10), 5146-50.
37. Yukl, E. T.; Elbaz, M. A.; Nakano, M. M.; Moënné-Loccoz, P., Transcription Factor NsrR from *Bacillus subtilis* Senses Nitric Oxide with a 4Fe-4S Cluster (†). *Biochemistry* **2008**, *47* (49), 13084-92.
38. Lu, T.-T.; Tsou, C.-C.; Huang, H.-W.; Hsu, I. J.; Chen, J.-M.; Kuo, T.-S.; Wang, Y.; Liaw, W.-F., Anionic Roussin's red esters (RREs) syn-/anti-[Fe(μ -SEt)(NO)₂]²⁻: the critical role of thiolate ligands in regulating the transformation of RREs into dinitrosyl iron complexes and the anionic RREs. *Inorganic chemistry* **2008**, *47* (13), 6040-50.

39. Tonzetich, Z. J.; Wang, H.; Mitra, D.; Tinberg, C. E.; Do, L. H.; Jenney, F. E., Jr.; Adams, M. W. W.; Cramer, S. P.; Lippard, S. J., Identification of protein-bound dinitrosyl iron complexes by nuclear resonance vibrational spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (20), 6914-6.
40. Massachusetts Institute of Technology. Department of, C.; Lippard, S. J.; Tinberg, C. E.; Tonzetich, Z. J.; Do, L. H.; Wang, H.; Yoda, Y.; Cramer, S. P., Characterization of Iron Dinitrosyl Species Formed in the Reaction of Nitric Oxide with a Biological Rieske Center. American Chemical Society: 2011.
41. Harrop, T. C.; Tonzetich, Z. J.; Reisner, E.; Lippard, S. J., Reactions of synthetic [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters with nitric oxide and nitrosothiols. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (46), 15602-10.
42. Chu, C. T.-W.; Dahl, L. F., Structural characterization of [AsPh₄]⁺[Fe₄(NO)₇(μ₃-S)₃]⁻. Stereochemical and bonding relationship of the Roussin black monoanion with the red ethyl ester, Fe₂(NO)₄(μ₂-SC₂H₅)₂, and Fe₄(NO)₄(μ₃-S)₄. *Inorganic Chemistry* **1977**, *16* (12), 3245-3251.
43. Grabarczyk, D. B.; Ash, P. A.; Vincent, K. A., Infrared spectroscopy provides insight into the role of dioxygen in the nitrosylation pathway of a [2Fe2S] cluster iron-sulfur protein. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (32), 11236-9.
44. Lin, Z. S.; Lo, F. C.; Li, C. H.; Chen, C. H.; Huang, W. N.; Hsu, I. J.; Lee, J. F.; Horng, J. C.; Liaw, W. F., Peptide-Bound Dinitrosyliron Complexes (DNICs) and Neutral/Reduced-Form Roussin's Red Esters (RREs/rRREs): Understanding Nitrosylation of [Fe-S] Clusters Leading to the Formation of DNICs and RREs Using a De Novo Design Strategy. *INORGANIC CHEMISTRY -AMERICAN CHEMICAL SOCIETY-* **2011**, *50* (20), 10417-10431.
45. Grabarczyk, D. B.; Ash, P. A.; Myers, W. K.; Dodd, E. L.; Vincent, K. A., Dioxygen controls the nitrosylation reactions of a protein-bound [4Fe4S] cluster. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)* **2019**, *48* (37), 13960-13970.
46. Tran, C. T.; Williard, P. G.; Kim, E., Nitric oxide reactivity of [2Fe-2S] clusters leading to H₂S generation. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (34), 11874-7.
47. Oakley, K. M.; Zhao, Z.; Lehane, R. L.; Ma, J.; Kim, E., Generation of H₂S from Thiol-Dependent NO Reactivity of Model [4Fe-4S] Cluster and Roussin's Black Anion. *Inorganic chemistry* **2021**, *60* (21), 15910-15917.
48. Chen, B.; Li, W.; Lv, C.; Zhao, M.; Jin, H.; Jin, H.; Du, J.; Zhang, L.; Tang, X., Fluorescent probe for highly selective and sensitive detection of hydrogen sulfide in living cells and cardiac tissues. *The Analyst* **2013**, *138* (3), 946-51.
49. Block, H.; Maertens, B.; Spriestersbach, A.; Brinker, N.; Kubicek, J.; Fabis, R.; Schafer, F.; Labahn, J., Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC). A Review. *Methods in Enzymology* **2009**, *463* (C), 439-473.
50. [https://www.mt.com/ca/fr/home/applications/Application Browse Laboratory Analytics/uv-vis-spectroscopy/uvvis-spectroscopy-explained.html](https://www.mt.com/ca/fr/home/applications/Application%20Browse%20Laboratory%20Analytics/uv-vis-spectroscopy/uvvis-spectroscopy-explained.html).
51. IMPLLEN uv-vis-spectrophotometer. <https://www.implen.de/uv-vis-spectrophotometer/>.
52. Sharma, A.; Schulman, S. G., *Introduction to fluorescence spectroscopy*. Wiley: New York, 1999.
53. Mongin, C. d.; Bibal, B.; Bassani, D.; Astruc, D.; Leray, I.; Université Bordeaux, I.; École doctorale des sciences, c.; Institut des Sciences, M. c. Synthèse et étude de cages moléculaires photo-modulables et génération de nano-cristaux d'or par photo-catalyse supramoléculaire. 2013.
54. PDB <https://www.rcsb.org/structure/1HIP>.
55. Agarwal; Tan, A.; Eren, J.; Tevelev, M.; Lui, A.; Cowan, S. M., Synthesis, Cloning and Expression of a Synthetic Gene for High Potential Iron Protein from *Chromatium vinosum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1993**, *197* (3), 1357-1362.
56. genscript <https://www.genscript.com/express-cloning-vector-list.html>.
57. Crack, J. C.; Green, J.; Thomson, A. J.; Le Brun, N. E., Techniques for the production, isolation, and analysis of iron-sulfur proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2014**, *1122*, 33-48.

58. Hirayama, T.; Nagasawa, H., Chemical tools for detecting Fe ions. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **2017**, *60* (1), 39-48.
59. Maragos, C. M.; Morley, D.; Wink, D. A.; Dunams, T. M.; Saavedra, J. E.; Hoffman, A.; Bove, A. A.; Isaac, L.; Hrabie, J. A.; Keefer, L. K., Complexes of .NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *Journal of medicinal chemistry* **1991**, *34* (11), 3242-7.
60. Hrabie, J. A.; Klose, J. R.; Wink, D. A.; Keefer, L. K., New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *Journal of Organic Chemistry; (United States)* **1993**, *58* (6), 1472-1476.
61. Roy, B.; du Moulinet d'Hardemare, A.; Fontecave, M., New Thionitrites: Synthesis, Stability, and Nitric Oxide Generation. *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59* (23), 7019-7026.
62. Saavedra, J. E.; Southan, G. J.; Davies, K. M.; Lundell, A.; Markou, C.; Hanson, S. R.; Adrie, C.; Hurford, W. E.; Zapol, W. M.; Keefer, L. K., Localizing antithrombotic and vasodilatory activity with a novel, ultrafast nitric oxide donor. *Journal of medicinal chemistry* **1996**, *39* (22), 4361-5.
63. Lippert, A. R., Designing reaction-based fluorescent probes for selective hydrogen sulfide detection. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2014**, *133*, 136-142.
64. Crack, J. C.; Stapleton, M. R.; Green, J.; Thomson, A. J.; Le Brun, N. E., Mechanism of [4Fe-4S](Cys)₄ cluster nitrosylation is conserved among NO-responsive regulators. *The Journal of biological chemistry* **2013**, *288* (16), 11492-502.
65. Crack, J. C.; Green, J.; Thomson, A. J.; Le Brun, N. E., Iron-sulfur clusters as biological sensors: the chemistry of reactions with molecular oxygen and nitric oxide. *Accounts of chemical research* **2014**, *47* (10), 3196-205.
66. Chen, B.; Lv, C.; Jin, H.; Zhang, L.; Tang, X.; Li, W.; Zhao, M.; Du, J., Fluorescent probe for highly selective and sensitive detection of hydrogen sulfide in living cells and cardiac tissues. *Analyst* **2013**, *138* (3), 946-951.
67. Lin, V. S.; Lippert, A. R.; Chang, C. J., Cell-trappable fluorescent probes for endogenous hydrogen sulfide signaling and imaging H₂O₂-dependent H₂S production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110* (18), 7131-7135.