

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

SYNTHÈSE DES SONDÉS FLUOROMÉTRIQUES POUR LA DÉTECTION DE
H₂S DANS DES MILIEUX BIOLOGIQUES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

À LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR

ASSALA KHALI

AOÛT 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.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de recherche en maîtrise, la professeure Erin Dodd, pour son encadrement exceptionnel, son accueil chaleureux, ses conseils précieux et son soutien constant tout au long de mon parcours académique. Sa confiance en moi et son engagement envers mon succès m'ont été d'un soutien inestimable. Je suis reconnaissante d'avoir eu la chance de travailler sous sa direction et de faire partie de son équipe. En plus de ses compétences scientifiques et de ses connaissances approfondies, je tiens à la remercier sincèrement pour sa patience, sa disponibilité, sa gentillesse et sa bienveillance. Ces qualités humaines ont rendu mon expérience de recherche enrichissante, agréable et motivante tout au long de ma maîtrise.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers toute l'équipe du laboratoire, en particulier mes collègues Ahmad Benhlima, Rebecca Zomblewou, Hichem Gamraoui et Nesrine Khitas, pour leur soutien, leurs encouragements, leurs aides et leurs conseils inestimables.

Je tiens à adresser un remerciement et une profonde gratitude à mes très chers parents, à qui je suis infiniment reconnaissant. Merci du fond du cœur, maman et papa, pour m'avoir toujours encouragé, et soutenu tout au long de mon parcours éducatif. J'aimerais également adresser un grand merci à ma famille, mes sœurs : Romaissa, Naila, Ilhem, Niama et mon frère Mohamed Aymen. Mes beaux-frères : Fadel, Juba, Samir et Imed. Mes nièces et neveux ainsi que tous mes proches. Enfin, je tiens à remercier mes amies Soumia Kasdi, Hanaa Benyerbah et spécialement Djamilia Toubal-Seghir d'avoir toujours été présentes à mes côtés et particulièrement durant les moments les plus difficiles.

DÉDICACE

A mes chers parents : Fatiha Ighoudane et Khali Abdessamir

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	x
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS.....	xii
RÉSUMÉ.....	xiv
ABSTRACT	xv
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	16
1.1 Le sulfure d'hydrogène	16
1.2 Les protéines Fer-Soufre.....	19
1.2.1 Généralités	19
1.2.2 La structure [2Fe-2S]	20
1.2.3 La structure [3Fe-4S]	21
1.2.4 La structure [4Fe-4S]	21
1.2.5 La molécule de l'oxyde nitrique (NO)	22
1.2.6 L'interaction entre l'amas [FeS] et NO comme source potentielle de H ₂ S biologique.....	22
1.3 Les sondes fluorescentes:.....	25
1.3.1 Généralité.....	25
1.3.2 Type de sondes fluorescentes.....	30
1.3.3 Mécanisme de réduction de l'azide en amine par une sonde fluorescente pour la détection du H ₂ S	32
1.4 Les techniques utilisées.....	35
1.4.1 La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	35
1.4.2 Chromatographie liquide rapide des protéines.....	37
1.4.3 La Spectroscopie UV-Visible	39
1.4.4 La Spectroscopie de fluorescence	42
Objectif.....	45
CHAPITRE 2 DÉVELOPPEMENT D'UN PROTOCOLE POUR LA CONCEPTION, SYNTHÈSE ET ÉVALUATION DES SULFUREFLUORES DE NOUVELLE GÉNÉRATION SF ₄ ET SF ₅ /SF ₆	47
2.1 Introduction.....	47
2.2 Partie expérimentale.....	49

2.2.1	Préparation de carboxyrhodamine 3',6'-Diamino-3-Oxo-3H-Spiro [Isobenzofuran1,9' Xanthene] n-Carboxylic Acid, n=5,6 (CR) pour la synthèse de SF5/SF6	50
2.2.2	Conception et synthèse de sulfurefluore de nouvelle génération SF4 avec une rhodamine commerciale	50
2.2.3	Conception et synthèse de Rhodamine 110 [3,6-Diamino-9-(2-carboxyphenyl)xanthenium chloride]	51
2.2.4	Élaboration et synthèse d'une sonde SF4 à base de rhodamine préparée.....	51
2.3	Résultats et discussion.....	52
2.3.1	Comparaison du spectre RMN ¹ H avec celui de la littérature pour l'intermédiaire carboxyrhodamine dans la synthèse de SF5/SF6	52
2.3.2	Comparaison du spectre RMN ¹ H de notre produit obtenu avec celui de la littérature pour la synthèse de la sonde SF4.....	59
2.3.3	Résultats de synthèse de la sonde SF4 avec la Rhodamine 110 de la section 2.2.3.....	62
2.3.4	Évaluation comparative de la synthèse de SF4 avec une rhodamine 110 préparé et commercialisé	66
CHAPITRE 3 DÉTERMINATION DE L'UTILITÉ DE LA SONDE SF4 PAR DES MESURES D'ABSORBANCE ET DE FLUORESCENCE EN PRÉSENCE DE NaSH ET D'UN MODÈLE DE PROTÉINE CONTENANT UN CLUSTER [4Fe-4S].....		68
3.1	Introduction.....	68
3.2	Matériel et méthodes	69
3.2.1	Évaluation de la libération de H ₂ S par la sonde SF4 en présence d'une source directe de H ₂ S (NaSH) et d'un modèle protéique FeS.....	69
3.2.2	Évaluation de la sonde SF4 avec un modèle de protéines contenant un cluster [4Fe-4S]	70
3.3	Résultats et discussion.....	76
3.3.1	Mesure de fluorescence et d'absorbance de la sonde SF4 en présence de NaSH.....	76
3.3.2	Comparaison des spectres d'intensité de fluorescence entre nos résultats et ceux de Chang <i>et al.</i> pour la sonde SF4 en présence de NaSH.....	79
3.3.3	Évaluation comparative des spectres de fluorescence et d'absorbance de la sonde SF4 en présence de NaSH : validation des résultats avec la rhodamine commerciale et synthétisée	83
3.3.4	Analyse des résultats de purification de la protéine HiPIP	85
3.3.5	Analyse de mesure d'interaction dans un milieu qui contient HiPIP et NO en présence de la sonde SF4	86
3.3.6	Comparaison de notre sonde SF4 avec la sonde commerciale de SF7-AM	92
CONCLUSION		96
PERSPECTIVES		99
ANNEXE LES SPECTRES RMN ENTIÈRE DE MES EXPÉRIENCES		100
RÉFÉRENCES		106

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Illustration des divers types de clusters fer-soufre présents en biologie : clusters [2Fe-2S], [3Fe-4S] et [4Fe-4S].	20
Figure 1.2 Amas FeS avec divers complexes nitrosyl FeS : DNIC (Dinitrosyl Iron Complex), MNIC (complexes nitrosyles de Fer mononucléaires), RRE (Roussin's Red Ester) /rRRE (Roussin's Red Ester réduit), RBS (Roussin's Black Salt). ⁴⁴	24
Figure 1.3 Différentes sondes fluorescentes basées sur la réduction de l'azide. ⁶⁵	29
Figure 1.4 Imagerie en temps réel du H ₂ S endogène produit dans les cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale pendant une stimulation avec le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), utilisant la sonde fluorescente SF7-AM. ⁴	31
Figure 1.5 Schéma d'interactions moléculaires et étapes du mécanisme de réduction du C7-Az par le H ₂ S. ⁷⁰	33
Figure 1.6 Schéma du mécanisme de réduction de la sonde SF4 par le H ₂ S : Interactions moléculaires et étapes du processus.	34
Figure 1.7 Composants d'un système FPLC. ⁷⁹	37
Figure 1.8 Modèles d'interactions entre les résidus d'histidine (His-tag) et l'ion métallique Ni ²⁺ . ⁸¹	39
Figure 1.9 Schéma de la configuration optique d'un spectrophotomètre UV/Vis. ⁸⁸	42
Figure 1.10 Diagramme de Jablonski-Perrin. ⁹¹	43
Figure 2.1 Conception et synthèse de sondes piégeables (SF4-SF5-SF6) pour la détection de H ₂ S. ⁴	47
Figure 2.2 (A) spectre de prédiction RMN ¹ H de carboxy-rhodamine (400 MHz, DMSO-d6) (B) Spectres RMN ¹ H de notre produit obtenu (300 MHz, DMSO-d6).	55
Figure 2.3 Analyse CCM des produits de la réaction du 1,3-aminophénol et du l'anhydride trimellitique : Comparaison des produits obtenus de l'expérience 1 (P1) et de l'expérience 2 (P2) avec éluant 5:2 (EtOAc/MeOH) (tableau 2.1).	56
Figure 2.4 Spectres empilées RMN ¹ H des produits bruts obtenus pour les expériences (1-5) (300 MHz, DMSO-d6).	57
Figure 2.5 (A) Spectre empilées RMN ¹ H du produit brut obtenu de l'expérience 2 Avec (B) Spectre RMN ¹ H de la fraction purifié (300 MHz, DMSO-d6).	58
Figure 2.6 Comparaison de spectre RMN ¹ H (A) de la littérature RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de la sonde SF4 avec un spectre RMN ¹ H (B) de produit purifié (300 MHz, CDCl ₃). ⁶⁸	60

Figure 2.7 Plaque CCM de produit obtenu après la synthèse de la sonde SF4 avec un éluant (1:1 Hex: EtOAc).....	61
Figure 2.8 Spectre RMN ¹ H de produit purifié (SF4) (300 MHz, CDCl ₃).....	63
Figure 2.9 Spectre RMN ¹³ C de produit purifié (300 MHz, CDCl ₃).....	64
Figure 2.10 (A) Spectre empilé de RMN ¹ H du produit purifié (SF4) en utilisant une rhodamine commerciale comme réactif (300 MHz, CDCl ₃). (B) Spectre empilé de RMN ¹ H de la fraction purifiée (SF4) en utilisant une rhodamine préparée comme réactif (300 MHz, CDCl ₃).....	67
Figure 3.1 Structure de la protéine à haut potentiel rédox d' <i>Allochromatium vinosum</i> contenant un cluster [4Fe-4S]. ⁹⁵	70
Figure 3.2 Interaction entre la sonde SF4 et une source directe de H ₂ S (NaSH).	76
Figure 3.3 Mesure d'intensité de fluorescence de la sonde SF4 en présence de 100 μM NaSH (spectre A) et mesure d'absorbance de la sonde SF4 en présence de NaSH (spectre B).	77
Figure 3.4 Comparaison des intensités de fluorescence de la sonde SF4 seule (spectre B) et en présence de NaSH (spectre A) sur une plage de temps de 5 à 40 minutes, accompagnée de la mesure d'absorbance de la sonde SF4 seule (spectre C). Un graphe comparatif des intensités de fluorescence de la sonde SF4 seule et en présence de NaSH à une longueur d'onde maximale de 520,5 nm (spectre D).	78
Figure 3.5 (A) Spectre d'intensité de fluorescence pour la sonde SF4 de groupe de Chang et al. en présence de NaSH, (B) Spectre d'intensité de fluorescence pour notre sonde SF4 en présence de NaSH, (C) Un graphe d'intensité de fluorescence de la sonde SF4 en présence de Na ₂ S de groupe de Chang et al. ⁴ (D) Un graphe comparatif des intensités de fluorescence de la sonde SF4 seule et en présence de NaSH à une longueur d'onde maximale de 520,5 nm.	79
Figure 3.6 (A) Spectre d'intensité de fluorescence de la sonde SF4 avec une rhodamine commercialisée en présence de NaSH (λ _{max} = 520,5 nm). (B) Spectre d'absorbance de la sonde SF4 avec une rhodamine commercialisée en présence de NaSH. (C) Spectre d'intensité de fluorescence de la sonde SF4 avec une rhodamine synthétisée en présence de NaSH, (λ _{max} = 520,5 nm). (D) Spectre d'absorbance de la sonde SF4 avec une rhodamine synthétisée en présence de NaSH.....	83
Figure 3.7 (A) Spectre UV-Vis de l'AvHiPIP : λ _{max} = 384 nm après purification, dans un volume de 3 ml de tampon HEPES (100 mM, pH 7,4) avec l'ajout de 30 μl de HiPIP (7,2 mM), (B) Les colonnes de nickel lors de la purification d'HiPIP, (C) La coloration de la protéine HiPIP après concentration.....	85
Figure 3.8 Schéma de l'exposition de la sonde fluorescente SF4 au H ₂ S libéré lors de la réaction de nitrosylation des clusters FeS.	87
Figure 3.9 Comparaison des spectres d'intensités de fluorescence entre : (A) la sonde SF4 + HiPIP + DEANONOate, (D) la sonde SF4 seule, (G) la sonde SF4 + DEANONOate, (M) la sonde SF4 + HiPIP. Comparaison des mesures d'absorbance entre : (B) la sonde SF4 + HiPIP + DEANONOate, (E) la sonde SF4 seule, (K) la sonde SF4 + DEANONOate, (N) la sonde SF4 + HiPIP. Graphes d'intensités de fluorescence emission λ _{max} = 520,5 nm de : (C) la sonde SF4 + HiPIP + DEANONOate, (F) la sonde SF4 seule, (L) la sonde SF4 + DEANONOate, (O) la sonde SF4 + HiPIP.	89

Figure A.1 Spectres entière RMN ^1H de notre produit obtenu dans la synthèse de carboxyrhodamine (300 MHz, DMSO- d_6).....	100
Figure A.2 Spectres empilées entière RMN ^1H des produits bruts obtenus pour les expériences (1-5) (300 MHz, DMSO- d_6).....	101
Figure A.3 Spectre entière RMN ^1H du produit purifié (SF4) en utilisant une rhodamine commerciale comme réactif (300 MHz, CDCl_3).	102
Figure A.4 Spectre entière de RMN ^1H de la fraction purifiée (SF4) en utilisant une rhodamine préparée comme réactif (300 MHz, CDCl_3).	103
Figure A.5 Spectre complet RMN ^{13}C de produit purifié (300 MHz, CDCl_3).	104

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Les principales constantes de dissociation acide (pKa) du H ₂ S	18
Tableau 2.1 Modification des variables de Lin <i>et al.</i>	53
Tableau 3.1 Composition du gel d'électrophorèse	74

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

FeS	Les protéines fer-soufre
RMN	La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire
HiPIP	Protéine à Haut Potentiel Fer-Soufre (High Potential Iron Sulfur Protein)
NRVS	Spectroscopie vibrationnelle par résonance nucléaire
IR	Spectroscopie infrarouge
RBS	Sel noir de Roussin (Roussin's Black Salt)
RRE	Ester rouge de Roussin (Roussin's Red Ester)
CCM	La chromatographie sur colonne
CR	Carboxyrhodamine
SF4	Ester d'acétoxyméthyle du sulfidefluor-4 (Sulfidefluor-4 acetoxymethyl ester)
SF5	Ester d'acétoxyméthyle du sulfidefluor-5 (Sulfidefluor-5 acetoxymethyl ester)
SF6	Ester d'acétoxyméthyle du sulfidefluor-6 (Sulfidefluor-6 acetoxymethyl ester)
MNIC	Complexe intermédiaire de mononitrosyliron (Intermediate mononitrosyliron complex)
DNIC	Complexe mononucléaire de dinitrosyle de fer (Mononuclear dinitrosyl iron complex)
H ₂ S	Sulfure d'hydrogène
C7-Az	7-azido-4-méthylcoumarine
FPLC	Chromatographie liquide rapide des protéines (Fast Protein Liquid Chromatography)
LB	Milieu Luria-Bertani (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

%	Pourcentage
RPM	Rotation par minute
UA	Unité arbitraire
≈	Presque égal à
s	Seconde
min	Minute
h	Heure
C	Concentration
°C	Degré Celsius
M	mol/L
mM	Millimolaire (10^{-3} M)
μM	Micromolaire (10^{-6} M)
mg	Milligramme
nm	Nanomètre
kDa	Kilodalton
mmol	Millimole

μmol Micromole

L Litre

mL Millilitre

μL Microlitre

RÉSUMÉ

Le sulfure d'hydrogène (H_2S) est une petite molécule réactive produite naturellement dans le corps. Elle est cruciale dans la transmission des signaux cellulaires, de manière similaire au monoxyde de carbone (CO) et à l'oxyde nitrique (NO). L'étude de l'interaction entre les protéines fer-soufre et le sulfure d'hydrogène (H_2S) est un domaine de recherche crucial qui attire beaucoup d'attention. Les protéines fer-soufre (FeS) régulent les réponses cellulaires face au stress nitrosatif. En particulier, la nitrosylation des groupes [4Fe-4S] offre une possibilité de production de H_2S . Néanmoins, comprendre le mécanisme de cette réaction demeure un défi, et pose un problème, en raison de manque de techniques permettant de contrôler le suivi de flux de H_2S . Une méthode alternative consiste à utiliser des sondes fluorescentes spécifiques du H_2S , c'est-à-dire des molécules qui présentent une activation de fluorescence en présence de H_2S . Notre hypothèse que la production directe de H_2S en réponse à l'exposition nitrosatif avec les amas FeS établira un lien entre le NO et le H_2S , favorisant ainsi une compréhension accrue de leurs interactions en tant que molécules de signalisation cellulaire. Nous rapportons ici l'adaptation des protocoles de synthèse des sondes fluorogènes Sulfidefluor-4 (SF4), Sulfidefluor-5 (SF5) et Sulfidefluor-6 (SF6), caractérisées par leur forte spécificité pour le H_2S et un manque de réactivité envers le NO et les thiols. Les résultats de la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire ont été cruciaux pour déterminer la structure moléculaire des sondes. Après la synthèse et la préparation de la sonde fluorescente SF4, celle-ci a été employée pour surveiller le H_2S en présence de NaSH, en utilisant la spectroscopie de fluorescence. Simultanément, l'évolution de cette réaction a été suivie à l'aide de la spectroscopie UV-visible. Par la suite, la sonde a été mise en œuvre pour surveiller la production de H_2S lors de la nitrosylation de protéines [4Fe-4S] modèles de type HiPIP (Protéine à Haut Potentiel Fer-Soufre). Cette approche vise à approfondir notre compréhension des interactions entre ces deux molécules de signalisation.

Mots clés : Sondes fluorescentes, protéines, sulfure d'hydrogène, signalisation cellulaire, nitrosylation.

ABSTRACT

Hydrogen sulfide (H_2S) is a small, reactive substance produced naturally in the body. It is crucial in the transmission of cellular signals, in a similar way to carbon monoxide (CO) and nitric oxide (NO). The study of the interaction between iron-sulfur proteins and hydrogen sulfide (H_2S) is a crucial area of research that is attracting a great deal of attention. Iron-sulfur (FeS) proteins regulate cellular responses to nitrosative stress. In particular, the nitrosylation of [4Fe-4S] groups offer an opportunity for H_2S production. Nevertheless, understanding the mechanism of this reaction remains a challenge, and poses a problem, due to the lack of techniques to control H_2S flux tracking. An alternative method consists of using H_2S -specific fluorescent probes, these are molecules that are fluorescence-activated in the presence of H_2S . Our hypothesis that the direct production of H_2S in response to nitrosative stress with FeS clusters will establish a link between NO and H_2S , promoting a greater understanding of their interactions as cell signaling molecules. We report here the adaptation of protocols for the synthesis of the fluorogenic probes Sulfidefluor-4 (SF4), Sulfidefluor-5 (SF5) and Sulfidefluor-6 (SF6), characterized by their high specificity for H_2S and an absence of reactivity towards NO and thiols. The results of nuclear magnetic resonance spectrometry were crucial in determining the molecular structure of the probes. Once the SF4 fluorescent probe had been synthesized and prepared, it was used to detect H_2S in the presence of NaSH, using fluorescence spectroscopy. At the same time, the evolution of this reaction was monitored using UV-visible spectroscopy. Subsequently, the probe was also used to monitor H_2S production during nitrosylation of model HiPIP (High potential iron sulfur protein) [4Fe-4S] proteins. This approach will help our understanding of the interactions between these two signaling molecules.

Key words: fluorescent probes, proteins, hydrogen sulfide, cell signaling, nitrosylation.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Le sulfure d'hydrogène

Le H₂S, également connu sous le nom de sulfure d'hydrogène, est un gaz incolore qui dégage une odeur typique d'œuf pourri.¹ Il est considéré à la base comme un gaz toxique,² inflammable à haute concentration.³ Pour la première fois, en 17 ans de recherche. Abe et Kimura ont proposé le H₂S comme étant une molécule a rôle physiologique important dans le système nerveux.³ Cependant, cette substance réactive produite naturellement dans l'organisme, elle peut être nocive ou bénéfique en raison de son activité redox extrêmement élevée.⁴

Le sulfure d'hydrogène (H₂S) est reconnu pour sa toxicité à des concentrations élevées, induisant une gamme de problèmes de santé allant des troubles respiratoires aux altérations du système nerveux.⁵

Sa capacité à traverser passivement la membrane cellulaire lui permet de pénétrer diverses cellules sans nécessiter de mécanismes actifs, ce qui contribue à son effet généralisé et potentiellement dévastateur sur les fonctions biologiques et physiologiques.⁶ En conséquence, une exposition prolongée ou à des niveaux élevés de H₂S peut être associée à un large éventail de maladies, telles que la maladie de Parkinson⁷, d'Alzheimer⁸, le diabète⁹, le syndrome de Down¹⁰ et le cancer.¹¹ Le H₂S n'est pas seulement associé à des effets néfastes sur la santé, mais il joue également un rôle important dans certaines fonctions biologiques bénéfiques. Par exemple, à des concentrations appropriées, le H₂S peut agir comme un médiateur cellulaire, participant à la régulation de processus physiologiques tels que la relaxation vasculaire, la modulation de la neurotransmission et la régulation du métabolisme énergétique.³ En outre, le H₂S peut également jouer un rôle dans la signalisation cellulaire et la protection contre le stress cellulaire, ce qui en fait un sujet d'intérêt croissant dans la recherche actuellement, soulignant ainsi la nécessité d'études approfondies pour mieux comprendre le mécanisme de cette substance.⁴

Ainsi, l'exploration scientifique des propriétés chimiques du H₂S a commencé bien avant la reconnaissance de son importance biologique.³ Récemment, la substance de H₂S a été identifiée comme une importante molécule de signalisation gazeuse largement répandue dans l'organisme jouant un rôle crucial dans de nombreux processus physiologiques¹². Cette molécule est considérée comme un gazotransmetteur, classé collectivement avec l'oxyde nitrique (NO) et le monoxyde de carbone (CO).¹³ Actuellement, les trois forment ainsi une famille de médiateurs endogènes qui se distinguent par leur nature gazeuse.¹⁴ Le gazotransmetteur est une petite molécule instable produite dans l'organisme par des réactions enzymatiques et caractérisée par une demi-vie très brève, variant de quelques secondes à quelques minutes.¹⁴ Le H₂S se distingue des autres gazotransmetteurs par sa structure tridimensionnelle non linéaire et sa réactivité chimique particulière.¹⁴ Ces caractéristiques lui confèrent des propriétés physico-chimiques uniques et lui permettent d'interagir avec des cibles biologiques spécifiques.¹⁴ Afin de contrôler les processus de la molécule H₂S de manière complexe et interdépendante, il est fréquemment associé à d'autres molécules de signalisation, comme l'oxyde nitrique (NO) et le monoxyde de carbone (CO). Le H₂S s'est avéré être un agent protecteur efficace contre le stress oxydatif dans une variété de contextes physiologiques et pathologiques, ouvrant ainsi la voie à des applications thérapeutiques prometteuses.¹⁵

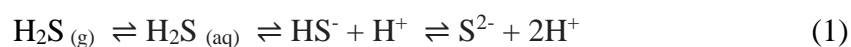
Dans les tissus des mammifères, le H₂S peut être produit et circuler librement à travers la membrane cellulaire, entraînant de nombreux effets biologiques sur différents systèmes.¹⁶ À l'intérieur des cellules, le H₂S peut interagir avec différentes molécules cibles, telles que des protéines, des enzymes et des ions, déclenchant ainsi une série de réactions biochimiques qui modulent divers processus cellulaires et physiologiques. Ces interactions contribuent à la diversité et à la complexité des effets de la signalisation du H₂S.

Malgré ses effets bénéfiques, le mécanisme d'action précis du H₂S reste sujet à débat, soulignant ainsi la nécessité d'une étude approfondie des mécanismes de signalisation cellulaire favorisant la survie et la protection des organes.¹⁵ Il est impliqué dans de nombreux processus biologiques, notamment les fonctions cardiovasculaires,¹⁷⁻¹⁸ circulatoires,¹⁹ anti-inflammatoires²⁰ et gastro-intestinales,²¹ ainsi que le système nerveux central²² et la réponse immunitaire.²³ Étant donné que le sulfure d'hydrogène est l'un des gaz naturels les plus abondants dans le corps humain, après

l'oxyde nitrique (NO) et le monoxyde de carbone (CO),^{16, 24} son influence sur la production et la régulation des enzymes dans l'organisme est considérable.²⁵

De la même manière que pour le NO et le CO, l'identification des enzymes biosynthétiques constitue maintenant une fondation solide pour comprendre comment le H₂S est produit, envoie des signaux aux cibles intracellulaires et influence différents processus physiologiques.²⁶ Il a été prouvé que le H₂S transmet un signal par un mécanisme similaire à celui de la nitrosylation, où il se lie de manière covalente avec le SH des cystéines formant ainsi le SSH. Un processus connu sous le nom de sulfhydratation.^{26, 27}

Le H₂S est soluble dans l'eau, avec des valeurs de solubilité d'environ 80 mM à 37 °C,²⁸ 100 mM à 25 °C, 122 mM à 20 °C.²⁹ Ces variations sont dues aux conditions expérimentales telles que la température, la pression et la composition de la solution.³ L'hydrogène sulfuré (H₂S) est un acide faible qui se dissocie selon l'équilibre de la réaction (1) :²⁹



H₂S est la forme moléculaire neutre non dissociée, HS⁻ est l'ion hydrosulfure, représentant la forme monoanionique, S²⁻ est l'ion sulfure, représentant la forme dianionique. L'équilibre de dissociation du H₂S varie en fonction du pH du milieu.³ À un pH neutre, l'ion hydrosulfure (HS⁻) est la forme principale présente, tandis qu'une faible proportion de H₂S moléculaire et d'ion sulfure (S²⁻) sont également présents.

Tableau 1.1 Les principales constantes de dissociation acide (pKa) du H₂S

	Équations	pKa	Température
1	$\text{H}_2\text{S} \rightleftharpoons \text{HS}^- + \text{H}^+$	6,98	25°C
2	$\text{HS}^- \rightleftharpoons \text{S}^{2-} + \text{H}^+$	19	25°C

Les principales caractéristiques du H₂S résident dans ses constantes de dissociation acide (pKa) : le pKa1 pour la première dissociation (Tableau 1.1), tandis que le pKa2 pour la seconde dissociation (Tableau 1.1). À un pH physiologique (pH 7,4), environ 72% du H₂S est présent sous forme d'ion hydrosulfure (HS⁻), tandis que 28% existent sous forme moléculaire (H₂S).³ La présence de la forme dianionique (S²⁻) est minime dans les solutions aqueuses à pH physiologique en raison de son pKa2 très élevé. Il est important de noter que les valeurs de pKa peuvent subir de légères variations selon la température et la composition du milieu.²⁹ Ces informations sont essentielles pour comprendre la spécificité et le comportement du H₂S dans les systèmes

biologiques et environnementaux.³ Étant donné que le sulfure d'hydrogène (H_2S) occupe une place significative dans les systèmes biologiques en agissant comme un gazotransmetteur et il joue aussi un rôle crucial dans la régulation de divers processus biologiques. Par conséquent, la relation entre la molécule H_2S et les protéines fer-soufre représente un domaine de recherche très important. Les protéines contenant des centres [FeS] sont des métalloprotéines cruciales pour de nombreux processus biologiques, tels que le transport d'électrons, les réactions d'oxydo-réduction et la régulation de l'expression génique.³⁰

Il est remarquable de constater que le H_2S partage des fonctions biologiques associées à celles du NO, ce qui suggère la possibilité de mécanismes de crosstalk entre ces gazotransmetteurs.³¹ En effet, H_2S , en tant que substance de signalisation gazeuse, peut être produite par l'interaction entre les amas de FeS et du monoxyde d'azote (NO).³¹ Cependant, la compréhension de cette interaction reste inconnue jusqu'à nos jours. D'après les recherches du groupe de Kim,³¹ les clusters fer-soufre interviennent dans la signalisation redox en créant un lien entre deux gazotransmetteurs essentiels, à savoir le NO et le H_2S .³¹ Des avancées récentes dans la conception des sondes fluorogènes, hautement spécifiques, quantifiables et localisées pour le H_2S . Ces dernières ont conduit à des molécules prometteuses pour l'étude de la production de H_2S à partir de la réactivité de la protéine FeS à des concentrations biologiquement pertinentes.⁴ Dans le but de mieux comprendre la formation du H_2S en contexte biologique, une série de sondes à base de diazidorhodamine sont synthétisées et étudiées.

1.2 Les protéines Fer-Soufre

1.2.1 Généralités

Les clusters fer soufre sont parmi les cofacteurs les plus répandus dans la nature. Ils représentent des ensembles atomiques présents dans les sites actifs des protéines contenant du fer et du soufre. Ces ensembles comprennent des cations de fer ($Fe^{2+/3+}$) et des anions sulfures (S^{2-}) organisés selon diverses structures tridimensionnelles.

Les protéines à clusters [FeS] jouent un rôle essentiel dans les systèmes biologiques et physiologiques, en particulier dans le transfert d'électrons, comme c'est le cas pour les protéines hydrogénases Ni-Fe.³² De plus, ces clusters peuvent également agir en tant que catalyseurs, comme le cas avec l'aconitase, qui contient un groupe prosthétique [4Fe-4S]. Dans ce groupe, l'un des atomes de fer n'est pas rattaché à un résidu protéique et peut catalyser de manière réversible l'isomérisation du citrate en isocitrate.³³ De plus, les protéines contenant des clusters [FeS] sont impliquées dans la régulation du stress oxydatif et nitrosatif.^{34,35}

Les protéines contenant des clusters [FeS] sont généralement classées en trois types principaux de clusters : les clusters [2Fe-2S], [3Fe-4S] et [4Fe-4S] comme illustré dans la figure 1.1.³⁶

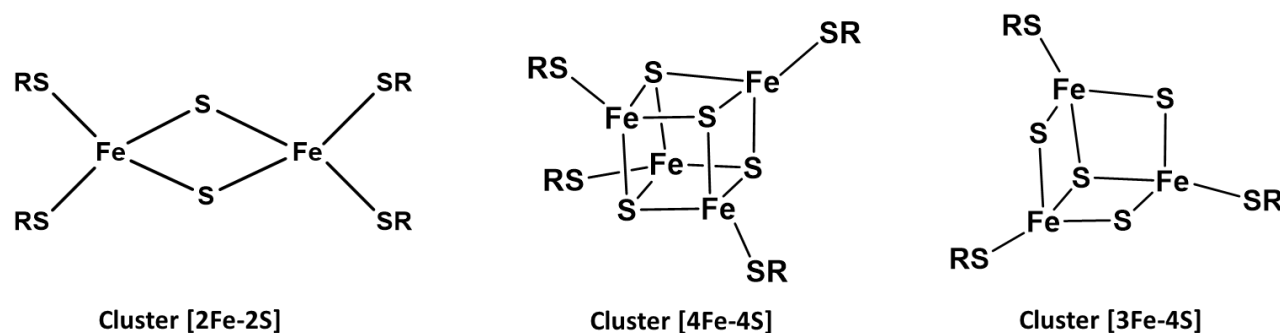


Figure 1.1 Illustration des divers types de clusters fer-soufre présents en biologie : clusters [2Fe-2S], [3Fe-4S] et [4Fe-4S].

1.2.2 La structure [2Fe-2S]

Les clusters [2Fe-2S] sont les plus élémentaires parmi les clusters [FeS]. En général, ils se composent de deux atomes de fer liés par deux atomes de soufre inorganique, et sont coordonnés à quatre résidus cystéine dans les ferrédoxines.³⁷ Cependant, il existe un cas particulier, celui des protéines Rieske ([2Fe-2S]^R), où l'un des atomes de fer est lié à un atome d'azote d'un résidu histidine.

Jusqu'à présent, leur fonction a été identifiée dans le transport d'électrons, le transfert de soufre et la détection. Ces clusters [FeS] sont sensibles à l'oxygène, au monoxyde d'azote (NO) et aux

espèces réactives de l'oxygène (ERO), ce que la nature peut exploiter pour réguler l'expression génique.

1.2.3 La structure [3Fe-4S]

Les clusters [3Fe-4S] sont moins fréquents que les clusters [2Fe-2S] et [4Fe-4S]. Ils sont composés de trois atomes de fer et de quatre atomes de soufre. Dans ces clusters, chaque atome de fer est coordonné par trois atomes de soufre inorganiques, tandis que le quatrième atome de soufre relie les trois atomes de fer.³⁸ En général, ces amas proviennent généralement de la dégradation d'un cluster [4Fe-4S], comme on peut l'observer avec l'aconitase, qui catalyse la conversion du citrate en isocitrate dans le cycle de l'acide citrique.³⁹ L'aconitase est une enzyme qui, dans son état actif, elle est dotée d'un cluster [4Fe-4S]. Cependant, lorsqu'elle subit une oxydation, elle perd un atome de fer, entraînant la formation d'un cluster [3Fe-4S], ce qui la rend inactive.⁴⁰ La plupart de ces clusters sont généralement présents dans les ferrédoxines des bactéries, principalement celles qui sont anaérobies. Leur fonction principale est le transfert d'électrons.⁴¹

1.2.4 La structure [4Fe-4S]

Les clusters [4Fe-4S] sont parmi les types d'amas [FeS] les plus fréquemment rencontrés dans la nature. Du point de vue de leur structure, ils adoptent une configuration sous forme d'un cube où chaque atome de fer est lié à quatre atomes de soufre inorganiques et à un autre ligand, typiquement une cystéine.⁴¹

Ce type de cluster présente la particularité de réguler son état d'oxydation, ce qui les divise en deux classes distinctes : " les ferrédoxines classiques " , qui ont un potentiel redox bas (entre -0,7 et -0,3 V), et les "HiPIP" (Protéine fer-soufre à haut potentiel), avec un haut potentiel redox compris entre (0,1 et 0,4 V).⁴² Les protéines de la classe HiPIP sont principalement présentes dans les bactéries photosynthétiques, où elles agissent en tant que donneuses d'électrons.

1.2.5 La molécule de l'oxyde nitrique (NO)

L'oxyde nitrique (NO) est un gaz radicalaire hautement réactif et toxique capable de pénétrer librement dans les cellules où il peut perturber les centres redox des protéines. Son rôle étant crucial et complexe dans de nombreux processus biologiques et physiologiques, il a été largement étudié dans la recherche scientifique.⁴³

L'oxyde nitrique (NO) est une molécule essentielle au bon fonctionnement des systèmes biologiques, régulant divers processus intracellulaires. Cependant, des niveaux élevés de NO peuvent entraîner du stress nitrosatif. Pour contrer ces effets, de nombreuses bactéries, y compris des agents pathogènes, ont développé des mécanismes de détection du NO et des réponses cellulaires appropriées. Chez les bactéries, NsrR est un régulateur transcriptionnel largement répandu impliqué dans la détection du NO.³⁵

1.2.6 L'interaction entre l'amas [FeS] et NO comme source potentielle de H₂S biologique

Seules quelques protéines [FeS] réagissent avec le NO de manière conforme à nos attentes dans la nature. Ce sont précisément ces protéines qui suscitent notre intérêt. Ces protéines ont évolué en réponse à la forte réactivité des clusters [FeS] avec le NO, un phénomène que la nature a exploité pour mener et réguler des processus biologiques spécifiques. Comme dans la protéine NsrR, spécialisée dans la détection du NO et répondant ainsi au stress nitrosatif grâce à un cluster [4Fe-4S] spécifiquement adapté à la réactivité du NO.

Ce petit nombre de protéines représente une cible majeure pour la réactivité d'oxyde nitrique, et la réaction du NO avec des clusters synthétiques [2Fe-2S] et [4Fe-4S] conduisant à la formation de diverses espèces de nitrosyle de fer dans les systèmes biologiques tels que Roussin's Black Salt (RBS), Roussin's Red Ester (RRE), Dinitrosyl Iron Complex (DNIC) comme illustré dans la figure 1.2.⁴⁴

L'équilibre redox de l'environnement exerce une influence significative sur les produits de nitrosylation formés lors de la réaction du NO avec les clusters [FeS]. Une étude menée sur la

protéine HiPIP-[4Fe-4S] d'*Acidithiobacillus ferrooxidans* en présence de NO, a montré que la réaction de nitrosylation génère différents composés en fonction des conditions environnementales (aérobies ou anaérobies).

Les méthodes de spectroscopie permettent d'identifier directement le produit final de la réaction de NO avec des amas [FeS] liés aux protéines.^{45 46} Les études ont montré que le RRE était le composé principal formé lors de la nitrosylation du cluster [4Fe-4S] en présence de traces d'oxygène, tandis que le RBS prédominait dans des conditions anaérobies. L'utilisation de la protéine HiPIP-[4Fe-4S] s'est avérée concluante, essentiellement en considérant sa résistance à l'oxygène et en raison de sa stabilité lors de sa réaction avec le NO en présence d'O₂. Ces résultats suggèrent que l'O₂ joue un rôle crucial dans la régulation des produits principaux de la nitrosylation.

Cependant, les résultats ainsi montrent que la ferrédoxine [4Fe-4S] formait le sel noir de Roussin (RBS) en tant que produit principal en absence de trace d'oxygène,⁴⁷ alors que la protéine de Rieske [2Fe-2S] produit le RRE en tant que produit de nitrosylation principal.⁴⁸

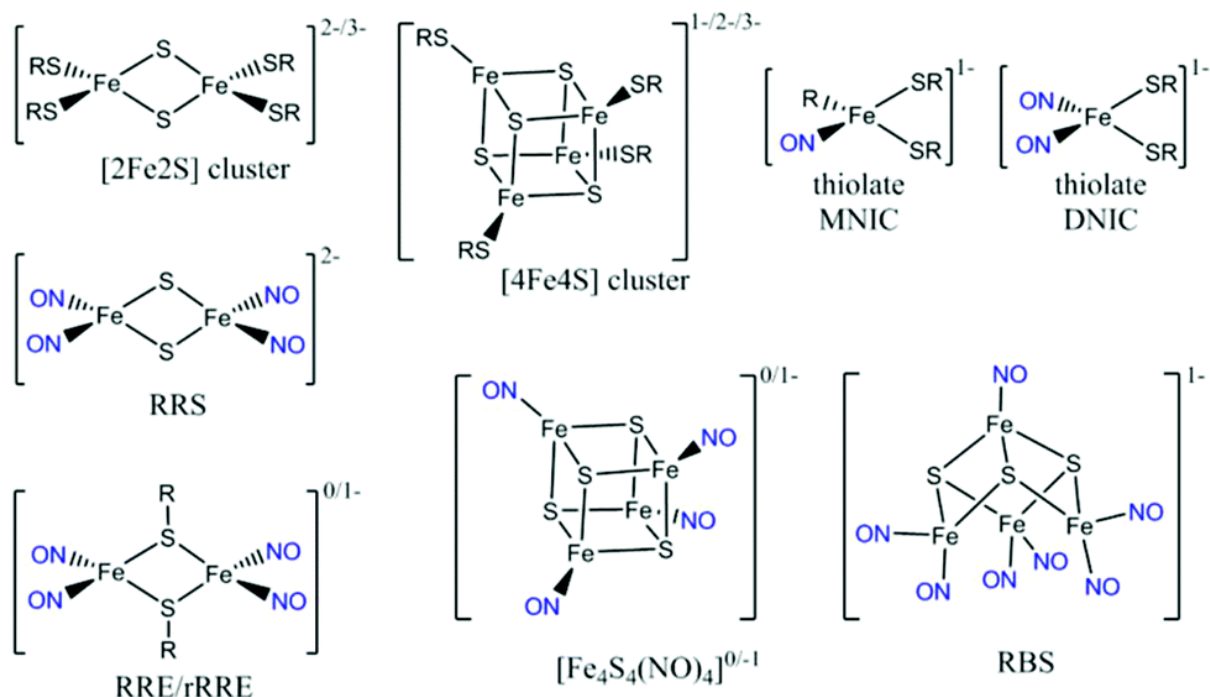


Figure 1.2 Amas FeS avec divers complexes nitrosyl FeS : DNIC (Dinitrosyl Iron Complex), MNIC (complexes nitrosyles de Fer mononucléaires), RRE (Roussin's Red Ester) /rRRE (Roussin's Red Ester réduit), RBS (Roussin's Black Salt).⁴⁴

Cependant, la compréhension de la réaction entre les clusters [FeS] et les dérivés de NO demeure limitée à ce jour, ce qui a suscité un intérêt croissant chez les chercheurs pour poursuivre des investigations visant à approfondir la compréhension de cette problématique. En 2015, le groupe de Eunsuk Kim a réalisé une étude sur la réaction entre les clusters [2Fe-2S] et le NO, en utilisant la fluorescence pour détecter la libération de H₂S.³¹ La génération de H₂S à partir des amas [2Fe-2S] et NO nécessite un acide pour fournir les protons nécessaires (H⁺) à la réaction. Cette réaction est influencée par le pH, car un pH bas (milieu acide) favorise la formation de H₂S.³¹ Les résultats ont montré que l'exposition du modèle de cluster [Fe₂S₂Cl₄]²⁻ aux NO en absence d'acide permet de former le DNIC et du soufre élémentaire, mais l'ajout de l'acide dans le milieu réactionnel génère du mononitrosyl MNIC tout en libérant du soufre sous forme de H₂S.³¹

Récemment, une autre approche a été menée pour étudier la réaction de NO avec un modèle de cluster [4Fe-4S] et le groupe de Michael D. Pluth ont ensuite utilisé une sonde fluorescente la 4-méthyl-7-azidocoumarine (C7-Az) pour détecter la libération de H₂S lors cette interaction, en présence d'une source de thiol.⁴⁹ En effet plusieurs méthodes sont utilisées pour la détection de H₂S a des concentrations élevé, notamment la colorimétrie,⁵⁰ la précipitation de sulfure induite par les métaux,⁵¹ la chromatographie en phase gazeuse. Cependant, la majorité de ces méthodes sont destructives et nécessitent souvent un traitement et/ou destruction de tissus.⁵² De plus, ces méthodes peuvent être coûteuses, lentes, manquer de spécificité et être difficiles à mettre en œuvre.

Pour surmonter les limitations des méthodes traditionnelles, des techniques alternatives basées sur des sondes fluorescentes chimiosélectives ont été développées.⁵³ Ces sondes offrent une sensibilité et une spécificité accrues pour la détection de H₂S, permettant une analyse plus précise et fiable dans divers environnements biologiques. Les sondes fluorescentes réagissent spécifiquement avec H₂S, générant un signal fluorescent mesurable qui facilite la quantification et la localisation de cette molécule dans les systèmes complexes.

Cependant, actuellement notre étude se base sur des sondes qui sont exploitées pour détecter la substance de H₂S dans des milieux où la nitrosylation des protéines [FeS] peut potentiellement générer du H₂S. En ciblant spécifiquement H₂S produit lors de ces processus, ces sondes fluorescentes permettent non seulement une meilleure compréhension des mécanismes de nitrosylation des protéines, mais aussi la surveillance précise des niveaux de H₂S. Les sondes fluorescentes chimiosélectives représentent ainsi un outil puissant pour la recherche en biochimie et en biologie cellulaire, ouvrant la voie à de nouvelles découvertes sur le rôle de H₂S dans divers processus physiologiques et pathologiques.

1.3 Les sondes fluorescentes:

1.3.1 Généralité

Un défi majeur dans la recherche sur le sulfure d'hydrogène réside dans la disponibilité limitée de capteurs, le manque d'outils et d'agents permettant une détection rapide et précise de cette molécule.⁵⁴ Bien que des techniques telles que l'analyse électrochimique,^{55 56} la chromatographie en phase gazeuse^{51, 57} et la colorimétrie^{58 59} aient été employées précédemment pour détecter, a des

très grandes quantités, la concentration de la substance H_2S mais leur efficacité a été particulièrement observée dans des conditions expérimentales où la substance était présente à des concentrations ou quantités élevées. Cependant, la recherche dans ce domaine nécessite une détection précise et fiable qui est essentielle pour des applications telles que la recherche en laboratoire. Par exemple, les sondes fluorogènes pour la détection de H_2S sont utilisées dans le domaine biologique pour l'imagerie de H_2S produit de manière endogène dans les cellules vivantes. Ainsi, dans des environnements expérimentaux spécifiques, l'application des sondes fluorogènes pour la détection du H_2S biologique revêt une importance cruciale. Cette molécule est souvent générée en petites quantités et elle est très localisée dans les tissus biologiques, nécessitant ainsi des outils sensibles et spécifiques pour son identification.

Malgré l'efficacité de ces approches pour détecter le sulfure d'hydrogène (H_2S) à des concentrations élevées. Ces dernières sont limitées en matière de sensibilité et d'applicabilité dans des contextes nécessitant une détection à des niveaux plus faibles, notamment dans les systèmes biologiques. En conséquence, ces méthodes sont coûteuses, non commerciales et elles ne permettent pas encore une détection instantanée en temps réel avec une précision satisfaisante du H_2S .

Pour surmonter l'obstacle lié à l'exploitation des meilleures méthodes adaptées à nos conditions expérimentales, il est essentiel d'utiliser des techniques permettant une détection efficace et précise de sulfure d'hydrogène, même à de faibles concentrations.⁵⁴

La fluorescence représente l'une des méthodes de détection les plus sensibles,⁵⁴ en raison de sa capacité à détecter des niveaux très faibles de concentrations émis par les molécules dans les échantillons. Les substances fluorescentes occupent une place prépondérante dans la recherche biologique moderne.⁶⁰ Leur emploi est de plus en plus répandu en raison de leur sensibilité, de leur variété, et de leur aptitude quantitative, qui permettent d'explorer les processus biologiques avec une exactitude et une résolution exceptionnelle.^{60, 61}

Les sondes fluorescentes constituent des outils chimiques précieux pour l'exploration des fonctions physiologiques des molécules. Elles présentent plusieurs avantages majeurs par rapport aux méthodes traditionnelles. Elles sont couramment simples à utiliser et à incorporer dans les

protocoles expérimentaux existants, ne nécessitant souvent que des équipements de laboratoire standards. Les fluorophores permettent une visualisation en temps réel des processus biologiques sans perturber ni endommager les cellules ou les tissus, offrant ainsi la possibilité de détecter et de suivre des cibles rares ou faiblement exprimées dans des environnements complexes. De plus, elles peuvent être conçues pour être hautement sensibles et spécifiques à des molécules d'intérêt.⁶²

Les sondes de fluorescence sont largement utilisées en biologie cellulaire, en biochimie, en pharmacologie et dans d'autres domaines de la recherche scientifique pour visualiser et étudier divers processus biologiques et chimiques. Elles sont des molécules capables de produire la lumière fluorescente lorsqu'elles sont excitées par une source lumineuse appropriée. Ces dernières sont utilisées pour marquer et détecter différentes cibles dans des échantillons biologiques ou chimiques. Ces cibles peuvent être des protéines, des acides nucléiques, des ions métalliques, des composés organiques, etc. Les sondes de fluorescence sont largement utilisées en pharmacologie, en biologie cellulaire, en biochimie et dans d'autres domaines de la recherche scientifique pour visualiser et étudier divers processus biologiques et chimiques.

Les molécules fluorescentes, parfois désignées sous le terme fluorophores, présentent une réactivité spécifique à la lumière qui les distingue des autres molécules.^{60, 61} Différents critères sont pris en compte pour choisir le fluorophore, tels que sa longueur d'onde d'émission, sa stabilité photométrique, sa solubilité et son affinité pour le H₂S. Ces critères visent à sélectionner des sondes optimales pour les applications de détection et d'imagerie de cette molécule de signalisation gazeuse.

La théorie de base du fonctionnement des sondes basées sur la réactivité pour le H₂S repose sur leur capacité à réagir spécifiquement avec le H₂S par rapport à d'autres composés, leur permettant ainsi de détecter le H₂S plus rapidement, même à des niveaux de concentration extrêmement faibles dans les milieux biologiques. La création de sondes moléculaires destinées à détecter le H₂S offre une opportunité d'explorer la présence de cette substance dans des tissus, dans d'autres organismes entiers et dans les cellules sans les altérer.⁶³ Ce progrès de la conception des sondes fluorescentes offre une sensibilité et une sélectivité suffisantes pour surveiller efficacement la production de H₂S, à des niveaux de signalisation biologiquement significatifs et il ouvre de nouvelles perspectives pour étudier ses divers rôles dans différents systèmes biologiques.⁴ L'exploration de ces nouvelles

sondes repose actuellement sur l'utilisation de différentes méthodes réactionnelles pour assurer la sélectivité du H₂S contrairement aux autres thiols biologiques.⁶³ La conversion sélective des azides en amines par le H₂S pourrait offrir une méthode douce pour obtenir un produit fluorescent qui contient les amines.⁶⁴

Le H₂S est reconnu comme un réactif réducteur capable de convertir les azides en synthèse organique, produisant ainsi des produits fluorescents.⁶⁵ Chang *et al.* ont développé les premières sondes fluorescentes comme montré dans la figure 1.3, Sulfidefluor-1 (SF1) et Sulfidefluor-2 (SF2),⁶⁶ qui présentent une fluorescence activée en réponse à la réduction de l'arylazide catalysée par le H₂S.⁶⁴ Par la suite, le même groupe de recherche a conçu de nouvelles sondes fluorescentes améliorées, nommées Sulfidefluor-4 (SF4) à Sulfidefluor-7 (SF7), qui a été construite en suivant les mêmes principes fondamentaux que les sondes initiales.⁶⁶ Ces sondes fluorescentes ont été considérablement améliorées pour offrir des performances supérieures en termes de sensibilité et de spécificité, ce qui les rendant ainsi plus efficaces pour visualiser et étudier divers processus biologiques. Ces avancées sont particulièrement remarquables dans leur capacité à produire une réponse de fluorescence robuste lorsqu'ils sont activés, conférant ainsi une sélectivité accrue pour la détection du H₂S.⁶⁶ Cette stratégie implique l'utilisation de rhodamines bis-azides pour réduire le signal de fond et l'ajout d'un groupe acétoxyméthyle pour améliorer la rétention intracellulaire.⁴⁶⁵ Cependant, ces sondes démontrent une grande spécificité pour le H₂S comparée à diverses autres espèces réactives du soufre, incluant les thiols cellulaires courants comme le glutathion et la cystéine, ainsi qu'une variété d'autres espèces réactives de l'oxygène et d'azote.⁶⁴

Comme illustré dans la figure 1.3, plusieurs sondes fluorescentes se basent sur la réduction de l'azide pour détecter le H₂S. Ces sondes intègrent un groupement azoture qui, en présence de H₂S, est réduit pour former l'amine correspondante, générant ainsi un produit fluorescent. Ce mécanisme de fonctionnement est similaire pour toutes ces sondes, soulignant une approche cohérente et unifiée dans leur conception et leur action.

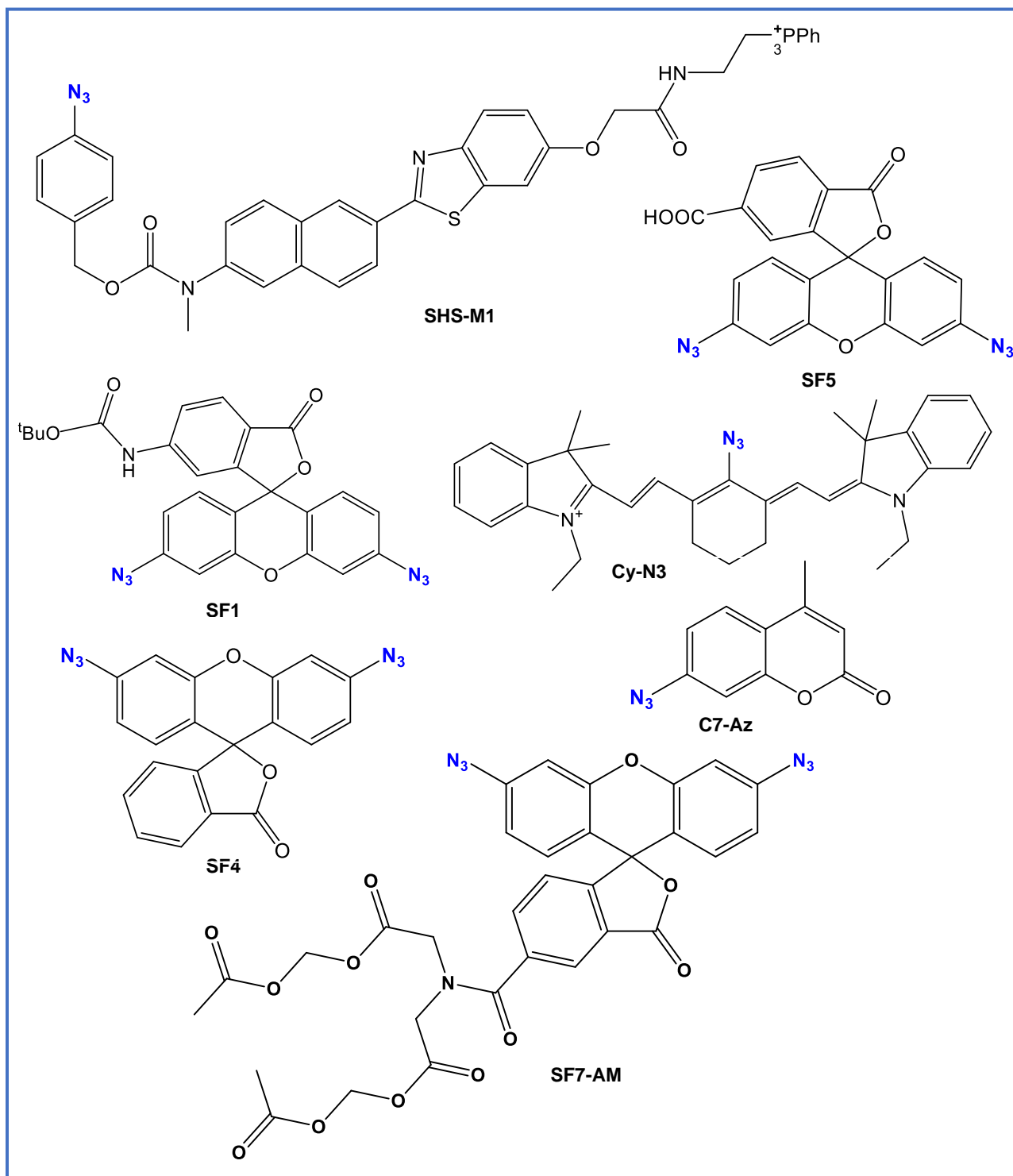


Figure 1.3 Différentes sondes fluorescentes basées sur la réduction de l'azide.⁶⁵

1.3.2 Type de sondes fluorescentes

1.3.2.1 Les sondes fluorogènes qualitatives pour la détection de H₂S

Les sondes fluorogènes sont des outils couramment utilisés pour déterminer la présence ou l'absence d'une substance spécifique dans un échantillon donné. Leur fonction principale est de confirmer la présence d'une substance de manière rapide et simple, sans fournir de mesure précise de sa quantité. Ces sondes sont fréquemment employées pour des analyses binaires, telles que la confirmation de la réaction chimique ou la détection d'un composé particulier dans un échantillon. Les sondes fluorescentes pour la détection du H₂S sont utilisées à la fois qualitativement pour confirmer la présence ou l'absence de H₂S et pour visualiser sa localisation. Par exemple, dans l'imagerie du H₂S produit de manière endogène dans les cellules vivantes comme illustré dans la figure 1.4, ces sondes permettent une visualisation directe et en temps réel de la distribution spatiale du H₂S, offrant ainsi des informations précieuses sur son rôle physiologique et son implication dans divers processus cellulaires.

Lorsque le H₂S est présent, il réagit avec la sonde fluorescente selon un mécanisme spécifique, provoquant une augmentation de l'intensité de la fluorescence. Cette augmentation de fluorescence peut être détectée à l'aide d'un appareil de mesure approprié, tel qu'un spectrofluorimètre. Si aucun H₂S n'est présent, aucune réaction avec la sonde fluorescente et aucune augmentation de fluorescence ne sera observée. Ainsi, en observant la présence ou l'absence de changement dans la fluorescence de la sonde, on peut qualifier de manière qualitative la présence de H₂S dans l'échantillon.

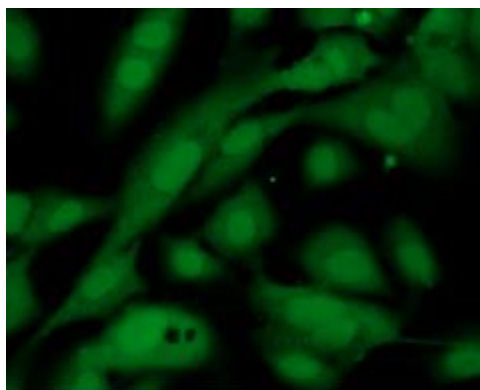


Figure 1.4 Imagerie en temps réel du H₂S endogène produit dans les cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale pendant une stimulation avec le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), utilisant la sonde fluorescente SF7-AM.⁴

1.3.2.2 Les sondes fluorogènes quantitatives pour la détection de H₂S

Les sondes quantitatives sont des moyens essentiels pour évaluer avec précision la concentration d'une substance dans un échantillon. Elles fournissent des résultats numériques qui reflètent directement la quantité de la substance présente. Ces sondes sont indispensables dans des contextes où des mesures précises sont requises, telles que la détermination de la concentration d'un médicament dans le sang ou la quantification des nutriments dans les aliments. Bien qu'elles soient souvent plus complexes à utiliser que les sondes qualitatives, elles offrent une évaluation plus détaillée et fiable de la quantité de la substance analysée. Par exemple, la GFP (Green Fluorescent Protein) est un fluorophore largement utilisé en biologie cellulaire et moléculaire.⁶⁷ Cette dernière peut être exprimée dans des organismes vivants et sa fluorescence peut être mesurée pour quantifier sa concentration. La fluorescence de la GFP est proportionnelle à sa concentration, permettant ainsi une mesure quantitative précise de ses niveaux dans un échantillon. Par conséquent, les sondes quantitatives qui sont conçues pour mesurer précisément les niveaux de certaines substances, elles peuvent aussi être exploitées de manière qualitative. Bien que leur principal objectif soit la quantification, leur sensibilité peut souvent détecter la présence ou l'absence d'une substance cible. Cependant, l'inverse n'est pas toujours vrai : une sonde qualitative ne peut pas toujours fournir des mesures quantitatives précises des concentrations.

Les sondes fluorescentes pour la détection de H₂S peuvent être utilisées de manière quantitative en mesurant l'intensité de la fluorescence produite en réponse à la présence de H₂S. Pour ce faire, on peut créer une courbe d'étalonnage en utilisant des échantillons de référence contenant des concentrations connues de H₂S. En mesurant l'intensité de fluorescence de ces échantillons, on peut établir une relation entre l'intensité de fluorescence et la concentration de H₂S. Ensuite, en mesurant l'intensité de fluorescence d'un échantillon inconnu, on peut utiliser la courbe d'étalonnage pour déterminer sa concentration en H₂S de manière quantitative. Cette approche permet une mesure précise de la concentration de H₂S dans un échantillon donné à l'aide de sondes fluorescentes.

D'un autre côté, les sondes étudiées par le groupe de Chang *et al.* sont utilisées pour détecter le sulfure d'hydrogène (H₂S).⁴ Elles peuvent être catégorisées comme des sondes qualitatives lorsqu'elles sont employées pour confirmer la présence de H₂S sans fournir de mesure précise de sa concentration.⁴ Cependant, si elles sont employées avec des méthodes appropriées pour mesurer quantitativement la concentration de H₂S, elles peuvent être considérées comme des sondes quantitatives. En pratique, les sondes fluorescentes comme la SF4 peuvent être adaptées à des analyses qualitatives ou quantitatives en fonction des paramètres expérimentaux et des méthodes d'analyse choisies.^{53, 68}

Le développement d'un agent réactif au sulfure exploite ce type de fluorophore en exploitant la réduction spécifique d'un groupe azido par le sulfure d'hydrogène. Du fait de l'écart d'électronégativité entre les groupes azido et amino, ainsi que de la plus grande liberté de rotation du groupe azido, la réduction du sulfonylazide en sulfonamide est censée altérer les propriétés électroniques et, par conséquent, les propriétés fluorescentes du composé.⁵⁴

1.3.3 Mécanisme de réduction de l'azide en amine par une sonde fluorescente pour la détection du H₂S

La conception des sondes fluorescentes repose sur des modifications apportées aux caractéristiques fluorescentes des sondes, notamment leur intensité de fluorescence. Cela se fait en exploitant les propriétés réductrices ou nucléophiles du sulfure d'hydrogène (H₂S).⁶⁹ En d'autres termes, les structures des sondes sont conçues de manière à ce qu'elles réagissent spécifiquement avec le H₂S, ce qui entraîne un changement mesurable dans leurs propriétés fluorescentes. Ce processus permet une détection sensible et sélective du H₂S dans divers milieux.

Les azides sont des composés qui peuvent être employés pour détecter le sulfure d'hydrogène (H_2S) en subissant une réduction en amines, processus catalysé par le H_2S . Cette réaction a été employée dans la synthèse de molécules organiques complexes, ce qui montre son potentiel pour la détection du H_2S .^{64, 66}

Étant donné que les sondes fluorogènes utilisées pour la détection du sulfure d'hydrogène (H_2S) fonctionnent selon un mécanisme similaire, j'ai opté pour l'utilisation d'une sonde décrite par le groupe de recherche dirigé par Michael D. Pluth *et al.* (4-méthyl-7-azidocoumarine, ou C7-Az) comme modèle expérimental.⁷⁰ Cette sélection vise à éclairer le processus de réduction des azotures par le H_2S à travers l'étude du mécanisme réactionnel. Cette décision de choix s'appuie sur la facilité de synthèse de la C7-Az et sur ses propriétés spectroscopiques bien caractérisées, qui la rendent particulièrement adaptée à cette approche.⁷⁰

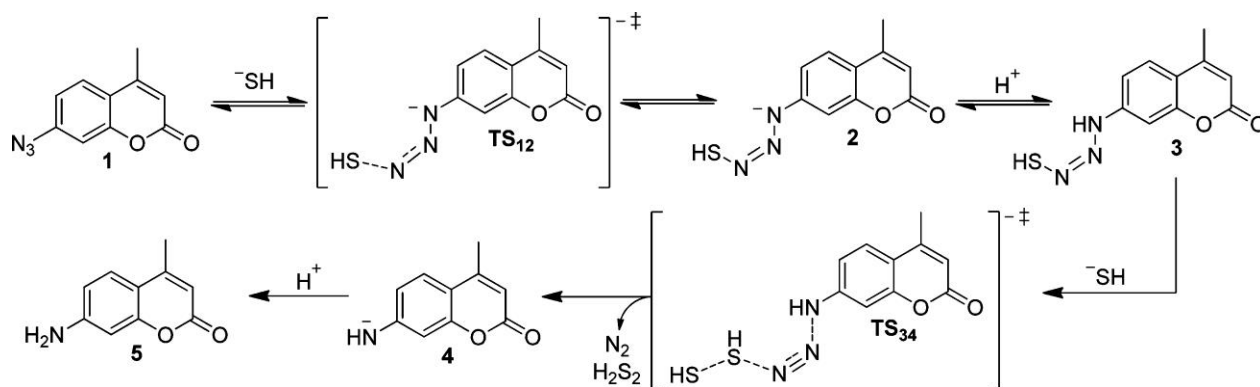


Figure 1.5 Schéma d'interactions moléculaires et étapes du mécanisme de réduction du C7-Az par le H_2S .⁷⁰

La figure 1.5 illustre le mécanisme de la molécule C7-Az, décrivant la phase initiale de la réaction qui implique la réduction de l'azide en son amine parente par le H_2S . Une attaque nucléophile réversible de l'ion sulfure (HS^-) sur l'azote terminal de l'azoture de C7-Az (1), où l'azote est considéré comme l'atome le plus électrophile de l'azoture.^{70, 71} Ce type d'attaque nucléophile a déjà été observé dans la réaction de Staudinger.^{70, 72} L'attaque nucléophile initiale conduit à la formation d'un intermédiaire azidothiol anionique (2). La protonation temporaire de l'azidothiol anionique (2) lors de son attaque par l'ion sulfure (HS^-) peut engendrer la création de l'espèce neutre (3),

considérée comme étant plus électrophile. Ensuite, une nouvelle attaque sur le composé (3) par un second équivalent de HS⁻ ou un autre thiol, tel que la cystéine, conduit à la formation d'une amine déprotonée (4), qui agit comme une base plus forte que l'intermédiaire (2), entraînant la libération de N₂ et H₂S₂. Enfin, un transfert de proton, probablement catalysé par le solvant, conduit à la formation du produit final C7-NH₂ (5).⁷⁰

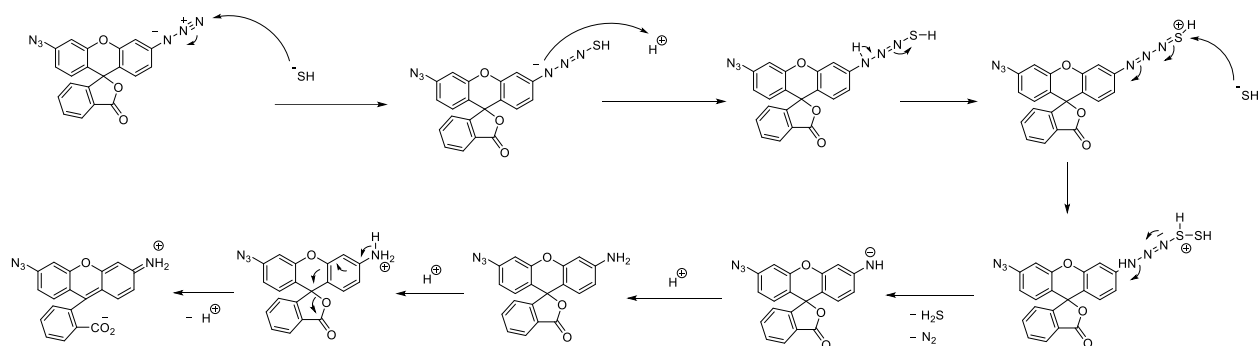


Figure 1.6 Schéma du mécanisme de réduction de la sonde SF4 par le H₂S : Interactions moléculaires et étapes du processus.

Dans chaque configuration d'une sonde fluorogène contenant une lactone (un hétérocycle oxygéné) et comportant deux groupes azide, la molécule avec l'anneau lactone fermé ne présente pas la structure de résonance fluorescente. Cependant, en présence de H₂S, si un seul groupe azido subit une réaction de réduction spécifique pour se transformer en amine, cela entraîne simultanément l'ouverture du cycle lactone et la formation de la forme conjuguée. Ce processus induit une forte fluorescence due à la structure de résonance fluorescente qui en résulte.

Cependant, dans le cas de la sonde SF4 (Figure 1.6), le processus de mécanisme de conversion de l'azoture en amine commence par une attaque nucléophile de l'ion sulfure (HS⁻) sur l'azoture, entraînant la formation d'un ion azoture. Par la suite, l'ion azoture est protoné en milieu acide (H⁺), ce qui conduit à une seconde attaque nucléophile de l'ion sulfure sur le groupe électrophile sulfhydryle de l'azidothiol, formant ainsi un disulfure. L'amine est obtenue par protonation de l'ion amidure en milieu acide (H⁺), précédée par l'élimination de diazote et de sulfure d'hydrogène.

Dans un milieu contenant une quantité suffisante de H_2S , une seule molécule d'azoture peut réagir avec cette espèce réactive pour former une amine. Cette réaction peut induire la formation d'une molécule fluorescente, car elle est particulièrement sensible. Ainsi, même une seule molécule d'azoture réagit, cela peut entraîner une augmentation de la fluorescence, rendant la molécule détectable.⁴ C'est pourquoi dans la figure 1.6, j'ai illustré la conversion d'une seule molécule d'azide en amine, sachant que ce processus peut également s'appliquer à la deuxième molécule d'azoture dans le même contexte réactionnel. Cette sensibilité accrue est cruciale, car elle permet la détection efficace du H_2S , même à des concentrations relativement faibles, ouvrant ainsi la voie à des applications potentielles dans divers domaines de la recherche.

1.4 Les techniques utilisées

1.4.1 La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN est une méthode spectroscopique utilisée pour analyser la composition de la matière. La caractérisation par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) constitue une méthode analytique avancée employée pour explorer la structure moléculaire des composés organiques. Elle repose les propriétés magnétiques des noyaux atomiques spécifiques présents dans les molécules. La RMN est fréquemment employée pour l'analyse des noyaux de carbone et d'hydrogène présents dans les molécules organiques.⁷³ Elle est également employée en imagerie médicale sous le nom d'IRM.

La RMN fournit des données précises sur la liaison atomique, la configuration stéréochimique et l'environnement moléculaire des atomes dans une substance. La caractérisation par RMN du carbone 13 (RMN ^{13}C) est particulièrement utile pour identifier les différents types de carbones présents dans une molécule, tels que les carbones sp^3 , sp^2 , ou sp . Les noyaux de carbone absorbent l'énergie des champs magnétiques à des fréquences spécifiques en fonction de leur environnement chimique, ce qui permet de distinguer les différents types de carbones et d'obtenir des informations sur leur connectivité.^{73, 74}

De manière similaire, la spectroscopie RMN du proton (RMN 1H) permet d'identifier les atomes d'hydrogène dans une molécule en fonction de leur environnement chimique spécifique. Les

atomes d'hydrogène absorbent également l'énergie des champs magnétiques à des fréquences spécifiques, ce qui permet de distinguer les différents types d'hydrogène tels que les hydrogènes aliphatiques, aromatiques, ou portés par des groupes fonctionnels spécifiques.⁷⁵

Le principe fondamental de la spectroscopie RMN implique l'application d'un champ magnétique externe et de radiofréquences précises pour exciter les noyaux atomiques présents dans l'échantillon. Les noyaux atomiques absorbent cette énergie et émettent ensuite des signaux qui peuvent être détectés et analysés. Les spectres RMN obtenus fournissent des informations précieuses sur la composition et la structure des molécules organiques, aidant ainsi les chimistes à élucider la structure des composés inconnus ou à caractériser les composés synthétisés.⁷⁶

La caractérisation par RMN du carbone et du proton nécessite l'utilisation d'un équipement spécialisé comprenant un aimant puissant et une sonde de détection. Les échantillons sont préparés en les dissolvant dans des solvants appropriés tels que le deutérochloroforme (CDCl_3) ou le deutérotoluène ($\text{C}_6\text{D}_5\text{CD}_3$). Cette étape est cruciale pour minimiser les interférences de signal et garantir des mesures précises lors de l'analyse par RMN du carbone et du proton.

Une fois les échantillons préparés, ils sont introduits dans l'appareil RMN, où des séquences d'impulsions de radiofréquences sont appliquées pour exciter les noyaux atomiques spécifiques. Les signaux RMN émis sont détectés, enregistrés, et utilisés pour permettre l'analyse de la structure moléculaire de l'échantillon.

En résumé, la méthode de caractérisation par RMN du carbone et du proton est essentielle en chimie organique, offrant une analyse détaillée et non destructive des structures moléculaires. Cette technique joue un rôle essentiel à la fois dans la recherche académique et l'industrie, offrant une analyse approfondie avec une caractérisation des composés organiques. Elle permet de comprendre leur réactivité et d'établir des relations cruciales entre leur structure et leur activité, ce qui est fondamental pour le développement de nouveaux médicaments, matériaux et produits chimiques.⁷⁴

76

1.4.2 Chromatographie liquide rapide des protéines

Chromatographie liquide rapide des protéines également connue sous le nom de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), est une méthode largement utilisée dans les domaines de la biologie et de la biochimie. La FPLC propose divers méthodes de séparation, tels que l'échange d'ions, l'affinité, l'hydrophobicité et l'exclusion de taille, offrant ainsi la possibilité de purifier et d'isoler de manière spécifique les protéines désirées. Cependant, elle est efficace pour la purification, la séparation et l'analyse des protéines ainsi que d'autres biomolécules à un débit considérablement rapide.⁷⁷

Cette méthode repose sur la variation d'affinité des composants d'un mélange envers deux matériaux distincts : un liquide en déplacement (phase mobile) et un solide poreux (phase stationnaire). En général, la phase mobile est constituée d'une solution tampon aqueuse, tandis que la phase stationnaire se compose d'une résine sous forme de billes, souvent de l'agarose réticulé. Ces billes sont emballées dans une colonne cylindrique en verre ou en plastique, formant ainsi la structure de la colonne de chromatographie liquide à haute performance (FPLC) comme montré la figure 1.9.⁷⁸

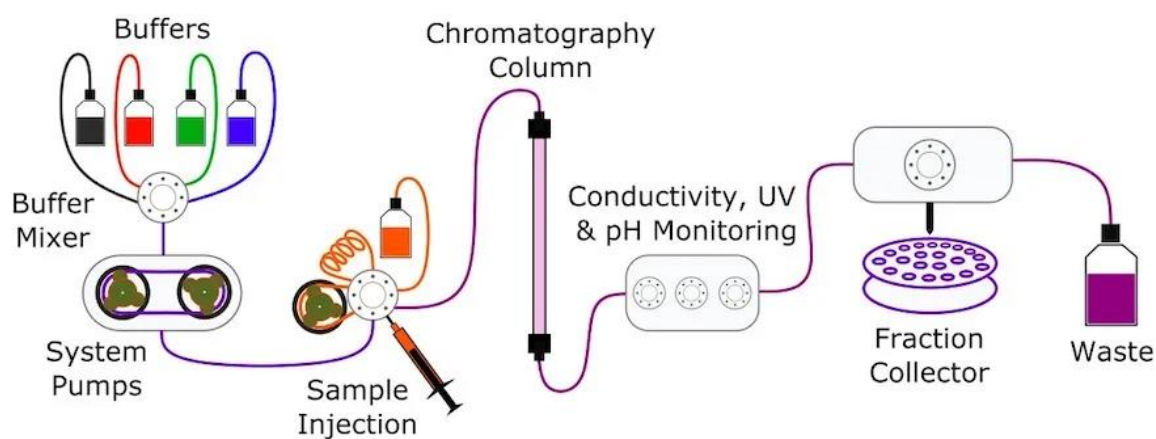


Figure 1.7 Composants d'un système FPLC.⁷⁹

Pour cette étude, nous avons employé la chromatographie IMAC (chromatographie d'affinité sur métal immobilisé), une technique de séparation basée sur l'utilisation des composés chélateurs covalents fixés sur des supports chromatographiques solides. Ces composés captent les ions métalliques, agissant ainsi comme ligands d'affinité pour diverses protéines. Cette technique repose sur la liaison coordonnée entre les ions métalliques et certains résidus d'acides aminés exposés à la surface des protéines.⁸⁰

Le processus de la technique de chromatographie d'affinité sur métal immobilisé (IMAC) repose sur l'utilisation d'une colonne chromatographique dont les particules sont fonctionnalisées avec des ions métalliques, tels que le cuivre (Cu^{2+}), le nickel (Ni^{2+}), ou le zinc (Zn^{2+}),⁸¹ qui démontrent une forte affinité pour les résidus d'histidine présents sur certaines protéines. Dans cette méthode, les colonnes de nickel (Ni^{2+}) sont couramment préférées en raison de leur capacité à se lier spécifiquement aux protéines marquées avec des séquences d'histidine (His-tag), assurant ainsi une purification rapide et efficace.⁸⁰

Une fois l'introduction de l'échantillon dans la colonne de nickel est effectuée, les protéines possédant des résidus d'histidine génèrent des complexes stables avec les ions Ni^{2+} et sont retenues par la matrice de la colonne comme illustré dans la figure 1.10. En revanche, les autres éléments de l'échantillon n'ayant pas d'affinité pour le Ni^{2+} , sont élués, c'est-à-dire qu'ils sont rapidement évacués de la colonne. Pour récupérer les protéines d'intérêt liées à la colonne, les conditions chromatographiques sont ajustées, notamment par l'ajout d'imidazole dans le tampon d'élution. L'imidazole entre en compétition avec les résidus d'histidine pour se lier aux ions de nickel, ce qui entraîne la libération des protéines d'intérêt de la colonne. Cette approche favorise la purification spécifique et efficace des protéines visées, simplifiant ainsi leur examen ultérieur.⁸²

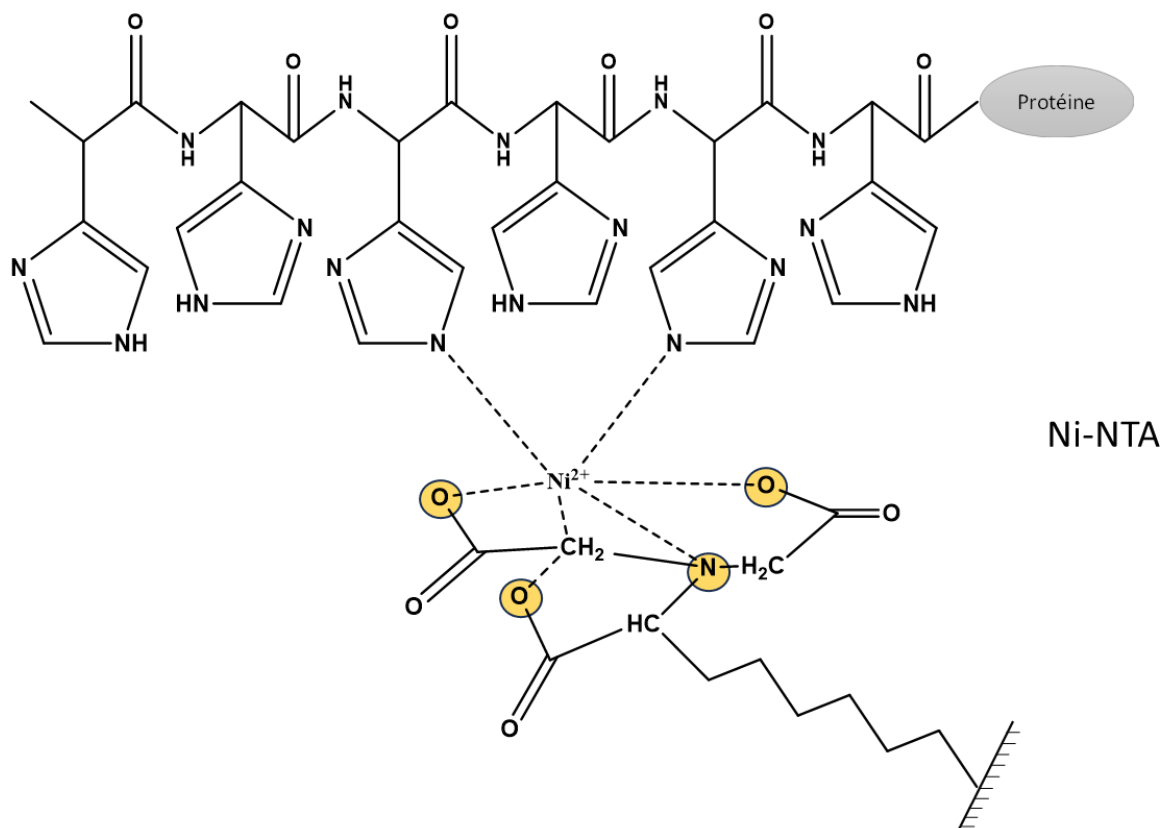


Figure 1.8 Modèles d'interactions entre les résidus d'histidine (His-tag) et l'ion métallique Ni^{2+} .⁸¹

1.4.3 La Spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Vis), également désignée sous le terme de spectroscopie ultraviolette-visible,⁸³ est une méthode analytique fondamentale est souvent utilisée dans différents domaines scientifiques, tels que, en chimie et en biochimie pour évaluer l'absorption de lumière par une solution. Elle exploite l'interaction entre la lumière ultraviolette (UV) et visible (Vis) et la matière pour caractériser les propriétés des échantillons analysés. Elle se fonde sur le principe selon lequel les molécules absorbent la lumière à des longueurs d'onde particulières, en fonction de leur structure électronique.⁸³ Cette méthode permet d'identifier des caractéristiques spécifiques de chaque composé chimique, telles que la longueur d'onde à laquelle l'absorption est maximale.

La spectroscopie UV-Vis étudie comment les molécules ou les ions absorbent la lumière UV et visible, ce qui entraîne les transitions électroniques entre les niveaux d'énergie au sein de la molécule ou des ions dans l'échantillon.⁸⁴ L'absorption de photons provoque des transitions électroniques, où un électron est excité d'un niveau énergétique bas (HOMO) à un niveau plus élevé (LUMO). Les spectres UV-Vis fournissent des informations sur les propriétés électroniques des composés chimiques incluant ainsi des informations liées à la structure moléculaire, car la taille de ΔE (l'énergie de la transition électronique) est liée à la structure électronique de la molécule.

La relation entre la longueur d'onde observée de l'absorbance (λ) et l'énergie (ΔE) de la transition électronique causée par l'absorption d'un photon est donnée par l'équation suivante, dérivée de la relation de Planck ⁸⁵ et de l'équation de l'énergie du photon :

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

ΔE : est l'énergie de la transition électronique

h : est la constante de Planck

ν : est la fréquence du photon

c : est la vitesse de la lumière

λ : est la longueur d'onde du photon

Cette équation montre que l'énergie de la transition électronique est inversement proportionnelle à la longueur d'onde du photon absorbé. Plus la longueur d'onde est courte, plus l'énergie associée à cette transition est élevée.

La spectroscopie UV-visible expose un échantillon à une gamme de rayonnements électromagnétiques comprenant des longueurs d'onde différentes dans les domaines de l'ultraviolet (UV) et du visible (Vis). Lors de cette interaction, certaines longueurs d'onde sont absorbées

sélectivement par l'échantillon dans ces domaines spectraux comme montré dans la figure 1.11. Un détecteur spécialisé enregistre ensuite la lumière non absorbée en fonction de la longueur d'onde, créant ainsi un spectre d'absorption spécifique de l'échantillon, appelé spectre UV-Vis. Un spectre UV-visible est une représentation graphique des variations d'absorption d'énergie d'une substance exposée à des rayonnements ultraviolet et visible. Il compare la quantité de lumière absorbée par une solution à étudier avec celle absorbée par le solvant seul. Cette absorption est régie par la loi de Beer-Lambert. L'analyse du spectre UV-visible permet de détecter différentes bandes d'absorption caractéristiques, correspondant à des structures électroniques spécifiques présentes dans les composants analysés.⁸⁶

La loi de Beer-Lambert, essentielle en spectroscopie UV-Visible, est un outil fondamental pour quantifier la concentration d'une substance absorbante dans une solution en mesurant simplement son absorbance à une longueur d'onde spécifique. Cette loi établit une relation précise entre l'absorbance de la solution, sa concentration et la longueur du trajet optique parcouru par la lumière, permettant ainsi une analyse précise des échantillons dans divers domaines scientifiques.^{86, 87} Cette loi se formule mathématiquement comme suit :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

A : représente l'absorbance, une mesure de la quantité de lumière absorbée par la solution.

ε : est le coefficient d'extinction molaire, une caractéristique spécifique de l'espèce absorbante à une longueur d'onde donnée, indiquant sa capacité d'absorption.

l : est la longueur du trajet optique parcouru par la lumière à travers la solution, généralement exprimée en centimètres (cm).

c : est la concentration de l'espèce absorbante, exprimée en moles par litre (mol/L).

La spectroscopie UV-VIS s'est avérée être un outil précieux pour atteindre plusieurs objectifs clés dans cette approche grâce à sa capacité d'identifier les différents composants présents, sa sensibilité aux changements de concentration et sa rapidité d'exécution.

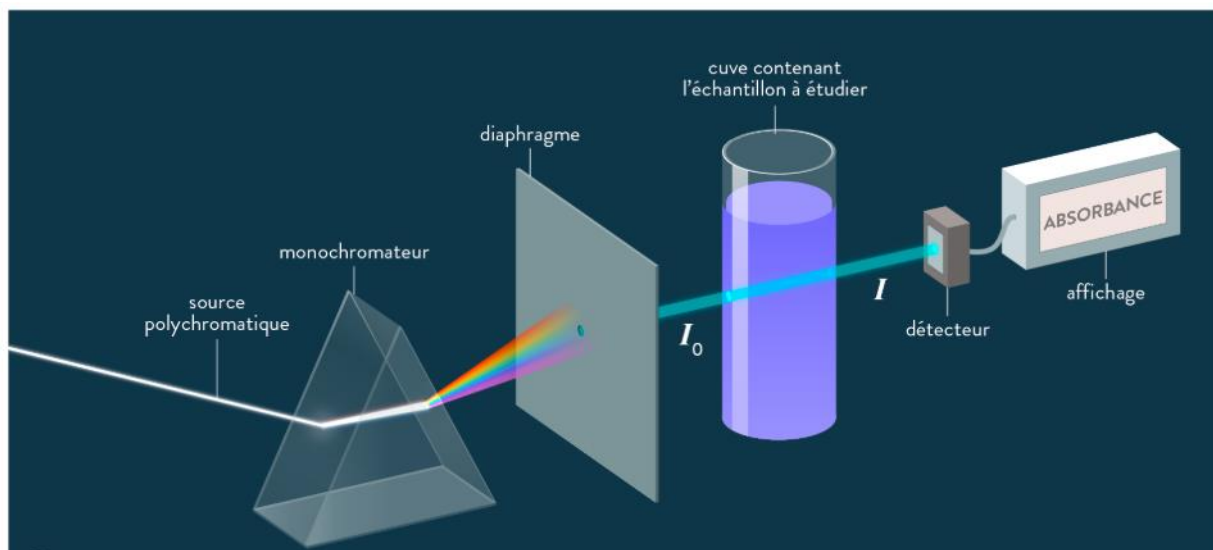


Figure 1.9 Schéma de la configuration optique d'un spectrophotomètre UV/Vis.⁸⁸

1.4.4 La Spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence est une technique analytique puissante utilisée dans divers domaines tels que la biologie, la chimie et la médecine. Elle permet de détecter et de quantifier des substances à des concentrations très faibles grâce à sa sensibilité élevée, qui peut être cent à mille fois supérieure à celle de la spectroscopie d'absorption.⁸⁹ Elle est également connue sous les termes de fluorimétrie ou spectrofluorimétrie. Cependant, elle représente une méthode de spectroscopie électromagnétique qui explore la lumière émise par une substance à la suite de son excitation par une source lumineuse.⁹⁰

La spectroscopie de fluorescence étudie l'émission de lumière par une substance après qu'elle a absorbé de la lumière à une longueur d'onde spécifique. Ce processus implique souvent des transitions électroniques entre les niveaux d'énergie moléculaire HOMO (plus haute orbitale moléculaire occupée) et LUMO (plus basse orbitale moléculaire non occupée). Lorsqu'un électron est excité de l'orbitale HOMO à un état excité, il peut retourner à son état fondamental en émettant de la lumière fluorescente. Comme montré ci-dessus dans la figure 1.12, le diagramme de

Jablonski-Perrin illustre les divers processus de désexcitation qui peuvent survenir après l'absorption d'un photon, conduisant à la formation d'un état excité.⁹¹

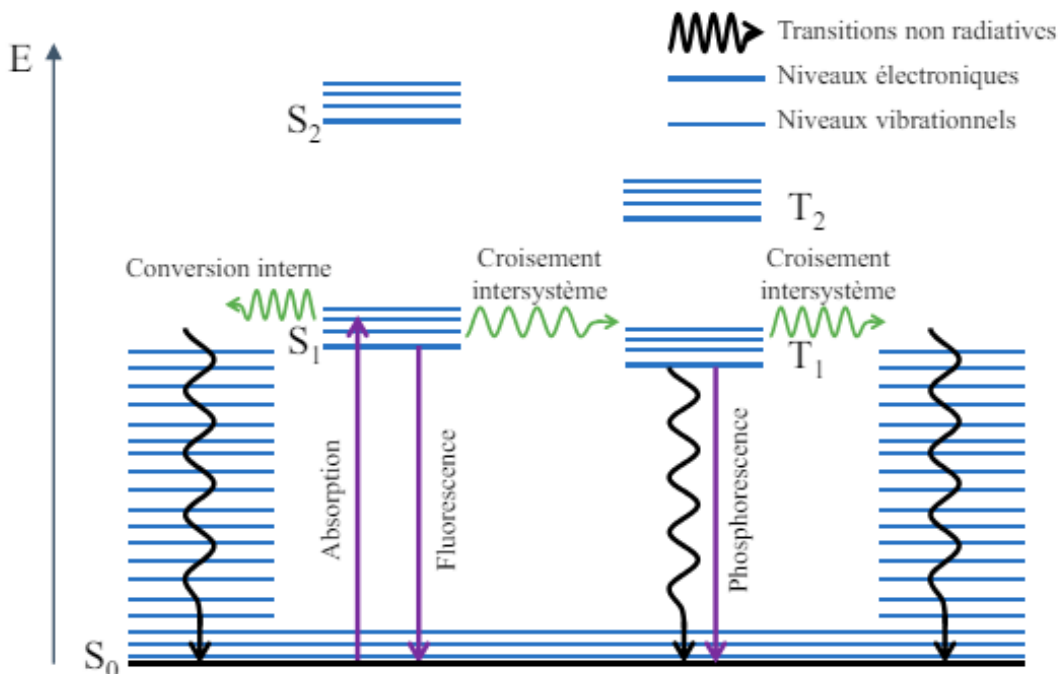


Figure 1.10 Diagramme de Jablonski-Perrin.⁹¹

La méthode spectroscopie de fluorescence repose sur l'excitation des molécules vers un état électronique excité par l'absorption d'un photon, suivi de la perte d'énergie par des collisions avec d'autres molécules. Elle consiste à exciter des molécules absorbant la lumière, appelées fluorophores, avec une longueur d'onde spécifique. Ces molécules émettent ensuite de la lumière à une longueur d'onde plus élevée lorsqu'elles reviennent à leur état fondamental.^{92, 93}

L'émission de fluorescence, analysée en spectroscopie de fluorescence, offre des informations précieuses sur la structure, la concentration et l'environnement chimique et d'autres propriétés des molécules étudiées. Cette technique permet une analyse détaillée des niveaux d'énergie, des

interactions moléculaires et des propriétés des molécules, offrant ainsi une compréhension approfondie de leur structure et de leur comportement. Cependant, son utilisation continue d'évoluer, ouvrant ainsi la voie à de nombreuses applications en chimie, en biochimie ainsi que dans divers domaines scientifiques.^{89,93}

Objectif

Les limitations des méthodes de détection actuelles pour le H₂S sont bien documentées dans la littérature, souvent en raison d'un manque de sélectivité et de spécificité dans les milieux biologiques. Cependant, l'approche de Chang *et al.*⁴ vise à remédier à ces lacunes en mettant en évidence le potentiel élevé des sondes fluorescentes pour la détection sélective du H₂S. Ces sondes réagissent rapidement au contact du H₂S, entraînant une augmentation significative de la fluorescence. Cette réaction permet une détection sensible, même à des concentrations faibles de H₂S. Néanmoins, un défi majeur associé à ces sondes est leur coût élevé. Cette contrainte financière peut restreindre leur utilisation généralisée malgré leurs avantages potentiels. De plus, leur disponibilité limitée pose un obstacle supplémentaire, car elles ne sont pas encore commercialisées et il n'existe aucun fournisseur établi pour les acquérir. Par conséquent, cette double contrainte financière et d'approvisionnement souligne l'importance cruciale pour la recherche de développer des moyens de rendre ces sondes plus abordables sans compromettre leur efficacité, ou d'explorer des alternatives plus économiques tout en maintenant leur performance.

Cependant, notre objectif est de résoudre cette problématique, il est impératif que nous, en tant qu'acteurs de la recherche, adaptions le développement des protocoles de synthèse pour la préparation de ces sondes, afin de pouvoir les fabriquer dans notre propre laboratoire. Cette approche offre plusieurs avantages, notamment la réduction des coûts de production en éliminant les frais de commercialisation et de distribution associés à l'achat de sondes prêtes à l'emploi tout en garantissant un contrôle total sur la qualité et la disponibilité des sondes. De plus, en maîtrisant la synthèse des sondes, nous avons la possibilité de les personnaliser selon nos besoins spécifiques, en ajustant par exemple leurs propriétés physico-chimiques pour une meilleure adaptation à notre système d'étude. Par conséquent, ces sondes doivent posséder une spécificité et une sélectivité élevées pour le H₂S, tout en restant inertes vis-à-vis d'autres molécules telles que le monoxyde d'azote (NO) et les thiols biologiques.

Après avoir conçu et développé les protocoles de synthèse des sondes fluorescentes, celles-ci seront utilisées pour vérifier la présence de H₂S en utilisant du NaSH comme source directe de H₂S. Par la suite, leur utilisation se concentrera sur la quantification et la surveillance de la production de

H₂S lors de la nitrosylation d'un modèle de protéines FeS bien connu et établi dans notre laboratoire, le HiPIP (High potential iron sulfur protein).

CHAPITRE 2

DÉVELOPPEMENT D'UN PROTOCOLE POUR LA CONCEPTION, SYNTHÈSE ET ÉVALUATION DES SULFUREFLUORES DE NOUVELLE GÉNÉRATION SF4 ET SF5/SF6

2.1 Introduction

En raison du manque de méthodes fiables pour suivre les niveaux endogènes de H₂S à faible concentration, de nombreux chercheurs se sont lancés dans l'étude, la conception, la synthèse et l'application d'une série d'indicateurs fluorescents de H₂S.^{4, 66} Le groupe de Chang a évalué de nouvelles sondes à base d'azide pour la détection du H₂S dans des milieux aqueux comme illustré dans la figure 2.1.^{4, 68}

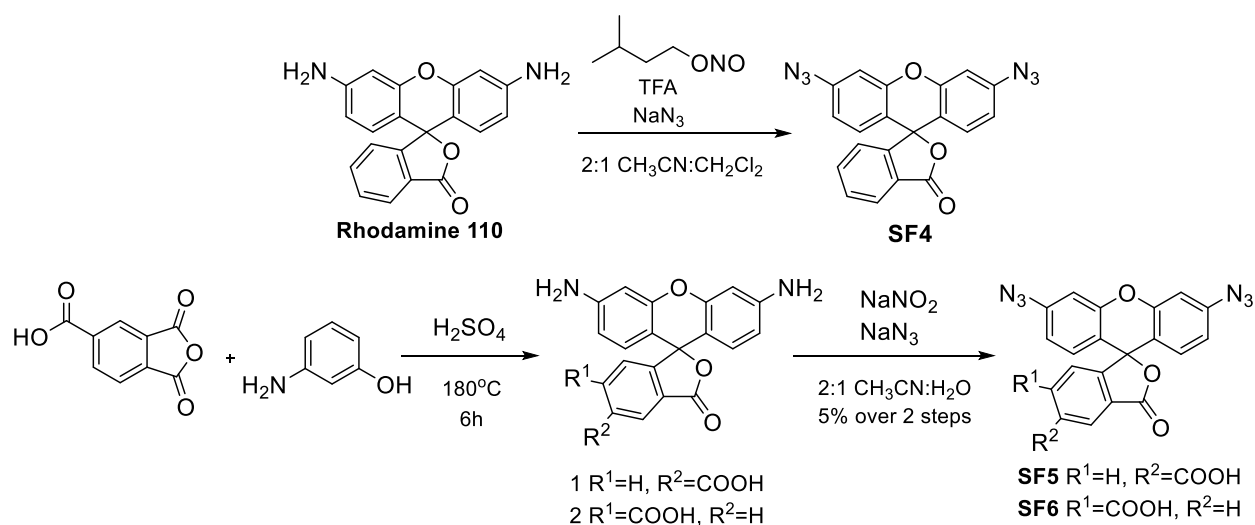


Figure 2.1 Conception et synthèse de sondes piégeables (SF4-SF5-SF6) pour la détection de H₂S.⁴

Notre objectif est d'obtenir un produit final de haute qualité, en reproduisant aussi fidèlement que possible les conditions expérimentales établies dans la littérature.

Dans ce chapitre, nous aborderons le développement de protocoles de synthèse pour les sondes SF4/SF5/SF6, ainsi que toutes les caractérisations effectuées sur les produits obtenus. Nous discuterons en détail les différentes étapes de synthèse, en mettant en évidence les conditions réactionnelles, les techniques utilisées pour le suivi des réactions et l'analyse des produits intermédiaires et finaux. Cette discussion permettra de comprendre plus en profondeur les aspects synthétiques et les propriétés des sondes développées.

Avant d'entamer la synthèse des sondes SF5/SF6, il est primordial d'entreprendre une étape préliminaire essentielle visant à produire l'intermédiaire Carboxyrhodamine (CR). Pour cela, nous avons initialement suivi le protocole expérimental de Lin *et al.* en respectant chaque étape de leur méthode.⁴ Nous avons accordé une attention particulière aux conditions expérimentales et aux instructions détaillées pour assurer le succès de la réaction. Par la suite, des ajustements et des modifications ont été apportés pour obtenir le produit final désiré, avec des résultats satisfaisants.

La sonde SF4, qui est une molécule plus simple, a également été étudiée en tant que sonde potentiellement utile pour les besoins de notre groupe de recherche. La sonde a été synthétisée avec succès en utilisant deux approches synthétiques distinctes. D'autre part, la préparation de l'intermédiaire Rhodamine 110 avant de commencer la synthèse de la sonde SF4 a constitué une étape très importante pour la continuité de notre réaction. La synthèse de la sonde SF4 a été réalisée sous une atmosphère d'azote pour éviter toute contamination ou réaction indésirable avec l'oxygène ou l'humidité de l'air. Cette dernière a été synthétisée en suivant un protocole expérimental déjà décrit dans la littérature.⁶⁸ La préparation synthétique du fluorophore de base rhodamine 110 a également permis de mieux comprendre les difficultés rencontrées dans la préparation de la carboxyrhodamine 110.

2.2 Partie expérimentale

Les réactifs ont été achetés auprès de fournisseurs bien établis tels que Fisher Scientific, Millipore Sigma et Cayman Chemicals.

La chromatographie sur couche mince (CCM) a été utile dans cette approche, pour faciliter la caractérisation des divers composants présents, ainsi pour le suivi d'évolution des réactions chimiques. Cette technique a été indispensable pour progresser dans la purification ultérieure via une chromatographie sur colonne. Les plaques de chromatographie ont été révélées à l'aide d'une lampe UV pour visualiser la séparation des composants. Après l'obtention des échantillons, une analyse des produits issus de chaque réaction a été effectuée à l'aide de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), "Bruker-300 Ultrashield NMR" qui fait référence à un spectromètre RMN spécifique de la série Ultrashield de Bruker, fonctionnant à une fréquence de 300 MHz.

Les spectres RMN ^1H ont présenté en spécifiant le déplacement chimique d'un système par rapport à sa multiplicité (s = singulet, d = doublet, t = triplet, dd = doublet de doublet, m = multiplet) de ses constantes de couplage exprimées en hertz (Hz). Les variations observées dans les positions chimiques des spectres RMN de nos produits par rapport à ceux de la littérature peuvent être attribuées aux différences de fréquences de résonance des appareils RMN utilisés, exprimées en MHz. En effet, l'appareil utilisé pour analyser nos échantillons fonctionne à une fréquence de 300 MHz, tandis que dans la littérature, les spectres ont été obtenus à une fréquence de 400 MHz. Cette différence de fréquence peut entraîner des variations légères dans les valeurs des déplacements chimiques observés, car la résolution et la sensibilité des appareils peuvent influencer la précision des mesures. Les noms SV1 (produit majeur) tandis que le SV2 (produit mineur) sont des codes utilisés pour décrire les pourcentages des parties de produits dans les spectres RMN.

2.2.1 Préparation de carboxyrhodamine 3',6'-Diamino-3-Oxo-3H-Spiro [Isobenzofuran1,9'-Xanthene] n-Carboxylic Acid, n=5,6 (CR) pour la synthèse de SF5/SF6

Le 1,3-aminophénol (3,88 g, 35,6 mmol, 2,08 équiv) a été dissous dans 34 ml d'acide sulfurique dans un flacon à pression scellable, suivi de l'ajout de (3,28 g, 17,1 mmol, 1,00 équiv) d'anhydride trimellitique (3,28 g, 17,1 mmol, 1,00 équiv). Le mélange été agité et chauffé à 185°C pour 6-18 heures (tableau 2.1). Après refroidissement à température ambiante, le mélange réactionnel a été versé dans 300 ml de CH₂Cl₂-CH₃CN 1: 1 sous agitation à 0°C à l'aide d'un bain de glace. Un précipité rouge s'est formé, qui a été filtré à l'aide d'un entonnoir Büchner et lavé 3 fois avec 3×50 ml CH₃CN puis séché. Le solide rouge est dissous dans 300 ml de méthanol et soniqué pendant 4 min. La suspension a été filtrée et le gâteau de filtration a été lavé avec 3×50 ml de MeOH. Le filtrat a été bien concentré. Les codes SV1 sont attribués au produit principal, tandis que les codes SV2 sont utilisés pour le produit secondaire. Ces désignations servent à représenter les pourcentages des différentes composantes observées dans les spectres RMN. RMN ¹H de produit cru: (300 MHz, DMSO-d₆, δ (ppm) SV1: 7.54 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.74 (dd, J = 3.0 Hz, 1H), 6.71 (d, J = 3.0 Hz, 1H). SV2: 7.82 (s, 1H), 6.52 (s, 1H). (CCM de produit brut pour les expériences 1 et 2 (5:2 EtOAc: AcOH) (P1) R_f : 0.66. (P2) R_f : 0.75.

2.2.2 Conception et synthèse de sulfurefluore de nouvelle génération SF4 avec une rhodamine commerciale

Dans un ballon contenant (46,0 mg, 0,126 mmol, 1,00 équiv) de Rhodamine 110 acheter (compagnie caymen), sont ajoutés 13,5 ml d'un mélange ACN: DCM (2:1) et (15,0 µL, 0,182 mmol, 1,40 équiv) d'acide trifluacétique. On observe la formation d'un précipité orange. On ajoute par la suite au milieu réactionnel (20,0 µL, 0,150 mmol, 1,20 équiv) de nitrite d'isoamyle donnant une coloration jaune à la solution. Après agitation pendant 2 h à température ambiante, l'azoture de sodium (17,0 mg, 0.516 mmol, 2.10 equiv) a été ajouté et la solution a été laissée sous agitation pendant 1h. Le mélange réactionnel a ensuite été versé dans 40 mL de NaHCO₃ saturé aq. On extrait la phase aqueuse avec 2 x 40 mL d'EtOAc. Les phases organiques combinées ont été séchées avec Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne

de silice (4:1 Hex: EtOAc a 1:1 Hex: EtOAc) pour donner SF4 (40 mg, 70%). CCM : Rf:0,76 (1:1 Hex: EtOAc). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) 8.06 (m, 1H), 7.75–7.61 (m, 2H), 7.17 (m, 1H), 6.97 (d, J = 1.9 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.75 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 2H).

2.2.3 Conception et synthèse de Rhodamine 110 [3,6-Diamino-9-(2-carboxyphenyl)xanthenium chloride]

Toute la procédure a été effectuée sous une atmosphère azote à l'aide de lien-shlenk. Deux ballons connectés à la ligne de shlenk, une contient 35 ml de H₂SO₄ et laisser dégazé pour 30 min, une contient (3,88 g, 35,6 mmol, 2,08 equiv) de 1,3-aminophénol, faire le transfert de liquide de ballon 1 au ballon 2, laisser sous agitation jusqu'à dissolution totale de 1,3-aminophénol, ouvrir rapidement le bouchon de ballon et rajouter (2,55 g, 17,1 mmol, 1.00 equiv) d'anhydride phtalique, chauffer pour 5h a 180°C. On remarque une dissolution rapide de l'anhydride phtalique avec l'apparition d'une coloration orange. Après refroidissement à température ambiante (rt), 100 g de glace pilée été ajouter doucement dans le mélange. Un précipité rouge s'est formé, qui a été filtré à l'aide d'un entonnoir de Buchner. Les solides rouges bruns ont été lavés avec 3 × 50 mL d'eau et bien séchés. Le matériau solide a été dissous dans 300 mL de méthanol (MeOH) et sonifié pendant 2 à 3 minutes pour assurer une dissolution complète. Ensuite, la suspension a été filtrée et le résidu de filtration a été lavé avec 3 × 50 mL de MeOH, en pressant doucement les solides avec une spatule. Le filtrat a été concentré à l'aide de rotavab et séché avec sous vide pour donner 2,30 g d'un solide rouge.

Le solide brut a été directement utilisé pour la deuxième partie de la synthèse du SF4, sans subir d'analyse préalable.

2.2.4 Élaboration et synthèse d'une sonde SF4 à base de rhodamine préparée

Toute la procédure a été réalisée sous atmosphère d'azote à l'aide d'un système de Schlenk. Dans un ballon contenant (1,91 g, 0,0058 mol, 1,00 équiv) du produit brut de la réaction de la section 2.2.3 sont ajoutés 150 ml d'un mélange ACN: DCM (2:1) et (0,959 ml, 0,0128 mmol, 2,20 équiv) d'acide trifluacétique. On observe la formation d'un précipité orange. On ajoute par la suite au

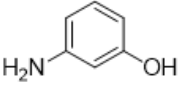
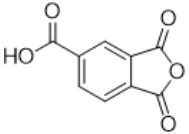
milieu réactionnel (1,80 ml, 0,0139 mmol, 2,40 équiv) de nitrite d'isoamyle donnant une coloration rouge clair à la solution. Après agitation pendant 2 heures à température ambiante, l'azoture de sodium (0,921 g, 0.0139 mol, 2.40 equiv) a été ajouté et la solution a été laissée sous agitation pendant 1h. Ensuite, 200 ml de NaHCO₃ saturé aq été versé dans le mélange réactionnel. On extrait la phase aqueuse avec 2 x 200 ml d'EtOAc. Les phases organiques combinées ont été séchées avec MgSO₄, filtrées et concentrées. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne de silice (4:1 Hex: EtOAc à 1:1 Hex: EtOAc) pour donner SF4 (40 mg, 70%). CCM : Rf:0,42 (1:1 Hex: EtOAc). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) 8.06 (m, 1H), 7.75–7.61 (m, 2H), 7.17 (m, 1H), 6.97 (d, J = 1.9 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.75 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 2H). RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 169.1, 152.9, 151.9, 142.8, 135.3, 130.1, 129.6, 126.2, 125.3, 123.7, 115.5, 115.2, 107.3, 81.7.

2.3 Résultats et discussion

2.3.1 Comparaison du spectre RMN ¹H avec celui de la littérature pour l'intermédiaire carboxyrhodamine dans la synthèse de SF5/SF6

Malgré les ajustements minutieux apportés au protocole de synthèse de la carboxyrhodamine, incluant des modifications des paramètres clés tels que la température, la durée de réaction et les quantités de réactives, dans le but de produire le n-carboxyrhodamine ciblé conformément à l'étude de Lin *et al.* les résultats obtenus n'ont malheureusement pas abouti à la formation du produit attendu. Ces efforts visant à optimiser les conditions expérimentales pour la synthèse de la carboxyrhodamine n'ont pas conduit au succès attendu, mettant en évidence la complexité et les défis de la chimie de synthèse, et soulignant la nécessité d'une approche plus approfondie pour atteindre l'objectif recherché. Les détails des ajustements sont présentés dans le tableau (2.1).

Tableau 2.1 Modification des variables de Lin *et al.*

Expérience	Température (°C)	Temp (Heures)			Purification par chromatographie sur colonne	Pourcentage des résultats RMN ¹ H (Produit brut)
1	185	6	2	1	/	96% SV1 4% SV2
2	185	12	2	1	Produit non obtenu	96% SV1 4% SV2
3	185	12	2	2	/	96% SV1 4% SV2
4	185	12	2	2.5	Produit non obtenu	96% SV1 4% SV2
5	185	6	2	2	/	95% SV1 5% SV2
Littérature	185	6	2	1	Pas de purification	5% produit brut

*Les désignations SV1 sont attribuées au produit principal, tandis que SV2 correspondent au produit secondaire. Ces codes sont utilisés pour représenter les pourcentages des différentes composantes des spectres RMN.

Nous avons décidé de modifier la quantité équivalente de l'anhydride trimellitique en raison de son instabilité et de sa propension à absorber l'humidité. Pour compenser cette instabilité et assurer une réaction complète, nous avons doublé la quantité de cet anhydride afin d'atteindre la concentration nécessaire dans le mélange réactionnel. Par ailleurs, nous avons prolongé le temps de réaction de 6 heures à 12 heures pour permettre aux réactifs de se dissoudre complètement et de réagir efficacement, garantissant ainsi l'obtention du produit souhaité.

Malgré les défis rencontrés lors de la synthèse de la carboxyrhodamine, nous avons entrepris la purification de certains produits par chromatographie sur colonne pour éliminer les impuretés. Les échantillons à purifier ont été sélectionnés en fonction de leur coloration rouge-brun, conformément à celle décrite dans le protocole de la littérature.⁴ La purification de ce composé s'est avérée particulièrement complexe en raison de problèmes de solubilité et d'autres facteurs, tels que l'humidité. De plus, dans l'article de Chang *et al.*, il est mentionné que le rendement attendu de

la réaction était de 5 %, ce qui suggère que le produit brut contient déjà une quantité significative de produits secondaires. Par conséquent, nous avons choisi de comparer le spectre RMN ^1H de notre produit brut avec un spectre prédictif, similaire à celui décrit dans la littérature, afin d'identifier les composés secondaires présents. Cette approche a été adoptée car nous n'avons pas trouvé d'image de spectre RMN ^1H dans la littérature, les données RMN disponibles étant uniquement sous forme de texte.⁴ Cette comparaison nous permettra d'évaluer la pureté du produit brut et de mieux comprendre la nature des impuretés présentes.

Les résultats de la première expérience pour l'intermédiaire carboxyrhodamine sont présentés ci-dessous dans la figure 2.2 et ils ont représentatifs pour toutes les expériences de cette variation. Le spectre révèle la présence des pics dans la plage de (6-9 ppm), ce qui correspond à la région aromatique. Cela est cohérent avec la structure moléculaire de notre composé, qui contient plusieurs cycles aromatiques. Les signaux pour le produit majeur (SV1) sont visibles, y compris le doublet à 7,54 ppm, ainsi que les trois doublets de protons adjacents vers (6,71-6,76 ppm). Les trois petits pics singulets vers (6,93-7,27 ppm) représentent le produit mineur (SV2), avec un singulet vers 7,83 ppm. Les données d'un spectre RMN ^1H obtenus par Lin *et al.* pour l'intermédiaire 5'-carboxy rhodamine nous donnent des signaux, RMN ^1H (400 MHz, d6-DMSO) δ 8.58 (s, 1H), 8.13 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 7.23 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.21 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), et 6.80 (m, 4H).⁴ La comparaison de nos spectres RMN ^1H avec ceux de la littérature a révélé des différences significatives, des pics observés (SV1 et SV2) par rapport à la carboxyrhodamine attendue. L'absence des pics correspondant aux signaux de l'intermédiaire suggère que le produit obtenu n'était pas celui attendu.

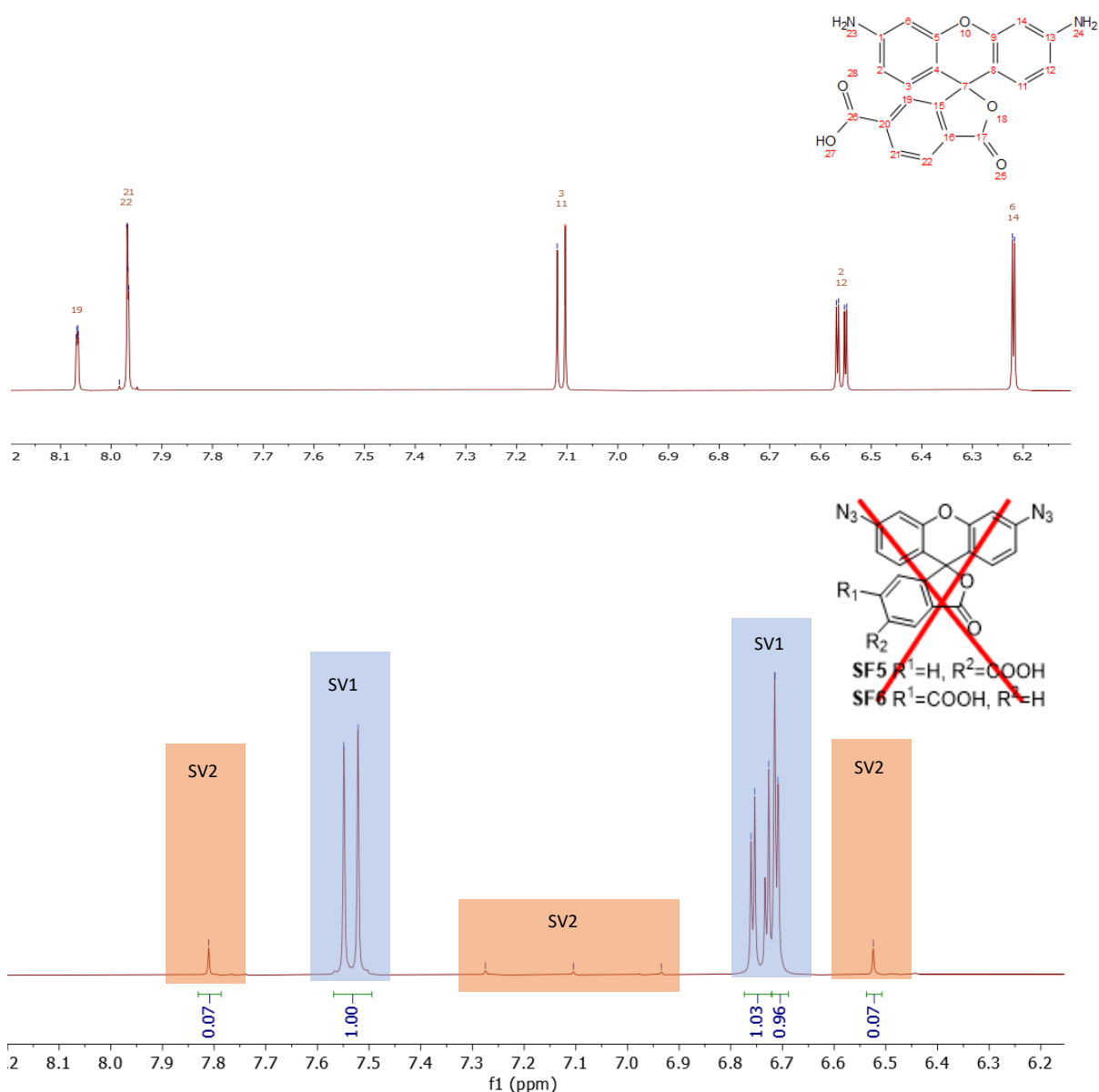


Figure 2.2 (A) spectre de prédiction RMN ^1H de carboxy-rhodamine (400 MHz, DMSO- d_6) (B) Spectres RMN ^1H de notre produit obtenu (300 MHz, DMSO- d_6).

Par la suite, nous avons réalisé une chromatographie sur couche mince (CCM) pour surveiller la progression de la réaction pour les deux premières expériences effectuées. Cependant, l'utilisation de l'éluant décrit par le groupe Lin *et al.* n'a pas donné une bonne séparation du produit. Nous avons donc choisi de modifier le mélange de solvants pour la plaque CCM en utilisant du méthanol, un solvant plus polaire. Bien que cette plaque ait permis un peu la migration des produits. Malheureusement, l'observation de la plaque de chromatographie sur couche mince (CCM)

présentée dans la figure 2.3 révèle la persistance des réactifs dans les produits finaux (P1 et P2), avec une capacité de séparation limitée pour le produit obtenu dans l'expérience. Les positions des taches sont identiques entre P1 et P2, cela peut indiquer que les deux expériences ont produit les mêmes composés.



Figure 2.3 Analyse CCM des produits de la réaction du 1,3-aminophénol et de l'anhydride trimellitique : Comparaison des produits obtenus de l'expérience 1 (P1) et de l'expérience 2 (P2) avec éluant 5:2 (EtOAc/MeOH) (tableau 2.1).

Les spectres RMN ^1H empilées des produits bruts obtenus nous permet de confirmer la présence des protons attachés au noyau aromatique dans la région (6-9 ppm). En utilisant le pic du solvant (DMSO- d_6) comme référence, les résultats de la spectroscopie de résonance magnétique (RMN proton) nous indiquent que la plupart des produits obtenus étaient similaires et presque identiques. En termes de différence de positionnement chimique observée, elles peuvent être attribuées à la contamination d'eau, aux solvants résiduels, à la température, aux impuretés chimiques, à la concentration de l'échantillon, aux effets de solvant, au pH de la solution, et aux interactions intermoléculaires.

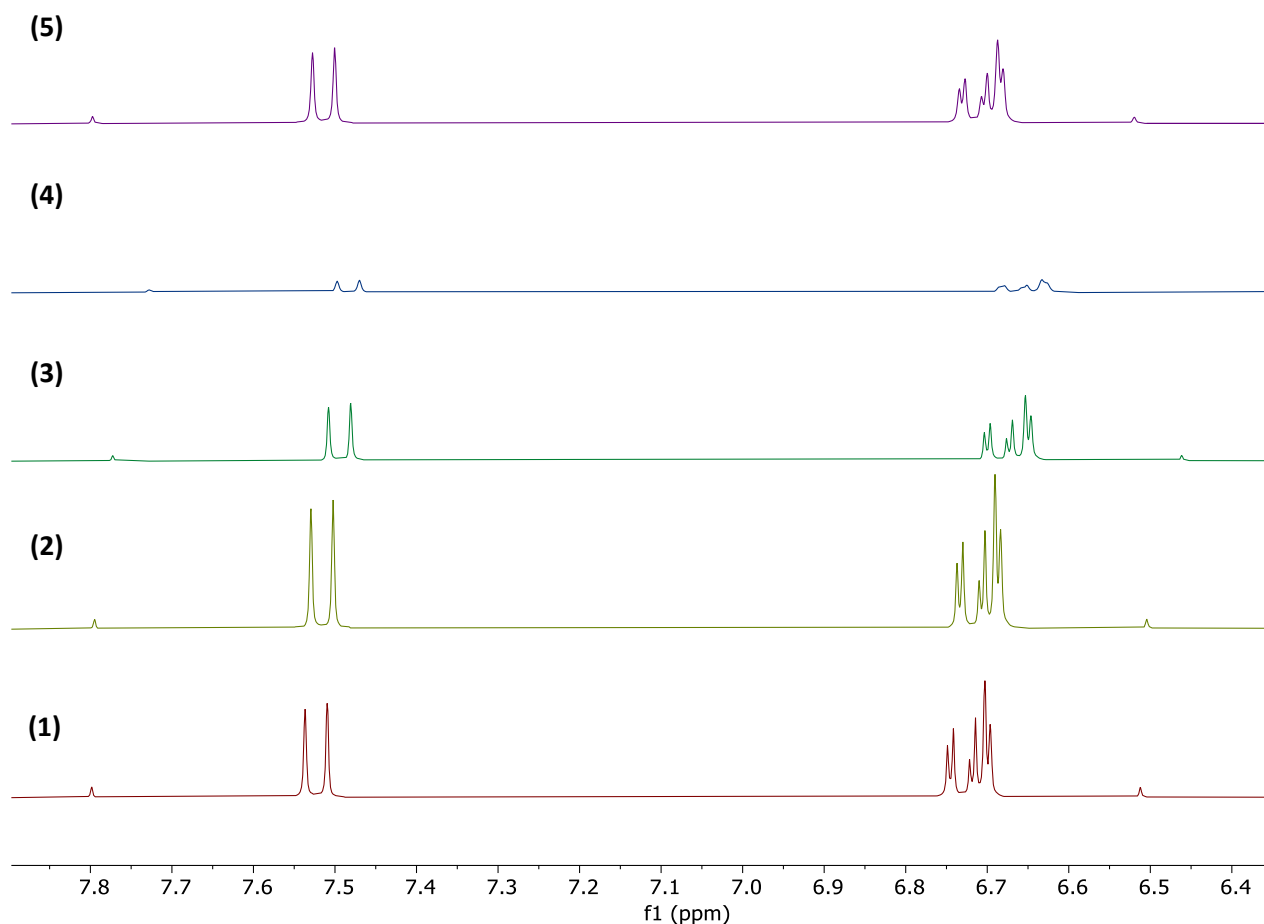


Figure 2.4 Spectres empilées RMN ¹H des produits bruts obtenus pour les expériences (1-5) (300 MHz, DMSO-d₆).

Malgré les défis rencontrés lors de la synthèse du carboxyrhodamine, nous avons opté pour la purification de quelques produits pour certaines expériences via la chromatographie sur colonne afin d'éliminer les impuretés. La purification de ce composé s'est révélée particulièrement complexe en raison des problèmes de solubilité et d'autre aspect comme l'humidité. De plus, dans l'article du groupe Chang *et al.* il est mentionné et précisé que le rendement attendu de la réaction était de 5% ce qui suggère que le produit brut contient déjà une importante quantité de produits secondaires.⁴ Ils ont également indiqué avoir poursuivi directement avec la deuxième étape de la synthèse pour préparer la molécule avec l'azide en utilisant le produit brut. Par conséquent, nous

avons également choisi de faire la comparaison avec un spectre RMN proton du produit brut. L'analyse comparative des spectres RMN ^1H du produit purifié par rapport à ceux du produit brut révèle des variations significatives, avec l'apparition de nouveaux pics plus intenses. D'après les résultats présentés dans la figure 2.5, nous n'avons pas observé les signaux correspondant à ceux décrits dans la littérature, ce qui suggère que le produit obtenu n'était pas le carboxyrhodamine attendu.

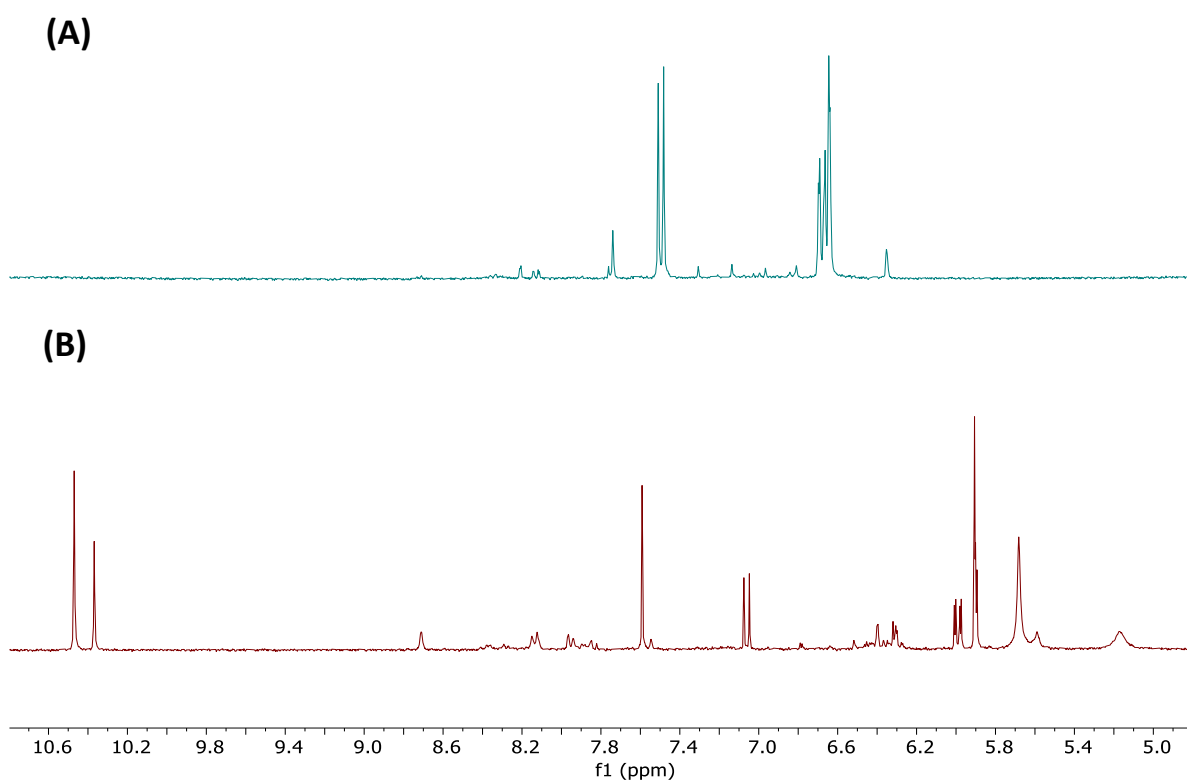


Figure 2.5 (A) Spectre empilées RMN ^1H du produit brut obtenu de l'expérience 2 Avec (B) Spectre RMN ^1H de la fraction purifié (300 MHz, DMSO- d_6).

La synthèse de l'intermédiaire carboxyrhodamine était une étape cruciale dans la préparation de la sonde fluorescente SF5/SF6. Par conséquent, elle s'est révélée être une tâche complexe, malgré de nombreuses modifications apportées aux multiples expériences. En dépit de nos efforts, les résultats obtenus n'ont pas été concluants. C'est pour cela que nous avons décidé d'explorer une nouvelle voie de synthèse pour obtenir une sonde fluorescente de type SF4 présentant une plus grande sélectivité et sensibilité envers le H₂S.

2.3.2 Comparaison du spectre RMN ¹H de notre produit obtenu avec celui de la littérature pour la synthèse de la sonde SF4

Dans cette approche, nous effectuons une étude comparative entre notre produit obtenu pour la synthèse de la sonde SF4 et la sonde SF4 décrite dans la littérature afin de garantir une interprétation rigoureuse et précise. Pour ce faire, nous analysons les spectres RMN ¹H de notre produit et les comparons avec ceux de la sonde SF4 standard, en tenant compte des déplacements chimiques, des multiplicités, et des intégrations observées. Cette comparaison permet de vérifier la conformité de notre produit avec la structure attendue et renforce la fiabilité de nos résultats et contribue à l'avancement des recherches sur les sondes fluorées.

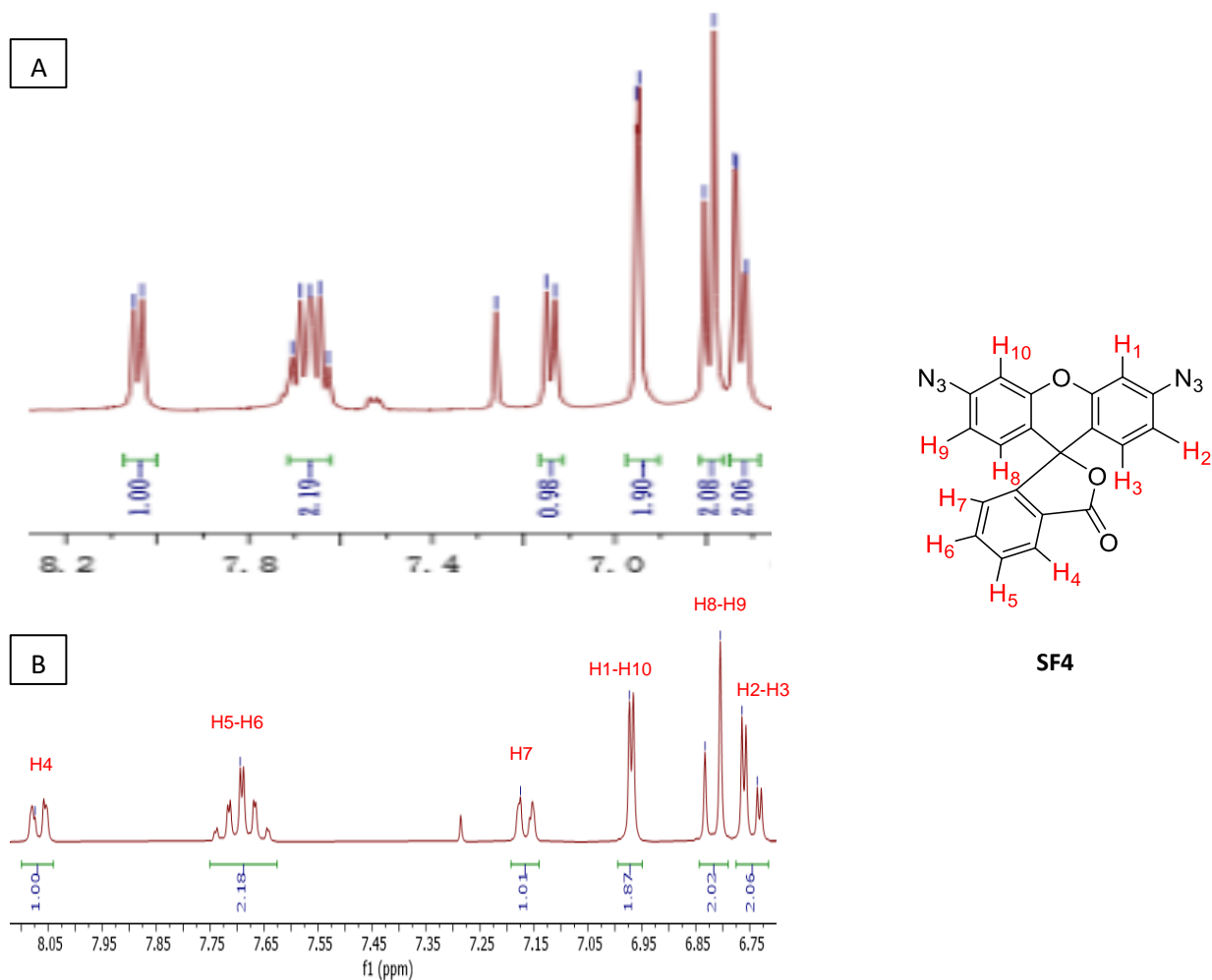


Figure 2.6 Comparaison de spectre RMN ^1H (A) de la littérature RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de la sonde SF4 avec un spectre RMN ^1H (B) de produit purifié (300 MHz, CDCl_3).⁶⁸

Nous présentons ici, les résultats obtenus pour la conception et la synthèse de la sonde SF4 de la section (2.2.2). Les données de spectroscopie RMN ^1H que nous avons obtenues pour la sonde SF4 présentent des signaux identiques à celles rapportées dans la littérature.⁶⁸ Les analyses de RMN ^1H ont révélé que le produit après chromatographie sur colonne était très pur. Le spectre de ce dernier était très proche à celui présenté dans la littérature en termes de multiplicité, de nombre de proton, et même d'intensité comme illustré dans la figure 2.6. Ce qui indique que le produit obtenu correspond bien à la sonde SF4 souhaitée. Ces observations suggèrent que le produit obtenu est en accord avec la structure de la sonde SF4 recherchée. Cette conclusion est appuyée aussi par l'analyse du spectre RMN ^{13}C , qui permet de localiser précisément chaque atome de carbone dans

la molécule. Les différences de positionnement chimique observées dans les spectres de RMN peuvent être dues aux différentes fréquences de résonance des appareils de RMN utilisés, exprimées en MHz.

Nous avons ainsi réalisé une chromatographie sur couche mince (CCM) pour surveiller l'avancement de la réaction comme présenté dans la figure 2.7. La chromatographie sur colonne (CCM) a démontré une bonne séparation du produit de la réaction avec un facteur de rétention (Rf) conforme aux attentes et aux critères de séparation souhaités. Cependant, elle a ainsi illustré que la réaction s'est déroulée conformément à nos attentes. Cette méthode nous a offert une représentation visuelle précise sur l'avancement de la réaction, nous permettant de déterminer le moment idéal pour isoler notre produit. En outre, la CCM a servi une méthode préliminaire de purification en nous permettant de repérer et d'identifier les fractions contenant le bon produit avant de procéder à une purification plus poussée par chromatographie sur colonne.



Figure 2.7 Plaque CCM de produit obtenu après la synthèse de la sonde SF4 avec un éluant (1:1 Hex: EtOAc).

L'étape de synthèse de l'intermédiaire Rhodamine 110 a revêtu une importance cruciale dans notre étude pour plusieurs raisons. Premièrement, la synthèse de Rhodamine 110 a permis d'éviter les dépenses répétitives liées à l'achat de réactifs, une considération essentielle étant donné les contraintes budgétaires de notre laboratoire. Il n'était pas possible d'acheter fréquemment des

réactifs en grande quantité. Cependant, la réussite de la synthèse de la rhodamine 110 en utilisant la réaction avec le 1,3-aminophénol et l'anhydride phtalique démontre que l'hypothèse initiale concernant la réaction employée pour tenter de produire la carboxyrhodamine était valide. Cela confirme que l'échec de la synthèse de la carboxyrhodamine était dû à l'instabilité de l'anhydride trimélique, et non à un problème lié aux conditions de réaction.

Cette étape cruciale a été réalisée avec succès en utilisant la technique de lien-schlenk (avec azote) pour travailler sous atmosphère inerte afin de prévenir toute réaction indésirable avec l'oxygène présent dans l'air. Cette synthèse réussie a constitué ainsi une avancée significative, nous permettant de poursuivre la préparation de la sonde SF4 sans analyser préalablement la Rhodamine 110 brute. Cette approche a ouvert la voie à des études ultérieures, soulignant ainsi l'importance de cette synthèse dans le processus global de notre projet.

2.3.3 Résultats de synthèse de la sonde SF4 avec la Rhodamine 110 de la section 2.2.3

La synthèse de la SF4 en utilisant notre rhodamine préparée comme réactif a été réalisée avec succès, ce succès ayant été vérifié par spectroscopie RMN ^1H ainsi que par spectroscopie RMN ^{13}C . Ces analyses ont permis de confirmer la formation du composé souhaité, en accord avec les données rapportées dans la littérature.^{68, 94} Cette validation expérimentale consolide ainsi la fiabilité de la méthode de synthèse utilisée et nous ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de la chimie des fluorescences.

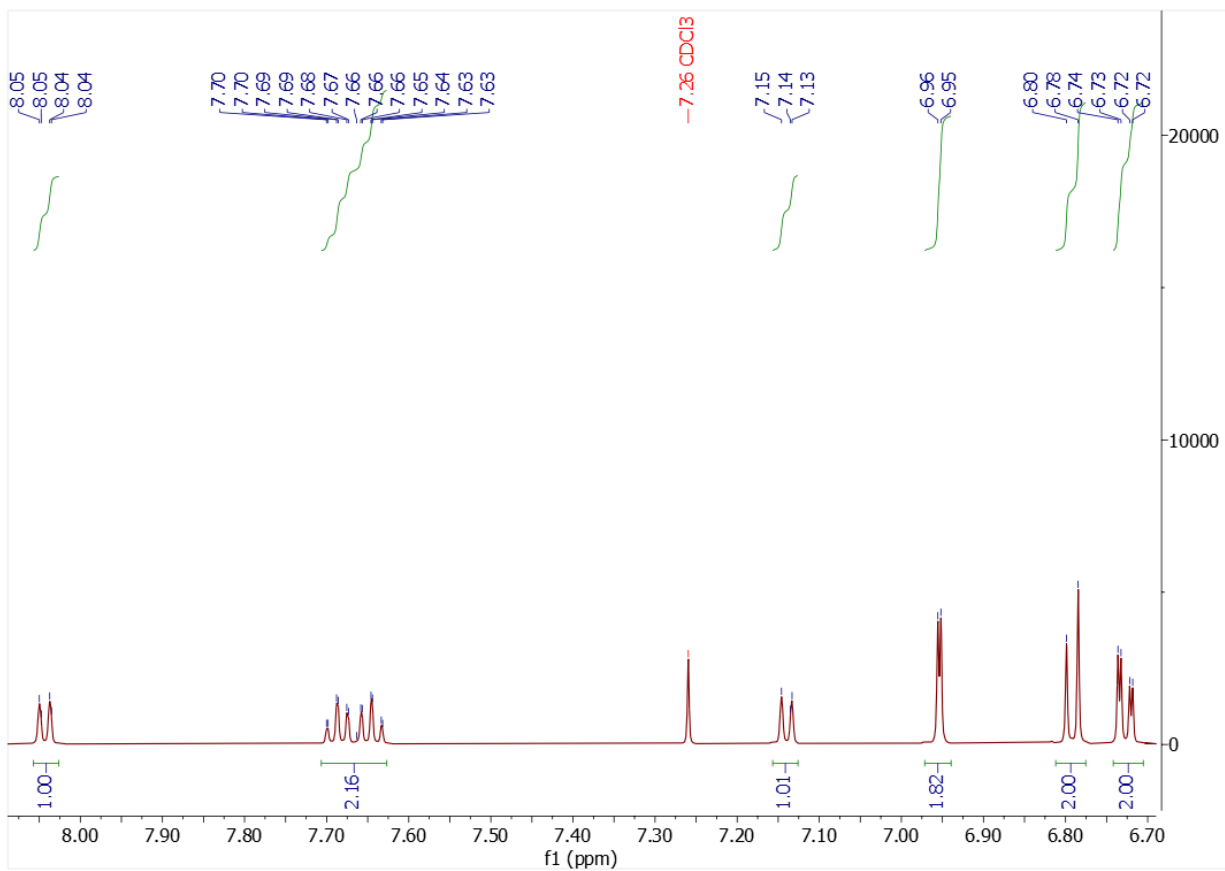


Figure 2.8 Spectre RMN ^1H de produit purifié (SF4) (300 MHz, CDCl_3).

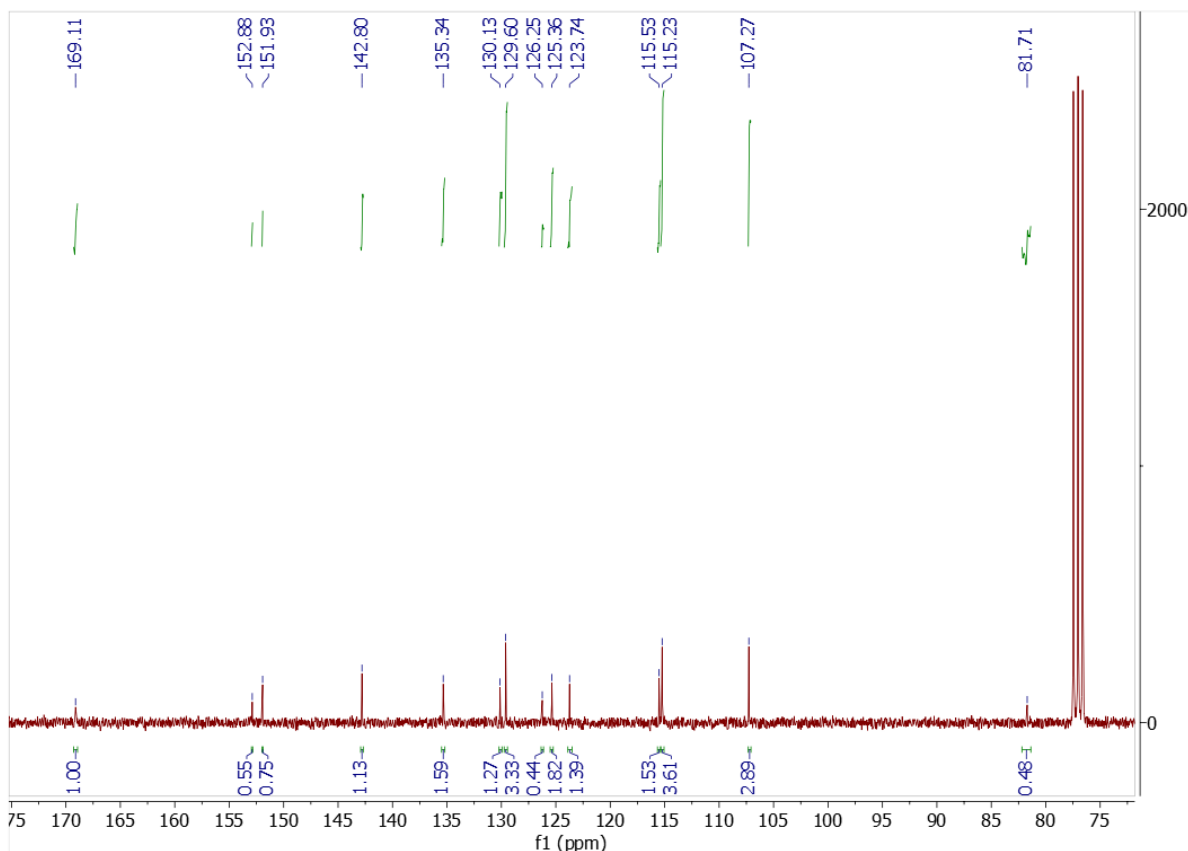


Figure 2.9 Spectre RMN ^{13}C de produit purifié (300 MHz, CDCl_3).

Pour évaluer les résultats de notre synthèse, nous avons réalisé un spectre RMN proton et un spectre RMN carbone 13. Les analyses par spectroscopie RMN ^1H ont montré que le produit obtenu après chromatographie sur colonne était de haute pureté. En examinant la multiplicité, le nombre de protons et même l'intensité des pics, il a été déterminé que le produit est bien conforme à la sonde SF4 désirée. Comme illustré dans la figure 2.8, les résultats de notre étude démontrent une cohérence significative avec les données documentées dans la littérature, mettant en évidence une convergence étroite entre nos observations et les informations préalablement rapportées.⁶⁸ Après analyse du spectre RMN ^1H , nous avons vérifié la correspondance entre le nombre de signaux observés et le nombre d'atomes d'hydrogène non équivalents présents dans notre molécule. En effet, le spectre montre un nombre de pics qui correspond exactement au nombre d'hydrogènes non équivalents, ce qui confirme la validité de notre interprétation.

Comme vous pouvez le constater, les pics apparaissent entre 6 et 8 ppm, ce qui correspond à la région aromatique. Cette observation est conforme à la structure de notre molécule qui contient exclusivement des cycles aromatiques. De plus, les dix protons de la molécule sont tous observables dans notre spectre RMN ^1H . Chaque proton apparaît avec la multiplicité prévue, indiquant les environnements chimiques distincts de chaque groupe de protons. Par exemple, les singulets, doublets, et triplets observés sont en accord avec la théorie et la structure prévue de notre molécule. Cela démontre non seulement la présence, mais aussi la répartition correcte des hydrogènes dans la molécule. En résumé, le spectre RMN ^1H obtenu est en parfaite adéquation avec la structure chimique prévue de notre molécule. Les positions et la multiplicité des pics confirment la présence et l'environnement des hydrogènes dans les cycles aromatiques, assurant ainsi la précision de notre analyse structurale.

Nous avons validé cette constatation en comparant nos données de spectroscopie RMN ^1H avec celles présentées dans la littérature pour la sonde SF4, qui révèlent des signaux similaires. Cette comparaison a confirmé que notre produit final correspond bien à la structure recherchée de la sonde SF4.⁶⁸ Les conclusions que nous avons tirées à partir des données et des observations sont également consolidées par l'interprétation du spectre RMN ^{13}C . En examinant le spectre RMN ^{13}C , nous avons remarqué qu'effectivement un nombre de signaux correspond exactement au nombre d'atomes de carbones non équivalents, ce qui valide notre interprétation structurale. Les pics de carbone apparaissent aux emplacements prévus, conformément aux références bibliographiques.⁹⁴ Chaque signal dans le spectre RMN ^{13}C est en accord avec les déplacements chimiques attendus pour les carbones dans la structure de la sonde SF4. Cette concordance permet une attribution précise de chaque atome de carbone dans la molécule. Par exemple, les pics associés aux carbones aromatiques et aux autres groupes fonctionnels sont bien définis et correspondent aux valeurs théoriques et expérimentales trouvées dans la littérature.⁹⁴ Les résultats illustrés dans la figure 2.9 représentent la visualisation claire des attributions de chaque atome de carbone dans la molécule.

En consolidant les données RMN ^1H et RMN ^{13}C , nous avons pu confirmer la structure de notre sonde SF4 avec une grande précision. En résumé, l'interprétation des spectres RMN ^1H et ^{13}C montre que nous avons le nombre correct de pics correspondant aux atomes d'hydrogène et de carbone non équivalents dans la molécule. Les signaux apparaissent aux endroits prévus,

consolidant ainsi nos conclusions que le produit final correspond à la structure recherchée de la sonde SF4 et en accord avec les références bibliographiques consultées.

2.3.4 Évaluation comparative de la synthèse de SF4 avec une rhodamine 110 préparé et commercialisé

Pour valider notre processus de purification et confirmer l'obtention du produit SF4 de haute pureté, nous avons procédé à une comparaison détaillée de deux spectres RMN ^1H de la sonde SF4 avec ceux d'une rhodamine 110 commerciale et d'une rhodamine 110 préparée comme montré dans la figure 2.10. Cette comparaison nous a permis de distinguer et d'identifier les pics caractéristiques à la sonde SF4 en utilisant le pic du solvant CDCl_3 comme référence. En effectuant une analyse attentive des pics, des déplacements chimiques et des intégrations, nous avons pu attribuer de manière précise la conformité et l'identification des protons spécifiques à la sonde SF4 dans les deux spectres de RMN ^1H avec la rhodamine 110 commercialisée et la rhodamine 110 préparée dans notre laboratoire.

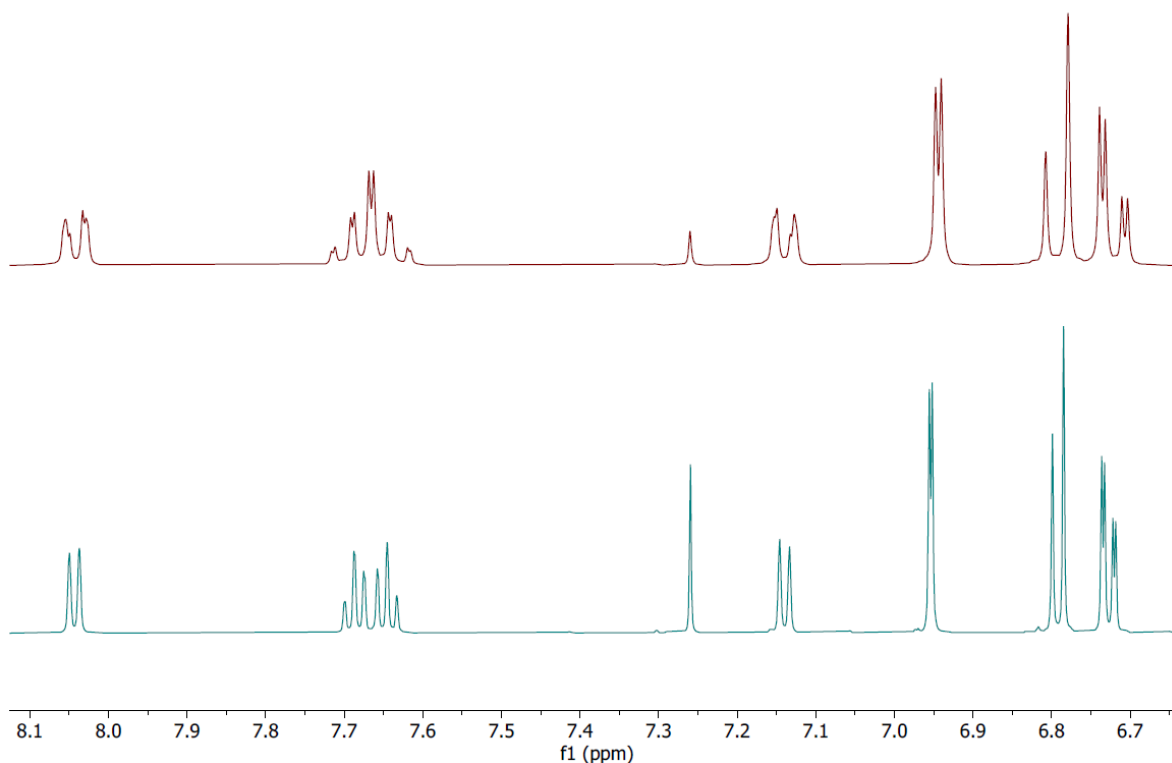


Figure 2.10 (A) Spectre empilé de RMN ^1H du produit purifié (SF4) en utilisant une rhodamine commerciale comme réactif (300 MHz, CDCl_3). (B) Spectre empilé de RMN ^1H de la fraction purifiée (SF4) en utilisant une rhodamine préparée comme réactif (300 MHz, CDCl_3).

Cette comparaison approfondie des spectres RMN ^1H pour les deux sondes SF4 a renforcé notre confiance en termes de pureté et d'identité du produit obtenu, fournissant ainsi une validation supplémentaire pour notre méthode de synthèse et assurant la qualité du produit final. Les deux spectres RMN ^1H étant très similaires et les molécules représentées par chaque spectre sont identiques et qu'il s'agit bien de la bonne molécule SF4. Cependant, cette observation renforce la cohérence de notre produit avec celui décrit dans la littérature. Il est aussi important de noter que le spectre RMN ^1H peut être influencé par divers facteurs, tels que la température ambiante ou la présence d'eau résiduelle dans le CDCl_3 .

CHAPITRE 3

DÉTERMINATION DE L'UTILITÉ DE LA SONDE SF4 PAR DES MESURES D'ABSORBANCE ET DE FLUORESCENCE EN PRÉSENCE DE NaSH ET D'UN MODÈLE DE PROTÉINE CONTENANT UN CLUSTER [4Fe-4S]

3.1 Introduction

Après avoir élaboré, développé et mis au point le protocole de synthèse de la sonde fluorescente, nous avons confirmé le succès de la préparation de la sonde SF4 grâce à des analyses RMN proton et carbone approfondies. Dans cette section, nous avons porté une attention particulière à évaluer la capacité, la spécificité et la sélectivité élevées de cette sonde envers le H₂S, tout en restant inertes vis-à-vis d'autres molécules telles que le monoxyde d'azote (NO) et les thiols biologiques.

Notre objectif dans un premier temps dans cette section est d'évaluer le bon fonctionnement de cette sonde pour la détection du H₂S. Pour ce faire, nous avons exposé notre sonde SF4 à une source directe de H₂S qui est le NaSH pour vérifier la présence de cette molécule dans le milieu. Ensuite, le deuxième objectif de cette section est de démontrer la capacité de notre sonde SF4 à détecter et observer la présence de H₂S durant la réaction de nitrosylation d'un modèle de protéine FeS bien connu et bien établi dans notre laboratoire, à savoir le HiPIP (High potential iron sulfur protein). Pour ce faire, nous avons effectué la réaction de nitrosylation en présence de la sonde SF4 que nous avons synthétisée, un capteur fluorescent spécifiquement conçu pour le H₂S.

La spectroscopie UV-Vis a été utilisée pour déterminer le type du cluster fer-soufre présent en analysant les longueurs d'onde d'absorption caractéristiques de ses composants. De plus, elle a servi à surveiller l'évolution de la réaction entre la sonde SF4 et le NaSH, en mesurant l'absorbance à des longueurs d'onde spécifiques au fil du temps. Enfin, elle a permis d'étudier l'interaction de la sonde SF4 avec des protéines FeS et le NO dans un contexte biologique. En parallèle, nous avons suivi l'évolution de la fluorescence de nos échantillons au fil du temps en utilisant la spectroscopie de fluorescence. Cette méthode nous a offert la possibilité de surveiller les changements d'intensité de fluorescence pour chaque réaction. Il est important de noter que, tout au long de la procédure, nous agitions soigneusement la cuvette avant chaque analyse, en la mélangeant 2 à 3 fois.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Évaluation de la libération de H₂S par la sonde SF4 en présence d'une source directe de H₂S (NaSH) et d'un modèle protéique FeS

3.2.1.1 Procédure de mesure d'évaluation de la fluorescence émise par la sonde SF4

On a pesé 2,00 mg de la sonde SF4 qu'on la fait diluer dans 1.70 ml de DMSO pour obtenir une concentration finale de 3 mM comme solution stock. Pour l'expérience chronologique, 3 ml de HEPES (3 mM) dégazé de 20 mM à pH 7,4 a été utilisée comme tampon et été ajouté dans deux cuvettes anaérobies de spectrophotomètre en quartz de 3 ml, munie d'un bouchon à vis étanche et de septa en silicone (STARNA), l'une servant de blanc et l'autre après le premier scan avec le blanc, on ajoute 10 µl de solution stock SF4. Agité uniformément avant que les spectres d'émission ne soient mesurés. L'intensité de la fluorescence a été mesurée à différents moments (5 min, 10 min, 15 min, etc.). La mesure des spectres d'émission de fluorescence a été effectuée à l'aide d'un photomètre de fluorescence Perkin Elmer, LS45 avec $\lambda_{ex} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 520$ nm. En parallèle on a suivi l'absorbance de la sonde SF4 avec la spectroscopie d'absorption UV-Visible.

3.2.1.2 Étude expérimentale de l'interaction entre la sonde SF4 en présence de NaSH

Une solution mère de NaSH (300 mM) dans un tampon HEPES dégazé de 20 mM à pH 7,4 a été utilisée comme source de H₂S. 2,00 mg de la sonde SF4 ont été dilués dans 1.70 ml de DMSO pour obtenir une concentration finale de 3 mM comme solution stock. Pour l'expérience temporelle, 3 ml de HEPES (3 mM) ont été ajoutés dans deux cuvettes anaérobies de spectrophotomètre en quartz de 3 ml, munie d'un bouchon à vis étanche et de septa en silicone (STARNA), l'une servant de blanc et l'autre contenant 10,0 µl de solution stock SF4. Agité uniformément avant que les spectres d'émission ne soient mesurés. L'intensité de la fluorescence a été mesurée les premières 5 minutes. Par la suite, 100 µL de NaSH ont été ajoutés dans la même cuvette contenant la sonde SF4, et la fluorescence a été mesurée à nouveau, et cela à différents moments (5 min, 10 min, 15 min). La mesure des spectres d'émission de fluorescence a été effectuée à l'aide d'un photomètre de fluorescence Perkin Elmer, LS45 avec $\lambda_{ex} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 520$ nm. En parallèle on a suivi l'évolution de la réaction entre la sonde SF4 et le NaSH au cours du temps avec une spectroscopie d'absorption UV-Visible.

3.2.2 Évaluation de la sonde SF4 avec un modèle de protéines contenant un cluster [4Fe-4S]

Dans cette section, nous aborderons le modèle de protéine qu'on va l'utiliser avec la sonde SF4 qui se porte sur la protéine AvHiPIP (High Potential Iron-Sulfur Protein *d'Allochrochromatium vinosum*), une protéine bactérienne renfermant un cluster [4Fe-4S] hautement conservé comme illustré dans la figure 3.1.

Nous avons sélectionné cette protéine comme modèle en raison de plusieurs critères spécifiques parce qu'elle est préalablement très connue, largement étudiée et très bien caractérisée dans notre laboratoire. Cependant, dans le but de réaliser la nitrosylation d'une protéine possédant un cluster [4Fe-4S] et d'élucider son mécanisme d'action, il est crucial de disposer la protéine AvHiPIP dans une forme hautement pure et en quantité suffisante. Cette partie de ce chapitre décrit en détail les stratégies utilisées pour exprimer la protéine AvHiPIP, ainsi que le protocole de purification qui a été mis en place pour obtenir une protéine de haute pureté. Les résultats obtenus sont présentés et discutés, ce qui permet de progresser vers l'étape suivante qui consiste à évaluer le mode d'action de la sonde SF4 en utilisant cette protéine modèle.



Figure 3.1 Structure de la protéine à haut potentiel rédox d'*Allochrochromatium vinosum* contenant un cluster [4Fe-4S].⁹⁵

3.2.2.1 Procédure de préparation de la protéine HiPIP

3.2.2.1.1 l'expression de la protéine HiPIP contenant [4Fe-4S]

Le protocole de production de HiPIP a été réalisé en deux étapes essentielles pour obtenir la protéine souhaitée. La première étape consistait à produire le HiPIP

1er jour : nous avons commencé par sortir les LB du frigo, prendre aussi les cellules compétentes au -82 °C, préparer deux eppendorfs : un blanc qui contient juste les cellules compétentes et un échantillon qui contient 2 ul de plasmide + cellules compétentes, et on va tous placer directement dans la glace pendant 40 min. Faire le choc thermique pour une durée de 2 min au bain à 42°C puis mettre 5 min sur la glace. Après les 5 min, on a rajouté dans les deux échantillons 1,00 ml de LB (c'est mieux de commencer toujours par le blanc) et les mettre dans incubateur pendant 2h30-3h à 37°C. Sortir les plaques de pétri du frigo. Centrifuger les 2 échantillons à 6000 rpm- 5 min. Prélever 960 ul de surnageant et le jeter, ensuite mélanger les 40 ul et le culot qui reste et le poser sur le côté de la boîte à pétri. Mettre le bout de fer dans EtOH puis dans la flamme et toucher le côté opposé où il n'y a pas de cellules. Finalement mettre les boîtes de pétries à l'incubateur à 37°C toute la nuit (12-16h). Jour 2: Vérification des colonies formées dans les boîtes de pétries. Préparer deux erlenmeyers qui contiennent 50 ml de LB, suivi de l'ajout de 50 ul d'ampicilline (AMP). Gratter un peu les colonies à l'aide d'un embout et le mettre directement dans LB-AMP. Incuber les erlenmeyers toute la nuit à 180 rpm, 30°C. 3ème jour : Nous avons divisé le contenu d'un erlenmeyer de 50 ml dans les erlenmeyers de 1 L (25 ml dans chacun). L'ampicilline a été initialement ajoutée au milieu de culture pour permettre la sélection des cellules qui contiennent le plasmide Pet-21d (+). Ensuite, les cellules ont été introduites dans un incubateur agité à une vitesse de 200 tours par minute (RPM) à une température de 37°C. Cette condition a favorisé la croissance et la multiplication des cellules. Après la phase de croissance initiale, transférez les cultures dans des bains d'eau glacée pendant 18 minutes. Ensuite, ajoutez de l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) à une concentration finale de 20 mM dans chaque erlenmeyer en utilisant une solution mère à 1M, en ajoutant 20,0 μ l par échantillon. À la suite de cette incubation, ajoutez une solution de Fe³⁺ (AIC = Ammonium iron citrate III) à une concentration de 200 Mm en ajoutant 100 μ l de Fe³⁺ et de la méthionine à 0,500 M à une concentration de 50,0 Mm en ajoutant 20,0 μ l de méthionine. Remettez ensuite les erlenmeyers dans l'incubateur pour une

période supplémentaire de 5 heures à 30°C et à 125 rpm. Après cette période, les cultures sont transférées dans des bouteilles Beckman de 500 ml et centrifugées à 6000 rpm pendant 18 minutes à 4°C. Les culots obtenus sont ensuite resuspendus dans l'eau et transférés dans des tubes de 50 ml. Ces tubes sont centrifugés à nouveau à 6000 rpm pendant 18 minutes à 4°C. Enfin, les culots sont conservés dans un congélateur à -20°C.⁹⁶

La deuxième étape consistait à purifier le HiPIP

3.2.2.1.2 La purification

La purification des protéines a été effectuée en utilisant la technique de chromatographie liquide rapide sur colonne à protéine (FPLC) (Fast Protein Liquid Chromatography) avec des colonnes de nickel. Les culots cellulaires contenant les protéines ont été lavés avec un tampon Tris 20 mM à un pH de 7,4 auquel du PMSF (2 mM) et de la lysozyme (0,40 mg/mL) ont été ajoutés afin d'inhiber l'activité des protéases pendant la lyse cellulaire. La rupture des membranes cellulaires a été réalisée par sonication l'aide d'un sonicateur à pointe (BRANSON, SONIFIER 450), en effectuant cinq cycles de 2 minutes en marche suivis de 2 minutes d'arrêt. Après cela, la combinaison a été centrifugée à 18000 tours par minute à une température de 4°C pendant 40 minutes afin de fractionner les débris (la phase solide) du surnageant (la phase liquide). La phase solide, c'est-à-dire le culot, a été enlevé, tandis que le surnageant comprenant les protéines a été maintenu sur la glace tout au long de la procédure de purification.⁹⁶

Cette étape avait pour but de limiter au maximum l'activité des protéases afin de prévenir la dégradation des protéines. Avant de procéder au passage du surnageant par la chromatographie sur colonne de nickel, le système FPLC a été préalablement purgé avec un tampon A contenant du tris à 20 mM et un pH de 7,4. Par la suite, le surnageant contenant les protéines HiPIP [4Fe-4S] a été injecté dans une colonne de nickel de 5,00 mL avec un débit de 1 mL/min. Le débit a été sélectionné pour favoriser la liaison de la plupart des protéines HiPIP aux ions nickel Ni²⁺ grâce à la présence de résidus d'histidine (His Tag) dans leur structure. Cela a permis de former un complexe stable entre les protéines et les ions nickel. Néanmoins, les autres impuretés ont été évacuées de la colonne vers les déchets. Nous avons observé un défi lors de l'application de ces conditions de purification, car la protéine HiPIP [4Fe-4S] obtenue présente un niveau d'impuretés notable. Nous avons évalué

la pureté de la protéine en utilisant la méthode de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE).⁹⁶

Pour remédier à cette problématique, nous avons mis en œuvre plusieurs stratégies. Dans un premier temps, nous avons opté pour l'utilisation de deux colonnes de nickel de 5 ml chacune au lieu d'une seule, afin d'obtenir une séparation plus efficace des protéines. En outre, nous avons débuté avec des gradients très progressifs, qui n'excédant pas 15 % de tampon B, et aussi nous avons diminué le débit à 0,500 mL/min afin de prolonger la durée de séparation.

Après ces ajustements, nous avons observé que la plupart des impuretés étaient retirées avec un gradient de 15 % de tampon B, pendant que notre protéine était collectée sous une forme très pure lorsque le gradient était augmenté à 20 % ou plus. Les fractions renfermant la HiPIP (de couleur brune) ont été regroupées, concentrées et échangées contre le tampon C (20 mM de TRIS, pH = 8,6) à l'aide de filtres centrifuges Amicon (3 kDa).⁹⁶

Pour évaluer la purification de la protéine HiPIP contenant un cluster 4Fe-4S et pour connaître la masse, une électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium) est utilisée. La préparation du gel SDS-PAGE, dont la composition est illustrée dans le tableau 3.1, commence par la confection d'un gel de polyacrylamide, suivi de la préparation des échantillons de protéines avec un tampon de chargement et une dénaturation par chauffage. Pour ce faire, 5 mg de protéines sont dénaturés en les chauffant à 95°C dans un tampon de dénaturation composé de Tris-HCl (250 mM, pH=6,8), SDS (10 %), glycérol (50 %), bleu de bromophénol (0,5 %), et dithiothréitol (DTT, 500 mM). Les échantillons protéiques ainsi dénaturés sont ensuite déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide contenant du SDS. L'électrophorèse est effectuée sous un courant électrique de 300 V et 50 mA pendant environ 90 minutes jusqu'à ce que les protéines migrent complètement. Après migration, le gel obtenu est coloré avec du bleu de commasie brillant (0,1 %), méthanol (40 %), acide acétique (10 %) suivi d'une décoloration dans une solution de méthanol (10 %) et acide acétique (10 %) pour visualiser les bandes protéiques obtenues. Cette méthode permet de vérifier la pureté de HiPIP en comparant les bandes obtenues aux standards de poids moléculaire.

Tableau 3.1 Composition du gel d'électrophorèse

Réactifs	Gel de séparation (12 %)	Gel de concentration (12 %)
Eau distillée	4,80 mL	2,93 mL
Acrylamide/Bisacrylamide	6 mL	670 µL
Tris-Base (1,5 M, pH=8,8)	3,9 mL	/
Tris-HCl (0,5 M, pH=6,8)	/	1,3 mL
SDS (10 %)	150 µL	50 µL
APS (10 %)	150 µL	50 µL
Temed	15 µL	5 µL

3.2.2.2 Procédure de préparation de DEA-NANOate

Le DEA-NONOate (Cayman Chemicals) qui est une source indirecte de NO a été préparé anaérobiquement sous forme d'une solution à 96 mM. Pour ce faire, un volume de 1680 µl d'une solution aqueuse de NaOH à 2 M, préalablement dégazée, a été ajouté à la bouteille de DEA-NONOate (Masse molaire = 155,13 g/mol). Ensuite, la solution a été divisée et répartie dans 6 flacons hermétiques, chacun contenant 280 µl, avant d'être stocké à -20 °C.

3.2.2.3 Procédure de préparation de la solution mère de la sonde SF4

Une solution de SF4 (Sulfidefluor-4) a été préparée avec soin en pesant dans un petit vial avec précision 2,00 mg du composé de SF4, qui a une masse moléculaire de 382.34 g/mol. Ensuite, 1,70 ml de DMSO ont été ajoutés pour obtenir une concentration finale de 3 mM. Avant utilisation, la solution a été dégazée pendant 30 minutes. Après utilisation, le vial a été stocké à une température

de -20 °C pour assurer sa stabilité à long terme. Ce processus rigoureux garantit la disponibilité d'une solution de SF₄ de haute qualité, prête à être utilisée dans diverses applications expérimentales de manière fiable, tout en assurant sa conservation optimale.

3.2.2.4 Mesure de fluorescence de la réaction de HiPIP avec NO en présence de la sonde SF₄

Pour surveiller la réaction de nitrosylation de la protéine HiPIP [4Fe-4S] avec le NO et pour détecter le H₂S libéré au cours de cette réaction, nous avons utilisé la spectroscopie de fluorescence. Cette méthode nous a permis de mesurer les intensités de fluorescence de chaque échantillon au fil du temps. Cependant, la spectroscopie UV-visible a été mise en œuvre pour suivre l'évolution de la réaction. Les mesures de chaque échantillon ont été réalisées successivement à chaque intervalle de temps, assurant un suivi minutieux et précis de la progression de réaction. Les analyses spectroscopiques ont été effectuées dans des conditions aérobies à l'air libre normal en utilisant une cuvette de fluorescence en quartz de 3 ml, munie d'un bouchon à vis étanche et de septa en silicone (STARNA). En employant des solutions dégazées ou préparées dans un environnement contrôlé à l'intérieur d'une enceinte à atmosphère contrôlée d'azote. Une cuvette en quartz équivalente, remplie d'un tampon dégazé, a été employée comme cellule de référence dans le spectrophotomètre UV-Visible. Dans les expériences habituelles, les spectres d'absorbance et de fluorescence ont été enregistrés pour un échantillon blanc de 3000 µL de tampon HEPES 100 mM à un pH de 7,4. Les spectres subséquents ont été enregistrés après l'addition de volumes adaptés de composé ou de protéine, en utilisant des seringues Hamilton gastight de 10 µL, 100 µL, 250 µL et 1000 µL, suivie d'un mélange doux jusqu'à homogénéisation. Pour cette étude dans le temps, 3 ml de solution de HEPES à une concentration de 100 mM et à un pH de 7,4 ont été ajoutés dans chacune des deux cuvettes anaérobies de spectrophotomètre en quartz de 3 ml, munie d'un bouchon à vis étanche et de septa en silicone (STARNA). Une cuvette a été utilisée comme blanc tandis que l'autre contenait 10 µL de solution stock de SF₄. Les cuvettes ont été uniformément agitées avant l'acquisition des spectres d'émission. L'intensité de la fluorescence a été évaluée au cours des cinq premières minutes. Ensuite, 60 µL de HiPIP ont été introduits dans la cuvette contenant la sonde SF₄, et la fluorescence a été évaluée. Par la suite, 30 µL supplémentaires de NO ont été ajoutés dans la même cuvette, et la fluorescence a été mesurée à plusieurs intervalles de temps (5 min, 10 min, 15 min, etc.).

Les spectres d'absorbance UV-visible ont été enregistrés dans la plage de longueurs d'onde allant de 280 nm à 600 nm. Quant aux spectres d'émission de fluorescence pour SF4 on a utilisé un filtre de 2% avec un gain élevé et une vitesse de 1000. Cependant, les spectres ont été capturés dans la plage de longueurs d'onde allant de 500 nm à 700 nm avec une excitation $\lambda_{ex} = 488$ nm, et une émission $\lambda_{em} = 520$ nm).

3.3 Résultats et discussion

3.3.1 Mesure de fluorescence et d'absorbance de la sonde SF4 en présence de NaSH

Pour évaluer la fonctionnalité de notre sonde SF4 et sa capacité à détecter le H₂S dans le milieu, nous l'exposons à une source directe de H₂S, le NaSH (sulfhydrate de sodium) comme illustré dans la figure 3.2. Cette approche permet de simuler une situation où le H₂S est présent en concentration contrôlée et mesurable, assurant ainsi la validité des résultats obtenus. Lors de l'exposition de SF4 à NaSH, nous prévoyons d'observer une modification spectrale indicative de l'interaction entre la sonde et le H₂S.

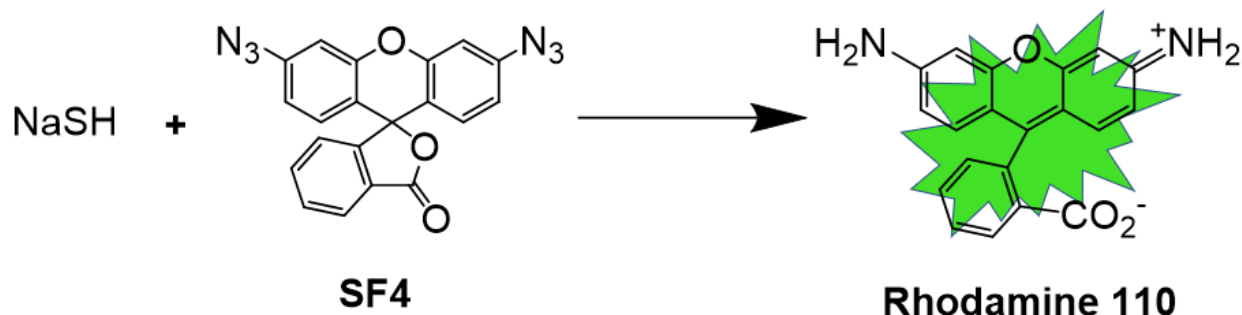


Figure 3.2 Interaction entre la sonde SF4 et une source directe de H₂S (NaSH).

La figure 3.3 montre que lors de l'ajout de NaSH en tant que source directe de H₂S dans un milieu qui contient la sonde SF4, cela a augmenté l'intensité de fluorescence de manière significative au fil du temps (spectre A). On parallèle, le suivi d'évolution de la réaction (spectre B) entre la sonde SF4 et en présence de NaSH au fil du temps a démontré une augmentation d'absorbance à 509 nm, ce qui correspond à la longueur d'onde maximale de rhodamine 110 (produit fluorescent). Observation d'une diminution d'absorbance du produit précédent contenant de l'azide, et une petite

augmentation d'absorbance qui est due à la formation d'un nouveau produit contenant l'amine. Cela prouve que la sonde SF4 est bien fonctionnelle et efficace pour détecter le H₂S dans le milieu.

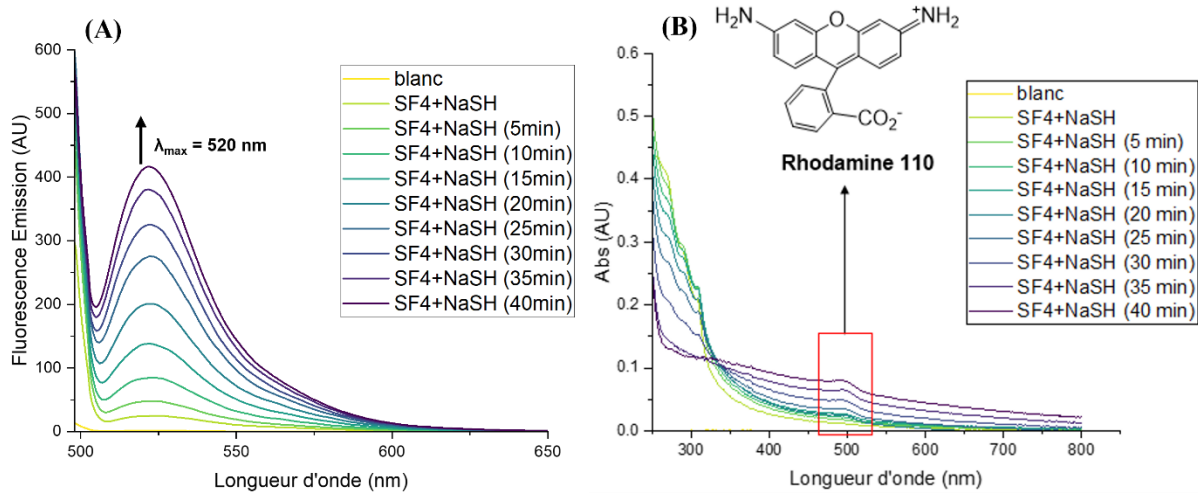


Figure 3.3 Mesure d'intensité de fluorescence de la sonde SF4 en présence de 100 μM NaSH (spectre A) et mesure d'absorbance de la sonde SF4 en présence de NaSH (spectre B).

Afin de confirmer l'efficacité de la sonde SF4 pour la détection de H₂S dans le milieu, on a fait une comparaison entre les intensités de fluorescence de la sonde SF4 seule et en présence de NaSH durant le temps comme illustré dans la figure 3.4. La mesure de SF4 toute seule a entraîné une intensité de fluorescence très petite qui augmente avec le temps. En parallèle, la mesure d'absorbance de la sonde SF4 seule n'a pas détecté aucune augmentation à la longueur d'onde 509 nm qui est dû à la longueur d'onde maximale de rhodamine 110. Un graphe des intensités de fluorescence à 520,5 nm de la sonde SF4 seule et en présence de NaSH au fil du temps a été mené pour valider la réponse de détection qui a confirmé la réponse de sensibilité de la sonde SF4 vers le H₂S. Les points rouges représentent la sonde SF4 en présence de NaSH, montrant une augmentation progressive de l'intensité de fluorescence avec le temps, atteignant environ 400 unités au bout de 40 minutes. Les points noirs montrent la sonde SF4 seule, qui présente une intensité de fluorescence stable et très faible sur la même période (graphe C figure 3.4).

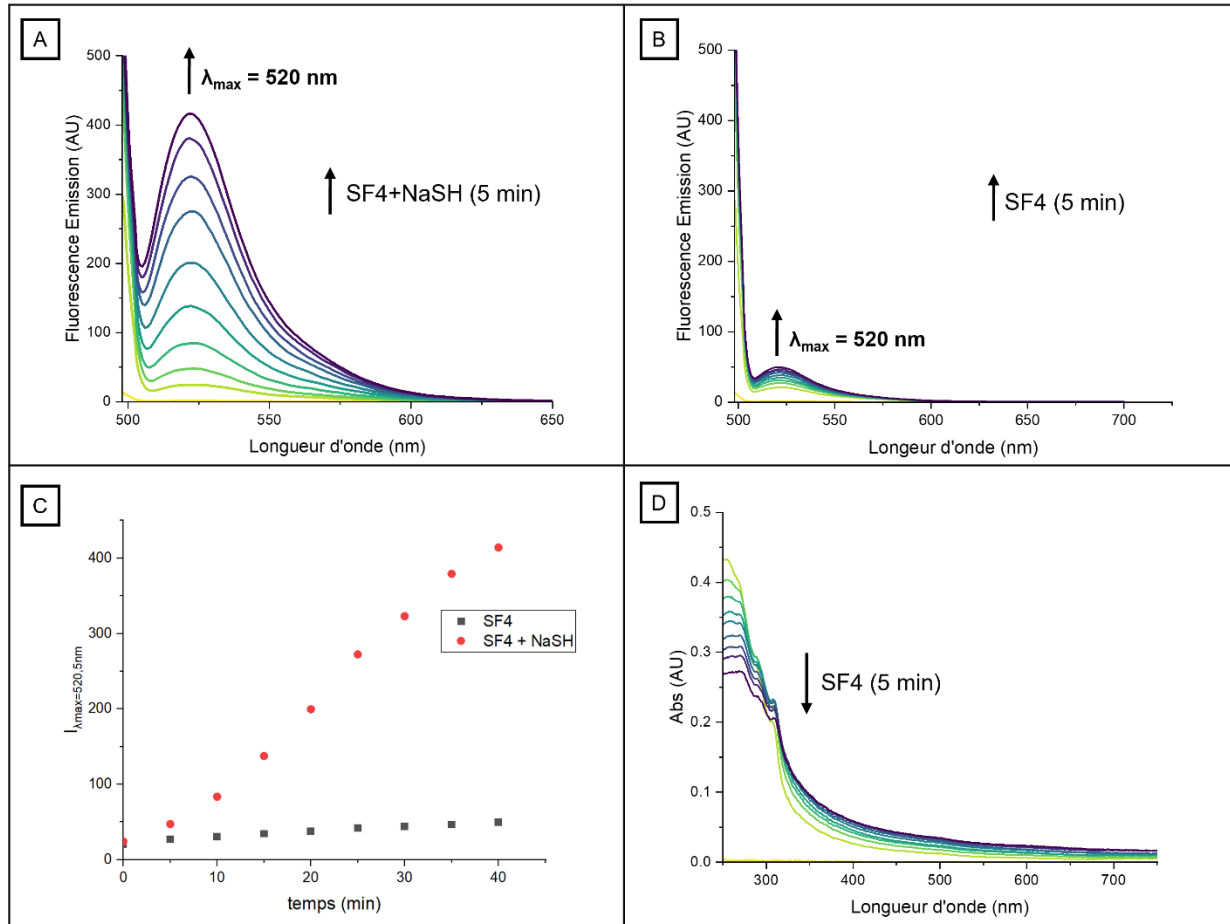


Figure 3.4 Comparaison des intensités de fluorescence de la sonde SF4 seule (spectre B) et en présence de NaSH (spectre A) sur une plage de temps de 5 à 40 minutes, accompagnée de la mesure d'absorbance de la sonde SF4 seule (spectre C). Un graphe comparatif des intensités de fluorescence de la sonde SF4 seule et en présence de NaSH à une longueur d'onde maximale de 520,5 nm (spectre D).

3.3.2 Comparaison des spectres d'intensité de fluorescence entre nos résultats et ceux de Chang *et al.* pour la sonde SF4 en présence de NaSH

Pour valider notre réponse de détection du H₂S avec la sonde SF4 et afin de confirmer sa spécificité et sa sélectivité envers cette molécule, nous avons entrepris une comparaison entre nos résultats et ceux du groupe de Chang *et al.* en analysant les graphes d'intensité de fluorescence en fonction du temps de la sonde SF4 en présence de NaSH / Na₂S, qui agit comme une source directe de H₂S comme illustré dans la figure 3.5 ci-dessous.⁴

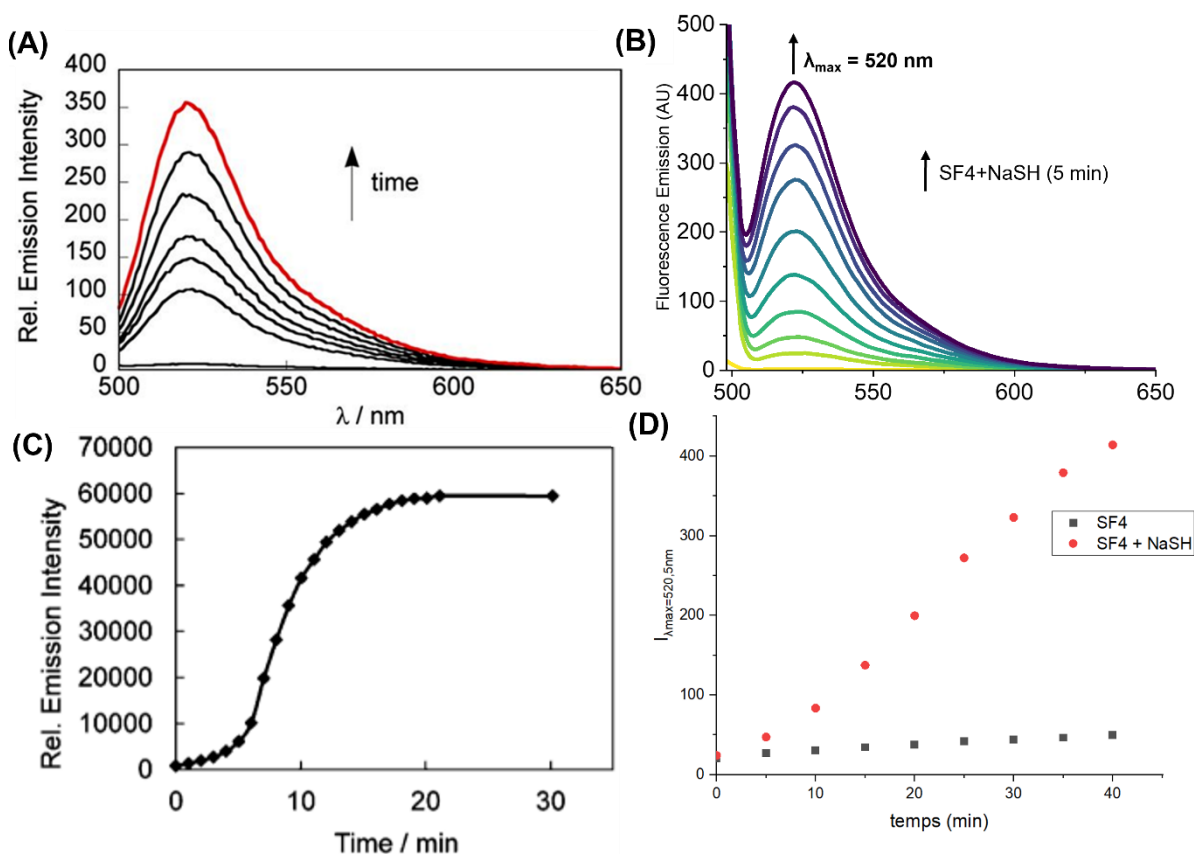


Figure 3.5 (A) Spectre d'intensité de fluorescence pour la sonde SF4 de groupe de Chang *et al.* en présence de NaSH, (B) Spectre d'intensité de fluorescence pour notre sonde SF4 en présence de NaSH, (C) Un graphe d'intensité de fluorescence de la sonde SF4 en présence de Na₂S de groupe

de Chang *et al.*⁴ (D) Un graphe comparatif des intensités de fluorescence de la sonde SF4 seule et en présence de NaSH à une longueur d'onde maximale de 520,5 nm.

En comparant les spectres d'intensité de fluorescence de la sonde SF4 que nous avons synthétisée (spectre B) avec ceux rapportés par le groupe de Chang *et al.* (spectre A) dans 20 mM HEPES à pH=7.4, il est clairement observable que notre sonde SF4 présente une augmentation similaire de l'intensité de fluorescence en présence de H₂S. Cette similitude démontre que notre sonde SF4 conserve des propriétés de détection du H₂S comparables à celles observées dans les travaux précédents. La capacité de notre sonde à détecter efficacement le H₂S, comme le prouve cette comparaison directe, valide la précision de notre synthèse et l'efficacité du produit final. Sur la base de ces données expérimentales solides, nous pouvons affirmer avec assurance que notre sonde SF4 est un outil fiable et sensible pour la détection du H₂S.

Les graphiques (C) et (D) illustrent la réponse de la sonde SF4 à la présence de donneurs de H₂S, permettant une comparaison entre la sonde préparée dans notre laboratoire et celle préparée par le groupe de Chang. Dans le graphique (C), nous observons l'intensité de fluorescence de la sonde SF4 en présence de Na₂S, comme rapporté par Chang *et al.* La courbe montre une augmentation rapide de l'intensité de fluorescence jusqu'à atteindre un plateau après environ 20 minutes, indiquant une réactivité de la sonde SF4 avec Na₂S. Le graphique (D) compare les intensités de fluorescence de notre sonde SF4 seule (carrés noirs) et en présence de NaSH (cercles rouges) à une longueur d'onde maximale de 520,5 nm. Les résultats montrent que l'intensité de fluorescence de la sonde SF4 augmente de manière significative en présence de NaSH, reflétant ainsi une réactivité de la sonde SF4 avec NaSH.

En comparant les deux graphiques, il est clairement observable que notre sonde SF4 présente une augmentation de fluorescence pas similaire à celle préparée par le groupe de Chang lorsqu'elle est exposée à un donneur de H₂S. Bien que notre sonde SF4 est assez proche de celle du groupe de Chang. Cela démontre que notre méthode de synthèse de SF4 est aussi spécifique que celle de Chang et que notre sonde est capable de détecter le H₂S avec une sensibilité comparable.

La courbe de Chang atteint un plateau après 20 minutes, tandis que notre sonde continue d'augmenter au-delà de 20 minutes, sans atteindre le plateau même après 40 minutes. Cette différence peut s'expliquer par plusieurs facteurs expérimentaux. Tout d'abord, la taille des cuvettes diffère, nous avons utilisé une cuvette de 1 cm x 1 cm, tandis que le groupe de Chang a utilisé une cuvette de 1 cm x 0,1 cm. Une cuvette plus large augmente le parcours optique, ce qui entraîne une plus grande dispersion de la lumière. Dans une cuvette de 1 cm x 1 cm, les photons émis par la fluorescence ont un trajet plus long à parcourir avant d'atteindre le détecteur. Pendant ce trajet, ils subissent plus de collisions avec les molécules du solvant ou de l'air, ce qui peut entraîner une absorption ou une déviation des photons. Ces collisions augmentent la probabilité que les photons soient absorbés ou dispersés avant d'atteindre le détecteur, réduisant ainsi l'intensité de fluorescence mesurée. En revanche, une cuvette plus étroite, comme celle de 1 cm x 0,1 cm utilisée par le groupe de Chang, minimise ces effets. Cela signifie que le parcours des photons est plus court. Cela diminue le nombre de collisions possibles et la dispersion de la lumière, permettant ainsi à une plus grande proportion de photons émis de parvenir directement au détecteur. Par conséquent, une cuvette plus étroite permet une détection plus efficace des photons émis, résultant en un signal de fluorescence plus intense et plus rapidement détecté.

Ensuite, les conditions expérimentales varient également, nous avons utilisé une concentration de sonde SF4 de 10 μM , contre 5 μM pour le groupe de Chang, et une concentration de NaSH de 10 mM, contre 1 mM pour eux. Par conséquent, La différence de ratio de concentration entre notre expérience et celle du groupe de Chang pourrait expliquer une cinétique de réaction différente. Dans notre expérience, une concentration plus élevée de SF4 (10 μM) signifie qu'il y a plus de molécules de sonde disponibles pour réagir avec le sulfure. En théorie, cela pourrait augmenter la vitesse initiale de la réaction, car plus de molécules de SF4 peuvent interagir simultanément avec NaSH. Cependant, avec une concentration de NaSH de 10 mM, beaucoup plus élevée que celle utilisée par le groupe de Chang (1 mM), la réaction peut être limitée par la disponibilité de SF4, même à 10 μM .

La cinétique de la réaction dépend de la concentration des deux réactifs : SF4 et NaSH. Dans notre cas, bien que nous ayons doublé la concentration de SF4 par rapport à celle du groupe de Chang, la réaction pourrait prendre plus de temps pour atteindre un plateau. En effet, avec une concentration de NaSH beaucoup plus élevée, les molécules de SF4 sont consommées rapidement,

mais comme il y a plus de réactifs en solution, la réaction se poursuit plus longtemps avant que toutes les molécules de SF4 ne soient complètement réagis. Cela se traduit par une cinétique de réaction plus lente et un plateau atteint après un temps plus long. En comparaison, dans l'expérience du groupe de Chang, avec une concentration plus faible de SF4 (5 μ M) et de NaSH (1 mM), la réaction est plus rapide, car il y a moins de réactifs en solution. Les molécules de SF4 réagissent rapidement avec les molécules de NaSH disponibles, atteignant le plateau de fluorescence en environ 20 minutes.

En résumé, la différence de concentrations de SF4 et de NaSH dans nos expériences respectives entraîne des cinétiques de réaction différentes. Notre réaction, avec une concentration de SF4 plus élevée, prend plus de temps pour atteindre un plateau de fluorescence, tandis que la réaction du groupe de Chang, avec des concentrations plus faibles, atteint le plateau plus rapidement.

Bien que les résultats soient comparables, les différences dans les conditions expérimentales et les paramètres utilisés expliquent les variations observées entre nos courbes de fluorescence et celles du groupe de Chang.

Aussi, comme attendu, les sondes SF4 sous forme de bis-azides sont peu réactives. Cependant, lorsqu'elles réagissent avec le H₂S produit à partir de donneurs de H₂S telles que NaSH ou Na₂S, les groupes azides sont réduits en anilines, générant ainsi de la rhodamine 110.⁴

Sur la base de ces preuves solides, nous pouvons affirmer avec confiance que notre sonde SF4 est un outil fiable et sensible pour la détection du H₂S. Ces résultats renforcent la validité de notre approche expérimentale utilisant NaSH comme source directe de H₂S. De plus, ils ouvrent de nouvelles perspectives en permettant l'exploration et la poursuite de l'utilisation de notre sonde SF4 avec d'autres systèmes biologiques susceptibles de générer du H₂S.

3.3.3 Évaluation comparative des spectres de fluorescence et d'absorbance de la sonde SF4 en présence de NaSH : validation des résultats avec la rhodamine commerciale et synthétisée

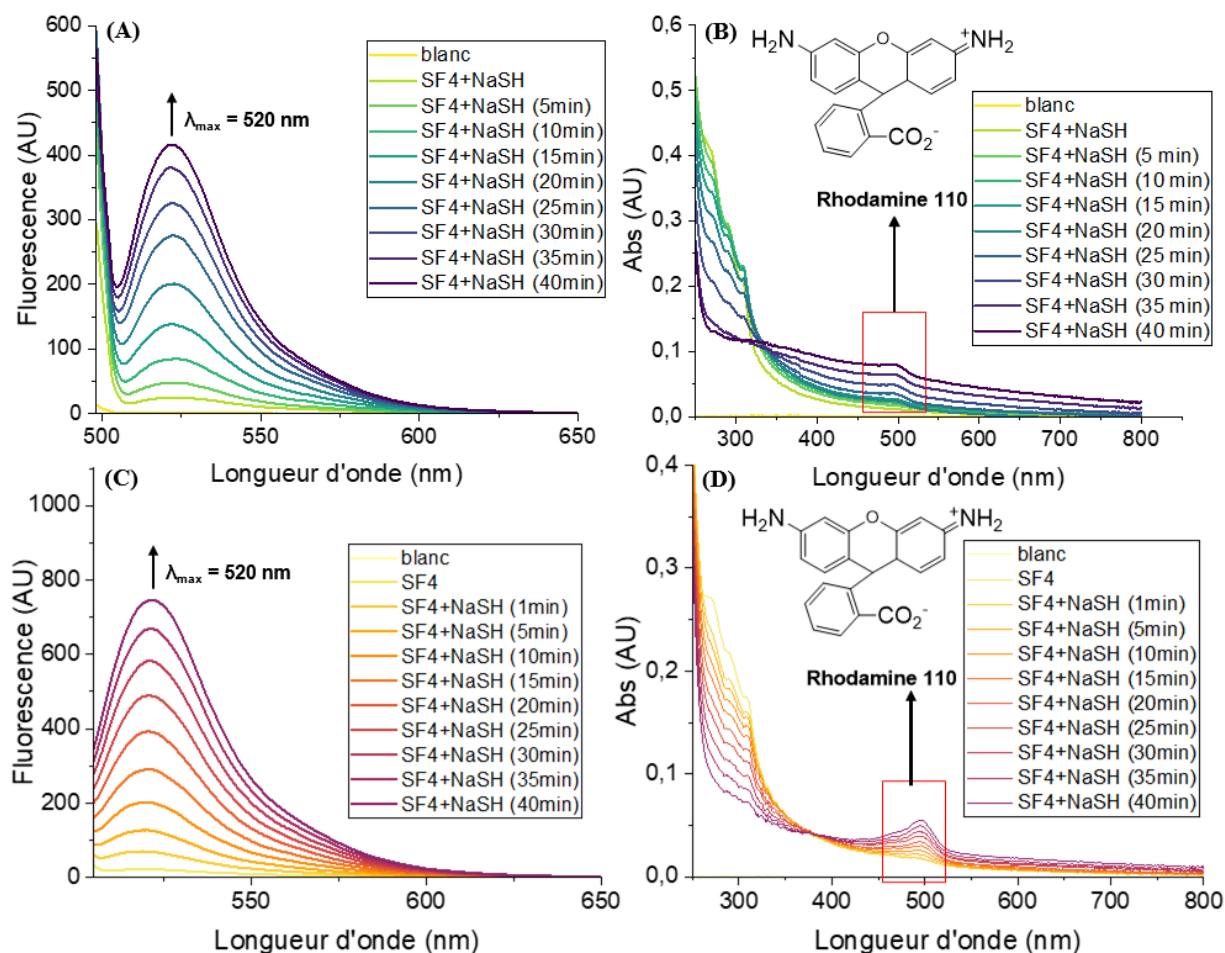


Figure 3.6 (A) Spectre d'intensité de fluorescence de la sonde SF4 avec une rhodamine commercialisée en présence de NaSH ($\lambda_{\max} = 520,5 \text{ nm}$). (B) Spectre d'absorbance de la sonde SF4 avec une rhodamine commercialisée en présence de NaSH. (C) Spectre d'intensité de fluorescence de la sonde SF4 avec une rhodamine synthétisée en présence de NaSH, ($\lambda_{\max} = 520,5 \text{ nm}$). (D) Spectre d'absorbance de la sonde SF4 avec une rhodamine synthétisée en présence de NaSH.

Après avoir validé la détection du H_2S par la sonde SF4 en utilisant NaSH comme source directe de H_2S , et confirmé sa spécificité ainsi que sa sélectivité envers cette molécule, nous avons procédé à une comparaison détaillée de nos résultats. Cette comparaison a été réalisée en analysant les spectres d'intensité de fluorescence et d'absorbance en fonction du temps pour la sonde SF4 en présence de NaSH, en utilisant une rhodamine commerciale et une rhodamine synthétisée, comme illustré dans la figure 3.6 ci-dessus.

La figure 3.6 présente les spectres de fluorescence et d'absorbance de la sonde SF4 en présence de NaSH, en comparant l'utilisation de rhodamine commercialisée (A et B) et de rhodamine synthétisée (C et D). Les spectres de fluorescence (A et C) montrent une augmentation de l'intensité en fonction du temps, indiquant une interaction croissante avec NaSH, tandis que les spectres d'absorbance (B et D) confirment cette interaction à travers des changements similaires. Les résultats montrent une évolution similaire des courbes de fluorescence et d'absorbance au fil du temps pour les deux types de rhodamines utilisées, suggérant une réponse de détection identique. Cette correspondance dans les résultats indique que la sonde SF4 préparée avec de la rhodamine commercialisée ainsi que celle préparée avec de la rhodamine synthétisée présentent des propriétés équivalentes. Cela confirme que la sonde SF4 conjuguée à la rhodamine commercialisée est fonctionnellement identique à celle conjuguée à la rhodamine synthétisée.

3.3.4 Analyse des résultats de purification de la protéine HiPIP

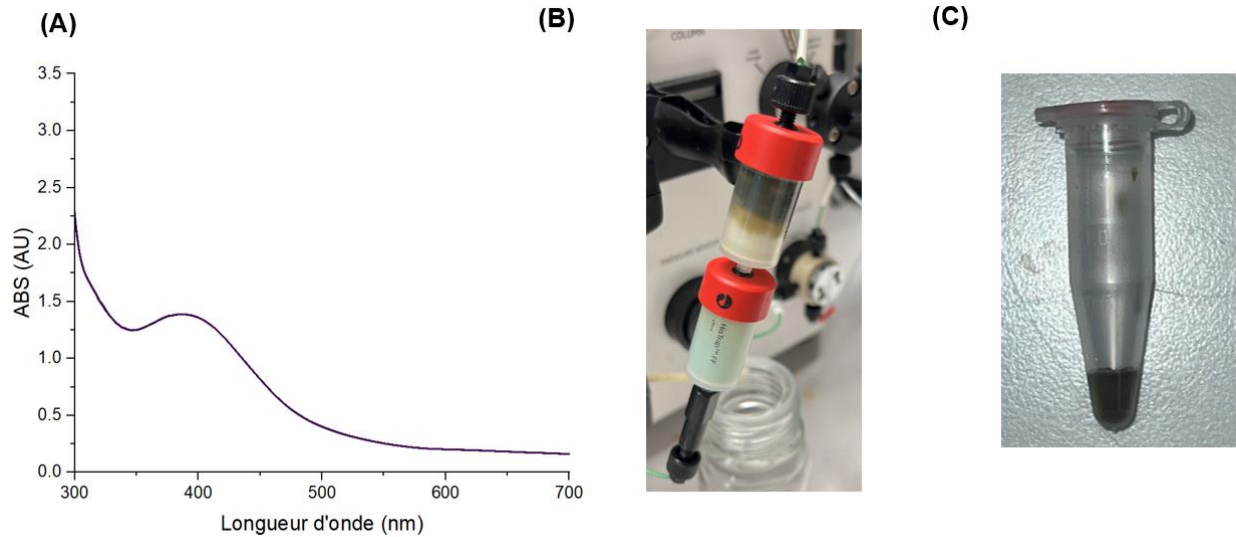


Figure 3.7 (A) Spectre UV-Vis de l'AvHiPIP : $\lambda_{\max} = 384$ nm après purification, dans un volume de 3 ml de tampon HEPES (100 mM, pH 7,4) avec l'ajout de 30 μ l de HiPIP (7,2 mM), (B) Les colonnes de nickel lors de la purification d'HiPIP, (C) La coloration de la protéine HiPIP après concentration.

La purification de notre solution de protéines a été effectuée avec succès en utilisant la chromatographie liquide rapide de protéines (FPLC), exploitant des colonnes de chromatographie d'affinité nickel (IMAC HP (Cytiva), 5 mL, chargés en nickel). Cette technique de purification hautement sélective a permis de séparer efficacement la protéine d'intérêt des autres composants présents dans l'échantillon, en se basant sur leur affinité pour les ions nickel immobilisés dans la colonne.

Les fractions protéiques obtenues ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) pour évaluer la pureté des échantillons. Les résultats ont montré des bandes nettes et bien définies correspondant à la protéine cible, confirmant ainsi l'efficacité de la purification par chromatographie d'affinité nickel. De plus, la spectroscopie UV-VIS a été utilisée pour caractériser les fractions protéiques, avec des pics d'absorbance, indiquant la présence de chromophores spécifiques associés à la protéine purifiée. Cela veut dire

que la courbe en violet (A) dans la figure 3.6, représente le spectre d'absorption initial de HiPIP [4Fe-4S], avec un pic à λ_{max} de 384 nm, qui est la caractéristique habituelle du cluster [4Fe-4S]. Ces analyses ont confirmé la pureté élevée des échantillons, les rendant aptes à des analyses ultérieures telles que la spectrométrie de masse pour une identification précise de la protéine et l'électrophorèse sur gel pour une analyse plus détaillée de sa structure et de sa taille moléculaire (Figure A.6).

3.3.5 Analyse de mesure d'interaction dans un milieu qui contient HiPIP et NO en présence de la sonde SF4

Les protéines contenant des clusters fer-soufre constituent l'une des principales cibles de réaction du NO. Lorsqu'elles entrent en contact avec le NO, les clusters [FeS] présents dans ces protéines sont convertis en différentes espèces de nitrosyle de fer par une réaction de nitrosylation.³¹ Parmi ces espèces, on trouve l'ester rouge de Roussin, le sel noir de Roussin et les composés de fer dinitrosylés comme illustré dans la figure 1.2. La formation de RRE et/ou de DNIC entraîne la libération de quatre sulfures inorganiques par cluster, alors qu'un sulfure inorganique est libéré par cluster lors de la formation de RBS. Cependant, on a choisi de travailler avec la protéine HiPIP qui est un élément bien connu, largement étudié et très bien caractérisé dans notre laboratoire. Après avoir réussi à produire la protéine HiPIP en grande quantité et avec une pureté excellente, ainsi qu'à confirmer le bon fonctionnement de notre sonde SF4 et sa capacité à détecter efficacement le H₂S dans le milieu en présence d'une source directe de H₂S telle que le NaSH, nous pouvons maintenant procéder à la suite des expériences.

Nous avons procédé à évaluer l'interaction de notre SF4 avec une source biologique potentielle de H₂S en utilisant un modèle de protéines FeS (HiPIP) en présence de NO. Son interaction avec le NO pourrait potentiellement entraîner la libération de sulfure sous forme H₂S.

L'objectif dans cette section est de confirmer la capacité de détecter et d'observer la présence de la molécule de H_2S lors de la réaction de nitrosylation. Pour ce faire, nous avons réalisé la réaction de nitrosylation en utilisant notre sonde fluorescente SF4 que nous avons préparée (un capteur fluorescent spécifique au H_2S).

L'évaluation de l'efficacité de la sonde fluorescente SF4 pour détecter le H_2S dépend principalement de l'observation d'une augmentation notable de l'intensité de fluorescence lors de son exposition à cette molécule cible. En effet, une sonde fluorescente de qualité, fonctionnelle et spécifique au H_2S , doit démontrer une réponse spécifique et sensible, se traduisant par une forte augmentation de la fluorescence en présence de H_2S par rapport à un contrôle sans H_2S .⁹⁷

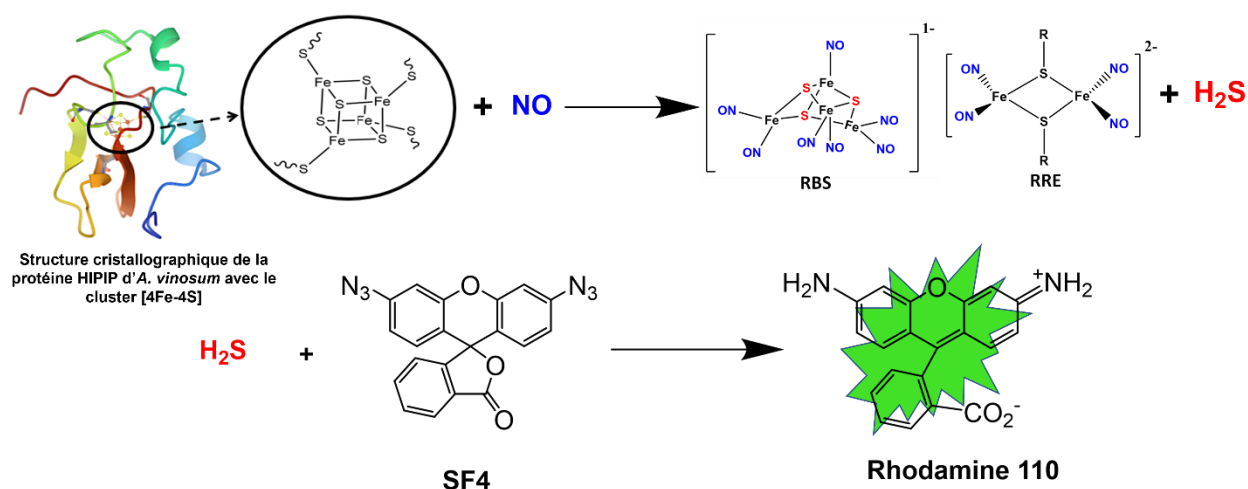


Figure 3.8 Schéma de l'exposition de la sonde fluorescente SF4 au H_2S libéré lors de la réaction de nitrosylation des clusters FeS.

La majorité des sondes qui sont basées sur la réduction des azides, y compris notre sonde SF4, sont conçues pour des analyses qualitatives et quantitatives. Ces sondes contiennent un groupement azide qui est réduit par le H_2S en son amine parente, générant ainsi un produit fluorescent. Toutefois, dans le cadre de notre étude, nous avons opté pour une utilisation qualitative de la sonde SF4 en

raison de limitations expérimentales qui restreignent son utilisation pour des analyses quantitatives. Par conséquent, on cherche ce qui est mieux pour cette étude, notre sonde servira uniquement à vérifier la présence ou l'absence de H_2S après la réaction de nitrosylation de l'amas FeS. En utilisant un spectrophotomètre à fluorescence et en se basant sur les recherches antérieures, en cas de détection réussie de H_2S dans le milieu, on s'attend à ce que la sonde devienne fluorescente, comme illustré dans la figure 3.8. Les études précédentes suggèrent que l'intensité de fluorescence augmentera de manière significative au fil du temps lors de l'incubation de la sonde SF4 avec le H_2S .

Comme l'illustre la figure 3.9, les mesures de fluorescence de notre sonde SF4 pour la détection de la molécule H_2S pendant la réaction de nitrosylation ont été effectuées de manière chronologique à l'aide d'un spectrophotomètre de fluorescence. Parallèlement, la progression de la réaction a été surveillée par spectroscopie d'absorption UV-Visible pendant une durée de 100 minutes. Les résultats obtenus sont présentés sous forme des spectres spectroscopiques.

Bien qu'il ait été initialement prévu de réaliser trois essais pour valider nos résultats, des contraintes expérimentales nous ont limité à deux répétitions. Pour assurer la robustesse et la fiabilité de nos données, nous avons tout de même mené ces deux répétitions indépendantes. Ce processus est essentiel dans toute démarche scientifique, car il permet de confirmer la reproductibilité et la consistance des résultats obtenus. Lors de ces essais, nous avons observé une augmentation significative de la fluorescence en utilisant la sonde seule, sans la présence de l'analyte cible. Cette augmentation inattendue de la fluorescence pourrait être attribuée à divers facteurs, tels qu'une contamination ou des interactions non spécifiques. Une analyse approfondie de ces résultats est présentée dans les sections suivantes, où nous discutons des implications potentielles de ces observations et explorons des explications possibles. Ces résultats soulèvent des questions intéressantes sur le comportement de la sonde dans différentes conditions expérimentales et pourraient avoir des implications pour son utilisation future dans des contextes similaires.

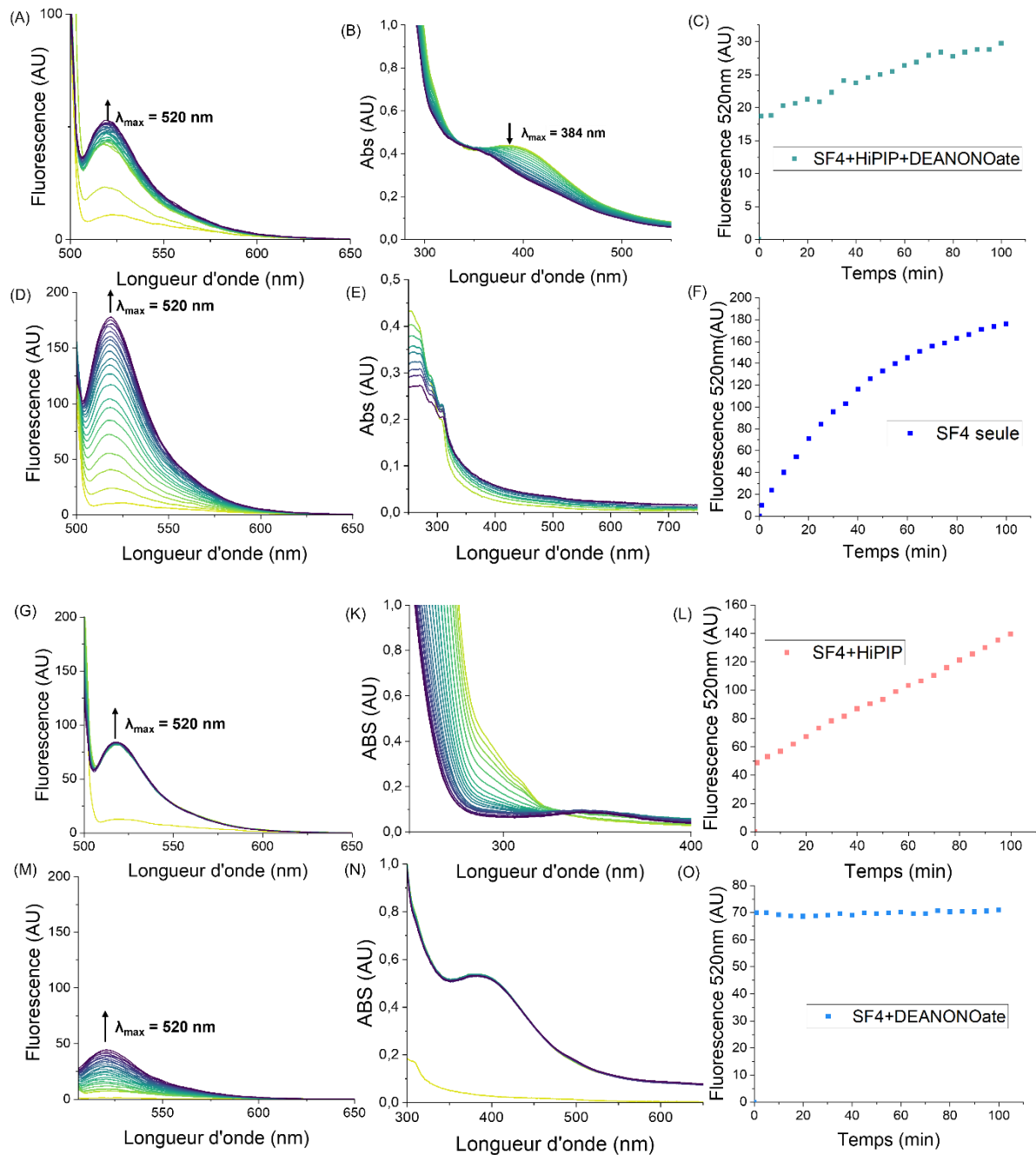


Figure 3.9 Comparaison des spectres d'intensités de fluorescence entre : (A) la sonde SF4 + HiPIP + DEANONOate, (D) la sonde SF4 seule, (G) la sonde SF4 + DEANONOate, (M) la sonde SF4 + HiPIP. Comparaison des mesures d'absorbance entre : (B) la sonde SF4 + HiPIP + DEANONOate, (E) la sonde SF4 seule, (K) la sonde SF4 + DEANONOate, (N) la sonde SF4 + HiPIP. Graphes d'intensités de fluorescence emission $\lambda_{\text{max}} = 520,5 \text{ nm}$ de : (C) la sonde SF4 +

HiPIP + DEANONOate, (F) la sonde SF4 seule, (L) la sonde SF4 + DEANONOate, (O) la sonde SF4 + HiPIP.

Suite à l'observation du spectre d'absorbance (A), lors de l'ajout de notre sonde SF4 à un milieu contenant HiPIP et le NO, et en comparant avec l'expérience de contrôle sans la présence de la sonde SF4 réalisé par mon collègue Ahmad Benhlime au sein de notre groupe de recherche,⁹⁶ nous avons conclu que la sonde SF4 n'a pas affecté la réaction entre HiPIP et le NO. En comparant les résultats de l'expérience de contrôle avec et sans la sonde SF4, il est clair que l'ajout de la sonde n'a pas altéré le profil d'absorption de la réaction, indiquant ainsi que la SF4 n'a pas influencé le déroulement de la réaction entre HiPIP et le NO. Ces résultats renforcent l'idée que la sonde SF4 ne perturbe pas le système de manière significative et que toute variation dans les observations ultérieures peut être attribuée à d'autres facteurs. De plus, une diminution d'absorbance vers la longueur d'onde maximale de 384 nm, comme déjà mentionné dans la littérature,⁴⁵ indique que la réaction de nitrosylation a bien eu lieu. Étant donné qu'il y a une réaction de nitrosylation des cluster FeS, il y a potentiellement une libération de soufre de la part de cluster FeS.

L'intensité précise de la fluorescence peut varier d'une expérience à l'autre en raison de variations dans la durée de chaque expérience, ce qui est inhérent à la spectroscopie de fluorescence. Cette variabilité peut être due à divers facteurs, tels que la qualité des échantillons, la température, les conditions expérimentales et les performances des équipements utilisés.

En parallèle, lors de l'étude, le spectre de fluorescence (B) de l'HiPIP en présence de NO et de la sonde fluorogène SF4, un pic significatif a été remarqué, atteignant une intensité de fluorescence d'environ ≈ 65 unités. Ce pic présente une augmentation graduelle de son intensité au fil du temps. Ces observations suggèrent une interaction complexe entre les molécules impliquées. Nous avons également suivi les intensités de fluorescence de HiPIP et de NO en présence de SF4 à une longueur d'onde de 520 nm. Cette mesure n'a pas produit une courbe de réponse linéaire.

Afin de vérifier la pertinence et l'ampleur du saut dans l'augmentation de l'intensité de fluorescence observée et pourquoi la courbe elle n'est pas linéaire, des expériences de contrôle ont été réalisées en reproduisant les mêmes conditions de réaction que celles de l'expérience principale. La sonde SF4 a été évaluée individuellement dans un premier temps, puis en combinaison avec HiPIP seul, et enfin avec DEA-NONOate seul. Cependant, pour chaque expérience, nous avons créé un graphique présentant le suivi temporel des intensités de fluorescence à une longueur d'onde de 520 nm. Ces expériences ont permis d'établir un contexte de référence pour interpréter les résultats obtenus lors de l'expérience de la réaction principale.

Nous avons commencé par étudier la sonde SF4 seule (D), ce qui a révélé une intensité de fluorescence élevée dépassant ≈ 160 unités, une valeur nettement supérieure à celle observée pour SF4+HiPIP+NO. Ensuite, le spectre de SF4+NO (G) a montré un saut important avec une intensité d'environ ≈ 80 unités, restant stable dans le temps et légèrement plus élevé que celle de SF4+HiPIP+NO. Dans le spectre (G), la sonde SF4 a montré une réactivité immédiate et rapide avec le DEA-NONOate. Enfin, le dernier contrôle avec SF4+HiPIP seul (M) a montré une intensité de ≈ 45 unités, légèrement plus faible que celle de SF4+HiPIP+NO. Ces résultats indiquent des interactions spécifiques entre les composés et suggèrent des mécanismes différents selon les combinaisons moléculaires étudiées.

Selon les recherches antérieures, il était attendu que lorsque la sonde SF4 détecte le H₂S potentiellement libéré au cours de la réaction de nitrosylation, cela se traduirait par une intensité de fluorescence supérieure dans le spectre (B) du (SF4+HiPIP+NO) par rapport aux contrôles (D, G et M). Cependant, dans notre cas, nous avons observé le contraire. Par conséquent, au cours de notre exploration de cette réaction, il semble que notre fluorophore SF4 n'a pas détecté aucune substance de H₂S dans le milieu expérimental. Ces résultats suggèrent que le mécanisme de détection de cette molécule par la sonde SF4 pourrait différer de celui attendu, ou que d'autres facteurs influencent l'intensité de fluorescence dans notre système comme la réactivité de notre sonde SF4 avec le NO qui a peut-être affecté son fonctionnement.

Par conséquent, les résultats obtenus ont été confirmés par deux répétitions de l'expérience, et réalisés avec une grande précision pour éliminer et éviter tout doute. La réponse des résultats est cohérente et reproductible pour chaque répétition de l'expérience. De plus, le pH du milieu

réactionnel a été vérifié à la fin de chaque réaction et est demeuré constant à 7,4, ce qui renforce la fiabilité de nos observations.

3.3.6 Comparaison de notre sonde SF4 avec la sonde commerciale de SF7-AM

Dans cette section, nous procédons à une comparaison entre l'utilisation d'une sonde fluorescente commerciale (étudié par un autre membre de notre groupe de recherche)⁹⁶ et notre sonde SF4 lors de la réaction de nitrosylation du cluster [4Fe-4S] (HiPIP avec NO). La première sonde, l'ester acétoxyméthylrique de sulfurefluor-7 (SF7-AM) est un agent d'activation de fluorescence récent. Elle représente ainsi un composé qui offre des avantages potentiels en termes de stabilité et de capacité de diffusion cellulaire pour la détection du H₂S dans les systèmes biologiques.⁹⁸ La sonde SF7-AM contient un groupement fonctionnel qui joue un rôle important. Ce groupement est souvent conçu pour améliorer la perméabilité cellulaire et/ou la solubilité de la sonde dans des milieux biologiques. Il est probable que le groupement AM (acétate de méthyle) soit utilisé pour faciliter l'entrée de la sonde dans les cellules.

Dans le cadre de notre recherche, les résultats du travail réalisé par Ahmad Benhlma au sein de notre groupe ont montré que lors de l'évaluation de la production de H₂S durant la réaction de nitrosylation du cluster [4Fe-4S] en utilisant le SF7-AM en présence de NO et du HiPIP, le SF7-AM présente une faible réactivité avec le NO.^{4, 96} En revanche, la deuxième sonde est notre sonde SF4, qui a démontré une grande sensibilité et spécificité pour la détection du H₂S dans l'expérience avec NaSH qui a été présentée par une grande augmentation de fluorescence comme décrit précédemment. Aussi, les deux sondes SF4 et SF7-AM préparées par le groupe de Chang en présence de 1 mM de Na₂S à 25 °C dans un tampon HEPES de 20 mM à pH 7,4, avec une excitation à 488 nm présente une réponse de détection notable vis-à-vis le H₂S.⁴ Les deux sondes (SF4 et SF7-AM) réagissent avec Na₂S, ce qui entraîne une augmentation de l'intensité d'émission. Cependant, les deux sondes montrent une augmentation rapide de l'intensité d'émission au début, suivie d'une stabilisation à un niveau plateau. La courbe de SF4 atteint un plateau plus rapidement que SF7-AM. SF4 semble atteindre un plateau autour de 20 minutes, tandis que SF7-AM continue d'augmenter plus lentement, atteignant un plateau vers 25 minutes. Ces observations indiquent que

bien que les deux sondes réagissent avec H₂S, la sonde SF4 est plus sensible ou présente une plus grande intensité de fluorescence comparée à SF7-AM.⁴

En analysant les résultats obtenus avec ces sondes, on vise à évaluer les performances relatives de chaque sonde en matière de sensibilité, de stabilité et de spécificité lors de la détection de composés sulfurés tels que le sulfure d'hydrogène (H₂S). Soulignant ainsi la diversité des sondes disponibles pour cette application et la nécessité de choisir la plus adaptée en fonction des besoins spécifiques de l'étude. Les expériences avec la sonde SF7-AM ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour notre sonde SF4 sauf que la longueur d'onde d'excitation était de 489 nm pour la sonde SF7-AM et pour la sonde SF4 était de 488 nm pour toute mesure d'émission de fluorescence qui ont été suivies au fil du temps.⁹⁶

Afin d'assurer une comparaison précise, des réactions de contrôle séparément distinctes ont été réalisées pour les deux fluorophores. Cette approche permet de garantir une comparaison équitable des performances des deux sondes, facilitant ainsi la fiabilité des données obtenues. En maintenant les mêmes paramètres expérimentaux tels que la concentration des réactifs, le pH et la température, nous pouvons assurer que toute différence dans les résultats obtenus est due aux propriétés intrinsèques des sondes elles-mêmes et non à des variations expérimentales. Les résultats obtenus avec la sonde SF7-AM montrent des différences significatives par rapport à nos observations avec notre sonde SF4.⁹⁶

Lors du suivi de la mesure d'absorbance pour la réaction de HiPIP [4Fe-4S] avec le NO en présence de SF7-AM, il a observé une diminution d'absorbance de la bande [4Fe-4S], indiquant la perte du cluster qui est due à la nitrosylation. De plus, une augmentation de l'absorbance vers 360 nm suggère la formation d'un autre produit, même en présence de SF7-AM.

En revanche, le suivi de l'absorbance de la réaction du HiPIP [4Fe-4S] avec le NO en présence de notre sonde SF4 a montré une diminution d'absorbance de la bande [4Fe-4S], indiquant la perte du cluster due à la nitrosylation. Cependant, aucune formation de produits n'a été observée autour de 360 nm. Ces résultats suggèrent que la présence de notre sonde SF4 n'a pas considérablement affecté la réaction de nitrosylation du cluster [4Fe-4S]. En effet, la diminution de l'absorbance de

la bande du cluster [4Fe-4S] vers 384 nm indique que la réaction de nitrosylation a bien eu lieu, même en présence de SF4.

D'autre part, l'intensité de fluorescence de SF7-AM lors de la réaction entre la HiPIP [4Fe-4S] et le NO a augmenté progressivement avec le temps, atteignant jusqu'à ≈ 70 unités arbitraires (UA) après 91 minutes. En revanche, le suivi de l'intensité de fluorescence de SF4 pendant la réaction de la HiPIP [4Fe-4S] avec le NO a montré une augmentation anormale avec un saut initial important suivi d'une légère augmentation au fil du temps, atteignant jusqu'à ≈ 65 unités arbitraires (UA) après 100 minutes.

L'analyse comparative des expériences de contrôles avec les deux sondes révèle des différences significatives dans leur réactivité respective avec le NO et le HiPIP. Lors du contrôle avec le HiPIP seul en présence de la sonde SF7-AM, une augmentation anormale de l'intensité de fluorescence a été observée, atteignant jusqu'à ≈ 820 UA après 91 minutes. En revanche, dans des conditions similaires, mais en présence de NO, l'intensité de fluorescence n'a atteint que ≈ 70 UA après la même période.

Parallèlement, le contrôle de NO seul en présence de la sonde SF4 avec une longueur d'onde d'excitation de 488nm a également engendré un saut initial notable de l'intensité de fluorescence, atteignant jusqu'à ≈ 90 UA après 100 minutes, tandis que l'exposition de la sonde SF4 avec le HiPIP et NO a maintenu une intensité de fluorescence d'environ ≈ 65 UA pendant la même durée de temps.

La structure de SF7-AM est similaire à celle de SF4, mais elle présente un groupement fonctionnel supplémentaire, AM (acétoxy méthylester, AMO). Ce groupement est souvent ajouté pour améliorer la perméabilité cellulaire, mais il peut aussi modifier la réactivité chimique de la sonde. Cependant, cette modification structurelle peut aussi protéger certains sites réactifs de la sonde, réduisant ainsi son interaction directe avec le monoxyde d'azote (NO), par exemple, s'il est attaché à un groupement fonctionnel qui pourrait normalement réagir avec NO, cela pourrait inhiber ou réduire cette interaction.

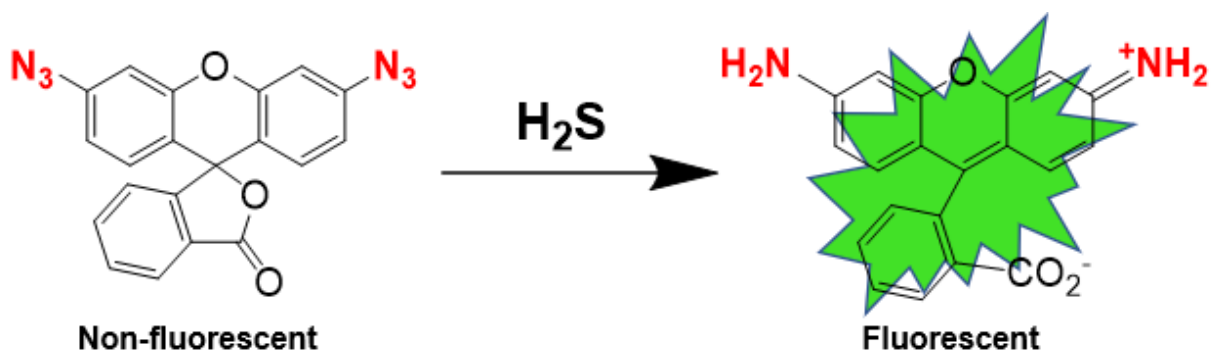
Pour conclure, notre hypothèse est que peut être la réactivité de NO avec la sonde SF4 à diminuer son fonctionnement et il n'a pas laissé notre sonde SF4 de détecter le H₂S au cours de la réaction de nitrosylation de cluster [4Fe-4S]. Cependant, la sonde SF4 pourrait être plus soluble dans le milieu réactionnel utilisé, facilitant une interaction plus rapide et directe avec le NO.

La présence du groupe acétoxy méthylester (AMO) pourrait induire des changements de conformation qui masquent ou réduisent l'accès aux sites réactifs, rendant ainsi la molécule moins susceptible de réagir avec le NO. Aussi ce groupement peut modifier la densité électronique autour des groupes réactifs, réduisant ainsi leur capacité à interagir avec le NO.

Ces résultats soulignent des interactions différenciées entre ces sondes et les molécules cibles, suggérant des mécanismes distincts de détection et d'interaction moléculaire qui nécessitent une analyse approfondie pour une meilleure compréhension des processus impliqués.

CONCLUSION

Plusieurs sondes fluorescentes pour la détection de H_2S sont basées sur la réduction de l'azide. Ces sondes contiennent un groupement azide qui, en présence de H_2S , est réduit en son amine parente, formant ainsi un produit fluorescent comme illustré dans la figure en bas. Une caractéristique intéressante de ces sondes est leur capacité à montrer une augmentation de la fluorescence lors de la conversion de la forme azide non fluorescente en forme amine. Ces sondes fonctionnent selon un mécanisme similaire, impliquant une attaque de substitution nucléophile réversible de HS^- sur l'azote le plus électrophile de l'azoture.



Sonde fluorescente basé sur la réduction de l'azide pour la détection de H_2S .

Dans cette étude, nous avons étudié la synthèse des sondes fluorescentes (Sulfidefluor-4, Sulfidefluor-5, Sulfidefluor-6). Ces capteurs ayant une sélectivité et une spécificité pour la détection de H_2S et un manque de réactivité envers le NO et les thiols. Cependant, l'étape préalable pour la production de l'intermédiaire carboxyrhodamine était indispensable lors de la synthèse de la sonde SF5/SF6. Par conséquent, la préparation de ce dernier n'a pas abouti à des résultats convenables. Ces résultats ont motivé l'exploration d'une autre voie de synthèse pour une sonde fluorescente de type SF4. Cette nouvelle méthode a conduit à des résultats satisfaisants, avec l'obtention du produit désiré, à savoir une synthèse réussie de la sonde SF4.

En conclusion, une synthèse efficace d'une sonde fluorescente SF4 de haute pureté a été développée et mise au point. La structure moléculaire de la sonde SF4 a été confirmée par spectroscopie RMN 1H et RMN ^{13}C , fournissant ainsi une caractérisation détaillée de la sonde. Les résultats de la

spectroscopie de fluorescence confirment que la sonde SF4 est efficace pour détecter de manière sensible et spécifique le H₂S dans le milieu. Cette affirmation a été confirmée par l'exposition de notre sonde au NaSH, qui a généré une réponse significative et spécifique, renforçant ainsi la validité de notre méthode de détection du H₂S. Cependant, les données issues de la spectroscopie d'absorption UV-Visible ont révélé une information cruciale sur l'apparition de la molécule fluorescente (rhodamine 110) lors de la réaction entre la sonde SF4 et le NaSH en temps réel. En parallèle, l'étude d'intensités de fluorescences de la sonde SF4 en présence de NaSH nous a permis de déterminer la capacité de la sonde à détecter la présence de H₂S. Ces observations ont permis une analyse approfondie de la dynamique réactionnelle. Nous avons observé que la réaction était relativement lente, ce qui nous a conduit à l'étudier qualitativement sur une période du temps. Cependant, les résultats obtenus avec notre sonde SF4 étaient qualitativement similaires à ceux rapportés par Chang *et al.* ce qui renforce la fiabilité de notre approche expérimentale.⁴

Pour conclure, les résultats obtenus avec NaSH confirment que notre sonde SF4, synthétisée selon un protocole déjà décrit dans la littérature, fonctionne correctement.⁴ Ils démontrent également que nous pouvons fabriquer du SF4 dans notre laboratoire de manière simple et économique. Par conséquent, ce SF4 facilement préparé présente un fort potentiel pour une détection précise du H₂S.

Par la suite, dans un premier temps, nous avons réussi à produire efficacement une protéine appelée HiPIP, hautement purifiée et dotée d'un cluster [4Fe-4S]. Après cela, nous avons utilisé notre sonde SF4 pour surveiller la production de H₂S lors de la nitrosylation de protéines FeS, en employant le modèle de protéines HiPIP contenant dans son centre un cluster [4Fe-4S]. Cette étude a été réalisée en utilisant le DEA-NONOate comme une source indirecte de NO, afin de simuler les conditions biologiques pertinentes. Cependant, les résultats des expériences de contrôle ont révélé une réactivité inattendue entre le SF4 et le DEA-NONOate, se traduisant par un profil inattendu d'un saut d'augmentation anormale de fluorescence en présence de ce dernier.

Ainsi, notre fluorophore n'a pas détecté la présence d'aucune molécule de H₂S lors de la nitrosylation des clusters FeS, ce qui a conduit à la proposition de deux hypothèses essentielles pour mieux comprendre le mécanisme d'interaction de cette réaction. Tout d'abord, il est possible que le soufre n'ait pas été libéré sous forme de H₂S dans cette réaction, mais plutôt sous forme S⁰. Ensuite, il est envisageable que la réaction de la sonde avec le NO ait perturbé son fonctionnement,

ralentissant ainsi son travail et ne permettant pas à la sonde SF₄ de fonctionner correctement. Ces hypothèses soulignent la complexité des interactions moléculaires impliquées dans la détection du H₂S et suggèrent la nécessité de mener des études supplémentaires pour élucider ces mécanismes.

Malgré plusieurs tentatives visant à suivre et à détecter la libération de H₂S lors de la réaction du HiPIP [4Fe-4S] avec le NO en utilisant la sonde SF₄, les résultats n'ont pas été concluants. Cette situation remet en question l'efficacité de la sonde SF₄ dans ce contexte spécifique. Nos résultats indiquent que bien que la préparation de la sonde SF₄ soit relativement simple et économique, mais elle ne se révèle pas d'être un agent fluorophore idéal dans nos conditions expérimentales, car elle ne produit pas les résultats satisfaisants attendus.

Ces résultats inattendus soulignent la complexité des interactions moléculaires impliquées dans la détection du H₂S et suggèrent la nécessité de poursuivre les recherches de manière approfondie, mettant en évidence la nécessité d'explorer d'autres approches ou d'autres sondes pour mieux comprendre le processus de cette réaction.

PERSPECTIVES

La complexité de la détection du H₂S en présence d'une source biologique potentielle, telle que la protéine HiPIP en présence de NO, nécessite la poursuite des recherches d'une manière plus approfondie.

La sonde SF₄, facilement préparée, présente un fort potentiel pour une détection précise du H₂S tel que confirmé en présence de NaSH. Cependant, il reste toutefois à développer des protocoles pour éviter toute réactivité indésirable supplémentaire, telle que celle observée avec le DEA NONOate.

Pour remédier à cette situation, nous envisageons d'explorer des ajustements et des améliorations de la sonde SF₄ avec le NO afin de détecter et surveiller la présence de H₂S lors de la nitrosylation des autres modèles de protéines FeS et dans d'autres systèmes biologiques qui génèrent le H₂S. Étant donné l'incertitude quant à la libération de H₂S et dans le but d'améliorer la détection du soufre libéré durant la réaction de nitrosylation des clusters FeS, nous prévoyons d'explorer de nouvelles sondes fluorescentes spécifiques pour la détection directe du soufre élémentaire (S⁰). Cette approche permettrait une détection directe et rapide du soufre élémentaire.

Ces nouvelles recherches nous permettront également d'explorer de nouvelles avenues pour la détection et la surveillance du soufre dans divers contextes biologiques et chimiques. Cette approche ouvrira la voie à l'amélioration de la compréhension des mécanismes des sondes qui sont caractérisées par une spécificité et une sélectivité importante envers la molécule de H₂S. Ces sondes seront capables de fournir une réponse fluorescente élevée même en présence de faibles concentrations de H₂S. Ces avancées ouvriront de nouvelles perspectives dans le domaine de la détection du soufre et de ses rôles dans le domaine biologique, et pourraient conduire au développement de nouvelles méthodes de détection plus sensibles et spécifiques.

ANNEXE
LES SPECTRES RMN ENTIÈRE DE MES EXPÉRIENCES

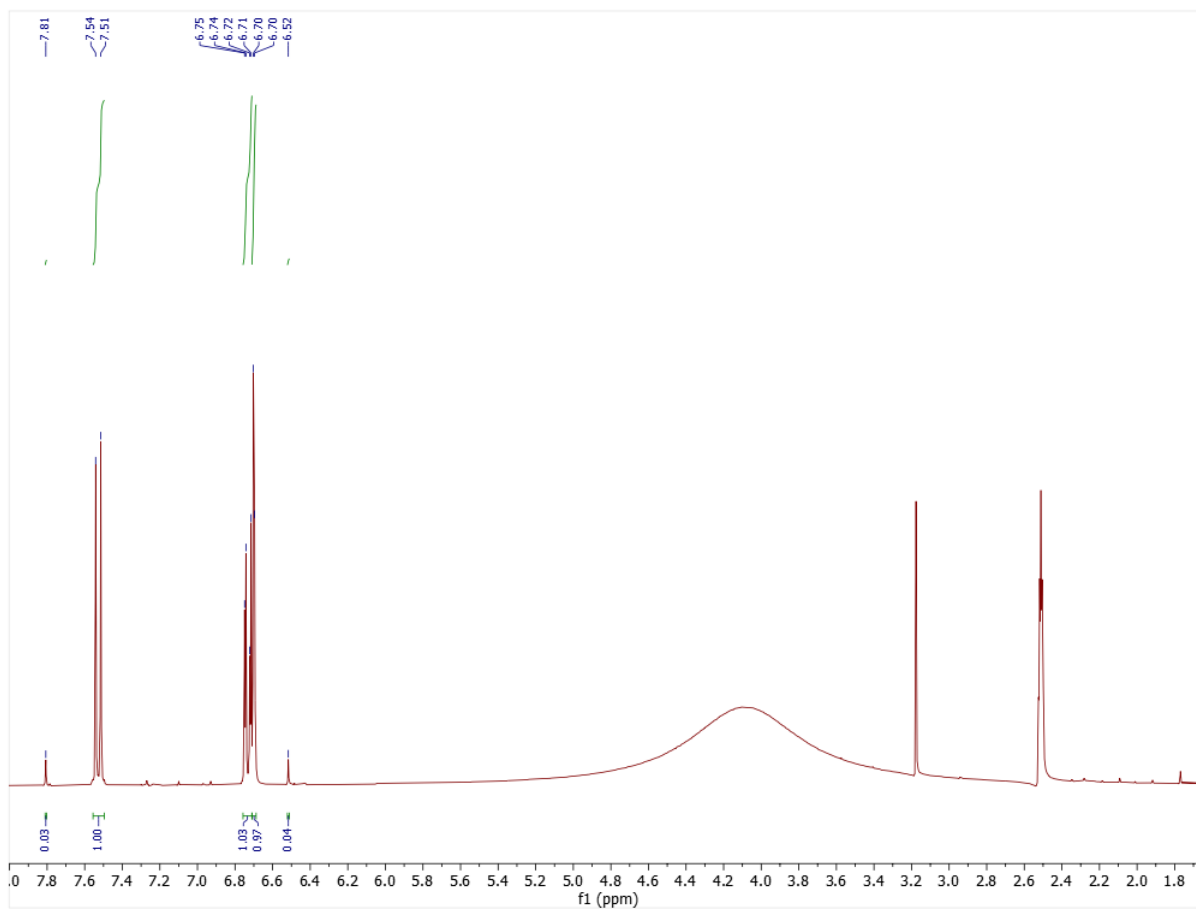


Figure A.1 Spectres entière RMN ^1H de notre produit obtenu dans la synthèse de carboxyrhodamine (300 MHz, DMSO- d_6).

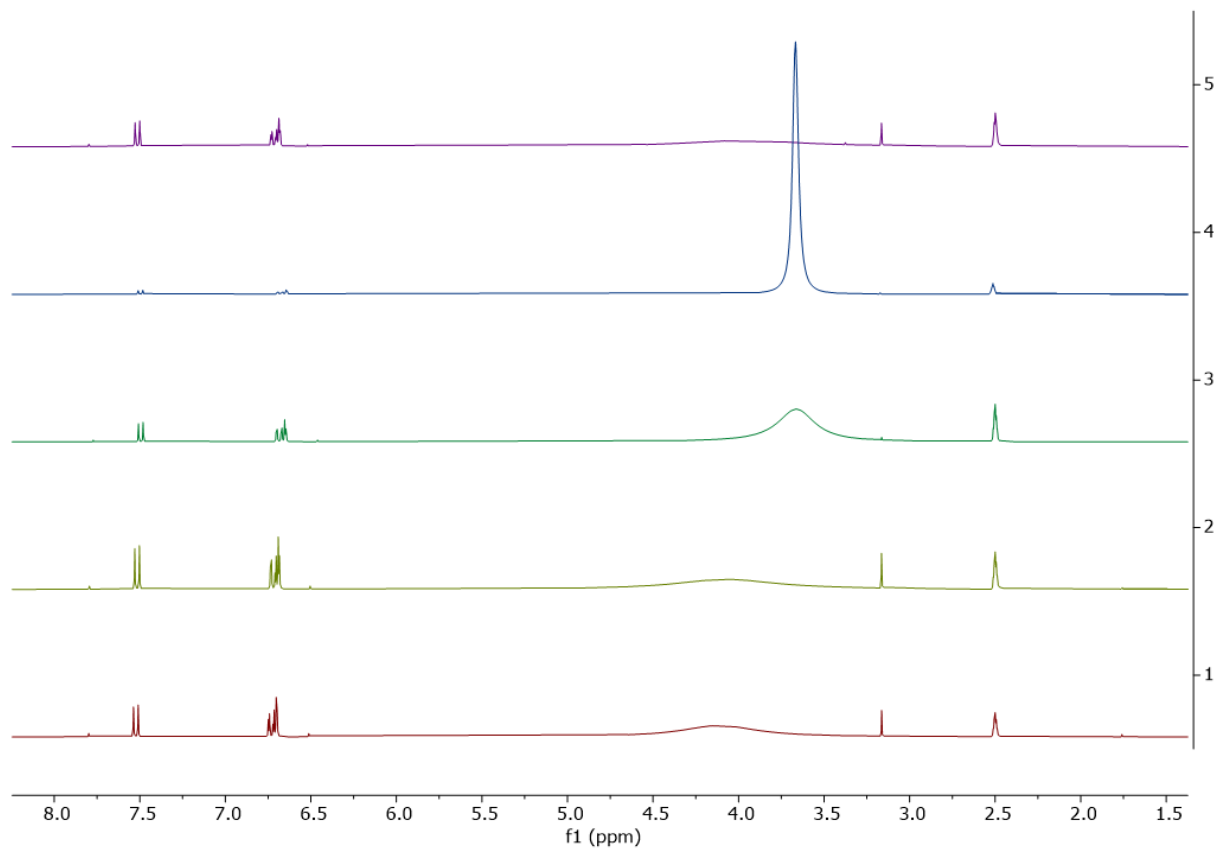


Figure A.2 Spectres empilés entière RMN ^1H des produits bruts obtenus pour les expériences (1-5) (300 MHz, DMSO- d_6).

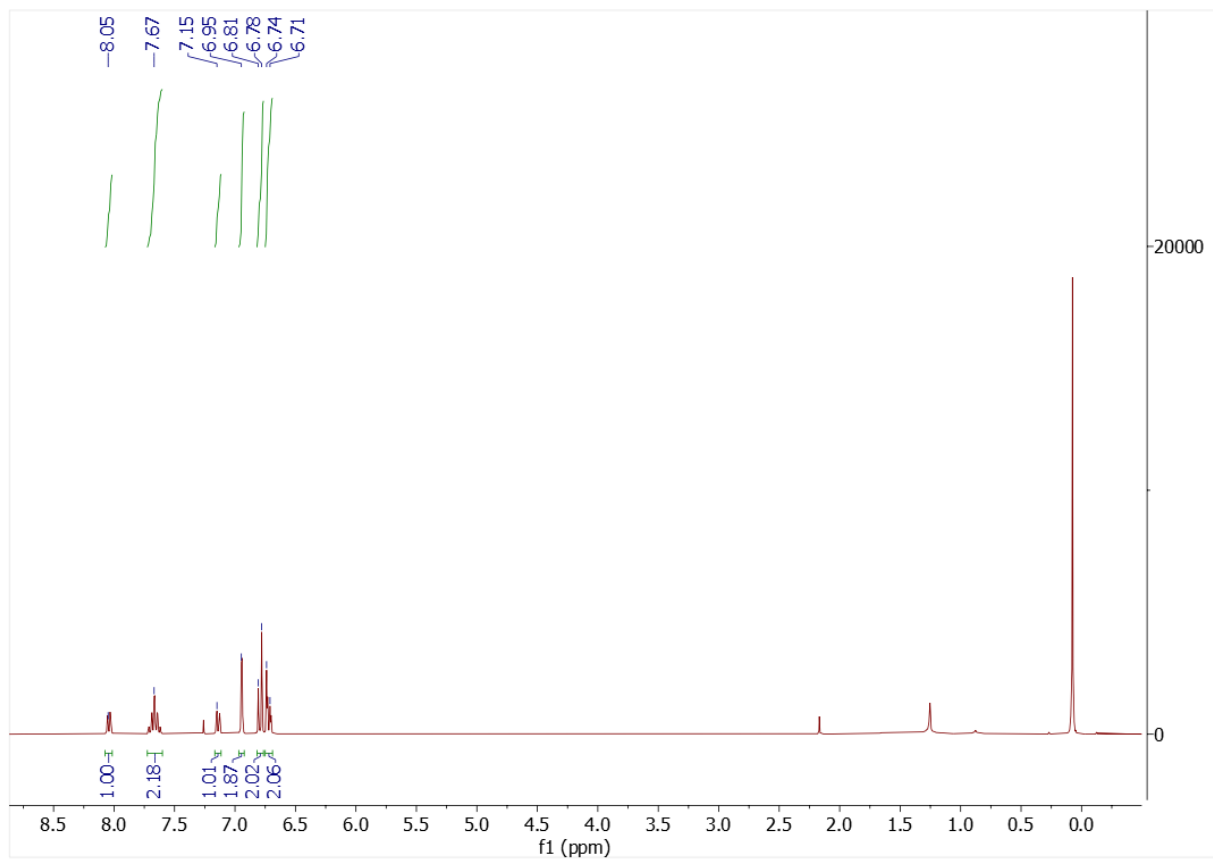


Figure A.3 Spectre entière RMN 1H du produit purifié (SF4) en utilisant une rhodamine commerciale comme réactif (300 MHz, CDCl₃).

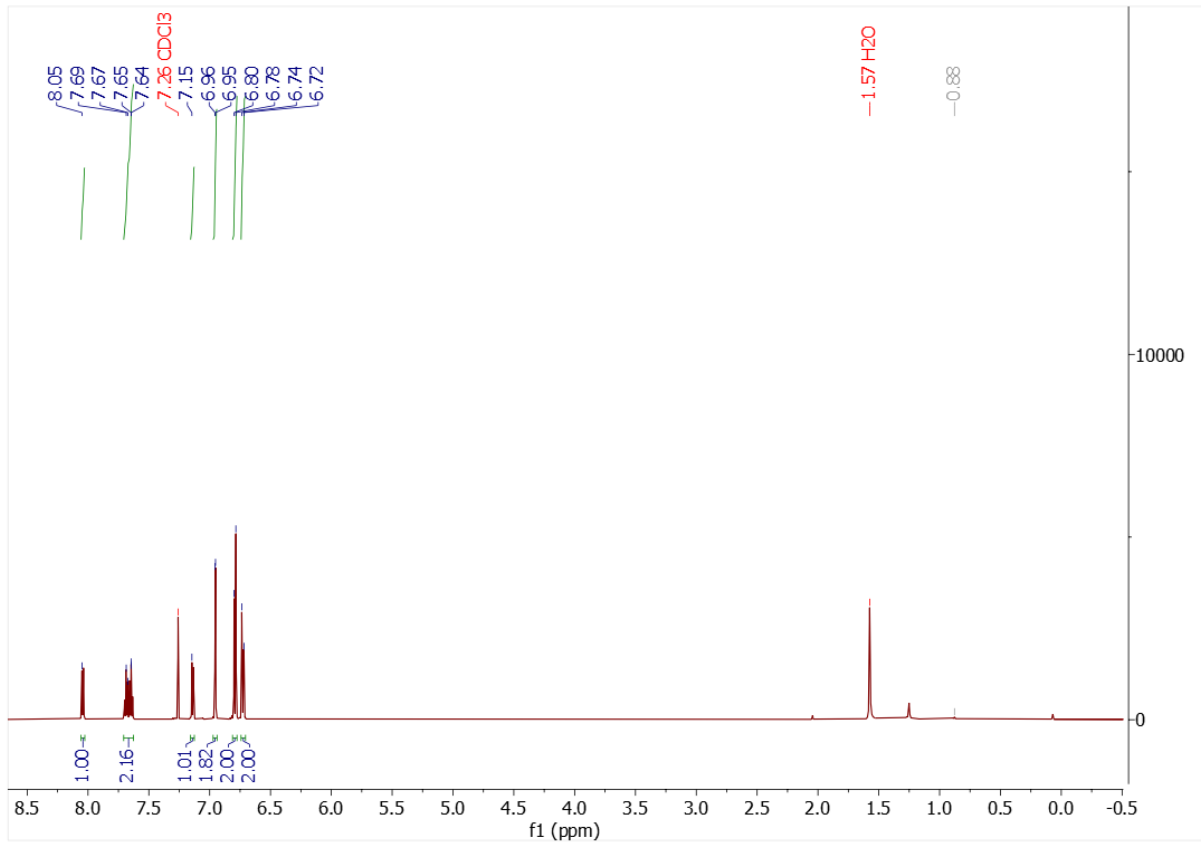


Figure A.4 Spectre entière de RMN ¹H de la fraction purifiée (SF4) en utilisant une rhodamine préparée comme réactif (300 MHz, CDCl₃).

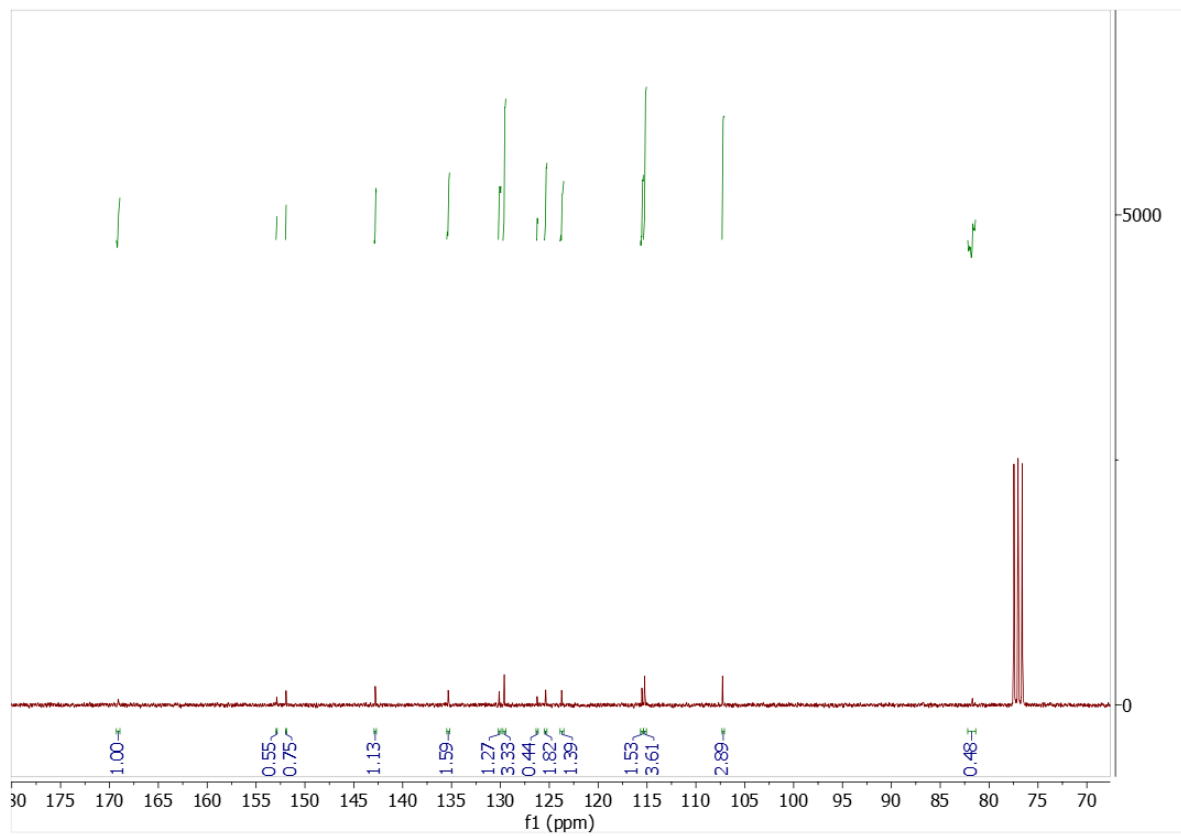


Figure A.5 Spectre complet RMN ^{13}C de produit purifié (300 MHz, CDCl_3).

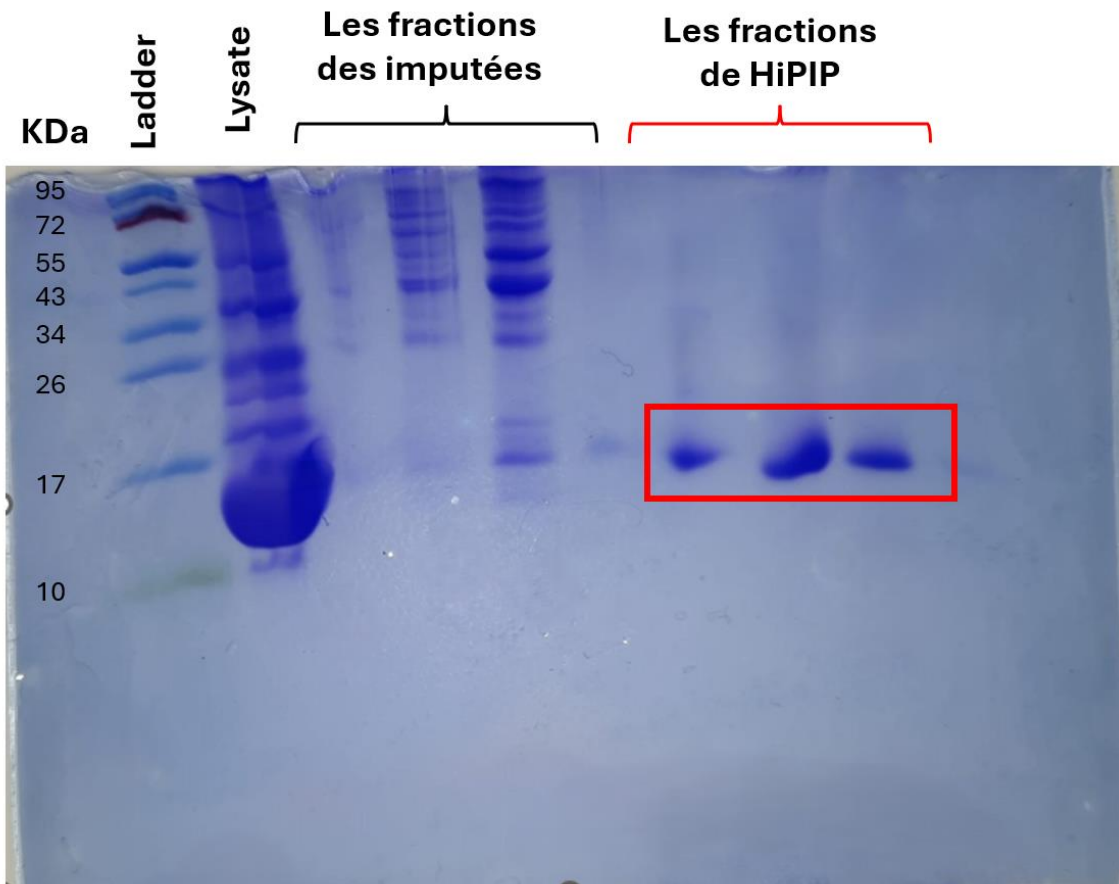


Figure A.6 Résultats de la purification d'AvHiPIP par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

RÉFÉRENCES

- (1) Guidotti, T. Hydrogen sulphide. *Occupational Medicine* **1996**, *46* (5), 367-371.
- (2) Reiffenstein, R.; Hulbert, W. C.; Roth, S. H. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **1992**, *32* (1), 109-134. Hendrickson, R. G.; Chang, A.; Hamilton, R. J. Co-worker fatalities from hydrogen sulfide. *American Journal of Industrial Medicine* **2004**, *45* (4), 346-350.
- (3) Li, Q.; Lancaster Jr, J. R. Chemical foundations of hydrogen sulfide biology. *Nitric oxide* **2013**, *35*, 21-34.
- (4) 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* **2013**, *110* (18), 7131-7135.
- (5) Sante Canada. *Le sulfure (sous forme de H₂S)*; Gouvernement du Canada, 1987. Rochette, L.; Vergely, C. Le sulfure d'hydrogène (H₂S), un gaz endogène à l'odeur d'œuf pourri, pourrait être un régulateur des fonctions cardiovasculaires. *Annales de cardiologie et d'angiologie* **2008**, *57* (3), 136-138.
- (6) Pietri, R.; Román-Morales, E.; López-Garriga, J. Hydrogen sulfide and hemeproteins: knowledge and mysteries. *Antioxidants & redox signaling* **2011**, *15* (2), 393-404.
- (7) Hu, L. F.; Lu, M.; Tiong, C. X.; Dawe, G. S.; Hu, G.; Bian, J. S. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models. *Aging cell* **2010**, *9* (2), 135-146.
- (8) Eto, K.; Asada, T.; Arima, K.; Makifuchi, T.; Kimura, H. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications* **2002**, *293* (5), 1485-1488.
- (9) Jain, S. K.; Bull, R.; Rains, J. L.; Bass, P. F.; Levine, S. N.; Reddy, S.; McVie, R.; Bocchini Jr, J. A. Low levels of hydrogen sulfide in the blood of diabetes patients and streptozotocin-treated rats causes vascular inflammation? Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA: 2010.
- (10) Kamoun, P.; Belardinelli, M.-C.; Chabli, A.; Lallouchi, K.; Chadeaux-Vekemans, B. Endogenous hydrogen sulfide overproduction in Down syndrome *Am. J. Med. Genet., Part A* **2003**, *116* (3), 310-311.
- (11) Hellmich, M. R.; Szabo, C. Hydrogen sulfide and cancer. *Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide* **2015**, (3), 233-241.
- (12) Powell, C. R.; Dillon, K. M.; Matson, J. B. A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochemical Pharmacology* **2018**, *149* (4), 110-123.
- (13) Quan, F.-S.; Lee, G.-J. Analytical methods for detection of gasotransmitter hydrogen sulfide released from live cells. *BioMed Research International* **2021**, *2021* (1), 5473965.
- (14) Cirino, G.; Vellecco, V.; Bucci, M. Nitric oxide and hydrogen sulfide: the gasotransmitter paradigm of the vascular system. *British journal of pharmacology* **2017**, *174* (22), 4021-4031.
- (15) Xiao, Q.; Ying, J.; Xiang, L.; Zhang, C. The biologic effect of hydrogen sulfide and its function in various diseases. *Medicine* **2018**, *97* (44), e13065.
- (16) Zhang, L.; Wang, Y.; Li, Y.; Li, L.; Xu, S.; Feng, X.; Liu, S. Hydrogen sulfide (H₂S)-releasing compounds: therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Frontiers in Pharmacology* **2018**, *9*, 1066.
- (17) Elrod, J. W.; Calvert, J. W.; Morrison, J.; Doeller, J. E.; Kraus, D. W.; Tao, L.; Jiao, X.; Scalia, R.; Kiss, L.; Szabo, C. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104* (39), 15560-15565.
- (18) Yang, G.; Wu, L.; Jiang, B.; Yang, W.; Qi, J.; Cao, K.; Meng, Q.; Mustafa, A. K.; Mu, W.; Zhang, S. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase. *Science* **2008**, *322* (5901), 587-590.
- (19) Olson, K. R.; Donald, J. A. Nervous control of circulation—the role of gasotransmitters, NO, CO, and H₂S. *Acta Histochemica* **2009**, *111* (3), 244-256.

- (20) Bhatia, M.; Gaddam, R. R. Hydrogen sulfide in inflammation: a novel mediator and therapeutic target. *Antioxidants & Redox Signaling* **2021**, *34* (17), 1368-1377.
- (21) Linden, D. R. Hydrogen sulfide signaling in the gastrointestinal tract. *Antioxidants & Redox Signaling* **2014**, *20* (5), 818-830.
- (22) Kimura, H. Hydrogen sulfide as a neuromodulator. *Molecular Neurobiology* **2002**, *26*, 13-19.
- (23) Datzmann, T.; Merz, T.; McCook, O.; Szabo, C.; Radermacher, P. H₂S as a therapeutic adjuvant against COVID-19: why and how? *Shock (Augusta, Ga.)* **2021**, *56* (5), 865.
- (24) Szabo, C. Gasotransmitters in cancer: from pathophysiology to experimental therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* **2016**, *15* (3), 185-203. Hartle, M. D.; Pluth, M. D. A practical guide to working with H₂S at the interface of chemistry and biology. *Chemical Society Reviews* **2016**, *45* (22), 6108-6117.
- Wang, R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB Journal* **2002**, *16* (13), 1792-1798.
- (25) Khattak, S.; Rauf, M. A.; Khan, N. H.; Zhang, Q.-Q.; Chen, H.-J.; Muhammad, P.; Ansari, M. A.; Alomary, M. N.; Jahangir, M.; Zhang, C.-Y. Hydrogen sulfide biology and its role in cancer. *Molecules* **2022**, *27* (11), 3389.
- (26) Vandiver, M. S.; Snyder, S. H. Hydrogen sulfide: a gasotransmitter of clinical relevance. *Journal of Molecular Medicine* **2012**, *90*, 255-263.
- (27) Mustafa, A. K.; Gadalla, M. M.; Sen, N.; Kim, S.; Mu, W.; Gazi, S. K.; Barrow, R. K.; Yang, G.; Wang, R.; Snyder, S. H. H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Science Signaling* **2009**, *2* (96), ra72-ra72.
- (28) Kabil, O.; Banerjee, R. Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285* (29), 21903-21907.
- (29) Kashfi, K.; Olson, K. R. Biology and therapeutic potential of hydrogen sulfide and hydrogen sulfide-releasing chimeras. *Biochemical Pharmacology* **2013**, *85* (5), 689-703.
- (30) Sendra, M. Etude mécanistique de la biosynthèse des centres fer-soufre chez Escherichia coli: quel rôle pour la protéine SufA? Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 2007.
- (31) Fitzpatrick, J.; Kim, E. Synthetic modeling chemistry of iron-sulfur clusters in nitric oxide signaling. *Accounts of Chemical Research* **2015**, *48* (8), 2453-2461.
- (32) Lubitz, W.; Ogata, H.; Rudiger, O.; Reijerse, E. Hydrogenases. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (8), 4081-4148.
- (33) Castro, L.; Tórtora, V. n.; Mansilla, S.; Radi, R. Aconitases: Non-redox iron-sulfur proteins sensitive to reactive species. *Accounts of Chemical Research* **2019**, *52* (9), 2609-2619.
- (34) Miller, H. K.; Auerbuch, V. Bacterial iron-sulfur cluster sensors in mammalian pathogens. *Metallomics : Integrated Biometal Science* **2015**, *7* (6), 943-956.
- (35) Crack, J. C.; Le Brun, N. E. Redox-sensing iron-sulfur cluster regulators. *Antioxidants & Redox Signaling* **2018**, *29* (18), 1809-1829.
- (36) 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* (3), 102164.
- (37) 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.
- (38) Gomes, C. M.; Wittung-Stafshede, P. *Protein Folding and Metal Ions: Mechanisms, Biology and Disease*; CRC Press, 2016.
- (39) Dodd, E. L.; Crack, J. C.; Thomson, A. J.; Le Brun, N. E. 13 Reactivity of iron-sulfur clusters with nitric oxide. *Iron-Sulfur Clusters in Chemistry and Biology* **2017**, 387.
- (40) Johnson, D. C.; Dean, D. R.; Smith, A. D.; Johnson, M. K. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74* (1), 247-281.
- (41) Liu, J.; Chakraborty, S.; Hosseinzadeh, P.; Yu, Y.; Tian, S.; Petrik, I.; Bhagi, A.; Lu, Y. Metalloproteins containing cytochrome, iron-sulfur, or copper redox centers. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (8), 4366-4469.

- (42) Jafari, S.; Tavares Santos, Y. A.; Bergmann, J.; Irani, M.; Ryde, U. Benchmark Study of Redox Potential Calculations for Iron–Sulfur Clusters in Proteins. *Inorganic Chemistry* **2022**, *61* (16), 5991-6007.
- (43) MacMicking, J.; Xie, Q.-w.; Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology* **1997**, *15* (1), 323-350. Steinert, J. R.; Chernova, T.; Forsythe, I. D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *The Neuroscientist* **2010**, *16* (4), 435-452.
- (44) 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* **2019**, *48* (37), 13960-13970.
- (45) 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. Mechanistic Insight into the Nitrosylation of the [4Fe– 4S] Cluster of WhiB-like Proteins. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (4), 1112-1121.
- (46) 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. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288* (16), 11492-11502.
- (47) Tonzetich, Z. J.; Wang, H.; Mitra, D.; Tinberg, C. E.; Do, L. H.; Jenney, F. E.; 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), 6914-6916.
- (48) Tinberg, C. E.; Tonzetich, Z. J.; Wang, H.; Do, L. H.; Yoda, Y.; Cramer, S. P.; Lippard, S. J. Characterization of iron dinitrosyl species formed in the reaction of nitric oxide with a biological Rieske center. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (51), 18168-18176.
- (49) 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.
- (50) Choi, M. G.; Cha, S.; Lee, H.; Jeon, H. L.; Chang, S.-K. Sulfide-selective chemosignaling by a Cu 2+ complex of dipicolylamine appended fluorescein. *Chemical Communications* **2009**, *16* (47), 7390-7392.
- (51) Radford-Knoery, J.; Cutter, G. A. Determination of carbonyl sulfide and hydrogen sulfide species in natural waters using specialized collection procedures and gas chromatography with flame photometric detection. *Analytical Chemistry* **1993**, *65* (8), 976-982.
- (52) Warenycia, M. W.; Goodwin, L. R.; Benishin, C. G.; Reiffenstein, R.; Francom, D. M.; Taylor, J. D.; Dieken, F. P. Acute hydrogen sulfide poisoning: demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochemical Pharmacology* **1989**, *38* (6), 973-981.
- (53) Zhang, H.; Wang, P.; Chen, G.; Cheung, H.-Y.; Sun, H. A highly sensitive fluorescent probe for imaging hydrogen sulfide in living cells. *Tetrahedron Letters* **2013**, *54* (36), 4826-4829.
- (54) Peng, H.; Cheng, Y.; Dai, C.; King, A. L.; Predmore, B. L.; Lefer, D. J.; Wang, B. A fluorescent probe for fast and quantitative detection of hydrogen sulfide in blood. *Angewandte Chemie* **2011**, *123* (41), 9846-9849.
- (55) Doeller, J. E.; Isbell, T. S.; Benavides, G.; Koenitzer, J.; Patel, H.; Patel, R. P.; Lancaster Jr, J. R.; Darley-Usmar, V. M.; Kraus, D. W. Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Analytical Biochemistry* **2005**, *341* (1), 40-51.
- (56) Richardson, C. J.; Magee, E. A.; Cummings, J. H. A new method for the determination of sulphide in gastrointestinal contents and whole blood by microdistillation and ion chromatography. *Clinica Chimica Acta* **2000**, *293* (1-2), 115-125.
- (57) Bérubé, P. R.; Parkinson, P. D.; Hall, E. R. Measurement of reduced sulphur compounds contained in aqueous matrices by direct injection into a gas chromatograph with a flame photometric detector. *Journal of Chromatography A* **1999**, *830* (2), 485-489.
- (58) Jiménez, D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Ros-Lis, J. V.; Benito, A.; Soto, J. A new chromo-chemodosimeter selective for sulfide anion. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (30), 9000-9001.

- (59) Lei, W.; Dasgupta, P. K. Determination of sulfide and mercaptans in caustic scrubbing liquor. *Analytica Chimica Acta* **1989**, *226* (1), 165-170.
- (60) Wysocka, A.; Krawczyk, Z. Green fluorescent protein as a marker for monitoring activity of stress-inducible hsp70 rat gene promoter. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2000**, *215* (1), 153-156.
- (61) Grandclaude, V. Synthèse de sondes chéniluminescentes et profluorescentes pour des applications en imagerie in vivo. INSA de Rouen, 2011.
- (62) Takano, Y.; Shimamoto, K.; Hanaoka, K. Chemical tools for the study of hydrogen sulfide (H₂S) and sulfane sulfur and their applications to biological studies. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **2016**, *58* (1), 7-15.
- (63) Lin, V. S.; Chang, C. J. Fluorescent probes for sensing and imaging biological hydrogen sulfide. *Current Opinion In Chemical Biology* **2012**, *16* (5-6), 595-601.
- (64) Pang, L.-J.; Wang, D.; Zhou, J.; Zhang, L.-H.; Ye, X.-S. Synthesis of neamine-derived pseudodisaccharides by stereo- and regio-selective functional group transformations. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, *7* (20), 4252-4266.
- (65) Takano, Y.; Echizen, H.; Hanaoka, K. Fluorescent probes and selective inhibitors for biological studies of hydrogen sulfide- and polysulfide-mediated signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* **2017**, *27* (10), 669-683.
- (66) Lippert, A. R.; New, E. J.; Chang, C. J. Reaction-based fluorescent probes for selective imaging of hydrogen sulfide in living cells. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (26), 10078-10080.
- (67) Tsien, R. Y. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* **1998**, *67* (1), 509-544.
- (68) Wei, L.; Zhu, Z.; Li, Y.; Yi, L.; Xi, Z. A highly selective and fast-response fluorescent probe for visualization of enzymatic H₂S production in vitro and in living cells. *Chemical Communications* **2015**, *51* (52), 10463-10466.
- (69) Xuan, W.; Sheng, C.; Cao, Y.; He, W.; Wang, W. Fluorescent probes for the detection of hydrogen sulfide in biological systems. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (10), 2282-2284.
- (70) Henthorn, H. A.; Pluth, M. D. Mechanistic insights into the H₂S-mediated reduction of aryl azides commonly used in H₂S detection. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137* (48), 15330-15336.
- (71) Bräse, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V. Organic azides: an exploding diversity of a unique class of compounds. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (33), 5188-5240.
- (72) Gololobov, Y. G.; Zhmurova, I.; Kasukhin, L. Sixty years of Staudinger reaction. *Tetrahedron* **1981**, *37* (3), 437-472.
- (73) Hall, L. Nuclear magnetic resonance. *Advances In Carbohydrate Chemistry* **1964**, *19*, 51-93.
- (74) Kleinberg, R. L. 9. Nuclear magnetic resonance. *Experimental Methods In The Physical Sciences* **1999**, *35*, 337-385.
- (75) Hore, P. J. *Nuclear magnetic resonance*; Oxford University Press, USA, 2015.
- (76) Chardaire-Riviere, C.; Roussel, J. Principle and potential of nuclear magnetic resonance applied to the study of fluids in porous media. *Revue De L'Institut Français Du Pétrole* **1992**, *47* (4), 503-523.
- (77) Plank, J.; Andres, P. R.; Krause, I.; Winter, C. Gram scale separation of casein proteins from whole casein on a Source 30Q anion-exchange resin column utilizing fast protein liquid chromatography (FPLC). *Protein Expression and Purification* **2008**, *60* (2), 176-181.
- (78) Tangvarasittichai, S.; Tangvarasittichai, O.; Jermnim, N. Comparison of fast protein liquid chromatography (FPLC) with HPLC, electrophoresis & microcolumn chromatography techniques for the diagnosis of β -thalassaemia. *Indian Journal of Medical Research* **2009**, *129* (3), 242-248.
- (79) Components of an FPLC System. **2024**.
- (80) Gaberc-Porekar, V.; Menart, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2001**, *49* (1-3), 335-360.

- (81) Block, H.; Maertens, B.; Spriestersbach, A.; Brinker, N.; Kubicek, J.; Fabis, R.; Labahn, J.; Schäfer, F. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods In Enzymology* **2009**, *463*, 439-473.
- (82) Abou Zeid, L. Evaluation de l'affinité et de la sélectivité vis-à-vis de l'uranium de différentes classes de peptides, par chromatographie d'interaction hydrophile couplée aux spectrométries de masse élémentaire et moléculaire. Sorbonne université, 2022.
- (83) Edwards, A. A.; Alexander, B. D. UV-Visible absorption spectroscopy, organic applications. **2017**.
- (84) Verma, G.; Mishra, M. Development and optimization of UV-Vis spectroscopy-a review. *World J. Pharm. Res* **2018**, *7* (11), 1170-1180.
- (85) Rothen, F. *Aux limites de la physique: les paradoxes quantiques*; PPUR Presses polytechniques, 2012.
- (86) Bakhouch, M. Techniques spectroscopiques d'analyse: Spectroscopies IR, UV-Vis et spectrométrie de Masse.
- (87) Piard, J.; Doré, C.; Placial, J.-P. Discussion sur les limites de loi de Beer-Lambert. *Le Bulletin de l'Union des Professeurs de Physique et de Chimie* **2022**.
- (88) de Beer Lambert, L. LC-12-Caractérisations par spectroscopie en synthèse organique (Lycée). **2022**.
- (89) Ellingsen, G.; Fery-Forgues, S. Application de la spectroscopie de fluorescence à l'étude du pétrole: le défi de la complexité. *Revue de l'institut Français du Pétrole* **1998**, *53* (2), 201-216.
- (90) Miyawa, J. H.; Schulman, S. G. Luminescence Spectroscopy. In *Handbook of Pharmaceutical Analysis*, CRC Press, 2001; pp 446-485.
- (91) Mongin, C. Synthèse et étude de cages moléculaires photo-modulables et génération de nanocristaux d'or par photo-catalyse supramoléculaire. Université Sciences et Technologies-Bordeaux I, 2013.
- (92) Gustavsson, T.; Mialocq, J.-C. Spectroscopie de fluorescence résolue en temps. *Réactions ultrarapides en solution Approches expérimentales et théoriques* **2007**, *27*.
- (93) Lakowicz, J. R.; Lakowicz, J. R. Introduction to fluorescence. *Principles of fluorescence spectroscopy* **1999**, *978* (1), 4757-3063.
- (94) Sasmal, P. K.; Carregal-Romero, S.; Han, A. A.; Streu, C. N.; Lin, Z.; Namikawa, K.; Elliott, S. L.; Köster, R. W.; Parak, W. J.; Meggers, E. Catalytic azide reduction in biological environments. *ChemBioChem* **2012**, *13* (8), 1116-1120.
- (95) Carterjunior, C. W., Kraut, J., Freer, S.T., Xuong, N.-H., Alden, R.A., Bartsch, R.G. *Two-angstrom crystal structure of oxidized chromatin high potential iron protein* 1974. (accessed 1976-11-22. Carter, C. W.; Kraut, J.; Freer, S. T.; Xuong, N.-h.; Alden, R. A.; Bartsch, R. G. Two-Angstrom crystal structure of oxidized Chromatin high potential iron protein. *Journal of Biological Chemistry* **1974**, *249* (13), 4212-4225.
- (96) Benhlila, A. 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]. **2024**.
- (97) Jia, T.-T.; Zhang, Y.; Hou, J.-T.; Niu, H.; Wang, S. H₂S-based fluorescent imaging for pathophysiological processes. *Frontiers in Chemistry* **2023**, *11* (3), 1126309.
- (98) Lippert, A. R. Designing reaction-based fluorescent probes for selective hydrogen sulfide detection. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2014**, *133*, 136-142.