



Soutenance de thèse de Martin DULAC
pour le titre de docteur de l'Université Sorbonne Paris Cité

Thèse de doctorat préparée à l'Université Paris Descartes et l'université Paris Diderot
Présentée et soutenue publiquement le jeudi 15 Novembre 2018 à 14h00
En salle 774 du bâtiment Lavoisier, 15 rue Jean-Antoine de Baïf, Paris 13

« Développement d'un biocapteur au sulfure d'hydrogène »

Résumé

Au-delà de son caractère polluant, hautement toxique et son odeur d'oeuf pourri il est désormais démontré que le sulfure d'hydrogène, H₂S, est également un transmetteur gazeux chez les mammifères aussi important que le monoxyde d'azote et le monoxyde de carbone. Cependant, et malgré de nombreuses avancées récentes, il n'existe toujours pas d'outils analytiques permettant une détection sensible, spécifique et en temps réel du sulfure d'hydrogène dans les milieux biologiques. Un tel dispositif permettrait notamment de valider l'implication d'H₂S dans certaines pathologies, ouvrant ainsi la voie à une utilisation pharmacologique de cette molécule.

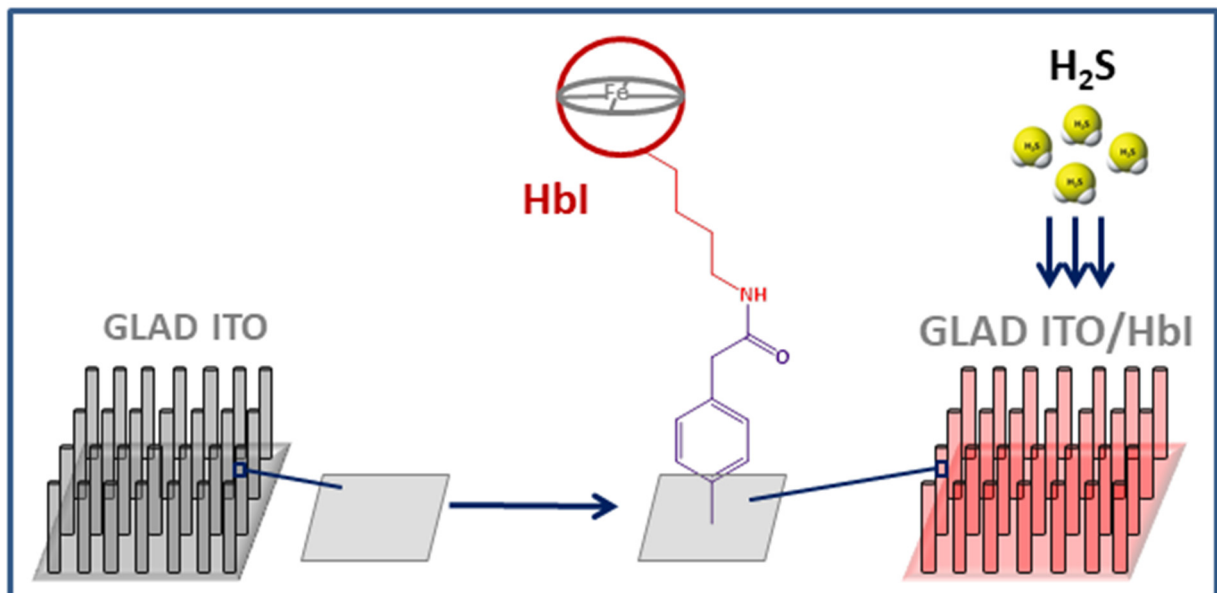
Nous proposons dans ce travail de doctorat de développer un biocapteur opto-électrochimique innovant, combinant l'extrême affinité et spécificité d'une sonde biologique avec la sensibilité d'une électrode d'oxyde métallique, 3D et transparente. Pour cela, notre attention s'est portée sur une hémoglobine particulière, l'hémoglobine I (HbI), qui présente à travers l'organisation et la composition originale de la poche de l'hème, une affinité et une spécificité de liaison avec H₂S très favorable. Les variations des propriétés spectroscopiques et électrochimiques de la protéine induites par la coordination d'H₂S au centre ferrique de l'hème, permettent une détection originale en temps réel, sensible et spécifique du H₂S.

Pour développer ce biocapteur, nous avons tiré parti d'électrodes mésoporeuses conductrices et transparentes constituées d'oxyde d'indium dopé à l'étain (ITO), préparées par méthode de dépôt physique (GLAD - GLancing Angle Deposition) offrant un excellent contrôle de la morphologie du film mésoporeux (épaisseur et porosité du film) et excellente reproductibilité. La tri-dimensionnalité du réseau GLAD ITO permet l'immobilisation non dénaturante, d'une grande

quantité biomolécules, facilitant la détection spectroscopique ainsi que, dans certains cas, un transfert d'électron direct.

Pour la modification des électrodes nanostructurées, nous avons développé une méthodologie en deux étapes, avec d'une part l'introduction de fonctions carboxyles par réduction électrochimique in situ de sels d'aryldiazoniums puis un couplage peptidique de l'hémoglobine I avec les amines primaires des résidus lysines de surface.

Les électrodes GLAD ITO/HbI modifiées ont par la suite été caractérisées par différentes techniques. Leurs stabilités en solution aqueuse, même à des forces ioniques élevées, est excellente. De plus nous avons démontré que la fixation rapide, réversible et sélective d' H_2S à HbI immobilisée peut être suivie par simple spectroscopie d'absorption UV-visible ouvrant la voie à des analyses en temps réel. L'affinité pour H_2S de l'électrode modifiée, de l'ordre du micromolaire et la spécificité du biocapteur vis-à-vis des autres thiols biologiques (cystéine, glutathion) permettent d'envisager de multiples applications valorisant ainsi le dispositif développé.





**Thesis defended by Martin DULAC
for the PhD at University Sorbonne Paris Cité**

Doctoral thesis prepared at the University Paris Descartes and the University Paris Diderot
Presented and defended publicly in Paris, November 15th 2018 at 2pm
In Bât. Lavoisier, 15 rue Jean-Antoine de Baïf, Paris 13, room 774

« Development of a hydrogen sulfide biosensor »

Abstract

Beyond its poisonous, corrosive, flammable and rotten odor properties, hydrogen sulfide (H₂S) has recently been found to be a major gaseous transmitter in humans, in the same way as nitric oxide and carbon monoxide. Accurate detection of the low H₂S concentrations present in biological media with an analytical tool, exhibiting appropriate sensitivity and specificity, is however still missing, restricting thus the characterization of the biological role of H₂S and its possible involvement in pathologies. In this context, we propose here an innovative opto-electrochemical biosensor that combines the high specificity and affinity of a H₂S-bioreceptor probe with the sensitivity of a 3D transparent metal oxide electrode. Our interest has notably been focused on a peculiar H₂S-sensitive hemoprotein, the hemoglobin I (HbI) which, on account of its original heme pocket organization, shows particularly high specificity and affinity binding towards H₂S. Upon reversible coordination of H₂S to the ferric heme center, variations in the spectroscopic and electrochemical features of the protein offer original real-time, specific and sensitive H₂S monitoring.

To develop our biosensor, we decided to take advantage of a transparent and fully conductive mesoporous metal-oxide electrode based on ITO (indium tin oxide) which preparation by glancing angle vapor deposition - GLAD allows for excellent control of the morphology (film thickness and porosity) and reproducibility. This three-dimensional matrix allows for adsorption of large amounts of biological molecules without significant denaturation and up to a concentration easily detected by spectroscopy, as well as direct electron transfer in some cases.

In order to prepare stable modified nanostructured electrodes, we have explored a two-steps covalent functionalization of the ITO surface by first introducing carboxyl functional groups by

electrochemical reduction of in-situ generated diazonium salts, followed by covalent peptidic coupling of the hemoglobin I through the surface-accessible lysine residues.

The resulting hemoglobin I-modified electrodes were characterized by different techniques. They exhibit excellent stability in solution, even in high ionic strength aqueous solutions. We further demonstrated that reversible H₂S fixation can be monitored by simple UV-visible absorption spectroscopy, with excellent affinity and real time detection in the micromolar range. Furthermore, the high selectivity compared to other biological thiols (cysteine, glutathione) allows multiple biosensor application, hence achieving the device valorization.

Composition of the jury

Reviewers	Claude JOLIVALT	Pr, Université Pierre et Marie Curie
	Frédéric BARRIÈRE	MCU-HDR, Université de Rennes
Examiners	Ursula LIEBL	Dr, Ecole Polytechnique Paris-Saclay
	Jean-Pierre MAHY	Pr, Université Paris Sud
Supervisor	Véronique BALLAND	MCU-HDR, Université Paris Diderot
	Erwan GALARDON	CR-HDR, Université Paris Descartes