HAL
open science

Monitoring de S-nitrosothiols dans des matrices biologiques grâce à des sondes nanostructurées

Margaux Berthou

To cite this version:

Margaux Berthou. Monitoring de S-nitrosothiols dans des matrices biologiques grâce à des sondes nanostructurées. Sciences pharmaceutiques. Université de Lorraine, 2022. Français. NNT : 2022LORR0253 . tel-04079982

HAL Id: tel-04079982

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-04079982v1

Submitted on 24 Apr 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE | BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par Margaux BERTHOU

Monitoring de S-nitrosothiols dans des matrices biologiques grâce à des sondes nanostructurées

Le 20 septembre 2022

Membres du jury :

Président :	Mme Catherine FOULON	PR, EA 7365, Université de Lilles,
Rapporteurs :	Mme Catherine FOULON	PR, EA 7365, Université de Lilles,
	Mme Murielle ROCHELET	MCU, AgroSup, Université de Bourgogne,
Examinateurs :	Mme Corinne RAVELET	PR, UMR 5063, Université Grenoble Alpes, Grenoble
	Mr Emmanuel LAMOUROUX	MCU, UMR 7053, Université de Lorraine, Nancy co-directrice de thèse
	Mr Igor CLAROT	MCU, EA 3452, Université de Lorraine, Nancy directeur de thèse
	Mr Arnaud PALLOTTA	MCU, EA 3452, Université de Lorraine, Nancy co-directeur de thèse

EA 3452 CITEFOR : Cibles Thérapeutiques et Expertise Préclinique du Médicament

9, avenue de la Forêt de Haye - BP 20199, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex

Remerciements

En tout premier lieu, je souhaite remercier profondément Igor Clarot et Arnaud Pallotta, respectivement directeur et co-directeur de thèse, pour m'avoir offert la possibilité de faire cette thèse, pour leur aide, leur disponibilité et leur accompagnement sans faille pendant ces 3 années à me supporter. J'en profite également pour remercier Neness sans qui nous ne serions pas allés bien loin.

Merci à Catherine Foulon et Murielle Rochelet, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail ainsi qu'à Corinne Ravelet et Emmanuel Lamouroux pour avoir suivi mon travail durant ces 3 ans.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans la disponibilité et l'accueil chaleureux que m'a témoigné l'ensemble du personnel du laboratoire Cithefor. Plus particulièrement je remercie Thomas Chaigneau pour son soutien de « qualité » et ses conseils de sioux, Isabelle Fries pour m'avoir initié au merveilleux monde de la bio, (commissaire) Jérémie Gouyon pour son expertise en PowerPoint, Alexandra Kleinhauss pour son apprentissage de la technique du rétro pipetage, mais aussi Anne Sapin Minet, Caroline Gaucher et l'ensemble du labo pour les moments de convivialité partagés autour d'un bon café.

À mes amis et collègues doctorantEs sans qui tout cela aurait été bien triste, étant tous dans la même galère, votre soutien m'a été précieux. Justine Bonetti, Célia Boukoufi, Rama Alhasan, Céline Delaitre et les autres, merci pour les fous rires, les sessions déménagement, les gouter partagés et les quarts d'heure plaintes.

Jordan, mon binôme, sans qui tout cela aurait été certes plus scientifique, mais beaucoup moins wahou (c'est pas des lol, c'est réel). Merci pour ton expertise en non-respect des bonnes pratiques de laboratoire, en temporisation et ton soutien quotidien.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui m'ont encouragées et m'ont accompagnées tout au long de ces années sans forcément toujours comprendre ce que je faisais. Je suis redevable à mes parents, ma sœur et mon frère ainsi que mes grands-parents pour leur confiance indéfectible dans mes choix et en mon talent qui aura fini par payer ! Merci à mes amis pour leur soutien et leurs encouragements. Pour finir et pas des moindres, je tiens à remercier du fond du cœur celui qui partage ma vie depuis tant d'années et sans qui tout cela n'aurait jamais été possible. Merci de m'avoir soutenu, aidé, d'avoir séché mes larmes et d'avoir cru en moi quand je n'y arrivai plus. Enfin plein d'amour à Nouhl, ma petite motivation au quotidien.

Je terminerai mes remerciements en citant un « grand » artiste qui a dit quelque chose un jour qui prend tout son sens après 3 dures et longues années de thèse :

« On a fait ce qu'on a fait comme on l'a fait mais on l'a fait ! » Shonen, ORELSAN

Table des matières

TABLE DES MATIERES

Formations ..... *i*
Production scientifique et enseignements ..... *iii*
Liste des figures ..... *v*
Liste des tableaux ..... *ix*
Liste des abréviations ..... *xi*
INTRODUCTION *1*
CHAPITRE 1 ..... *7*
1. Les thiols **9**
1.1. Thiols en santé : rôles biologiques 10
1.2. Problématique des thiols donneurs de NO 16
1.3. Thiols volatils 18
2. Article 1: Nanoscale contribution to thiol sensing **21**
3. Développement de matériaux nanostructurés **38**
3.1. Intérêts des matériaux nanostructurés 38
3.2. Méthodes de nanostructuration de surface 40
3.3. Nanoparticules impliquées dans la nanostructuration 43
4. Hypothèse de travail **44**
CHAPITRE 2 ..... *49*
1. Les supports nanostructurés **51**
2. Matériel et méthodes **53**
2.1. Nanoparticules d'or 53
2.2. Nanostructuration des membranes 56
2.3. Caractérisation de la nanostructuration 60
2.4. Principe du dispositif 62
2.5. Traitement des échantillons biologique 63
2.6. Stratégies analytiques 64
3. Développement du dispositif **70**
3.1. Choix du dispositif 70
3.2. Choix des conditions et du mode opératoire 73
3.3. Influence de la porosité de la membrane 75
3.4. Influence du temps de contact AuNP-thiol 78
4. Article 2 : Gold nanostructured membranes to concentrate low molecular weight thiols, a proof of concept study **80**
5. Étude de l'efficacité du dispositif vis-à-vis des *S*-Nitrosothiols **93**
5.1. Preuve de concept 94
5.2. Application du dispositif à une matrice biologique : plasma 100
6. Conclusion et perspectives **102**
CHAPITRE 3 ..... *107*
1. Thiols volatils et méthodes associées **109**
2. Matériel et méthodes **113**
2.1. Membranes 113
2.2. Nanostructuration 114
2.3. Caractérisation 117
2.4. Évaluation des performances du dispositif 117
2.5. Traitement des échantillons alimentaires 119
2.6. Quantification 120
3. Développement du dispositif **122**
3.1. Choix du dispositif 122
3.2. Nanostructuration 123
3.3. Evaluation de l'efficacité de la membrane 124

4. Application à des matrices agroalimentaires 129
4.1. Influence du thiol 132
4.2. Influence de la matrice 134
5. Conclusion 135
CHAPITRE 4 139
1. Problématique des donneurs de NO 141
2. Matériel et méthodes 144
2.1. Filtres 144
2.2. Modèle de barrière intestinale 145
2.3. Stratégie analytique mise en place dans chaque compartiment 149
3. Résultats 154
3.1. Pourcentage d'extraction 154
3.2. article 3, nanostructurated material contribution to thiol quantification in intestinal mimicking media 157
3.3. Application aux RSNO 175
4. Conclusion 182
DISCUSSION ET PERSPECTIVES 185
CONCLUSION 191
BIBLIOGRAPHIE 195

FORMATIONS

2019-2022	Doctorat d'Université au laboratoire CITHEFOR EA3452.
2018-2019	Master 2 Biologie Nanomédecine et Qualité parcours qualité.
2017-2018	Master 1 Bio Sciences et Ingénierie de la Santé option Bio Ingénierie du Médicament
2015-2017	DUT génie chimique, génie des procédés option bio procédés : mention assez bien
2014	Baccalauréat scientifique spécialité physique-chimie option espagnol : mention bien.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE ET ENSEIGNEMENTS

Publications

M. Berthou, A. Pallotta, J. Beurton, T. Chaigneau, A. Athanassiou, C. Marcic, E. Marchioni, A. Boudier, I. Clarot, Gold nanostructured membranes to concentrate low molecular weight thiols, a proof of concept study, Journal of Chromatography B. 1198 (2022) 123244. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123244.

→ IF: 3,205

M. Berthou; I. Clarot; J. Gouyon; D. Steyer; M. A. Monat; A. Boudier, A. Pallotta, Nanoscale contribution to thiol sensing, Microchemical Journal.

→ IF: 4,821

Communications orales

AESAP (Association des Enseignants en Sciences Analytiques et Pharmaceutiques) (congrès national), distanciel, 28 juin 2021 : Développement d'un dispositif nanostructuré pour le monitoring de molécules thiolées

APA (Advance in Pharmaceutical Analysis) (congrès international), Nancy, du 23 au 26 juin 2022: *Gold nanostructured membranes to concentrate volatils thiols in food media*

Communication poster

Analytics (congrès national), Nantes, du 5 au 8 septembre 2022: *Gold nanostructured membranes to concentrate low molecular weight thiols and S-nitrosothiols*

Encadrement

Stage de L3 (Licence de chimie, Université de Paris), avril à juin 2021, Anna Phan

→ Optimisation d'un dispositif nanostructuré pour l'étude de candidats médicaments

Enseignements

2020-2021 : (48 h)

- Faculté de pharmacie : DFASP1, travaux pratiques développement analytique et galénique (18 h)
- IUT Nancy-Brabois : licence professionnelle, travaux pratiques contrôle qualité (12 h)
- Préparateur en pharmacie hospitalière : travaux pratiques contrôle qualité (18 h)

2021-2022: (57 h)

- Faculté de pharmacie :
  - DFASP1, travaux pratiques développement analytique et galénique (18 h)
  - DFGSP2, travaux pratiques apprentissage des Techniques de Base (9 h)
- IUT Nancy-Brabois : licence professionnelle, travaux pratiques contrôle qualité (12 h)
- Préparateur en pharmacie hospitalière : travaux pratiques contrôle qualité (18 h)

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: STRUCTURES MOLÉCULAIRES DES DIFFÉRENTS THIOLS DÉCRITS ET UTILISÉS DANS CE MANUSCRIT. 10
FIGURE 2: MÉCANISMES RÉACTIONNELS DE S-THIOLATION (1) ET S-NITROSYLATION (2) APPLIQUÉS AUX PROTÉINES.....11
FIGURE 3: VOIES DE SYNTHÈSE DES DIFFÉRENTS THIOLS DE BAS POIDS MOLÉCULAIRE DANS L'ORGANISME. ..13
FIGURE 4: SCHÉMA RÉCAPITULATIF DES DIFFÉRENTES FONCTIONS DU GSH PHYSIOLOGIQUE. SCHEMA.....14
FIGURE 5: SCHÉMA SIMPLIFIÉ DU DEVENIR DE RS ET DE NO ISSU D'UN DONNEUR DE NO ADMINISTRÉ (RSNO) FACE À UNE BARRIÈRE PHYSIOLOGIQUE AVEC RX DES THIOLS (FAIBLE OU HAUT POID MOLÉCULAIRE) POTENTIELLEMENT IMPLIQUÉS. 18
FIGURE 6: REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU DISPOSITIF NANOSTRUCTURÉ À BASE D'AUNP POUR LA CAPTURE ET L'ANALYSE SPÉCIFIQUE DE THIOLS. 46
FIGURE 7: SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES D'OR.....54
FIGURE 8: CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES AUNP COLLOÏDALE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE (A), TEM (B), DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIÈRE (C) ET ÉLECTROPHORÈSE LASER À EFFET DOPPLER (D). 55
FIGURE 9: MEMBRANE EN CELLULOSE RÉGÉNÉRÉE UTILISÉE POUR LA NANOSTRUCTURATION. 57
FIGURE 10: INFLUENCE DU PH SUR LA CHARGE GLOBALE DU PAH. 59
FIGURE 11: MÉTHODOLOGIE D'IMMOBILISATION DES AUNP COLLOÎDALES SUR UN FILTRE SERRINGUE, BASÉ SUR LES INTÉRACTIONS ÉLECTROSTATIQUES ENTRE LE POLYMÈRE D'ACCROCHE (CHARGÉ POSITIVEMENT) ET LES AUNP (CHARGÉES NÉGATIVEMENT). 59
FIGURE 12: DOSAGE DE L'OR PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE PAR APPARIEMENT D'ION. 61
FIGURE 13: MÉTHODOLOGIE D'UTILISATION DU DISPOSITIF NANOSTRUCTURÉ. PROCESSUS COMPOSÉ DE DEUX ÉTAPES (ADSORTPION ET DÉSORPTION) SUIVI D'UNE QUANTIFICATION DES ESPÈCES THIOLÉES EN HPLC. 63
FIGURE 14: SCHÉMA RÉACTIONNEL DES ESPÈCES THIOLÉES ET NITROSÉES ET LEUR MÉTHODES ANALYTIQUES ASSOCIÉES.....65
FIGURE 15: SCHÉMA RÉACTIONNEL D'UNE MOLÉCULE THIOLÉE AVEC LE RÉACTIF D'ELLMAN EN SPECTROMÉTRIE UV-VIS.....66
FIGURE 16: CHROMATOGRAMMES DE GSH (A) ET NAC (B) POUR DES CONCENTRATIONS COMPRISES ENTRE 0,5 ET 50,0 µM.....67
FIGURE 17: RÉACTIONS IMPLIQUÉES DANS LE DOSAGE DES IONS NITRITES ET DES S-NITROSOTHIOLS DANS LE DOSAGE PAR LA MÉTHODE FLUORIMÉTRIQUE DE DAN. 68
FIGURE 18: MÉTHODE DE QUANTIFICATION DES ESPÈCES NITROSÉES PAR LA MÉTHODE DE GRIESS-SAVILLE.69
FIGURE 19: ETUDE DE LA VARIATION DE FRÉQUENCE SUR UN CRISTAL QUARTZ RECOUVERT D'OR AFIN D'ÉTUDIER LE TEMPS D'IMMOBILISATION DU POLYMÈRE D'ACCROCHE, DES AUNP ET DES RINÇAGES.....74
FIGURE 20: COMPARAISON DE LA DENSITÉ D'IMMOBILISATION EN AUNP PAR CM2 EN FONCTION DE LA POROSITÉ DES MEMBRANES NANOSTRUCTURÉES APRÈS 15 DÉPÔTS D'AUNP (N = 3). 76

FIGURE 21: ETUDE DE LA DENSITÉ D'IMMOBILISATION EN AUNP PAR CM2 DE MEMBRANES NANOSTRUCTURÉES EN FONCTION DU NOMBRE DE DÉPÔTS D'AUNP (N = 1) POUR UNE POROSITÉ 0,45 µM (BLEU), 0,80 µM (VERT), 1,20 µM (ORANGE) ET 5,00 µM (GRIS). 77
FIGURE 22: COMPARAISON DE LA CAPACITÉ MAXIMALE D'ADSORPTION EN NAC DES MEMBRANES NANOSTRUCTURÉES EN FONCTION DE LEUR POROSITÉ. 78
FIGURE 23: CINÉTIQUE DE FORMATION DE LA LIAISON AU-S AVEC UNE SOLTUION DE NAC 50 µM (500 µL). ..79
FIGURE 24: MÉTHODOLOGIE ANALYTIQUE APRÈS FILTRATION DES RSNO À TRAVERS LE FILTRE NANOSTRUCTURÉ POUR QUANTIFIER LES RSH (A), RSNO (B), NO (C) ET IONS NITRITES (D). 95
FIGURE 25: ETUDE DE L'INTÉRACTION ENTRE NACNO (6 µM) ET LA MEMBRANE NANOSTRUCTURÉE EN FONCTION DU TEMPS DE CONTACT (GRIS) PAR ANALYSE DES RSNO DANS LE FILTRAT (N = 3). LE CONTRÔLE EST RÉALISÉ DANS UN FILTRE SANS AUNP (BLEU). 97
FIGURE 26: ETUDE DE L'INTERACTION PAR FILTRATION DIRECTE DE NACNO (BLEU) ET GSNO (GRIS) SUR UN FILTRE NANOSTRUCTURÉ ET FILTRE TÉMOIN, PAR ANALYSE DES RSNO PRÉSENTS DANS LE FILTRAT (N = 3)....98
FIGURE 27: COMPARAISON DE L'INTÉRACTION GSNO/AUNP IMMOBILISÉES EN FONCTION DE LA MATRICE : PBS (BLEU) ET PLASMA (GRIS), AVEC TÉMOINS SUR FILTRE NON NANOSTRUCTURÉS PAR ANALYSE DU GSNO DANS LE FILTRAT (N = 1). 101
FIGURE 28: ILLUSTRATION DE L'UTILISATION DU NEM AVANT FILTRATION D'UNE SOLUTION CONTENANT RSH ET RSNO (A) POUR BLOQUER LES FONCTIONS THIOL DES RSH (B) ET ADSORBER UNIQUEMENT LESTHIOLS ISSUS DE LA DÉNITROSATION (C). 102
FIGURE 29: MEMBRANE EN CELLULOSE RÉGÉNÉRÉE DANS LE DISPOSITIF CENTRIFUGEABLE. 114
FIGURE 30: MÉTHODOLOGIE D'IMMOBILISATION DES AUNP COLLOÏDALES SUR UN FILTRE CENTRIFUGEABLE BASÉ SUR LES INTÉRACTIONS ÉLECTROSTATIQUES ENTRE LE POLYMÈRE D'ACCROCHE (CHARGÉ POSITIVEMENT) ET LES AUNP (CHARGÉES NÉGATIVEMENT). 116
FIGURE 31: MÉTHODOLOGIE D'UTILISATION DU DISPOSITIF NANOSTRUCTURÉ CENTRIFUGEABLE AVECS PBS. LE PROCESSUS SE DÉCOMPOSE EN DEUX ÉTAPES (ADSORPTION ET DÉSORPTION) SUIVIES D'UNE QUANTIFICATION EN HPLC. 118
FIGURE 32: MÉTHODOLOGIED'UTILISATION DU DISPOSITIF NANOSTRUCTURÉ CENTRIFUGEABLE AVECS PBS. LE PROCESSUS SE DÉCOMPOSE EN DEUX ÉTAPES (ADSORPTION ET DÉSORPTION) SUIVIES D'UNE QUANTIFICATION EN SPME GC-MS....120
FIGURE 33: MEMBRANE NANOSTRUCTURÉE CENTRIFUGEABLE. 122
FIGURE 34: ETUDE DE LA SATURATION DE LA MEMBRANE NANOSTRUCTURÉE PAR AJOUTS SUCCÉSSIFS DE 25 NMOL DE NAC (500 µL 500 µM) (N = 1). 125
FIGURE 35: ILLUSTRATION DU PHÉNOMÈNE D'ENCOMBREMENT STÉRIQUE DES AUNP SUR LES DIFFÉRENTS MEMBRANES NANOSTRUCTURÉES. 126
FIGURE 36: EVOLUTION DU POURCENTAGE D'ADSORPTION DE NAC SUR LA MEMBRANE NANOSTRUCTURÉE EN FONCTION DE LA VITESSE DE ROTATION DE LA CENTRIFUGEUSE (N = 1). 127
FIGURE 37: COMPARAISON DE L'ÉFFICACITÉ DE RELARUAGE DE NAC ADSORBÉES SUR LE FILTRE CENTRIFUGEABLE (BLEU ET TRAIT PLEIN) ET FILTRE SERRINGUE (ORANGE POINTILLÉS). 128
FIGURE 38: STRUCTURE CHIMIQUE DES THIOLS VOLATILS ÉTUDIÉS. 129

FIGURE 39: PRINCIPE D'ANALYSE EN SPME-GC-MS APRÈS ADSORPTION ET DÉSORPTION DU LE FILTRE CENTRIFUGEABLE. 130
FIGURE 40: ETUDE DE L'ADSORPTION DE THIOLS SUR LA MEMBRANE NANOSTRUCTURÉE: 3MHA (BLEU), 3MH (ORANGE) ET 2FFT (GRIS). 131
FIGURE 41: ETUDE DE RELARGAGE DES THIOLS DE LA MEMBRANE NANOSTRUCTURÉE PAR RAPPORT AU POURCENTAGE PRÉDÉDEMMENT ADSORBÉ: 3MHA (BLEU), 3MH (ORANGE) ET 2FFT (GRIS). 131
FIGURE 42: REPRÉSENTATION THÉORIQUE DE L'ENCOMBREMENT STÉRIQUE ENGENDRÉ PAR LE 3MHA, 3MH ET 2FFT LORS DE L'ADSORPTION SUR LA MEMBRANE NANOSTRUCTURÉE. 132
FIGURE 43: PRÉSENTATION DES DIFFÉRENTS MÉCANISMES POSSIBLE DE PASSAGE DE BARRIÈRE POUR UN RSNO. 143
FIGURE 44: SCHÉMA DU DISPOSITIF TRANSWELL® DÉCOMPOSÉ EN 3 PARTIES : LE COMPARTIMENT APICAL SIMULANT LA BARRIÈRE INTESTINAL (A), LE COMPARTIMENT BASOLATÉRAL SIMULANT LE COMPARTIMENT SANGUIN (B) ET LE COMPARTIMENT CELLULAIRE FORMÉ PAR LES CELLULES CACO-2 (C). 147
FIGURE 45: STRATÉGIE ANALYTIQUE MISE EN PLACE POUR LA QUANTIFICATION DES DIFFÉRENTES ESPÈCES (RSH, RSNO, IONS NITRITES ET PROTÉINES) EN FONCTION DU COMPARTIMENT CONSIDÉRÉ (APICAL, BASOLATÉRAL ET CÉLLULAIRE).. 149
FIGURE 46: RÉACTION SUPPORT DU DOSSAGE DU GSH PAR LE 2,3-NAPHTALÈNE DICARBOXALDÉHYDE (NDA) 152
FIGURE 47: RÉACTION SUPPORT DU DOSAGE DES PROTÉINES EN PRÉSENCE DE CUIVRE (2) PAR L'ACIDE BICINCHONINIQUE (BCA) ABOUTISSANT À LA FORMATION D'UN COMPLEXE VIOLET DÉTÉCTABLE EN SPÉCTROPHOTOMÉTRIE UV-VIS. 153
FIGURE 48: CINÉTIQUE DE RELARGAGE APRÈS ADSORPTION DE NAC ET/OU GSH DANS LE MILIEU HBSS... 156
FIGURE 49: MÉTHODE ANALYTIQUEAPPLIQUÉES À LA QUANTIFICATION DES RSNO, RSH ET IONS NITRITES DANS LE MILIEU APICAL ET BASOLATÉRAL. 176
FIGURE 50:BILAN DE MATIÈRE ET RÉPARTITION DE RSNO ET RSH APRÈS DÉPÔT DE NACNO (50 NMOL) OU GSNO (50 NMOL) DANS LE COMPARTIMENT APICAL APRÈS 4H D'INCUBATION À 37 °C. 178
FIGURE 51: BILAN DE MATIÈRE ET RÉPARTITION DE RSNO ET RSH APRÈS DÉPÔT DE NACNO (50 NMOL) ET GSNO (50 NMOL) DANS LE COMPARTIMENT APICAL APRÈS 4H D'INCUBATION À 37 °C. 180
FIGURE 52: EVOLUTION DE LA CAPACITÉ D'ADSORPTION DU FILTRE NANOSTRUCTURÉ EN FONCTION DU NOMBRE DE RECYCLAGES. 188

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: APPORTS DES NANOMATÉRIAUX PAR RAPPORT AUX MÉTHODES CLASSIQUES, POUR LA QUANTIFICATION DES THIOLS. 37
TABLEAU 2 : EXEMPLES DE MATÉRIAUX NANOSTRUCTURÉS UTILISÉES POUR LA QUANTIFICATION SPÉCIFIQUE D'ANALYTES. 43
TABLEAU 3: CONTRÔLE QUALITÉ DES AUNP (ÉVALUÉ SUR 147 LOTS) PAR RAPPORT AUX SPÉCIFICATIONS MISES EN PLACE AU LABORATOIRE (103). 56
TABLEAU 4: PARAMÈTRES DE VALIDATION DES COURBES STANDARD POUR LES S-NITROSOTHIOLS (RSNO) ET LES IONS NITRITES (NO_2-) DANS UN TAMPON PHOSPHATE PH 7,4 (N=3) 69
TABLEAU 5: RÉCAPITULATIFS DES DONNÉES D'ADSORPTION OBTENUES AVEC RSNO ET RSH DANS MATRICE SIMPLE ET PLASMA. 105
TABLEAU 6: ÉTUDE DE LA DENSITÉ D'IMMOBILISATION EN AUNP PAR CM² EN FONCTION DE DEUX PARAMÈTRES : LA CONCENTRATION EN PAH ET LE NOMBRE DE DÉPÔTS D'AUNP. 123
TABLEAU 7: COMPARAISON DES DEUX TYPES DE DISPOSITIFS NANOSTRUCTURÉS : FILTRE SERINGUE ET CENTRIFUGEABLE. 136
TABLEAU 8: PARAMÈTRES DE VALIDATION DE LA COURBE STANDARD POUR DU GSH DANS UN TAMPON PHOSPHATE/HCL- 0,1 M + EDTA-2MM (N = 10). 152
TABLEAU 9: PARAMÈTRES DE VALIDATION DES COURBES STANDARD POUR DU GSH DANS UN TAMPON PHOSPHATE HCL-0,1 M, EDTA-2 MM (N=10) 153
TABLEAU 10: DÉTERMINATION DES POURCENTAGES D'EXTRACTION POUR NAC, GSH ET NAC + GSH EN MILIEU HBSS APRÈS 4H D'INCUBATION DANS LE DISPOSITIF TRANSWELL® ET FILTRATION À TRAVERS LA MEMBRANE NANOSTRUCTURÉE. 155
TABLEAU 11: QUANTIFICATION DES THIOLS INTRACELLULAIRES À TRAVERS LE DISPOSITIF NANOSTUCTURÉ (N = 3). 181
TABLEAU 12: DEMI-VIE ET LOG P DE NACNO ET GSNO EN CONDITIONS BIOLOGIQUES. 183

LISTE DES ABREVIATIONS

2FFT	2-furfurylthiol
3MH	3-mercaptohexanol
3MHA	3-mercaptohexyl acétate
4MMP	4-mercapto-4-methyl-2-pentanone
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
AFM	Microscopie à Force Atomique
AgNP	Nanoparticules d'argent
AlbNO	*S*-nitrosoalbumine
AuNP	Nanoparticules d'or
CaCo-2	*Cancer Coli-2*
CMR	Cancérigène, Mutagène et Reprotoxique
COV	Composés Organiques Volatils
CuNP	Nanoparticules de cuivre
Cys	Cystéine
CysNO	*S*-nitrosocystéine
DAN	2,3-diaminonaphthalene
D_C	Diamètre de cœur
DCS	Chimioluminescence de soufre
D_h	Diamètre hydrodynamique
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DTNB	5,5-dithio-bis-(acide 2-nitrobenzoïque)
DTT	Dithiothréitol
ECZ	Électrophorèse capillaire de zone
eNOS	Nitric oxide synthase de l'endothélium
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
GC	Chromatographie Gaseuze
GCL	γ-glutamyl-cystéine ligase
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse
GGT	Gamma-glutamyltranspeptidase
GR	Glutathion réductase
GS	Glutathion synthétase
GSH	Glutathion
GSNO	*S*-nitrosoglutathion
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion *S*-transferase
HCys	Homocystéine
HPLC	Chromatography Liquide Hautes Performances
iNOS	Nitric oxide synthase inductible
K_D	Constante de dissociation à l'équilibre
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
MALDI	*Matrix Assisted Laser desorption/Ionisation*
MB	Méthylbutéthiol

Mrp	*Multidrug resistance-associated proteins*
MS	Spectrométrie de masse
NAC	*N*-acétylcystéine
NACNO	*S*-nitroso Nacetylcystéine
NAT	2,3-naphthotriazole
NDA	2,3-naphtalène dicarboxaldéhyde
NED	N-(1-Naphtyl)éthylènediamine
NEM	N-ethylmaleimide
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Nitric oxide synthase
NP	Nanoparticules
PAH	Poly (hydrochlorure d'allylamine)
PBS	*Phosphate Buffer Solution*
PDI	Protéine disulfure isomérase
PDMS	Polyiméthylsiloxane
PEI	Poly(éthylène imine)
pHMB	p-hydroxymercuribenzoate sodium
PSH	Protéine porteuse groupement thiol
PSNO	*S*-nitrosoprotéine
QCM	Microbalance à Cristal de Quartz
$RS^{\bullet}$	Radical Thiyl
RSH	Thiol réduit
RSNO	*S*-Nitrosothiol
RSSR	Thiol oxydé
SALDI	*Surface Assisted Laser desorption/Ionisation*
SERS	Diffusion Raman Exaltée par Surface
SO	Monoxyde de soufre
SPE	*Solid Phase Extraction*
SPME	Micro Extraction en Phase Solide
SPR	Résonance Plasmonique de Surface
TEER	Résistance électrique transépithéliale
TNB_2^-	2-nitro-5-thiobenzoate

INTRODUCTION

Dans le domaine de la santé, de l'environnement ou encore de l'agro-alimentaire, les thiols occupent une place importante de par leurs différentes fonctions liées au groupement sulfhydrile qui les composent. Ainsi, d'un point de vue physiologique, les thiols permettent un maintien de l'homéostasie redox et participent également à certaines fonctions biologiques. Dans le domaine agro-alimentaire, ces thiols sont responsables du goût et de l'odeur de nombreuses denrées alimentaires mais aussi de leur stabilité.

L'importance de ces composés, de plus en plus décrits dans la littérature, a accru leur étude et notamment leur quantification. De nombreuses méthodes ont ainsi été développées, afin de caractériser les thiols présents et leur concentration. Les stratégies sont variées, allant de méthodes non séparatives, spectrophotométrie UV-Vis et de fluorescence, à des méthodes séparatives et plus complexes comme de la chromatographie liquide ou gazeuse couplées ou non à de la spectrométrie de masse (MS). De manière plus anecdotique, on retrouve également des méthodes par électrophorèse capillaire de zone (ECZ) ou des techniques de pré extraction par Micro Extraction en Phase Solide (SPME). Ces méthodes ont montré un réel intérêt, particulièrement dans le domaine de la santé pour mieux comprendre les mécanismes régis par les thiols mais souffrent tout de même de certaines lacunes. En effet, ces molécules sont très réactives de par leur groupement thiol et donc peu stable, mais elles sont également présentes en faibles quantités pouvant aller jusqu'au ng/L dans certaines matrices. De plus, la plupart des méthodes développées étant basées sur une réaction de dérivation par couplage avec une molécule permettant la détection, la sélectivité entre les différents thiols est un vrai challenge. Des solutions ont été envisagées et notamment par le biais de l'utilisation de nanoparticules utilisées soit pour l'extraction des thiols et associées aux précédentes méthodes ou soit comme méthode analytique par modifications des propriétés physico-chimiques des nanoparticules (modification de la bande plasmon ou quenching). Ces méthodes, de plus en plus utilisées offrant de nouvelles propriétés liées à l'échelle nanométrique, montrent des résultats encourageants d'un point de vue sélectivité et sensibilité. Cependant, les problèmes liés à la stabilité de ces nanoparticules sous forme colloïdale limitent leur utilisation et obligent la mise en place de certains pré-traitements. La quantification des différents thiols dans leurs environnements demeure donc un challenge important du fait de l'intérêt majeur de ces molécules.

Dans ce travail, nous nous focalisons sur les nanoparticules d'or (AuNP), lesquelles présentent une forte affinité pour le groupement thiol, largement décrite dans la littérature. Le but de ce travail consiste à exploiter l'avidité existante entre thiol et AuNP afin de développer un dispositif nanostructuré permettant de s'affranchir des contraintes environnementales des nanoparticules et ainsi prolonger leur stabilité. Ce dispositif ainsi crée devra être capable de capturer les thiols de manière spécifique, à la manière d'une extraction, avant une analyse par méthode chromatographique.

Ce manuscrit est organisé en quatre chapitres. Le premier présente un état de l'art décrivant le rôle et l'intérêt des principaux thiols dans différents domaines. Une revue de la littérature est proposée, portant sur les différentes méthodes utilisant des nanomatériaux afin de quantifier ces thiols et leur valeur ajoutée en comparaison des méthodes traditionnelles existantes. Ces différents aspects font l'objet d'une revue générale publiée dans le journal Micro Chemical Journal (article 1).

Le second chapitre est consacré au développement du dispositif nanostructuré par des AuNP et l'évaluation de ses performances dans deux différentes matrices à travers deux thiols modèles : le glutathion (GSH) et la *N*-acétylcystéine (NAC) et leurs équivalents nitrosés. Le dispositif sélectionné est un filtre seringue composé d'une membrane en cellulose régénérée qui sera nanostructuré par adaptation d'une méthode dites de dip-coating. Dans un premier temps, le dispositif a été développé, optimisé et caractérisé à travers différentes techniques de spectroscopie. Dans un second temps, afin d'évaluer les capacités du dispositif vis-à-vis des thiols et évaluer ses performances, une méthode de Chromatography Liquide Hautes Performances (HPLC) a été développée et validée selon la norme ICH Q2-R1. Les capacités d'adsorption et de désorption de la membrane dans une matrice simple, solution tamponnée et complexe, plasma de rat, ont été évaluées. Dans cette partie, le dispositif a montré sa capacité à quantifier le GSH endogène dans le plasma sans effet matrice. Ces travaux ont été publiés en 2022 dans Journal Of Chromatography B (article 2, Berthou M. *et al.*, J. Chrom. B., 2022 (1198), 123244).

Le troisième chapitre est consacré à l'application du dispositif nanostructuré pour la capture de thiols volatils contenus dans des matrices agro-alimentaire. Cette partie, en collaboration avec une start-up basée à Strasbourg, TWISTAROMA, a permis l'extraction des différents thiols de boissons alcoolisées (vin, bière…). Pour cela, la méthode séparative associée à l'extraction par le dispositif a évoluée vers une

méthode adaptée au caractère volatil des thiols : chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) présentant un détecteur spécifique du soufre. Les résultats ont montré l'efficacité du dispositif pour l'extraction de thiols dans ces matrices avec des différences d'affinités en fonction de la molécule et influant sur l'efficacité de relargage.

Le quatrième chapitre concerne l'utilisation de la membrane dans le contexte des thiols, liés ou non au monoxyde d'azote, donnés par voie orale pour la supplémentation dans le cas de certaines pathologies, notamment cardiovasculaires. Ainsi, le dispositif a été utilisé avec un modèle de barrière intestinale pour étudier la perméation de ces molécules à travers la membrane cellulaire. Ces travaux ont permis de situer notre dispositif et démontrer son apport vis-à-vis des méthodes classiquement utilisées pour la quantification de thiols dans des matrices biologiques. Ces résultats font partie d'une publication en finalisation qui sera prochainement soumise dans le Journal of Pharmaceutical Analysis (article 3).

Ce mémoire se termine par une discussion et une conclusion générale résumant les faits marquants des travaux réalisés. Les points clés de ce travail peuvent être résumés de la manière suivante : développement d'une membrane nanostructurée permettant la capture directe et sélective de thiols dans diverses matrices de par un dispositif simple d'utilisation, rapide et facilement adaptable. Enfin, nous développerons les principales perspectives à court et long termes ainsi que les verrous qu'il faudra lever pour aller vers une industrialisation du dispositif.

CHAPITRE 1

1. LES THIOLS

Le terme « thiol » se réfère aux composés porteurs d'un groupement fonctionnel sulfhydryle -SH. On les retrouve également sous la dénomination de mercaptans [1]. Le thiol est l'analogue soufré des alcools puisque le soufre remplace l'oxygène. Ces composés ont pour caractéristique principale d'être fortement odorants à très faibles concentrations [2]. En effet, on associe aux thiols notamment l'odeur d'œuf pourri, d'ail, de moufettes [3] ou encore du gaz de ville afin que celui-ci (inodore sous forme naturelle) soit détectable à l'odorat. Cependant, tous les thiols ne sont pas associés à une odeur désagréable. Dans le domaine agroalimentaire, les thiols, souvent appelés « thiols volatils » sont responsables de l'odeur caractéristique de certaines denrées alimentaires. Ainsi, le café doit son odeur, notamment, au 2-Furfurylthiol et le pamplemousse au 3-mercaptohexan-1-ol.

Les thiols (Figure 1) peuvent être dissociés en 2 grandes familles :

- Ceux composés de l'assemblage d'acides aminés que l'on peut classifier en fonction de leur poids moléculaire.
- Les thiols dit volatils parmi lesquels on peut distinguer deux groupes en fonction de leur domaine industriel d'utilisation.

Ces deux catégories seront traitées de manière séparée dans les prochains paragraphes puisque leur rôle, leur intérêt, les méthodes de quantifications et les enjeux associés diffèrent.

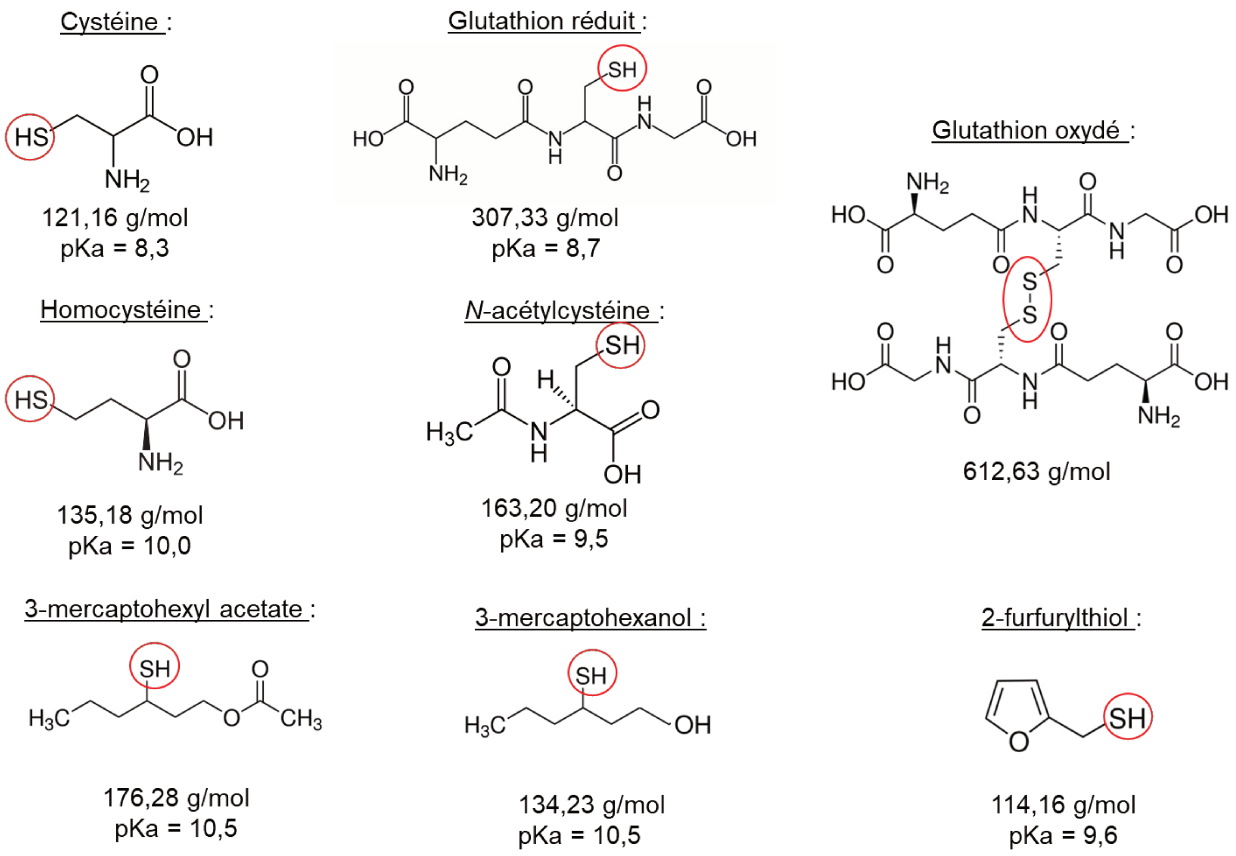


FIGURE 1: STRUCTURES MOLECULAIRES DES DIFFERENTS THIOLS DECRITS ET UTILISES DANS CE MANUSCRIT.

1.1. THIOLS EN SANTE : ROLES BIOLOGIQUES

Les thiols peuvent être présents comme groupements fonctionnels pour des macromolécules telles que les protéines, on parle alors de « thiols à haut poids moléculaire ». La protéine la plus connue portant un groupement thiol est l'albumine. Mais, les thiols peuvent aussi exister sous forme de petits peptides, non liés à des macromolécules. On citera alors, entre autres, le GSH, la cystéine (Cys), l'homocystéine (HCys)…

D'un point de vue biologique, les thiols sont omniprésents [4] et ont des rôles essentiels notamment au niveau cellulaire comme celui de lutter contre le stress oxydant [5] ou de détoxifiant [6]. Parmi les acides aminés "naturels", seules la méthionine et la Cys contiennent du soufre. La Cys est la seule à posséder un groupement thiol. Ainsi,

toutes les fonctions sulfhydryles trouvées sur les protéines, les peptides et enzymes sont portés par des Cyss. Cela leur confère notamment des propriétés structurales et une grande réactivité.

1.1.1.1. HAUT POIDS MOLECULAIRE (HMW)

Les protéines thiolées (PSH) sont celles possédant une fonction thiol (oxydée ou réduite), apportée par une Cys. Parmi les plus courantes chez les mammifères on citera l'albumine. Ces PSH peuvent être oxydées par deux mécanismes : la *S*-thiolation et la *S*-nitrosylation (Figure 2) [7]. Ces changements s'opèrent suite à un stress oxydatif et sont réversibles. La *S*-thiolation engendre la réduction de la protéine avec un GSH pour lutter contre une espèce radicalaire [8]. La *S*-nitrosylation correspond quant à elle à la réaction entre une PSH et un *S*-Nitrosothiol, c'est-à-dire un thiol liant un monoxyde d'azote (NO) par son soufre. Cette réaction engendre une *S*-nitrosoprotéine (P-SNO) et un thiol réduit.

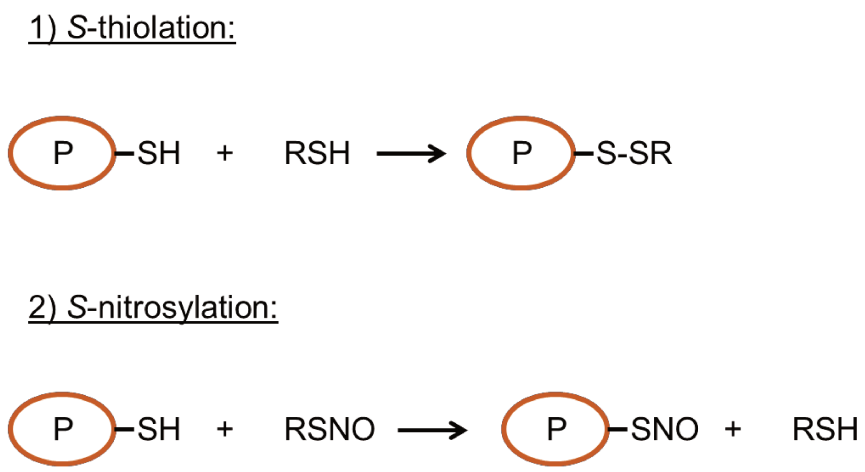


FIGURE 2: MECANISMES REACTIONNELS DE S-THIOLATION (1) ET S-NITROSYLATION (2) APPLIQUES AUX PROTEINES.

Parmi les protéines qui subissent ces modifications au niveau du groupement thiol, on retrouve entre autres : l'actine [9], la créatine kinase [10] ou encore l'hémoglobine [11]. Ces modifications sont réversibles et sont une réponse adaptative au stress oxydant [12]. Des études suggèrent que ces transformations peuvent avoir une importance autant comme mécanisme de protection que de signalisation [13].

1.1.1.2. BAS POIDS MOLECULAIRE (LMW)

Parmi les thiols de bas poids moléculaire, le plus largement étudié et décrit est le GSH. Ce thiol est un tripeptide (composé d'une Cys, d'une glycine et d'un glutamate) que l'on peut retrouver sous forme réduite GSH (environ 85 % [14]) mais également oxydée (GSSG). Le GSH est présent chez presque tous les eucaryotes [4] et parfois chez certains procaryotes de type bactéries aérobiques (*E. coli, Ochrobac-trum anthropi, Burkholderia xenovorans…*) [15].

La synthèse du GSH s'opère en deux étapes, toutes deux ATP-dépendantes (Figure 3). La première étape a lieu dans le cytosol chez les êtres vivants et permet la condensation d'un glutamate et d'une Cys grâce à la γ-glutamyl-cystéine ligase (GCL). La seconde étape consiste à condenser une glycine à la molécule précédemment obtenue par le biais de la glutathion synthétase (GS). Après synthèse, le GSH peut traverser les membranes vers d'autres compartiments cellulaires. Une partie du GSH cellulaire provient de la réduction de sa forme oxydée par la glutathion réductase (GR) cependant parfois, cette réserve de GSSG ne suffit pas, lors d'un stress oxydatif trop important, par exemple. Dans ce cas, il faut donc que l'organisme en synthétise de nouveau comme décrit auparavant [16].

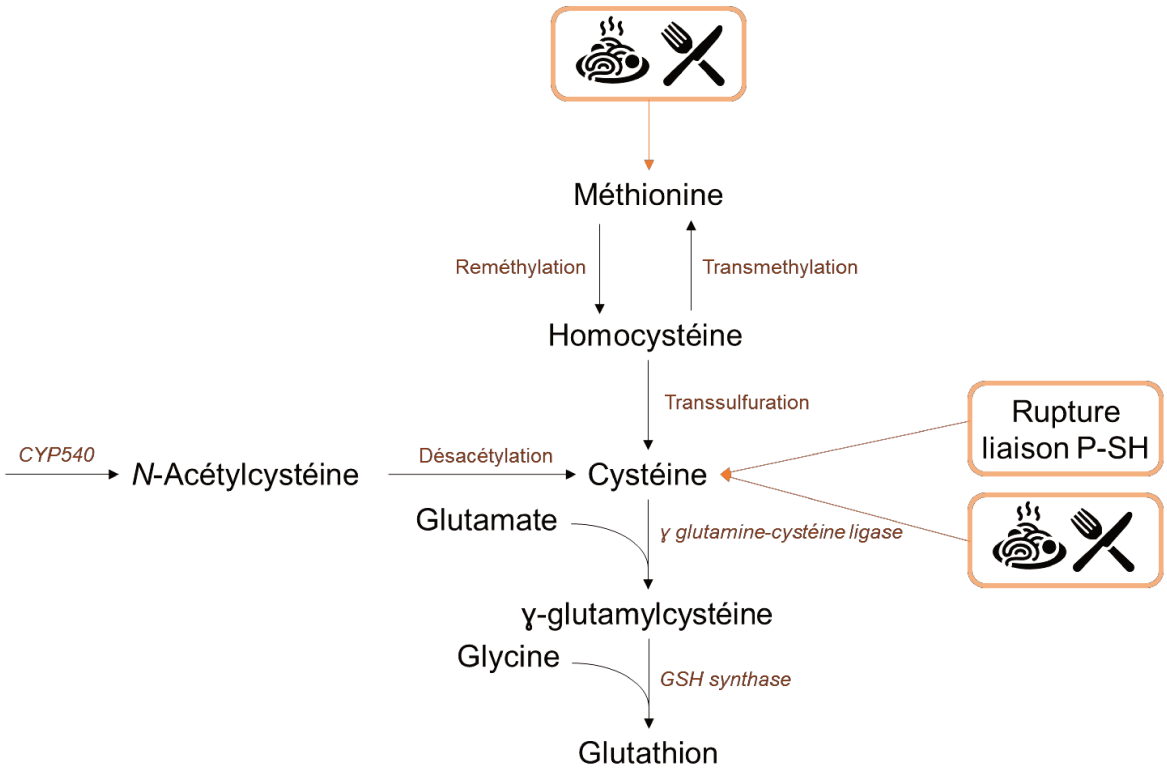


FIGURE 3: VOIES DE SYNTHESE DES DIFFERENTS THIOLS DE BAS POIDS MOLECULAIRE DANS L'ORGANISME.

Le principal rôle du GSH est lié à la capacité de son groupement thiol de céder un électron, ce qui lui confère un excellent pouvoir réducteur. Ainsi, le GSH est impliqué dans de nombreuses réactions d'oxydoréduction illustrées en Figure 4 [17]. Il participe notamment à l'homéostasie redox en réagissant avec les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites lors de la respiration cellulaire. Il agit par exemple comme substrat pour la glutathion peroxydase afin de réduire le peroxyde d'hydrogène ou les hydro peroxydes lipidiques [18]. GSH entre également en jeu dans le métabolisme de certains xénobiotiques ou molécules physiologiques pour détoxifier l'organisme par conjugaison directe ou à travers l'action de la glutathion *S*-transferase (GST) notamment pour les excréter [19,20]. Cette détoxification a lieu essentiellement au niveau des reins et du foie. Enfin, le rôle antioxydant du GSH s'exerce aussi par réaction avec les radicaux libres de l'organisme, aboutissant à la formation de GSSG [21]. Un autre rôle du GSH est le maintien du statut thiol des protéines. En effet, le GSH sert de source en Cys pendant la synthèse des protéines, aboutissant ainsi à la formation d'une protéine thiolée et de

GSSG. De plus, il possède une action antioxydante ou réduit les ponts disulfures des protéines [22]. Cette réaction est réversible mais la concentration physiologique de GSSG cellulaire étant très basse (quelques micromolaires [23]), la formation de protéines avec des ponts disulfures est limitée. Enfin, le GSH joue un rôle de régulateur cellulaire en modulant la différenciation et la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore la neurotransmission [24–26].

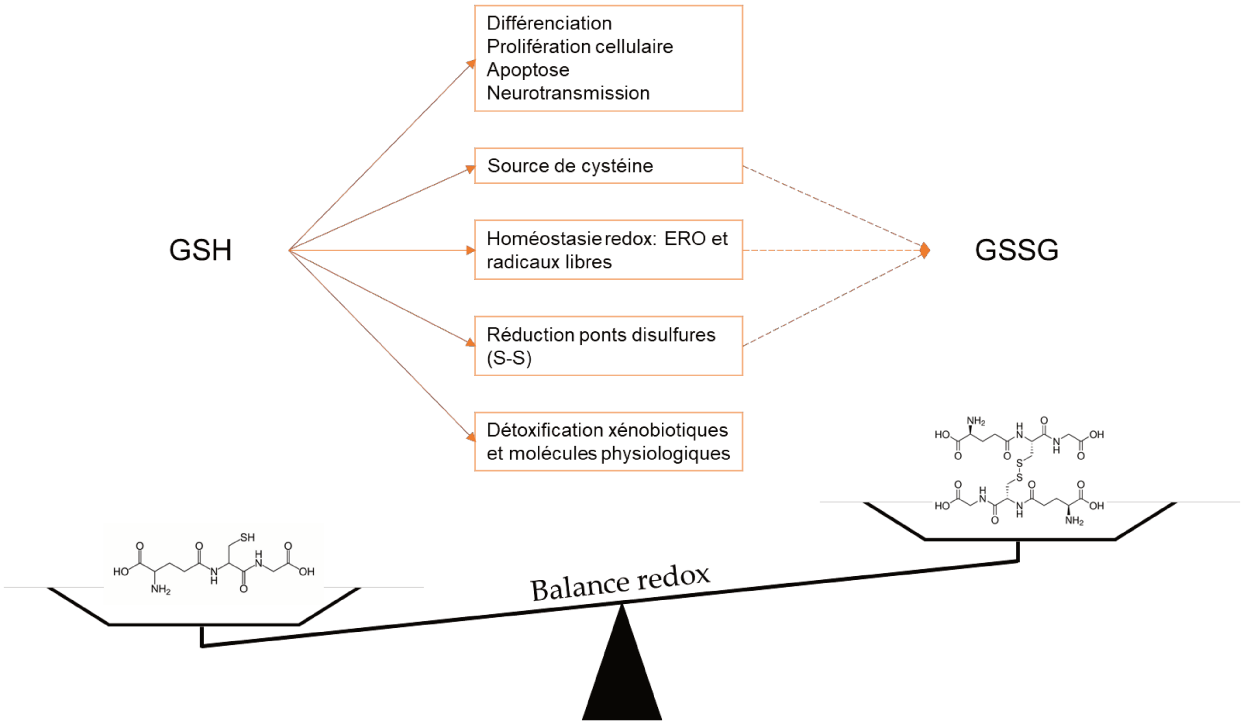


FIGURE 4: SCHEMA RECAPITULATIF DES DIFFERENTES FONCTIONS DU GSH PHYSIOLOGIQUE.

Le GSH est présent dans les cellules, dans le sang total à des concentrations de l'ordre du millimolaire et dans le plasma à hauteur de quelques micromolaires [27]. Ce stock de GSH peut être influencé par de nombreux facteurs comme vu précédemment. La présence de métaux lourds [28], l'exposition à des ERO [29], des xénobiotiques, des espèces radicalaires ou des molécules susceptibles de générer des radicaux [30], va diminuer la quantité de GSH au profit de GSSG [31]. De plus, la consommation de GSH par la GST influe également sur la quantité de GSH disponible dans la cellule. Ainsi, pour restaurer le GSH, il existe deux voies principales, la réduction du GSSG sous l'effet de la GR, et avec consommation de NADPH, ou la synthèse de « nouveau » GSH selon la voie

de synthèse décrite auparavant. Cette capacité de synthèse est largement dépendante du niveau de Cys et de l'activité de la GCL [32]. Enfin, d'autres facteurs physiologiques peuvent atteindre à la quantité de GSH [33], principalement par le biais d'une diminution de l'activité de la GCL. Avec l'âge, la concentration en GSH diminue significativement du fait de la diminution de l'expression de la GCL et de la GS [34]. Certaines pathologies sont également associées à cette diminution d'expression génique : Alzheimer, les troubles bipolaires, la maladie de Huntington, la sclérose en plaques, l'autisme, Parkinson ou encore la schizophrénie par exemple [27,35–37]).

Par ses différents rôles, la connaissance du taux de GSH et de GSSG chez un individu est un indicateur plus qu'intéressant quant à son état de santé ou comme biomarqueur pour certaines maladies [38]. En effet, le ratio GSH/GSSG permet de rendre compte de certaines maladies [39] ou d'un état de stress oxydatif au niveau cellulaire [23]. Dans les deux cas, on observe généralement une diminution de ce ratio du fait de la diminution de la quantité en GSH. En condition normale, le ratio molaire GSH/GSSG est de 100/1 tandis qu'il a été démontré à l'aide de modèles de stress oxydatif que ce ratio chuté à 10/1 voire à 1/1 dans certains cas sévères [40].

L'acide aminé à l'origine des fonctions thiols de toutes les molécules endogènes est la Cys. Celle-ci est apportée à l'organisme principalement par l'alimentation (produits laitiers, fruits de mer, œuf, viande, soja…) mais également par rupture de liaison de certaines protéines et enfin elle est formée à partir de la méthionine via réaction de transsulfuration (correspondant à une conversion de l'HCys en Cys par réduction de la cystathionine) (figure 3) [41]. D'un point de vue physiologique, en plus d'être la première source de thiol de l'organisme, la Cys intervient dans la synthèse de GSH, de la coenzyme A et entre dans la biosynthèse des lipides et des ions sulfures [42]. La Cys joue donc un rôle important dans la constitution des muscles squelettiques [43], de la kératine [44].

L'HCys est formée par transméthylation de la méthionine durant son processus de conversion (figure 3) [45]. Ce peptide sert de précurseur pour la Cys en présence de vitamine B6 [46]. 50% de l'Hcys de l'organisme est dédié à cette production. Son autre rôle consiste à servir de substrat pour la production de méthionine par reméthylation. Les

pathologies associées à une hyperhomocyteinémie sont des dysfonctionnements rénaux, des maladies cardiovasculaires [47] ou encore des problèmes neurologiques [48].

Enfin, la NAC est produite par l'organisme au niveau du foie par l'enzyme cytochrome P450 (figure 3). Elle est également apportée de manière exogène par le biais de complément alimentaire aux propriétés antioxydantes, car elle n'est présente au sein d'aucun aliment. La NAC est ainsi reconnue et approuvée comme médicament par la FDA et l'Organisation mondiale de la Santé comme substance mucolytique. Elle agit comme précurseur de la Cys qui elle-même permet de produire du GSH. Elle a par ailleurs un rôle détoxifiant en réagissant avec des espèces oxydantes [49]. Elle est prescrite notamment en complément pour des maladies telles que l'asthme [50], Alzheimer [51], les bronchites chroniques [52] … La NAC est également utilisée pour traiter les intoxications au paracétamol. Ses effets sont directement liés à un dérèglement au niveau du métabolisme de la Cys et du GSH cités précédemment.

1.2. PROBLEMATIQUE DES THIOLS DONNEURS DE NO

Les molécules thiolées ont également la capacité de se lier au NO par réaction de nitrosation afin de former des *S*-nitrosothiols (RSNO). Cette forme joue le rôle de transporteur du NO.

Le NO est un gazo-transmetteur radicalaire très réactif (temps de demi-vie d'environ quelques secondes) [53]. Il est produit en continu au niveau des cellules endothéliales par une enzyme, la nitric oxide synthase (NOS) à partir de la L-arginine. Cette enzyme est active de façon constitutive mais peut être stimulée par différents agonistes comme la thrombine [54], l'adénosine 5'-diphosphate (ADP) [55] ou les quinines [56]. Néanmoins, le principal stimulus de la production basale de NO semble être la contrainte de cisaillement exercée par le flux sanguin [57–59].

NO est essentiel au maintien de l'homéostasie redox vasculaire, par exemple, il intervient dans le maintien du tonus basal en relaxant les cellules musculaires lisses vasculaires [60]. Il possède des propriétés anti-athérogéniques : il inhibe l'adhésion,

l'activation, la sécrétion du contenu des granules et l'agrégation des plaquettes et facilite leur désagrégation [61]. NO prévient aussi le chimiotactisme des monocytes [62], inhibe l'adhésion des leucocytes à l'endothélium [63] ainsi que la migration [64] et la prolifération [65] des cellules musculaires lisses. À concentration physiologique (de l'ordre du nanomolaire), NO présente également des propriétés anti-inflammatoires, notamment en diminuant la perméabilité vasculaire [66], en inhibant la dégranulation des neutrophiles [67] et des mastocytes [68], ou encore en inhibant la production de cytokines immunomodulatrices (interleukines IL-12 et IL-1) par les macrophages [69].

Le transport au sein de l'organisme de ce radical se fait donc par le biais de molécules soufrées (GSH, protéines contenant une Cys…). Les RSNO sont classées dans la catégorie des donneurs de NO, au même titre que les dérivés nitrés et les complexes inorganiques métal-NO. Parmi les plus connus, on peut citer la *S*-nitrosoalbumine (AlbNO) ou le *S*-nitrosoglutathion (GSNO). Ces molécules permettent de prolonger la demi-vie du NO au sein de l'organisme (5,5 h pour AlbNO et entre 45 min et 1 h pour GSNO) et constituent un réservoir de NO [70]. Pour tout cela, les RSNO représentent un choix judicieux pour le développement de thérapie visant à supplémenter un déficit en NO. Cependant, de nombreux travaux menés au sein du laboratoire ont montré que les caractéristiques physico-chimiques de la partie thiolée (RSH) du RSNO (stabilité, lipophilie, métabolisme enzymatique) influent sur le devenir du RSNO et donc du NO [71]. Il existe ainsi un lien direct entre la structure du RSH et le devenir du RSNO [72]. La pharmacocinétique de ces RSNO est complexe du fait des diverses réactions et échanges pouvant avoir lieu (dénitrosation, transnitrosation…) comme le démontre schématiquement la Figure 5. Ces mécanismes sont encore méconnus et avec eux le devenir des RSNO dans l'organisme. Une meilleure connaissance de ces mécanismes permettrait de développer le ou les candidats médicament adaptés à une supplémentation efficace en NO.

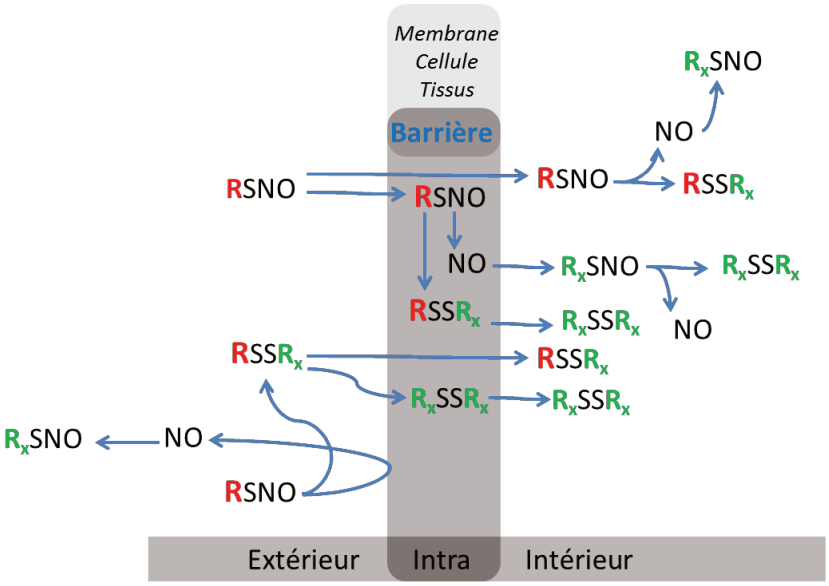


FIGURE 5: SCHEMA SIMPLIFIE DU DEVENIR DE RS ET DE NO ISSU D'UN DONNEUR DE NO ADMINISTRE (RSNO) FACE A UNE BARRIERE PHYSIOLOGIQUE AVEC RX DES THIOLS (FAIBLE OU HAUT POID MOLECULAIRE) POTENTIELLEMENT IMPLIQUES.

Pour mieux appréhender la pharmacocinétique des RSNO il faudrait être en mesure de quantifier chaque espèce dans chaque compartiment. Cela passe par la mesure de la quantité en NO et ses dérivés, en RSNO et aux RSH associés. Or, il n'existe pas encore de méthode unique, simple et applicable à tout type de matrice, notamment pour les RSH, qui permettrait d'avoir une vision globale des espèces présentes.

1.3. THIOLS VOLATILS

Parmi les thiols volatils, il en est un qui présente un rôle tant au niveau biologique qu'environnemental et industriel. En effet, bien qu'il soit considéré comme toxique et malodorant d'un point de vue environnemental, le sulfure d'hydrogène (H_2S) est un gazotransmetteur agissant au niveau physiologique comme anti-inflammatoire, antioxydant et agent neuroprotecteur [73,74]. C'est pourquoi il a été montré qu'un défaut au niveau du métabolisme de H_2S était impliqué dans diverses pathologies cardiovasculaires, neurologiques ou inflammatoire [75,76]. La principale voie de synthèse

de ce gaz utilise la Cys [77,78]. Au niveau environnemental, H_2S est retrouvé dans de nombreux procédés industriels, en agriculture ou encore pour le traitement des eaux usées. Les principales conséquences de l'exposition à ce gaz sont une odeur déplaisante, une atteinte oculaire [79] et pulmonaire [80] pouvant aller jusqu'au décès [81].

Lorsque l'on emploie le terme « thiol volatil » cela réfère le plus souvent aux thiols aux rôles organoleptiques. Ils sont responsables du goût et de l'odeur de multiples denrées alimentaires. Ces molécules ont un effet à très faible concentration (de l'ordre du ng/L). À concentration optimale, elles sont notamment responsables des arômes fruits de la passion, pamplemousse, groseille, cassis, café grillé ou encore du buis. Cependant, à plus forte concentration, elles peuvent impacter de manière négative la denrée alimentaire. Dans le cas des boissons telles que la bière, le vin ou le champagne, une attention particulière est donnée à ces thiols puisque qu'ils influencent, non seulement les arômes mais aussi le maintien de la stabilité de la boisson de par la réactivité du groupement thiol. C'est pourquoi des études sont menées afin de contrôler ou prédire la concentration en thiol et les différentes espèces présentes dans le but de pouvoir influer sur le goût. Parmi les thiols les plus connus, on retrouve le 3-mercaptohexanol (3MH), le 2-furfurylthiol (2FFT), le 3-mercaptohexyl acétate (3MHA) et le 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone (4MMP) responsable de l'arôme pamplemousse, café grillé, fruit de la passion et buis respectivement [82,83].

Outre leur rôle organoleptique, les thiols volatils ont une autre fonction : la stabilité, liée à leur activité antioxydante. Il a été démontré que de faibles concentrations de thiols peuvent réagir avec les ERO pour éviter l'oxydation et donc la détérioration de la boisson [84–86]. D'autre part, des concentrations plus élevées de thiols conduisent à la génération d'espèces aldéhydiques avec un impact négatif sur la saveur de la boisson [87]. L'équilibre doit être maintenu pour garantir la qualité du produit, car la concentration variétale en thiols est un aspect critique qui dépend de plusieurs facteurs :

- Types de raisins : le niveau de précurseur de thiol spécifique dépend du type de raisin. En effet, une quantité plus élevée de précurseurs conduit à une quantité de thiols variétaux beaucoup plus importante ou à une meilleure conservation des arômes lors du vieillissement du vin [88]. Le type de raisin apparaît comme un

premier facteur influençant la quantité de précurseurs. Les raisins ne présentent pas d'arômes intenses mais agissent comme des sources d'arômes potentiels ou latents [89].

- Opérations pré fermentaires : le temps de vendange influence la concentration variétale en thiols. Kobayashi [90] a montré que le niveau maximal de précurseurs de thiol est atteint 16 semaines après la floraison. Ils ont également démontré que la hauteur et la composition du sol jouent un rôle dans la quantité de précurseurs. En effet, Dufourcq *et al.* ont prouvé que les sols argilo-calcaires favorisent une meilleure teneur en aromatiques que les sols sablo-argileux acides [91]. De plus, il a été démontré qu'un déficit hydrique modéré et une température élevée augmentent la quantité de Cys-3MH dans les fruits [92]. Enfin, le type de traitement des raisins influence l'extraction des précurseurs. Les précurseurs cystéinylés et glutathionylés sont principalement localisés dans la peau du raisin et la récolte mécanique conduit à une concentration plus élevée de précurseurs en raison de la limitation des dommages aux baies [93].
- Paramètres de la fermentation alcoolique : Des Gachons et ses équipes [94] ont démontré que seules quelques quantités de thiol variétal sont libérées pendant la fermentation (1,4% pour la 4MMP, 3,0% pour et 4,2% pour la 3MH sont libérés de leur précurseur). Cette quantité dépend de la souche de levure et de la température. L'augmentation de la température de fermentation jusqu'à 20 °C au lieu de 13 °C entraîne une plus grande quantité de thiols variétaux [95]. De plus, Anfang et ses collègues ont démontré que la cofermentation avec une autre souche de levure (*S. bayanus* ou *Pichia kluyveri* par exemple) génère plus de thiols [96].

L'importance de ces thiols tant au niveau aromatique qu'antioxydant en font des marqueurs organoleptiques important pour prédire l'impact sur les consommateurs.

2. ARTICLE 1: NANOSCALE CONTRIBUTION TO THIOL SENSING

Il a été montré, par leurs nombreuses fonctions, l'importance des thiols tant au niveau biologique qu'au niveau alimentaire. En effet, une concentration trop élevée ou au contraire trop faible peut avoir des effets néfastes voire délétères pour l'organisme ou pour la denrée alimentaire considérée. Pour être au fait de ces variations de concentration, il faut pouvoir quantifier chaque espèce thiolée avec précision et spécificité vis-à-vis des autres espèces (notamment des autres thiols).

De ce fait, de multiples méthodes ont été développées afin d'identifier et de quantifier les thiols dans les différentes matrices dans lesquelles ils sont retrouvés. Parmi ces méthodes, il existe des méthodes spectroscopiques (spectrophotométrie, UV-vis ou de fluorescence…) et séparatives comme la chromatographie, l'électrophorèse… Ces nombreuses méthodes présentent cependant certaines lacunes liées directement aux propriétés des thiols eux-mêmes. En effet, la grande réactivité des thiols, leur faible concentration ainsi que la complexité de leur matrice d'origine obligent à adapter les méthodes. Ainsi, des étapes de prétraitement sont mises en place pour extraire les thiols de leur matrice mais cela rallonge la méthode et influe sur la concentration en thiol. De plus, la spécificité vis-à-vis d'un thiol parmi les autres n'est généralement pas atteinte. Enfin, les limites de quantification (LOQ) atteinte sont parfois supérieures aux concentrations de thiol dans les différentes matrices et particulièrement dans l'alimentaire.

L'article suivant, publié dans Micro Chemical Journal, propose une revue de la littérature des méthodes analytiques, intégrant des nanomatériaux, pour l'identification et la quantification de thiols. Le but est de mettre en évidence l'intérêt croissant de développer ces nanomatériaux afin de répondre aux lacunes des différentes méthodes classiquement utilisées. En effet, ces méthodes permettent d'atteindre la sensibilité, sélectivité et spécificité qui fait défaut dans certaines méthodes usuelles sans nanomatériaux. Cette revue s'intéresse ainsi à l'intérêt de ces thiols, aux inconvénients des méthodes actuelles et enfin à l'apport des nanoparticules pour pallier ces problèmes.

Microchemical Journal 183 (2022) 107994

Contents lists available at ScienceDirect

Microchemical Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/microc

Review Article

Thiol sensing: From current methods to nanoscale contribution

Margaux Berthou [a], Igor Clarot [a,b], Jeremie Gouyon [a], Damien Steyer [c], Marie Anais Monat [c,d], Ariane Boudier [a,b], Arnaud Pallotta [a,b,*]

[a] Université de Lorraine, CITHEFOR, F-54000 Nancy, France
[b] Nanocontrol, F-54000 Nancy, France
[c] TWISTAROMA, 300, Bd Sébastien Brant CS 10413, F-67412 Illkirch, France
[d] Inserm U1258 – CNRS UMR7104 – IGBMC – Université Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Nanomaterial
Thiol
Sensing
Analytical methods

ABSTRACT

Thiols play critical roles in many biologicals processes: they are involved in combating oxidative stress and maintaining redox homeostasis. In agri-food, they are responsible for organoleptic aspect of many foodstuffs. Thus, thiol identification and quantification are challenging due to their similar chemical structures (especially for small/volatile thiols), reactivity and matrices of these compounds. To overcome the analytical issues, many methods and technics were developed each with their own advantages and drawbacks. Lately, one emerging field in analytical development goes through the contribution of nanoparticles. Scientific teams rely on their unique properties to improve sensitivity, selectivity and decrease matrices effects. This review is an overview of current methods for thiol detection followed by the report of nanomaterial contribution to the field. Finally, a critical point of view will be given to these new sensing methods, from their potential to their limits.

1. Thiol key roles in biology and food

A thiol is a compound presenting a sulfhydryl group (SH). Thiols play a key-role in biology and also in food matrices because of their characteristic odors/taste (pleasant or unpleasant) [1,2]. In biological matrices, thiols can be divided into two different groups: low and high molecular weight thiols. The first group comprises low molecular weight thiols, one can find glutathione (GSH) and its oxidized form GSSG, cysteine (Cys) or homocysteine (Hcys) [3]. The second group comprises thiolated proteins such as albumin or hemoglobin [4]. In agri-food, low molecular weight and volatile thiols are very strong-smelling molecules that can impact the aroma of numerous foods, such as fruits, grilled meat and alcoholic [5] or non-alcoholic beverages [6]. It should also be mentioned that the simplest thiol, hydrogen sulfide (H_2S), is colorless, toxic and malodorous (rotten eggs). Characteristics and signaling of H_2S have already been discussed in many reviews dealing with this subject [7–10]. This manuscript will exclusively be focused on the other low molecular thiols.

1.1. Thiols as biomarkers

Biological fluids contain many aminothiols such as GSH, Cys and Hcys, that play a pivotal role in biological processes. GSH, a tripeptide thiol presents in most living organism cells, plays a major role as an antioxidant [11]. GSH is involved in regulating pathways, protection against radical damages [12,13], signal transduction [14], cell cycle [15] …. GSH concentrations range from 100 μM to 10 mM and from 0.6 μM to 100.0 μM in blood and plasma respectively [16]. GSH is tightly linked to GSSG and their balance gives information about the cell oxidative stress state [17] among other indications. A lot of studies took interest in investigating GSH/GSSG ratio as it will be further described [18–20]. It has been demonstrated for instance that GSH level variations are considered as a biomarker of neurodegenerative diseases (Parkinson [21], Alzheimer [22], Huntington disease [23] …).

Cys is the primary thiol-containing amino acid, synthesized in the liver from methionine [24]. It is the most abundant low molecular weight thiol in blood plasma with a physiological level comprised between 135 and 300 μM [25]. It contributes to multiple biological functions such as cell growth, lipid biosynthesis [26], skeletal muscles homeostasis [27] or in mitochondria and endoplasmic reticulum [28,29].

Hcys is an intermediate of the metabolic pathway for the conversion of methionine into Cys [30] and is present in blood plasma in a concentration ranging from 5 to 15 μM [31]. An excess of Hcys (>30 μM) is

* Corresponding author at: Université de Lorraine, CITHEFOR, F-54000 Nancy, France.
E-mail address: Arnaud.pallotta@univ-lorraine.fr (A. Pallotta).

https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107994
Received 5 July 2022; Received in revised form 2 September 2022; Accepted 12 September 2022
Available online 22 September 2022
0026-265X/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

considered to be a risk factor for neurodegenerative (dementia [32], Alzheimer [33] …) or cardiovascular diseases [34,35].

One important biological function of both low and high molecular weight thiols is their involvement in nitric oxide (NO) storage and transportation. It is achieved through the formation of *S*-nitrosothiols (RSNO) or *S*-nitrosoproteins (PSNO) [36]. NO is a gasotransmitter involved in many physiological and pathological mechanisms [37]. RSNO allows an increase of NO half-life from few seconds to several hours, depending on the involved thiol [38–40]. Properties of RSH lead to different RSNO permeability and transport mechanisms that can influence its pharmacokinetic [41]. To increase RSNO half-life, nanotechnologies can be used to protect RSNO and control its release [42]. RSNO can be quantified through NO direct (NO probe or through its stable isotope ^{15}N [43]) and indirect (nitrite or nitrate quantification) measurements, or by thiol carrier quantification. However; when S-NO bond is broken, it leads to the formation of radical species ($RS^{\bullet}$ and $NO^{\bullet}$) with poor stability. $RS^{\bullet}$ will quickly form RSSR molecules creating a bias during identification and quantification. As an example, when it comes to GSNO quantification, nanomolar concentrations were reported in blood plasma [44–46].

1.2. Thiols as flavory compounds

In agri-food products, thiols are classified as volatile compounds and also as low molecular weight thiols contributing to aroma profile. The so-called volatile thiols are present in low concentrations in alcoholic (beer, wine…) and in non-alcoholic (coffee, fruit juices…) drinks. Thiols are actually released from their cysteinylated and gluthionylated precursors present in food matrices through alcoholic fermentation by enzymatic action of *Saccharomyces cerevisiae* [47]. When linked to these precursors, thiols are odorless (Fig. 1A) and it is only once released that they can express their full aromatic potential (Fig. 1B). Volatile thiol composition depends on yeast strain, precursor extraction from grape must and alcoholic fermentation period [48,49]. Thiols are therefore considered as key markers in the beverage quality. Their very low perception threshold (ng/L or ppt) greatly influences the taste and flavor of the product [50]. As an example, 3-mercaptohexanol (3MH) is present in wine ($0.3.10^3$ –45.10^3 nM) and fruit juice (15.10^3 –14.10^5 nM) and is responsible for grapefruit flavor. The taste of roasted coffee in the eponymous beverage but also in wine is linked to the presence of 2-furfurylthiol (2 FFT) at concentrations of approximately 250 nM in coffee and ranging from 2 to 482 nM in wine [51–53]. However, higher concentrations of 2 FFT lead to undesirable smell. Additionally, unwanted amine-like taste in beer or coffee can be linked to the presence of methylbutenethiol up to 6 nM [53,54].

Beside their organoleptic role, thiols present another function. Their antioxidant activity is linked to their stability. It has been demonstrated that low-concentrated thiols can react with Reactive Oxygen Species (ROS) to avoid oxidation and therefore drink deterioration [55–57]. On the other hand, highly-concentrated thiols lead to the generation of aldehyde species with a negative impact on drink and food taste [58]. Thiol balance needs to be maintained to ensure product quality. Three main factors influence the thiol pool: grape types [59,60], pre-fermentatives operations (vendange time, soils, grape treatment…) [61–63] and alcoholic fermentation [64–66].

1.3. Challenge

As depicted, the complete characterization of thiols in biological fluids and drinks is then crucial to predict their potential impact on health and on future customers. Therefore, there is an increasing interest in their identification and quantification.

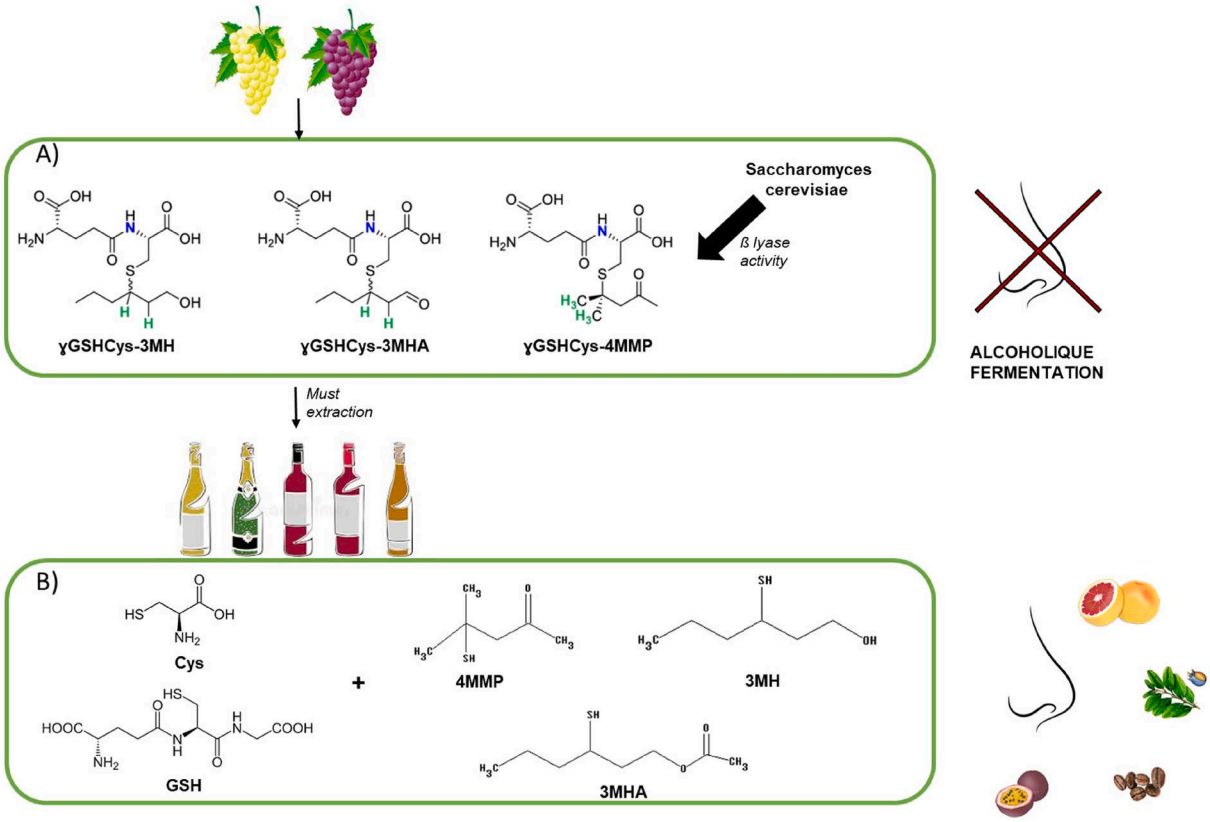


Fig. 1. Release mechanisms of thiols in wine. A) alcoholic fermentation where volatiles thiols are odorless and linked to their Cysteinylated and glutathionylated precursors. B) thiol release from their precursors associated with aromatic expression. Cys: Cysteine; Glu: Glutathione; 3MH: 3-mercaptohexanol; 3MHA: 3-mercaptohexyl acetate; 4MMP: 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone.

For now, this section highlighted major issues concerning thiol identification and quantification: low concentrations, poor stability, high diversity and complex matrices. It genuinely addresses the issue of detection of thiolated compounds at the interface of biology and chemistry. Since few years, nanoparticles (NP) appeared as a solution in various fields of applications such as biomedical [67], environmental [68], agri-food sector [69] … Indeed, transition to the nanoscale offers new physico-chemical properties to a material such as higher specific surface area, higher reactivity… All nanomaterials developed for thiol quantification, answered traditional methods shortcomings. These approaches generally require some expensive and sophisticated apparatus (mass hyphenated systems, specific fibers…) or time-consuming analytical procedures. Moreover, these methods rely on the interactions between certain NP and thiols. It is especially true for gold nanoparticles (AuNP) having a near covalent binding energy with thiols (40–50 kcal/mol) [70]. In this paper, we aimed at providing an overview of research work employing nanomaterials for thiol sensing (identification and/or quantification), from their benefits to current methods and limits. Our review will not focus on thiol Self Assembled Monolayer, for which NP are used to nanostructure materials as it has already been extensively described in the literature [71].

2. Thiols quantification and limits

Due to thiol importance and ubiquity, analytical methods have been developed and are widely described in literature for identification and/or quantification. The quantification of these compounds remains challenging due to their reactivity (disulfide bond formation) [72], their low abundance and the complex matrices considered [49]. Different strategies have been developed to solve these issues, such as specific analytical or pretreatment methods [73–77].

For instance, pretreatment steps usually involve different types of solvents such as carcinogenic, mutagenic or reprotoxic (CMR) ones. Thiol extraction from wine often involves either dichloromethane or diethyl-ether [75,78]. These solvents are toxic, non-recyclable and must be removed before any measurements, increasing pretreatment time and manipulation steps. Pretreatments for protein removal is often required because they can interfere in chromatographic or electrophoretic analysis. In fact, proteins can affect retention time, peak shape, resolution and, of course, detection response. Three classical different approaches can be used to remove proteins: acidification, organic solvent addition and filtration [78–81]. As previously stated and depending on selected approach, process will take more time and can also be detrimental toward the molecule of interest. In blood plasma, addition of acidic agents for protein removal will decrease sample pH and favors conversion of GSH into GSNO or will lead to RSNO degradation. Furthermore, it has been demonstrated that GSH in plasma at room temperature has a half life time of approximately 20 min [82]. Thus, increasing treatment time will lead to GSH oxidation and the concentration estimated after analysis cannot reflect the initial GSH concentration. This phenomenon also occurs for food matrices because thiols are volatiles, sensitives to oxidation and very reactive [83].

Another challenge revolving in thiol quantification is the selectivity between different thiols in the same matrix. Indeed, whether in biological or food matrices, many thiols are presents. Methods should be able to allow separation of thiols or should be specific of thiols of interest. This requires pretreatment steps to isolate or select one or different thiols from their matrices. Tominaga and his team have developed an extraction method using p-hydroxymercuribenzoate sodium (pHMB) for successive liquid/liquid extraction of 3MH in wine [84]. This method was used by other researchers because of its specificity for volatile thiols against other compounds [85]. Despite its efficacy, these isolation steps increase pretreatment time and can also affect thiol concentration. To avoid these negative effects, thiol derivatization methods were developed for quantitation in an accurate and reliable way using fluorescent probes or alkylation agents [86–88]. However, these methods are complicated to develop and are not always selective toward a single thiol.

Quantification and identification methods are chosen according to the targeted concentration range. Thiols are usually present in low concentrations (down to few nanograms or nanomoles per liter). Indeed, methods should head for the lowest limits of detection (LOD). In food matrices especially, analytical methods capable of reaching such detection thresholds are required like GC coupled with mass spectrometry (MS) [89]. Analytical methods used to quantify thiols can be divided into 2 groups: non separative and separative methods. Both groups present their advantages and drawbacks that will be discussed in the following paragraphs and summarized in Table 1.

Non separative methods are simple and low cost but are affected by insufficient specificity and selectivity. Analytical methods such as UV–visible spectrophotometry, fluorimetry or amperometry are employed [90–92]. One of the first to be developed was the Ellman's Method [93]. It is a simple spectrophotometric quantification implying the reaction of thiols with 5,5′-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) leading to the formation of 2-nitro-5-thiobenzoate, detected at 412 nm in simple matrices (water, buffers …). This method as well as other non-separative are not selective and do not respond to thiol specificity (low concentration and complexity of matrices). Therefore, more complex methods were used to quantify and most of all separate thiols between each other to ensure a selectivity. These separative methods are more complex but they can reach picomolar LOD [73]: Liquid Chromatography (LC) or Capillary Zone Electrophoresis (CZE) allow both selectivity and sensitivity [75,94]. For example, GSH quantification in blood plasma with LC coupled with coulometric detection can achieve LOD of fM against 3 μM for a classic Ellman's method [93,95]. Because of matrices complexities, many derivative methods have also been developed [75,94].

Fig. 2 shows LOD variation as a function of the methods. Unsurprisingly, non-separative methods can be as sensitive as some separative methods but suffer from a lack of specificity. In addition, LOD are not low enough to quantify thiols with low concentrations ($<10^4$ fM). Among separative methods, fluorimetric detection appears more sensitive than UV–vis detection whether it is for LC or CZE separation. Hyphenation of MS with separation technics allows for reaching better LOD (about 10^5 times lower). For GC methods, there is no significant differences adding MS. Moreover, LOD are 10^4 times lower than LC and CZE methods. This can be explained by the fact that the GC allows to get rid of thiol complex matrices. Therefore, better thiol selectivity and sensitivity is obtained with GC and GC–MS methods. Despite this, GC methods have limitations such as equipment cost or pretreatment steps. GC methods are used for volatiles thiols and are hardly applicable to nonvolatile thiols.

According to these different aspects, analytical methods already developed present one or many disadvantages acting as obstacles to the understanding of thiol roles and mechanisms. Indeed, many methods do not allow reaching LOD in accordance with low thiols concentration [100,105,106]. More recent methods present lower LOD (<100 fM) but this high sensitivity is associated to other limitations: many pretreatments steps are required, making the method time-consuming [45,107,108]. Pretreatment also affects thiol concentrations and can require the use of harmful chemicals and/or toxic solvents [68,69,79]. Finally, several developed methods employed derivative molecules specific to SH to increase sensitivity and selectivity, while increasing sample processing time [75,94,109].

3. Nanomaterials and thiol sensing

Over the past few years, the number of publications describing the incorporation of nanomaterials in different fields has increased exponentially [110–113]. NP appears as a potential answer to some challenges previously described. Indeed, nanosystems exhibit interesting and useful properties linked to their high specific surface, reactivity, stability, catalytic activity or conductivity that can offer new

Table 1
Classical methods for thiols analysis and quantification.

Analytical Methods	Analytes	Matrices	Pretreatments	LOD (fmol/L)	Drawbacks	Ref
Spectrophotometry UV–vis	GSH	Plasma	- Masking of GSH with p-benzoquinone TNB^{2-} to remove excess of p-benzoquinone	$0.02.10^{9}$	Use of derivatizing agent	[95]
	GSSG	Blood	- Addition of metaphosphoric acid 20 min incubation 25 min centrifugation Complexation with Alloxan	ND	Use of derivatizing agent Enable to quantify GSSG	[94]
Fluorimetry	GSH	PBS buffer solution	- Use of DMSO Addition of p-benzoquinone for GSH selectivity	$0,1.10^{9}$	Not applicable to complex matrices Only applicable to GSH	[96]
	HCys		NA	$7.7.10^{9}$	Specific to thiol containing amino acid	[97]
LC	GSH	Grape juice and white wine	- Addition of sulfur dioxide Derivatization with p-benzoquinone	$5.5.10^{7}$	Use of derivatizing agent	[98]
	Cys	Plasma	- Addition of TCEP for disulfide bond reduction for 15 min Addition of PLP as derivatizing agent for 15 min at 45 °C Deproteinization with perchloric acid during 10 min	$2.5.10^{9}$	Time consuming Use of derivatizing agent	[99]
	HCys		- Addition of Tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) for disulfide bond reduction for 15 minAddition of pyridoxal 5′-phosphate (PLP) as derivatizing agent for 15 min at 45 °C Deproteinization with perchloric acid during 10 min	$0.25.10^{9}$		
	GSSG	Plasma	- Reduction of disulfide thiols Release of protein bound thiol Protein precipitation with metaphosphoric acid	5.10^{3}	Use of harmful chemicals Many pretreatment step	[73]
CZE	GSH	Rat Hepatocytes	- Lyses Centrifugation	$2.3.10^{9}$	LOD not appropriate[†]	[100]
		Saliva	- Derivatization with EMA reagent	$0.18.10^{6}$	Use of derivatizing agent	[101]
LC-MS	HCys	Plasma	- Reduction of disulfide bonds with Dithiothreitol (DTT) Addition of a precipitation reagent Mix for 30 min	$0.4.10^{9}$	Time consuming	[102]
	3MH 3MHA 4MMP 2FFT	Wine	- Addition of thiol in wine samplesDerivatization with 4,4′-Dithiopyridine (DTDP) Separation on C18 cartridge Elution with methanol Evaporation	6.10^{3} 1.10^{4} 6.10^{3} 6.10^{3}	Multiple pretreatment steps Use of harmful chemicals Derivative method	[75]
GC–MS	3MH 3MHA 4MMP 2FFT BM	Wine	- Derivatization with o-methyl hydroxylamine Separation on SPE cartridge Cartridge conditioning with dichloromethane and methanol Derivatization of retains thiolselution with solvent mixture (hexane + diethyl ether)	6.10^{4} 1.10^{4} 5.10^{3} 4.10^{3} 4.10^{3}	Pretreatment steps Use of harmful chemicals Time-consuming	[74]
	3MH		- Extraction in dichloromethane Liquid-liquid extraction with p-HMB Evaporation Thiol release from p-HMB with Cys Thiol extraction with dichloromethane	2.10^{4}	Use of harmful chemicals Multiples steps Time consuming	[89]
LC-MS/MS	GSH	Plasma	- Blocking of SH group Centrifugation Ultrafiltration	$22.5.10^{6}$	Multiples pretreatment steps	[45]
SPME-GC–MS	2FFT	Coffee	- Derivatization with hydroxy hydroquinone (HHQ) Dry evaporation Dissolution in water	ND	Specific only to 2FF	[103]
HS-SPME and GC–MS/MS	3MH 3MHA 4MMP	Beer	- Removing of carbon dioxide (30 min at 4 °C) Addition of triethylamine	$1.6.10^{4}$ $1.2.10^{3}$ $1.2.10^{3}$	Long time method development Expensive equipment	[104]

BM: Benzyl-mercaptan, CZE: Capillary Zone Electrophoresis, Cys: Cysteine, DTNB: 5,5-dithio-bis-(acide 2-nitrobenzoïque), EMA: Dimethyl sulfoxide, DMSO: Dimethyl sulfoxide,DTDP: 4,4′-Dithiopyridine DTT: Dithiothreithol, FFT: 2-Furanmethanethiol, FID: Flame Ionization Detector, FPD: Flame Photometric Detector, GC: Gas Chromatography, GSH: glutathione reduced, GSSG: Glutathione oxidized, HCl: hydrogen chloride, HHQ: hydroxy hydroquinone, HS-SPME: Head Space Solid Phase

Micro Extraction, LC: Liquid Chromatography, MS: Mass Spectrometry, NA: Non-Applicable, NaOH: sodium hydroxide, ND: non-determined, PBS: Phosphate Buffer Solution, pHMB: p-hydroxymercuribenzoate, PLP: pyridoxal 5′-phosphateSPME: Solid Phase Micro Extraction, SPE: Solid Phase Extraction, TNB^{2-}: 2-nitro-5-thiobenzoate, TCEP: Tris(2-carboxyethyl) phosphine, 3MH: 3-mercaptohexanol, 3MHA: 3-mercaptohexyl acetate, 4MMP: 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone. When detection method is not specified, it is considered to be UV–vis detection.
†: LOD not appropriate = above thiol concentration in biomatrices (blood, plasma, saliva, urine…).

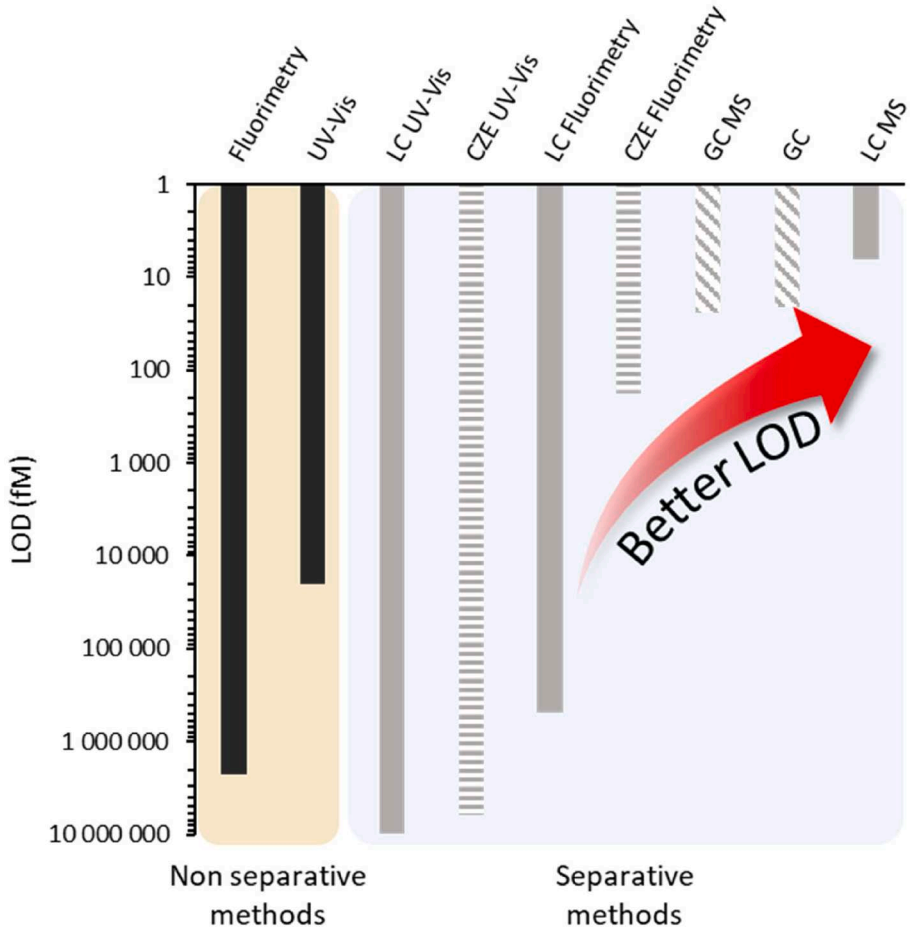


Fig. 2. LOD comparison of current thiol quantification methods (data extracted from Table 1: means of all LOD values).

functionalities to the original material [114–116] (Fig. 3). Indeed, NP with a specific affinity toward one substrate present a real interest in nanomaterial development. Before starting, the term nanomaterials will refer to colloidal NP, nanotube, nanofiber… While nanostructurated materials will described materials with new abilities granted by the addition of nanomaterials. Nanomaterials have been at the forefront of research for thiol quantification.

NP can act as sensors to detect thiol traces through specific interactions, allowing capture, purification or pre-concentration of a thiol from a sample. Considering that thiols are present at low concentrations, nanomaterials can be used to directly quantify these molecules or as a pretreatment step for extraction, enrichment or purification from their matrices. The most described in literature are gold nanomaterials [117] due to their strong affinity for SH function (binding energy around 40–50 kcal/mol) [70]. NP characteristics (size, shape, composition …) play a key role in their analytical capacity. For instance, NP shape and size will influence the number of available sites for thiol bounding. Table 2 summarizes, in a non-exhaustive way, nanosensing thiol methods developed over the past 10 years.

3.1. Optical methods

3.1.1. Colorimetric sensing

Based on optical properties of NP, and more specifically the presence of surface-plasmon resonance characteristic of metallic NP, different colorimetric assays have been developed to detect and quantify thiols. These methods are easy to develop, rapid and low cost.

Thiol colorimetric detection methods are mostly based on AuNP aggregation and/or resonance plasmon band modification. Colorimetric methods have been developed and published, based on AuNP aggregation [118,120,121]. He *et al.* has developed a colorimetric detection method for GSH and Cys [119]. It is based on chronometric method of blue methylene and hydrazine catalyzed by AuNP. In absence of the two thiols, the blue solution becomes colorless due to the presence of AuNP in 10 min. The presence of thiol, that are known to show high affinity for AuNP, inhibits their catalytic activity, increasing the reaction time up to several hours. It is directly related to GSH or Cys concentration [119]. The selectivity of this method for the two thiols compared to other amino acid was investigated and showed non-significative changes of reaction time.

Although AuNP are the most described nanomaterials, other compositions have been developed. Ju and his team synthesized silver NP (AgNP) on nitrogen-doped graphene quantum dots (*N*-GQD). In

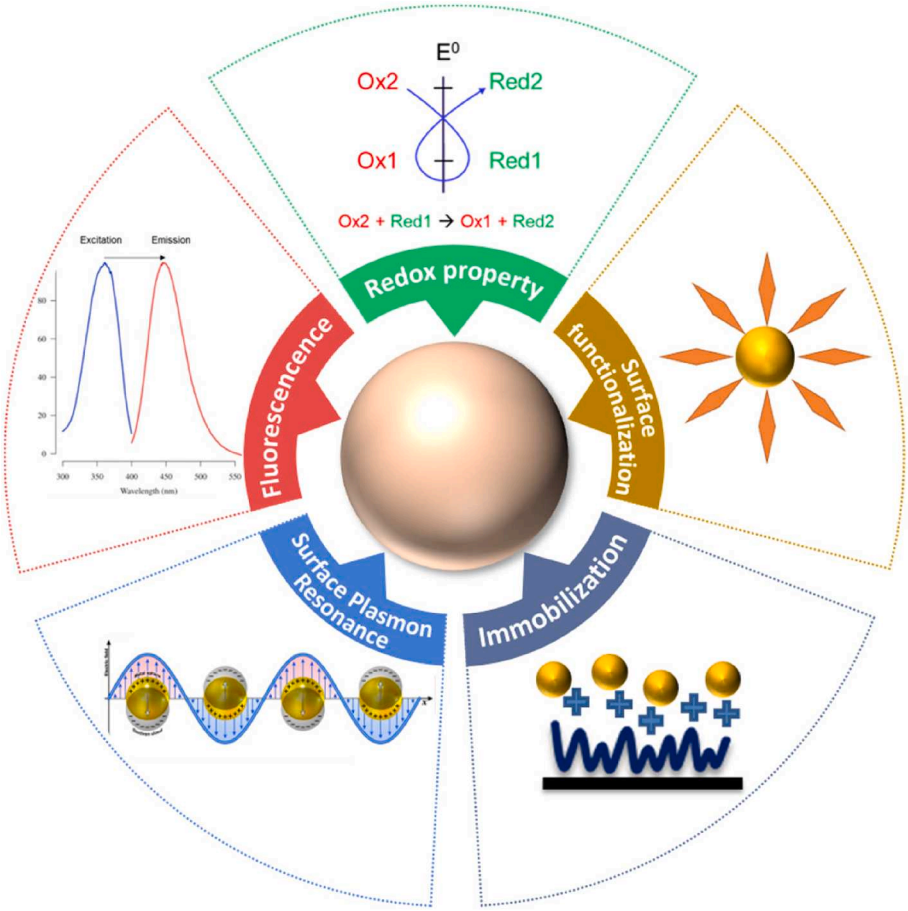


Fig. 3. NP properties for thiol detection methods.

presence of tetramethylbenzidine (TMB) and H_2O_2, oxidation of TMB in oxTMB occurs. This oxidation resulted in 2 absorption peaks at 652 and 890 nm. Adding GSH to this previous solution, reduction of oxTMB in TMB resulted in decrease of adsorption peak at 652 nm which is dependent on GSH concentration. Absorbance monitoring at 652 nm allows to quantify GSH concentration in blood plasma with a LOD of 31.10^6 fM [135]. In the same way, Zhou *et al.* developed a thiol sensing method using silver nanoprism based on wavelength displacement after thiol adsorption on silver [152]. This method allows GSH, Cys and dithiothreitol (DTT) selectivity in serum with a LOD of 10.10^6 fM.

Even if they present good selectivity and sensitivity, these methods used colloidal NP with stability issues [164]. Furthermore, physicochemical properties greatly influence thiol interaction and detection. Thus, a routine use of these methods requires a rigorous knowledge and control of NP characteristics which is restrictive for industrial production [165]. Finally, NP aggregation makes the probe non-reusable.

3.1.2. *Fluorescence-based sensing*

Most of nanomaterials for fluorimetric thiol sensing are based on fluorescence quenching which refers to the process by which fluorescence intensity of a sample decreases or increases (Fig. 4). This deactivation/activation mechanism is caused by molecular interaction [154]. The changes in fluorescence intensity can be used as source of information for some biological systems (like quencher accessibility to fluorophore or quencher/fluorophore quantity).

Metallic nanomaterials (AuNP, AgNP …) show interesting optical properties and high fluorescence quenching efficiency [167], which are affected by NP size and geometry. Combination of chromophores and metallic NP can therefore serve as sensor. The strong bond between AuNP and -SH groups allows a preferential adsorption with a desorption of a chromophore presenting lower affinity. Among the different fluorescent ligand, Nile Red (NR) is one of the most described in literature. However, Kapur *et al.* synthesized protein functionalized AuNP using mCherry protein which is quenched when bound to AuNP. These NP targeted thiols are based on the competitive displacement of mCherry for adsorption of thiols. It resulted in an increasing fluorescence due to mCherry release in the medium, correlated with the quantity of adsorbed thiols. They also showed that kinetics and thiol types played a key-role in chemical adsorption on AuNP, and therefore on the observed fluorescence [136]. Other nanoparticles-based methods were developed using different ligands. Luo and his team designed a nanoprobe composed of AuNP functionalized with a Redox responsive Silica (ReSi) matrix linked with Fluorescein IsoThioCyanate (FITC). In presence of GSH (or other thiols) at relatively high concentrations (10 mM), a destruction of the disulfide-linked ReSi-FITC resulted in the release of FITC and recovery of native fluorescence of the free-probe [137]. Based on the same mechanism, Xu and co-workers designed an AuNP sensor functionalized with BODIPY (fluorescent molecule) quenched by the presence of Cys or GSH in living cells. The signal response was thiol specific, fast and with a LOD of 30.10^6 fM [139]. Other identical methods are described in literature with LOD of nanomolar level [134,138,140,142,168].

Even though AuNP are more widely described, researchers have developed similar method based on fluorescence properties of other NP. Zhang *et al.* who used turn-off fluorescence-based method with AuNP and Silicon NP (SiNP) [148]. Addition of Cys led to a release of AuNP adsorbed from SiNP surface and restored the fluorescence. LOD was estimated at 35.10^9 fM in ethanolic solution. AgNP was also widely used as for example by Li and his team who developed Silver nanocluster (AgNC) stabilized by single-stranded DNAs (DNA-AgNC). In presence of

Table 2
Nanomaterial based methods for thiols analysis and quantification.

NP			Analytes	matrices	Mechanisms	Analytical methods	LOD (fmol/L)	Drawbacks	REF
Core	**Ligand**	**Size (nm)**							
AuNC	polyvinylpyrrolidone (PVP)	9 (D_h)	Cys GSH HCys	PBS	Competitive displacement	Fluorimetry	35.10^6	ND	[118]
AuNP	Citrate	13 (D_h)	Cys GSH	Fetal bovine serum	Reaction between methylene blue and hydrazine catalyzed by AuNP. Reaction time decreased when thiol interact with AuNP.	Spectrophotometry	10.10^9 8.10^9	Reaction time: 2 h30 with GSH LOD not appropriate Non-reusable	[119]
		ND	GSH	Water	Detect oxidative stress. GSH generate AuNP aggregation with APTES and not GSSG.		ND	Non-reusable	[120]
		8 (D_c)	Thiourea	Waste water	Aggregation of AuNP and wavelength displacement		$2.14.10^6$	Non-reusable	[121]
		10.8 (D_h)	Cys	Water	Aggregation of AuNP and wavelength displacement		10.10^3	Selectivity with other thiols Non-reusable	[122]
		13 (D_h)	Cys	Water	Aggregation of AuNP and wavelength displacement		100.10^6	Selectivity with other thiols Non-reusable	[123]
		ND	GSH GSSG	Cells	Thiol selective probe on nanoporous silicon chip	SALDI-MS	3.10^9	GSSG detection need reduction step	[124]
		13 (D_h)	GSH	Liver	Thiol selective probe	MALDI-TOF-MS	2.10^9	ND	[125]
		20 (D_h)	GSH	Saliva urine	AuNP immobilized on syringe to act as solid-phase extraction followed by DTT desorption	LC	5.10^6	Loss or desorption of AuNP not evaluated	[126]
		6 (D_h)	GSH NAC	PBS Plasma	Immobilization onto a cellulosic membrane to selectively capture thiol	LC	$0.5.10^9$	Non-recyclable	[127]
		16 (D_h)	GSNO	Plasma	Indirect GSNO quantification by denitrosation	Amperometric	100.10^6	Non-reusable Blocking step for other free thiols	[128]
		10–20 (D_h)	GSH	Skin	Immobilization of AuNP on a paper for thiol sensing by color change of paper due to AuNP aggregation	Visual	$6.9.10^9$	Analysis based on photography	[129]
	Tween-20	13 (D_c)	GSH	Seawater	Selective thiol enrichment with AuNP followed by DTT desorption and CZE analysis	CZE	2.10^6	Selectivity with other thiols not tested	[130]
		13 (D_c)	Cys GSH Hcys	Plasma	Selective thiol enrichment with AuNP followed by DTT desorption and CZE analysis		10.10^6 –65.10^6	Non-reusable	[131]
		13 (D_c)	Cys GSH Hcys	Buffer	Selective thiol enrichment with AuNP followed by DTT desorption and CZE analysis		554.10^6 28.10^6 456.10^6	Insufficient extraction due to AuNP or DTT low concentration	[132]
		ND		Saliva			5.10^6	Non-reusable	[133]

(*continued on next page*)

Table 2 (*continued*)

NP			Analytes	matrices	Mechanisms	Analytical methods	LOD (fmol/L)	Drawbacks	REF
Core	**Ligand**	**Size (nm)**							
			Cys GSH Hcys Methionine		Selective thiol enrichment with AuNP followed by DTT desorption and CZE analysis				
	Rhodamine G	20 (D_h)	Cys GSH	Buffer	Reduced thiols were blocked with *N*-ethylmaleimide and oxidized thiols was quantified by competitive displacement	Fluorimetry	$0.57.10^9$ $0.68.10^9$	Pretreatment needed Non-reusable	[134]
	ND	19 (D_c)	GSH	water	AgNP catalyzes oxidation of TMB with H_2O_2 and GSH reduced oxTMB (color change)	Spectrophotometry	31.10^6	Non-reusable	[135]
	mcherry	13 (D_c)	Cys GSH	Buffer	Competitive displacement of mcherry (thiol dependent)	Fluorimetry	ND	Non-reusable	[136]
	Silica + fluorescein isothiocyanate	10 (D_c)	GSH	Cells	Release of fluorescein by GSH		ND	Non-reusable Selectivity not tested	[137]
	$NaYF_4$:Yb^{3+},Er^{3+}	40 (D_h)	GSH	Buffer	Competitive displacement		30.10^6	Non-reusable Selectivity not tested	[138]
	BODIPY	15 (D_h)	Cys Hcys	Cells	Competitive displacement		ND	Non-reusable	[139]
	Patterned poly(acrylic acid)	25 (D_c)	GSH	Buffer	Thiol selective probe	SALDI-MS	$0.1.10^6$	Not thiol selective Non-reusable	[140]
	Citrate cetyltrimethylammonium bromide Sodium borohydride	20 152.5 (D_c)	GSH Cys GSSG	plasma	Aggregation of AuNP and wavelength displacement	Spectrophotometry	$1.5.10^{12}$ - 1.10^9	Non-reusable	[141]
	Chitosan	ND	Cys	Water	Aggregation of AuNP and wavelength displacement		$0.1.10^9$	Non-reusable	[142]
AuNP AgNP	ND	10–20 (D_c)	GSH	Cells	Thiol selective probe	SALDI-MS	ND	Selectivity with other thiols not tested Non-applicable to GSSG quantification	[143]
AuNP Carbon QD	citrate	3.74.7 (D_c)	Cys	milk	Competitive displacement	Fluorimetry	12.10^6	Selectivity not tested Non-reusable	[144]
AuNC SiQD	ND	ND	Cys		Competitive displacement	Fluorimetry	10.10^6	Selectivity not tested Long NP synthesis process	[145]
Nanoporous Gold	ND	ND	Dodecanethiol	Ethanol	solid-phase microextraction	GC–MS	$0.1.10^9$	Use of harmful chemicals	[146]
Nanoporous Gold	ND	ND	Alkanethiol	Ethanol	solid-phase microextraction		ND	Use of harmful chemicals	[147]
Silicon NP	AuNP	40 (D_h)	Cys	Buffer	Competitive displacement	Fluorimetry	35.10^9	Non-reusable Selectivity not tested	[148]
AgNP	DTNB	20–60 (D_h)	GSH DTNB	PBS	Immobilization onto a porous silicon disk for surface-enhanced Raman scattering application	Raman Spectroscopy	$74.9.10^6$ 10.10^6	Selectivity tested with Cys and HCys only	[149]
AgNC	DNA	7 (D_c)	Cys GSH	Water	Competitive displacement	Fluorimetry	$0.45.10^9$ $4.50.10^9$	Non-reusable	[150]

(*continued on next page*)

Table 2 (*continued*)

NP			Analytes	matrices	Mechanisms	Analytical methods	LOD (fmol/L)	Drawbacks	REF
Core	**Ligand**	**Size (nm)**							
	sodium dodecyl sulfate	ND	Cys		Aggregation of AuNP and wavelength displacement		83.10^{6}	Selectivity with other thiols not tested Non-reusable	[151]
Silver nanoprism	Citrate	30 (D_c)	Cys GSH dimercaptosuccinic acid mercaptopropionic acid DTT	serum	Wavelength displacement	Spectrophotometry	10.10^{6}	Non-reusable	[152]
Graphene QD	ND	2 (D_h)	Cys GSH Hcys	serum	Competitive displacement	Fluorimetry	$2.5.10^{6}$ $5.0.10^{6}$ $5.0.10^{6}$	Non-reusable Interferences with amino acids	[153]
Carbon dots	ND	2 (D_c)	Cys GSH Hcys	Buffer	Competitive displacement		69.10^{6} 80.10^{6} 76.10^{6}	Non-reusable	[154]
	Rhodamine B	2–3 (D_c)	GSH	Water Plasma food	Competitive displacement		20.10^{6}	Non-reusable Selectivity with other thiols not tested	[155]
	Metal ions	16 (D_c)	2-mercaptoethanol mercaptoacetic acid	fetal bovine serum	Competitive displacement		1.10^{9}	Non-reusable Selectivity with other thiols not tested LOD not appropriate	[156]
	Au	7 (D_c)	6-Thioguanine	NA	Competitive displacement		$10.\ 10^{6}$	Non-reusable Selectivity with other thiols not tested	[157]
nitrogen-doped graphene QD	ND	2.2 (D_c)	Cys GSH	Water	Competitive displacement		36.10^{6} 34.10^{6}	Non-reusable	[158]
	ND	3–5 (D_c)	GSH	PBS	Competitive displacement		$30.\ 10^{6}$	Non-reusable Selectivity with other thiols not tested	[159]
	ND	10(D_h)	Cys GSH	PBS	cobalt phthalocyanine immobilized on nitrogen-doped graphene QD onto a glassy carbon electrode showed electrocatalytic activity towards the oxidation of three different thiols	Amperometry	1.10^{9}	LOD not appropriate	[160]
nitrogen-doped graphene QD + V_2O_5 nanosheets	ND	2–8 (D_c)	Cys	Serum	Competitive displacement	Fluorimetry	50.10^{6}	Non-reusable Selectivity with other thiols not tested	[161]
ZnO NR	AuNP	4.32 (D_c)	GSH	Water	Thiol selective probe with ZnO NR desorption improvement	SALDI-MS	150.10^{-3}	ND	[162]
AuNP Pt NS Fe_3O_4 NP TiO_2 NP Se NP CdTe QD	ND	14 37 13 5 100 3	GSH	Water	Thiol selective probe		$1.4.10^{2}$ $2.3.10^{4}$ $8.3.10^{3}$ $2.2.10^{3}$ $3.3.10^{4}$ $1.9.10^{2}$	Desorption problems for Pt NS	[163]

APTES: 3-Aminopropyltriethoxysilane, AgNC: Silver Nanocluster, AgNP: Silver Nanoparticles, CdSe: Cadmium selenide, CdTe: Cadmium telluride, Cys: Cysteine, CZE: Capillary Zone Electrophoresis, Dc = core diameter, Dh = Hydrodynamic Diameter, DNA: Deoxyribonucleic Acid, DTNB: 5,5-dithio-bis-(acide 2-nitrobenzoïque), DTT: Dithiothreitol, GC: Gas Chromatography, GSH: Glutathione reduced, GSNO: *S*-nitrosoglutathione, GSSG: Glutathione oxidized, Hcys: Homocysteine LC: Liquid Chromatography, LOD: Limit Of Detection, MALDI-MS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI-TOF-MS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight – Mass Spectrometry, MS: Mass Spectrometry, NAC: *N*-Acetylcysteine, ND: non-determined, NP: Nanoparticles, NR: NanoRod, NS: NanoSponge, NT: NanoTube, OxTMB: 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine oxidized, PVP: polyvinylpyrrolidone, QD: Quantum Dots, SALDI-MS: Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization- Mass Spectrometry, TGA: Thioglycolic Acid, TMB: 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine, ZnO: Zinc Oxide.
When detection method is not specified, it is considered to be UV–vis detection.
† : LOD not appropriate = above thiol concentration in biomatrices (blood, plasma, saliva, urine…).

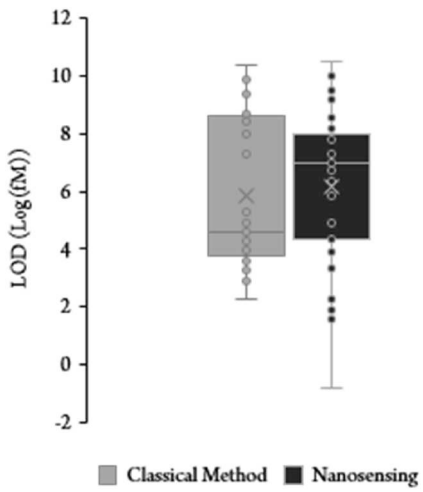


Fig. 4. Direct LOD comparison between classical methods (grey box) and nanosensing methods (black box) (Data extracted from Tables 1 and 2).

GSH or Cys, an adsorption on AgNC occurred, leading to formation of a nonfluorescent complex and/or aggregation of AgNC, decreasing fluorescence intensity. LOD were reported to $0.134.10^9$ fM and $0.172.10^9$ fM for GSH and Cys, respectively [150]. Wu *et al.* developed a fluorescent probe using graphene QD (GQDs) which emitted strong blue fluorescence in aqueous buffer solution, quenched in presence of mercury (II) ions. In presence of GSH, Cys and Hcys, Hg^{2+} release occurred and a fluorescence turned on, directly correlated to thiol concentration. The assay was highly sensitive with LOD of $5.0.10^6$, $2.5.10^6$ and $5.0.10^6$ fM for GSH, Cys and Hcys, respectively. However, some interferences with amino acids and proteins were observed [153]. Many similar methods were developed using carbon dots (CD) [155–157,159] or nitrogen-doped graphene QD [158,161].

Nanoparticle fluorescence-based methods have been extensively used for rapid thiol detection, however they present few limitations. In the same way as colorimetric assays, these methods are linked to NP stability and are for single-use.

3.2. Other non-separative methods

The main goal of using NP-based materials is thiol amplification/ separation/ extraction from their matrices for chemical and biological detection. Recently, NP have been widely employed for determination of thiol analysis in Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS) and SALDI-MS. The use of NP presents two interests: the first is energy absorption of laser and its transfer that will induce desorption and ionization of the analyte with a high efficiency. The second advantage is the specific interaction between NP and the analyte, acting as a selective probe. Most of studies report the use of AuNP [124,125,140,143,162] because of their strong affinity for thiols but other NP can be used. That is why Chiang *et al.* investigated six different types of colloidal NP for GSH quantification in SALDI-MS. This paper is older than 10 years but presented for the first-time interesting comparisons between different nanomaterials in terms of thiol sensing: AuNP, TiO_2 NP, Se NP, CdTe QD, Fe_3O_4 NP and Pt Nanosponges (Pt NS). Previously mentioned NP employed reached LOD of femtomolar level. The sensitivity of Pt NS for SALDI-MS appeared to be less important than other NP because of too strong interaction with the analyte. Pt-S bound energy is 50 kcal/mol [169] which is too strong to efficiently desorb GSH and explained the high values of the obtained variation coefficients.

Concerning RSNO compounds, nanomaterials are useful for denitrosation (from RSNO to $RS^{\bullet}$ + $^{\bullet}NO$). Baldim *et al.* developed an analytical method based on the use of AuNP for the decomposition of RSNO. The NO release is monitored by amperometry and can be directly related to the initial RSNO concentration. They also studied GSNO saturation of the colloidal AuNP suspension by successive additions of GSNO. They showed that a saturated state was achieved with 30 μM of GSNO for 9 nM AuNP suspension. Considering the specific interaction between other blood plasma thiols and AuNP, authors decided to block SH function with iodoacetic acid. Thus, only RSNO can interact with AuNP. They determined the blood plasma volume saturating an AuNP suspension and the effect of other RSNO present in plasma amperometric signal, steric hindrance caused by albumin for example [128]. This method employed an indirect quantification of RSNO through NO quantification. However, NO have a very short half-life (few seconds) which may lead to underestimation of RSNO concentration.

3.3. Separative methods

Separative methods can be associated to nanomaterials to increase selectivity and sensitivity for thiols. Shen *et al.* developed a method using CZE coupled to Tween 20 capped AuNP [130]. The first step is the extraction of thiols from the matrix (seawater). The use of Tween 20 as a ligand allows AuNP dispersion in highly saline solution. After a release of adsorbed molecules by ligand exchange with DTT, desorbed thiols were derivated with *o*-phtalaldehyde (OPA), resulting in the formation of isoindole. Authors proved that their process is able to separate five thiols with LOD down to $0.1.10^3$ –$6.0.10^3$ fM. Drawback of this method is the possible interaction with amino containing molecule because OPA is not thiol specific. It is a reagent normally used for amine quantification. Method without derivatization using also Tween 20-capped AuNP was developed by Wang *et al.* [133]. Thiols were adsorbed on NP (60 min) followed by a release step and a CZE quantification. 3 different releasing agents, commonly used were tested (DTT, 2,3-Dimercapto-1-propanol and 2-mercaptoethanol). The lower LOD was obtained for GSH (5.10^6 fM) with a 2-mercaptoethanol release. Literature report other AuNP nanomaterials coupled to CZE method [130,131,133]. These methods employed Tween 20-capped AuNP for GSH extraction and desorption (through DTT ligand exchange) with the highest LOD being 2.10^6 fM.

Less described, nanostructurated devices allowed to get rid of stability issues and pretreatment step (in previously described methods) such as centrifugation to remove colloidal NP. Researchers created an AuNP-coated syringe for GSH extraction from biological matrices followed by a release step using DTT and a LC quantification [126]. Syringes were coated using layer-by-layer method and allowed to reach a LOD of 5.10^6 fM for GSH in saliva. Nanostructurated materials coupled with separative methods were also described for alkanethiol quantification. GC–MS methods were developed with Solid Phase Micro

Extraction (SPME) fibers coated with AuNP to capture thiols compounds while being thermally desorbed in GC headspace. Efficiency of SPME coated fibers appeared to be 11 times higher than non-coated fibers in term of sensitivity [146]. This method was able to selectively analyze and quantify mixture of alkanethiols (hexanethiol, octanethiol, and dodecanethiol) with higher extraction efficiency than a classical GC–MS headspace analysis but requiring higher desorption energy [147]. In the same way, a syringe filter cellulosic membrane has been developed in our lab, with AuNP adsorbed through electrostatic interactions with a positively charged polymer previously immobilized on the substrate [127]. Thiols (either in simple or complex matrices) were adsorbed by filtration without any pretreatment of the sample and released by chemical desorption (ligand exchange) before HPLC analysis. The coated filter was able to adsorb NAC and GSH quantities up to 270 and 70 nmol respectively. Thiol specificity and concentrating power have been demonstrated and results suggest the possibility to apply the device on any type of biological or food matrices. A similar strategy was also developed by Mompó-Roselló *et al,* through the direct coating of a syringe core. However, we observed that AuNP attached to plastic walls are removed with each piston passage, suggesting that immobilization developed by Mompó-Roselló *et al.* may be unstable against strong shear stresses. Among nanostructurated devices developed, literature described AuNP immobilization on a glass microfluidic channel surface in electrophoresis (fluorescent mode) microchips for GSH quantification in bacteria (*E. coli*, *S. aureus* and *S. enterica)* with $0.01.10^6$ fM LOD [132]. AuNP Nanostructurated papers were developed by Markina and his team to visually evaluate presence of thiol in human skin [129]. The detection procedure implied the assessment of the color change of the paper sensor resulting from aggregation of gold nanoparticles caused by thiols with $6.9.10^9$ fM LOD.

Separative methods using nanomaterials present better selectivity and specificity than optical methods. However, strong interactions between NP and thiols lead to desorption issues for SALDI/MALDI-MS methods. Furthermore, to increase thiol selectivity, many methods use derivatizing agent implying an increase in pretreatment time. Finally, promising results were obtained with nanostructurated materials as sample pretreatment support, avoiding stability and pretreatment issues.

4. Conclusion

This review offers an overview of thiol analysis issues, intrinsically linked to their properties and characteristics. Most of current methodologies present a lack of sensitivity, or require many pretreatment steps to overcome these drawbacks. In that way, analytical methods based on nanomaterials were developed. The overwhelming majority employed metallic nanoparticles, with more than 73 % being constituted of Au according to our reading (Table 2). New methods were developed, based on aggregation, coupling, fluorescence enhancement, fluorescence quenching, resonance light scattering and so on. Those reach nanomolar LOD and restrict the need for pretreatment steps since AuNP share specific interactions with thiols. Considering the literature, we noticed that LOD depends on NP size and type but also on ligand nature when functionalized. However, as most of them are based on fluorimetric or colorimetric detection without hyphenation to separative methods, thiol discrimination remains a challenging step. Moreover, some of these methods are unsuitable for routine use in a laboratory due to several issues: non-recyclability of nanomaterial, poor colloidal stability of NP (long term storage, pH sensitivity…) or handling complexity. There is therefore a compromise between an affordable method without selectivity (metallic NP and UV–vis detection for example) and an expensive equipment or nanomaterials harder to develop for routine use but reaching expected sensitivity and selectivity. When it comes to LOD, some nanosensing methods are able to reach values of a few femtomolar, even if median LOD appear to be similar as classical methods (Fig. 4).

Finally, few methods using nanostructurated materials (immobilized NP, nanosized pores … [146,147,171]) were developed and appeared promising. Their principal advantages lie in easy handling, potential reuse and an absence of colloidal instability or interferences from matrices. Those devices still require further development steps with strict NP control (monodispersed sizes, controlled charges, homogenous functionalization…) and device characterization (immobilization density, fabrication reproducibility, stability…).

Whether it is for nanomaterial or nanostructurated material, disadvantages were highlighted: the lack of stability of colloidal nanoparticles and the impossibility to obtain a reusable method for thiol sensing. Indeed, phenomena on which detection and/or separation are based lead to nanoparticles and/or sensor destruction. In the next few years, main challenge will remain in the development of a nanostructurated device, such as a kit, for fast, sensitive and specific thiol sensing in different matrices. It should have the following characteristics: high density of immobilized NP, applicable to different media (pH, salt concentration, complexity …) with the possibility of hyphenation to several analytical methods. Finally, the reusability would be an asset in terms of green chemistry and/or ecology.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgments

Authors would like to thank the IGBMC-CNRS UMR7104/INSERM U1258/University of Strasbourg for the financing through France relance.

References

[1] B. Quintanilla-Casas, N. Dulsat-Serra, N. Cortés-Francisco, J. Caixach, S. Vichi, Thiols in brewed coffee: assessment by fast derivatization and liquid chromatography–high resolution mass spectrometry, LWT – Food Sci. Technol. 64 (2015) 1085–1090, https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.010.
[2] N. Müller, D. Rauhut, Recent developments on the origin and nature of reductive sulfurous off-odours in wine, Fermentation 4 (2018) 62, https://doi.org/10.3390/fermentation4030062.
[3] K. Van Laer, C.J. Hamilton, J. Messens, Low-molecular-weight thiols in thiol-disulfide exchange, Antioxid. Redox Signal. 18 (2013) 1642–1653, https://doi.org/10.1089/ars.2012.4964.
[4] O. Rudyk, P. Eaton, Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems, Redox Biol. 2 (2014) 803–813, https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.06.005.
[5] A. Roland, R. Schneider, A. Razungles, F. Cavelier, Varietal thiols in wine: discovery, analysis and applications, Chem. Rev. 111 (2011) 7355–7376, https://doi.org/10.1021/cr100205b.
[6] R.J. Cannon, C.-T. Ho, Volatile sulfur compounds in tropical fruits, J. Food Drug Anal. 26 (2018) 445–468, https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.014.
[7] B. Olas, Hydrogen sulfide in signaling pathways, Clin. Chim. Acta 439 (2015) 212–218, https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.037.
[8] E. Zaorska, L. Tomasova, D. Koszelewski, R. Ostaszewski, M. Ufnal, Hydrogen sulfide in pharmacotherapy beyond the hydrogen sulfide-donors, Biomolecules 10 (2020) 323, https://doi.org/10.3390/biom10020323.
[9] B.D. Paul, S.H. Snyder, Gasotransmitter hydrogen sulfide signaling in neuronal health and disease, Biochem. Pharmacol. 149 (2018) 101–109, https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.11.019.
[10] M. Bhatia, Hydrogen sulfide as a vasodilator, IUBMB Life 57 (2005) 603–606, https://doi.org/10.1080/15216540500217875.
[11] C. Gaucher, A. Boudier, J. Bonetti, I. Clarot, P. Leroy, M. Parent, Glutathione: antioxidant properties dedicated to nanotechnologies, Antioxidants 7 (2018) 62, https://doi.org/10.3390/antiox7050062.
[12] K. Helbig, C. Bleuel, G.J. Krauss, D.H. Nies, Glutathione and transition-metal homeostasis in Escherichia coli, J. Bacteriol. 190 (2008) 5431–5438, https://doi.org/10.1128/JB.00271-08.
[13] S. Srivastava, K.V. Ramana, A. Bhatnagar, S.K. Srivastava, Synthesis, quantification, characterization, and signaling properties of glutathionyl

conjugates of enals, Methods Enzymol. 474 (2010) 297–313, https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)74018-0.
[14] R. Janaky, K. Ogita, B.A. Pasqualotto, J.S. Bains, S.S. Oja, Y. Yoneda, C.A. Shaw, Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS, J. Neurochem. 73 (1999) 889–902, https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0730889.x.
[15] P. Diaz-Vivancos, A. de Simone, G. Kiddie, C.H. Foyer, Glutathione – linking cell proliferation to oxidative stress, Free Radic. Biol. Med. 89 (2015) 1154–1164, https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.09.023.
[16] A. Meister, On the discovery of glutathione, Trends Biochem. Sci. 13 (1988) 185–188, https://doi.org/10.1016/0968-0004(88)90148-x.
[17] L. Flohe, The fairytale of the GSSG/GSH redox potential, Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj. 2013 (1830) 3139–3142, https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.020.
[18] L. Cao, D. Waldon, Y. Teffera, J. Roberts, M. Wells, M. Langley, Z. Zhao, Ratios of biliary glutathione disulfide (GSSG) to glutathione (GSH): a potential index to screen drug-induced hepatic oxidative stress in rats and mice, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 2635–2642, https://doi.org/10.1007/s00216-012-6661-8.
[19] C. Romagnoli, G. Marcucci, F. Favilli, R. Zonefrati, C. Mavilia, G. Galli, A. Tanini, T. Iantomasi, M.L. Brandi, M.T. Vincenzini, Role of GSH/GSSG redox couple in osteogenic activity and osteoclastogenic markers of human osteoblast-like SaOS-2 cells, Febs J. 280 (2013) 867–879, https://doi.org/10.1111/febs.12075.
[20] E. Nur, M. Verwijs, D.R. de Waart, J.-J.-B. Schnog, H.-M. Otten, D.P. Brandjes, B. J. Biemond, R.P.J.O. Elferink, Increased efflux of oxidized glutathione (GSSG) causes glutathione depletion and potentially diminishes antioxidant defense in sickle erythrocytes, Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis. 2011 (1812) 1412–1417, https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.04.011.
[21] G.D. Zeevalk, L. Manzino, P.K. Sonsalla, L.P. Bernard, Characterization of intracellular elevation of glutathione (GSH) with glutathione monoethyl ester and GSH in brain and neuronal cultures: Relevance to Parkinson's disease, Exp. Neurol. 203 (2007) 512–520, https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.09.004.
[22] S. Charisis, E. Ntanasi, M. Yannakoulia, C.A. Anastasiou, M.H. Kosmidis, E. Dardiotis, G. Hadjigeorgiou, P. Sakka, A.S. Veskoukis, D. Kouretas, N. Scarmeas, Plasma GSH levels and Alzheimer's disease. A prospective approach: results from the HELIAD study, Free Radic. Biol. Med. 162 (2021) 274–282, https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.027.
[23] J. Sian, D.T. Dexter, A.J. Lees, S. Daniel, Y. Agid, F. Javoy-Agid, P. Jenner, C. D. Marsden, Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia, Ann. Neurol. 36 (1994) 348–355, https://doi.org/10.1002/ana.410360305.
[24] M. Wirtz, M. Droux, Synthesis of the sulfur amino acids: cysteine and methionine, Photosynth. Res. 86 (2005) 345–362, https://doi.org/10.1007/s11120-005-8810-9.
[25] R.M. Strongin, Selective Indicators for Optical Determination of Disease Biomarkers - ProQuest, Chemistry, Portland State University, 2014. https://search.proquest.com/openview/76628d003462672f310f334d1420887e/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y.
[26] J. Yin, W. Ren, G. Yang, J. Duan, X. Huang, R. Fang, C. Li, T. Li, Y. Yin, Y. Hou, S. W. Kim, G. Wu, L-Cysteine metabolism and its nutritional implications, Mol. Nutr. Food Res. 60 (2016) 134–146, https://doi.org/10.1002/mnfr.201500031.
[27] I. Papet, D. Rémond, D. Dardevet, L. Mosoni, S. Polakof, M.-A. Peyron, I. Savary-Auzeloux, Sulfur Amino Acids and Skeletal Muscle, in: 2019: pp. 315–343. 10.1016/B978-0-12-810422-4.00020-8.
[28] S. Shahrokhian, Lead phthalocyanine as a selective carrier for preparation of a cysteine-selective electrode, Anal. Chem. 73 (2001) 5972–5978, https://doi.org/10.1021/ac010541m.
[29] D.W. Bak, T.J. Bechtel, J.A. Falco, E. Weerapana, Cysteine reactivity across the subcellular universe, Curr. Opin. Chem. Biol. 48 (2019) 96–105, https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.11.002.
[30] E. Lonn, Homocysteine lowering with folic acid and b vitamins in vascular disease, N. Engl. J. Med. 354 (2006) 1567–1577, https://doi.org/10.1056/NEJMoa060900.
[31] M.A. Mansoor, A.M. Svardal, P.M. Ueland, Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma, Anal. Biochem. 200 (1992) 218–229, https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90456-h.
[32] J. Sławek, M. Białecka, Chapter 57 - Homocysteine and Dementia, in: C.R. Martin, V.R. Preedy (Eds.), Diet Nutr. Dement. Cogn. Decline, Academic Press, San Diego, 2015: pp. 611–621. 10.1016/B978-0-12-407824-6.00057-4.
[33] K. Miwa, M. Tanaka, S. Okazaki, Y. Yagita, M. Sakaguchi, H. Mochizuki, K. Kitagawa, Increased total homocysteine levels predict the risk of incident dementia independent of cerebral small-vessel diseases and vascular risk factors, J. Alzheimers Dis. JAD. 49 (2016) 503–513, https://doi.org/10.3233/JAD-150458.
[34] I. Graham, E. Leslie, L.E. Daly, H. Refsum, K. Robinson, L.E. Brattström, P. M. Ueland, R.J. Palma-Reis, G.H.J. Boers, R.G. Sheahan, B. Israelsson, S. Cuna, C. S. Uiterwaal, R. Meleady, D. McMaster, P. Verhoef, J. Witteman, P. Rubba, H. Bellet, J.C. Wautrecht, H.W. de Valk, A.C. Sales Luis, F.M. Parrot-Roulaud, K. S. Tan, I. Higgins, D. Garcon, M.J. Medrano, M. Candito, A.E. Evans, G. Andria, Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European concerted Action Project, Jama, J. Am. Med. Assoc. 277 (1997) 1775–1781.
[35] S. Lee, P.5.a.006 Plasma homocysteine as a risk factor for Korean patients with vascular and Alzheimer's dementia, (n.d.) 1.
[36] C. Gaucher, A. Boudier, F. Dahboul, M. Parent, P. Leroy, S-nitrosation/denitrosation in cardiovascular pathologies: facts and concepts for the rational design of s-nitrosothiols, Curr. Pharm. Des. 19 (2013) 458, https://doi.org/10.2174/1381612811306030458.
[37] S. Moncada, Nitric OXIDE IN THE VASCULATURE: PHYSIOLOGY AND PATHOPHYsiology, Ann. N. Y. Acad. Sci. 811 (1997) 60–69, https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb51989.x.
[38] J.S. Stamler, D.I. Simon, J.A. Osborne, M.E. Mullins, O. Jaraki, T. Michel, D. J. Singel, J. Loscalzo, S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 (1992) 444–448.
[39] J. Beurton, A. Boudier, A. Barozzi Seabra, N.E. Vrana, I. Clarot, P. Lavalle, Nitric oxide delivering surfaces: an overview of functionalization strategies and efficiency progress, Adv. Healthc. Mater. (2022) e2102692–e, https://doi.org/10.1002/adhm.202102692.
[40] C. Perrin-Sarrado, Y. Zhou, V. Salgues, M. Parent, P. Giummelly, I. Lartaud, C. Gaucher, S-Nitrosothiols as potential therapeutics to induce a mobilizable vascular store of nitric oxide to counteract endothelial dysfunction, (2020).
[41] J. Bonetti, Y. Zhou, M. Parent, I. Clarot, H. Yu, I. Fries-Raeth, P. Leroy, I. Lartaud, C. Gaucher, Intestinal absorption of S-nitrosothiols: permeability and transport mechanisms, Biochem. Pharmacol. 155 (2018) 21–31, https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.06.018.
[42] M. Parent, Y. Zhou, J. Bonetti, C. Perrin-Sarrado, I. Lartaud, A. Sapin-Minet, C. Gaucher, Antioxidant properties of S-nitrosoglutathione and nanotechnologies, Proceedings 11 (2019) 15, https://doi.org/10.3390/proceedings2019011015.
[43] H. Yu, P. Chaimbault, I. Clarot, Z. Chen, P. Leroy, Labeling nitrogen species with the stable isotope 15N for their measurement by separative methods coupled with mass spectrometry: a review, Talanta 191 (2019) 491–503, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.011.
[44] E. Bramanti, V. Angeli, Z. Mester, A. Pompella, A. Paolicchi, A. D'Ulivo, Determination of S-nitrosoglutathione in plasma: comparison of two methods, Talanta 81 (2010) 1295–1299, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.02.024.
[45] D. Tsikas, M. Schmidt, A. Böhmer, A.A. Zoerner, F.-M. Gutzki, J. Jordan, UPLC–MS/MS measurement of S-nitrosoglutathione (GSNO) in human plasma solves the S-nitrosothiol concentration enigma, J. Chromatogr. B 927 (2013) 147–157, https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.01.023.
[46] B. Mayer, S. Pfeiffer, A. Schrammel, D. Koesling, K. Schmidt, F. Brunner, A new pathway of nitric oxide/cyclic GMP signaling involving S-nitrosoglutathione, J. Biol. Chem. 273 (1998) 3264–3270.
[47] T. Tominaga, A. Furrer, R. Henry, D. Dubourdieu, Identification of new volatile thiols in the aroma of Vitis vinifera L. var. Sauvignon blanc wines, Flavour, Fragr. J. 13 (1998) 159–162, https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199805/06)13:3<159::AID-FFJ709>3.0.CO;2-7.
[48] J.H. Swiegers, R.L. Kievit, T. Siebert, K.A. Lattey, B.R. Bramley, I.L. Francis, E. S. King, I.S. Pretorius, The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine, Food Microbiol. 26 (2009) 204–211, https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.08.004.
[49] B. Concejero, P. Hernandez-Orte, J. Astrain, B. Lacau, C. Baron, V. Ferreira, Evolution of polyfunctional mercaptans and their precursors during Merlot alcoholic fermentation, LWT – Food Sci. Technol. 65 (2016) 770–776, https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.018.
[50] T. Tominaga, D. Dubourdieu, A novel method for quantification of 2-Methyl-3-furanthiol and 2-furanmethanethiol in wines made from *Vitis vinifera* grape varieties, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 29–33, https://doi.org/10.1021/jf050970b.
[51] D.L. Capone, A. Barker, P.O. Williamson, I.L. Francis, The role of potent thiols in chardonnay wine aroma: potent thiols in chardonnay wine, Aust. J. Grape Wine Res. 24 (2018) 38–50, https://doi.org/10.1111/ajgw.12294.
[52] C. Camarasa, M. Ugliano, M. Nikolantonaki, R. Schneider, F. Cavelier, F. Cha, I. Œnologue, S. Delpech, Devant le jury composé de, (n.d.) 210.
[53] N. Dulsat-Serra, B. Quintanilla-Casas, S. Vichi, Volatile thiols in coffee: A review on their formation, degradation, assessment and influence on coffee sensory quality, Food Res. Int. 89 (2016) 982–988, https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.008.
[54] M.-L.-K. Cibaka, J. Gros, S. Collin, Revue sur les analogies et les différences relevées entre un cône de houblon et une baie de raisin : arômes soufrés et azotés, Biotechnol. Agron. Soc. Environ. (2017) 16.
[55] M.N. Lund, M.L. Andersen, Detection of thiol groups in beer and their correlation with oxidative stability, J. Am. Soc. Brew. Chem. 69 (2011) 163–169, https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2011-0620-01.
[56] M.J. Wu, F.M. Clarke, P.J. Rogers, P. Young, N. Sales, P.J. O'Doherty, V. J. Higgins, Identification of a protein with antioxidant activity that is important for the protection against beer ageing, Int. J. Mol. Sci. 12 (2011) 6089–6103, https://doi.org/10.3390/ijms12096089.
[57] M.L. Andersen, M. Gundermann, B.P. Danielsen, M.N. Lund, Kinetic models for the role of protein thiols during oxidation in beer, J. Agric. Food Chem. 65 (2017) 10820–10828, https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05012.
[58] J.J. Baert, J. De Clippeleer, B. Jaskula-Goiris, F. Van Opstaele, G. De Rouck, G. Aerts, L. De Cooman, Further elucidation of beer flavor instability: the potential role of cysteine-bound aldehydes, J. Am. Soc. Brew. Chem. 73 (2015) 243–252, https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2015-0531-01.
[59] V. Ferreira, R. Lopez, The actual and potential aroma of winemaking grapes, Biomolecules 9 (2019) 818, https://doi.org/10.3390/biom9120818.
[60] A. Peña-Gallego, P. Hernández-Orte, J. Cacho, V. Ferreira, S-cysteinylated and s-glutathionylated thiol precursors in grapes A review, Food Chem. 131 (2012) 1–13, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.079.
[61] T. Dufourcq, R. Schneider, R. Renard, E. Serrano, Incidences du climat, du sol, de la date de récolte sur le potentiel aromatique du cépage Colombard en Gascogne Incidences of the climate, the soil, and the harvest date on Colombard aromatic potential in Gascony, in: 2006.Sun.

[62] X. Choné, Contribution à l'étude des terroirs de Bordeaux : étude des déficits hydriques modérés, de l'alimentation en azote et de leurs effets sur le potentiel aromatique des raisins de Vitis vinifera L. cv. Sauvignon blanc, These de doctorat, Bordeaux 2, 2001. http://www.theses.fr/2001BOR20917 (accessed February 10, 2022).

[63] D.W. Jeffery, Spotlight on varietal thiols and precursors in grapes and wines, Aust. J. Chem. 69 (2016) 1323, https://doi.org/10.1071/CH16296.

[64] C.P. des Gachons, Recherches sur le potentiel aromatique des raisins de Vitis vinifera L. Cv. Sauvignon blanc, Undefined. (2000). https://www.semanticscholar.org/paper/Recherches-sur-le-potentiel-aromatique-des-raisins-Gachons/2a22e8dc289dd395d257079e35f30dc7ee7923f6 (accessed February 10, 2022).

[65] I. Masneuf-Pomarède, M.-L. Murat, G. Naumov, T. Tominaga, D. Dubourdieu, Hybrids Saccharomyces cerevisiae X Saccharomyces bayanus var. uvarum having a high liberating ability of some sulfur varietal aromas of Vitis vinifera Sauvignon blanc wines, J. Int. Sci. Vigne Vin. 36 (2002) 205–212. 10.20870/oeno-one.2002.36.4.965.

[66] N. ANFANG, M. BRAJKOVICH, M. Goddard, Anfang N, Brajkovich M, Goddard MR.. Co-fermentation with Pichia kluyveri increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. Aust J Grape Wine R 15: 1-8, Aust. J. Grape Wine Res. 15 (2008) 1–8. 10.1111/j.1755-0238.2008.00031.x.

[67] N.N. Sazhina, Determination of antioxidant activity of various bioantioxidants and their mixtures by the amperometric method, Russ. J. Bioorganic Chem. 43 (2017) 771–775, https://doi.org/10.1134/S1068162017070147.

[68] N. Fu, H. Wang, M. Li, G. Zheng, H. Zhang, S. Liang, Spectrofluorimetric determination of thiols in biological samples with a new fluorescent probe 3-maleimidylbenzanthrone, Anal. Lett. 38 (2005) 791–802, https://doi.org/10.1081/AL-200051025.

[69] L. Kukoc-Modun, M. Biocic, N. Radić, Determination of penicillamine, tiopronin and glutathione in pharmaceutical formulations by kinetic spectrophotometry, Acta Pharm. 71 (2021) 619–630, https://doi.org/10.2478/acph-2021-0038.

[70] H. Häkkinen, The gold–sulfur interface at the nanoscale, Nat. Chem. 4 (2012) 443–455, https://doi.org/10.1038/nchem.1352.

[71] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, Chem. Rev. 105 (2005) 1103–1170, https://doi.org/10.1021/cr0300789.

[72] E.C. Kritzinger, F.F. Bauer, W.J. du Toit, Role of glutathione in winemaking: A review, J. Agric. Food Chem. 61 (2013) 269–277, https://doi.org/10.1021/Jf303665z.

[73] S. Melnyk, M. Pogribna, I. Pogribny, R.J. Hine, S.J. James, A new HPLC method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma aminothiols using coulometric electrochemical detection11This work was funded by a grant from the FDA-Office of Women's Health, J. Nutr. Biochem. 10 (1999) 490–497, https://doi.org/10.1016/S0955-2863(99)00033-9.

[74] L. Mateo-Vivaracho, J. Zapata, J. Cacho, V. Ferreira, Analysis, occurrence, and potential sensory significance of five polyfunctional mercaptans in white wines, J. Agric. Food Chem. 58 (2010) 10184–10194, https://doi.org/10.1021/jf101095a.

[75] D.L. Capone, R. Ristic, K.H. Pardon, D.W. Jeffery, Simple quantitative determination of potent thiols at ultratrace levels in wine by derivatization and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) analysis, Anal. Chem. 87 (2015) 1226–1231, https://doi.org/10.1021/ac503883s.

[76] D. Giustarini, A. Milzani, I. Dalle-Donne, R. Rossi, Detection of S-nitrosothiols in biological fluids: A comparison among the most widely applied methodologies, J. Chromatogr. B. 851 (2007) 124–139, https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.031.

[77] A. Roland, S. Delpech, L. Dagan, M.-A. Ducasse, F. Cavelier, R. Schneider, Innovative analysis of 3-mercaptohexan-1-ol, 3-mercaptohexylacetate and their corresponding disulfides in wine by stable isotope dilution assay and nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A. 1468 (2016) 154–163, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.09.043.

[78] C. Bayle, C. Issac, R. Salvayre, F. Couderc, E. Caussé, Assay of total homocysteine and other thiols by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection: II. Pre-analytical and analytical conditions, J. Chromatogr. A 979 (2002) 255–260, https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01504-2.

[79] E. Camera, M. Rinaldi, S. Briganti, M. Picardo, S. Fanali, Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App. 757 (2001) 69–78, https://doi.org/10.1016/s0378-4347(01)00081-0.

[80] A.F. Loughlin, G.L. Skiles, D.W. Alberts, W.H. Schaefer, An ion exchange liquid chromatography/mass spectrometry method for the determination of reduced and oxidized glutathione and glutathione conjugates in hepatocytes, J. Pharm. Biomed. Anal. 26 (2001) 131–142, https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00402-2.

[81] C. Muscari, M. Pappagallo, D. Ferrari, E. Giordano, C. Capanni, C.M. Caldarera, C. Guarnieri, Simultaneous detection of reduced and oxidized glutathione in tissues and mitochondria by capillary electrophoresis, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App. 707 (1998) 301–307, https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00595-1.

[82] E. Beutler, O. Duron, B.M. Kelly, Improved method for the determination of blood glutathione, J. Lab. Clin. Med. 61 (1963) 882–888.

[83] M. Nikolantonaki, Identification of adducts between an odoriferous volatile thiol and oxidized grape phenolic compounds: kinetic study of adduct formation under chemical and enzymatic oxidation conditions | journal of agricultural and food chemistry, J. Agric. Food Chem. 2647–2656 (2012).

[84] T. ToMINAGA, Identification de l'acetate de 3-mercaptohexanol, compose aforte odeur de buis, intervenant dans l'arome des vins de Sauvignon, (n.d.) 4.

[85] S. Bailly, V. Jerkovic, J. Marchand-Brynaert, S. Collin, Aroma extraction dilution analysis of sauternes wines. key role of polyfunctional thiols, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 7227–7234, https://doi.org/10.1021/jf060814k.

[86] A.M. Svardal, M.A. Mansoor, P.M. Ueland, Determination of reduced, oxidized, and protein-bound glutathione in human plasma with precolumn derivatization with monobromobimane and liquid chromatography, Anal. Biochem. 184 (1990) 338–346, https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90691-2.

[87] J. Oliver Sass, W. Endres, Quantitation of total homocysteine in human plasma by derivatization to its N(O, S)-propoxycarbonyl propyl ester and gas chromatography–mass spectrometry analysis, J. Chromatogr. A 776 (1997) 342–347, https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00080-7.

[88] M. Koller, H. Eckert, Derivatization of peptides for their determination by chromatographic methods, Anal. Chim. Acta. 352 (1997) 31–59, https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00321-8.

[89] E. Sarrazin, S. Shinkaruk, T. Tominaga, B. Bennetau, E. Frérot, D. Dubourdieu, Odorous impact of volatile thiols on the aroma of young botrytized sweet wines: identification and quantification of new sulfanyl alcohols, J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 1437–1444, https://doi.org/10.1021/jf062582v.

[90] P. Monostori, Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review - PubMed, J. Chromatogr. B. 877 (2009) 3331–3346, https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.016.

[91] S.-C. Liang, H. Wang, Z.-M. Zhang, X. Zhang, H.-S. Zhang, Direct spectrofluorimetric determination of glutathione in biological samples using 5-maleimidyl-2-(m-methylphenyl) benzoxazole, Anal. Chim. Acta 451 (2002) 211–219, https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01409-X.

[92] T. Inoue, J.R. Kirchhoff, Electrochemical detection of thiols with a coenzyme pyrroloquinoline quinone modified electrode, Anal. Chem. 72 (2000) 5755–5760, https://doi.org/10.1021/ac000716c.

[93] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, Arch. Biochem. Biophys. 82 (1959) 70–77, https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6.

[94] K. Kowalska, M. Zalewska, H. Milnerowicz, The application of capillary electrophoresis in the determination of glutathione in healthy women's blood, J. Chromatogr. Sci. 53 (2015) 353–359, https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu035.

[95] K. Ngamchue, Rapid method for the quantification of reduced and oxidized glutathione in human plasma and saliva | analytical chemistry, Anal. Chem. 89 (2017) 2901–2908, https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04186.

[96] X. Dai, Z.-F. Du, L.-H. Wang, J.-Y. Miao, B.-X. Zhao, A quick response fluorescent probe based on coumarin and quinone for glutathione and its application in living cells, Anal. Chim. Acta 922 (2016) 64–70, https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.04.003.

[97] N. Nehra, V.D. Ghule, R.K. Tittal, Simpler fluorescent probe for homocysteine selective detection, J. Mol. Struct. 1250 (2022), 131755, https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131755.

[98] D. Fracassetti, N. Lawrence, A.G.J. Tredoux, A. Tirelli, H.H. Nieuwoudt, W.J. Du Toit, Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method, Food Chem. 128 (2011) 1136–1142, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.001.

[99] R. Głowacki, J. Stachniuk, K. Borowczyk, H. Jakubowski, Quantification of homocysteine and cysteine by derivatization with pyridoxal 5'-phosphate and hydrophilic interaction liquid chromatography, Anal. Bioanal. Chem. 408 (2016) 1935–1941, https://doi.org/10.1007/s00216-016-9308-3.

[100] W. Jin, X. Li, N. Gao, Simultaneous determination of tryptophan and glutathione in individual rat hepatocytes by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection at a carbon fiber bundle−Au/Hg dual electrode, Anal. Chem. 75 (2003) 3859–3864, https://doi.org/10.1021/ac0207022.

[101] J. Hodáková, J. Preisler, F. Foret, P. Kubáň, Sensitive determination of glutathione in biological samples by capillary electrophoresis with green (515nm) laser-induced fluorescence detection, J. Chromatogr. A 1391 (2015) 102–108, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.062.

[102] C. Hellmuth, B. Koletzko, W. Peissner, Aqueous normal phase chromatography improves quantification and qualification of homocysteine, cysteine and methionine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. B 879 (2011) 83–89, https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.016.

[103] Z. Sun, N. Yang, C. Liu, R.S.T. Linforth, X. Zhang, I.D. Fisk, Aroma binding and stability in brewed coffee: a case study of 2-furfurylthiol, Food Chem. 295 (2019) 449–455, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.175.

[104] T. Tominaga, G. Guimbertau, D. Dubourdieu, Contribution of benzenemethanethiol to smoky aroma of certain vitis vinifera L. Wines, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 1373–1376, https://doi.org/10.1021/jf020756c.

[105] M.A. Raggi, R. Mandrioli, F. Bugamelli, C. Sabbioni, Comparison of analytical methods for quality control of pharmaceutical formulations containing glutathione, Chromatographia 46 (1997) 17–22, https://doi.org/10.1007/BF02490925.

[106] Z. Sun, K. Hayat, J. Yu, E. Karangwa, E. Duhoranimana, X. Zhang, S. Xia, Quantification of free 2-furfurylthiol in coffee brew using a prefabricated coffee model, Food Anal. Methods 11 (2018) 654–662, https://doi.org/10.1007/s12161-017-1034-8.

[107] B. Fedrizzi, G. Versini, I. Lavagnini, D. Badocco, G. Nicolini, F. Magno, Hyphenated gas chromatography–mass spectrometry analysis of 3-mercapto-hexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in wine, Anal. Chim. Acta 621 (2008) 38–43, https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.10.040.

[108] B. Fedrizzi, G. Versini, I. Lavagnini, G. Nicolini, F. Magno, Gas chromatography–mass spectrometry determination of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in wine: a comparison of headspace solid phase microextraction and solid phase extraction methods, Anal. Chim. Acta 596 (2007) 291–297, https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.007.
[109] P. Darriet, T. Tominaga, V. Lavigne, J.-N. Boidron, D. Dubourdieu, Identification of a powerful aromatic component of Vitis vinifera L. var. sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, Flavour, Fragr. J. 10 (1995) 385–392, https://doi.org/10.1002/ffj.2730100610.
[110] M. Ahmed, S.M. Youssef, H.S. El-Sayed, H.H. El-Sayed, F.M. Salama, M.H. Assem, Abd El-Salam, Novel bionanocomposite materials used for packaging skimmed milk acid coagulated cheese (Karish), Int. J. Biol. Macromol. 115 (2018) 1002–1011, https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.165.
[111] S. Jaworski, M. Wierzbicki, E. Sawosz, A. Jung, G. Gielerak, J. Biernat, H. Jaremek, W. Łojkowski, B. Woźniak, J. Wojnarowicz, L. Stobiński, A. Małolepszy, M. Mazurkiewicz-Pawlicka, M. Łojkowski, N. Kurantowicz, A. Chwalibog, Graphene oxide-based nanocomposites decorated with silver nanoparticles as an antibacterial agent, Nanoscale Res. Lett. 13 (2018) 116, https://doi.org/10.1186/s11671-018-2533-2.
[112] M. Kachoei, A. Nourian, B. Divband, Z. Kachoei, S. Shirazi, Zinc-oxide nanocoating for improvement of the antibacterial and frictional behavior of nickel-titanium alloy, Nanomed 11 (2016) 2511–2527, https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0171.
[113] M.A. Yassin, T.A. Elkhooly, S.M. Elsherbiny, F.M. Reicha, A.A. Shokeir, Facile coating of urinary catheter with bio–inspired antibacterial coating, Heliyon 5 (2019), https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02986.
[114] S. Azlin-Hasim, M.C. Cruz-Romero, M.A. Morris, E. Cummins, J.P. Kerry, Spray coating application for the development of nanocoated antimicrobial low-density polyethylene films to increase the shelf life of chicken breast fillets, Food Sci. Technol. Int. Cienc. Tecnol. Los Aliment. Int. 24 (2018) 688–698, https://doi.org/10.1177/1082013218789224.
[115] W. Niu, X. Li, S.K. Karuturi, D.W. Fam, H. Fan, S. Shrestha, L.H. Wong, A.I.Y. Tok, Applications of atomic layer deposition in solar cells, Nanotechnology 26 (2015), 064001, https://doi.org/10.1088/0957-4484/26/6/064001.
[116] X. Meng, X.-Q. Yang, X. Sun, Emerging applications of atomic layer deposition for lithium-ion battery studies, Adv. Mater. Deerfield Beach Fla 24 (2012) 3589–3615, https://doi.org/10.1002/adma.201200397.
[117] G.Z. Tsogas, F.A. Kappi, A.G. Vlessidis, D.L. Giokas, Recent advances in nanomaterial probes for optical biothiol sensing: a review, Anal. Lett. 51 (2018) 443–468, https://doi.org/10.1080/00032719.2017.1329833.
[118] J. Kubavat, J. Thakarda, T. Tyagi, S. Bhowmik, P. Maity, Selective sensing of thiols by aryl iodide stabilized fluorescent gold cluster through turn-off excimer emission caused by ligand displacement, J. Chem. Sci. 133 (2021) 72, https://doi.org/10.1007/s12039-021-01944-z.
[119] Y. He, L. Zheng, Gold nanoparticle-catalyzed clock reaction of methylene blue and hydrazine for visual chronometric detection of glutathione and cysteine, ACS Sustain. Chem. Eng. 5 (2017) 9355–9359, https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b02391.
[120] M.J. Farrell, R.J. Reaume, A.K. Pradhan, Visual detection of denatured glutathione peptides: a facile method to visibly detect heat stressed biomolecules, Sci. Rep. 7 (2017) 2604, https://doi.org/10.1038/s41598-017-02899-3.
[121] Y.-L. Cao, Y. Li, F. Zhang, J.-Z. Huo, X.-J. Zhao, Highly sensitive 'naked-eye' colorimetric detection of thiourea using gold nanoparticles, Anal. Methods 7 (2015) 4927–4933, https://doi.org/10.1039/C5AY00558B.
[122] S. Jongjinakool, K. Palasak, N. Bousod, S. Teepoo, Gold nanoparticles-based colorimetric sensor for cysteine detection, Energy Procedia 56 (2014) 10–18, https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.07.126.
[123] Q. Qian, J. Deng, D. Wang, L. Yang, P. Yu, L. Mao, Aspartic acid-promoted highly selective and sensitive colorimetric sensing of cysteine in rat brain, Anal. Chem. 84 (2012) 9579–9584, https://doi.org/10.1021/ac3024608.
[124] M. Li, S. Mao, S. Wang, H.-F. Li, J.-M. Lin, Chip-based SALDI-MS for rapid determination of intracellular ratios of glutathione to glutathione disulfide, Sci. China Chem. 62 (2019) 142–150, https://doi.org/10.1007/s11426-018-9327-7.
[125] D. Wan, M. Gao, Y. Wang, P. Zhang, X. Zhang, A rapid and simple separation and direct detection of glutathione by gold nanoparticles and graphene-based MALDI–TOF-MS, J. Sep. Sci. 36 (2013) 629–635, https://doi.org/10.1002/jssc.201200766.
[126] O. Mompó-Roselló, M. Vergara-Barberán, E.F. Simó-Alfonso, J.M. Herrero-Martínez, In syringe hybrid monoliths modified with gold nanoparticles for selective extraction of glutathione in biological fluids prior to its determination by HPLC, Talanta 209 (2020), 120566, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120566.
[127] M. Berthou, A. Pallotta, J. Beurton, T. Chaigneau, A. Athanassiou, C. Marcic, E. Marchioni, A. Boudier, I. Clarot, Gold nanostructured membranes to concentrate low molecular weight thiols, a proof of concept study, J. Chromatogr. B 1198 (2022), 123244, https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123244.
[128] V. Baldim, A. Ismail, P. Taladriz-Blanco, S. Griveau, M.G. de Oliveira, F. Bedioui, Amperometric quantification of s-nitrosoglutathione using gold nanoparticles: a step toward determination of s-nitrosothiols in plasma, Anal. Chem. 88 (2016) 3115–3120, https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04035.
[129] M. Markina, N. Stozhko, V. Krylov, M. Vidrevich, K.h. Brainina, Nanoparticle-based paper sensor for thiols evaluation in human skin, Talanta 165 (2017) 563–569, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.012.
[130] C.-C. Shen, W.-L. Tseng, M.-M. Hsieh, Selective extraction of thiol-containing peptides in seawater using Tween 20-capped gold nanoparticles followed by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence, J. Chromatogr. A 1220 (2012) 162–168, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.11.057.
[131] C.-W. Chang, W.-L. Tseng, Gold nanoparticle extraction followed by capillary electrophoresis to determine the total, free, and protein-bound aminothiols in plasma, Anal. Chem. 82 (2010) 2696–2702, https://doi.org/10.1021/ac902342c.
[132] Y. Zhang, W. Chen, Y. Zhang, Y. Zhang, L. Zhu, P. He, Q. Wang, Sensitive analysis of reduced glutathione in bacteria and HaCaT cells by capillary electrophoresis via online pre-concentration of transient trapping combined with the dynamic pH junction mode, New J. Chem. 41 (2017) 12920–12929, https://doi.org/10.1039/C7NJ02184D.
[133] M. Wang, Z. Chen, X. Jing, H. Zhou, Y. Wang, J. Ye, Q. Chu, Tween 20-capped gold nanoparticles for selective extraction of free low-molecular-weight thiols in saliva followed by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, J. Chromatogr. B 1176 (2021), 122756, https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122756.
[134] A. Çifteci, S.E. Çelik, R. Apak, Gold-nanoparticle based turn–on fluorometric sensor for quantification of sulfhydryl and disulfide forms of biothiols: measurement of thiol/disulfide homeostasis, Anal. Lett. 55 (2022) 648–664, https://doi.org/10.1080/00032719.2021.1958830.
[135] J. Ju, R. Zhang, W. Chen, Photochemical deposition of surface-clean silver nanoparticles on nitrogen-doped graphene quantum dots for sensitive colorimetric detection of glutathione, Sens. Actuat. B Chem. 228 (2016) 66–73, https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.007.
[136] A. Kapur, Self-assembled gold nanoparticle-fluorescent protein conjugates as platforms for sensing thiolate compounds via modulation of energy transfer quenching | bioconjugate chemistry, Bioconjug. Chem. 28 (2017) 678–687, https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00006.
[137] Y.-L. Luo, X.-C. Huang, W.-M. Tu, H.-Y. Hsu, Differential in situ sensing of extra- and intracellular glutathione by a novel redox-responsive silica matrix-Au nanoprobe, Anal. Chim. Acta 902 (2016) 196–204, https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.018.
[138] H.-Q. Chen, F. Yuan, L. Wang, Simple and sensitive turn-on luminescent detection of biothiols based on energy transfer between green-emitting upconversion nanocrystals and gold nanoparticles, Anal. Methods 5 (2013) 2873, https://doi.org/10.1039/c3ay40105g.
[139] J. Xu, H. Yu, Y. Hu, M. Chen, S. Shao, A gold nanoparticle-based fluorescence sensor for high sensitive and selective detection of thiols in living cells, Biosens. Bioelectron. 75 (2016) 1–7, https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.007.
[140] A. Sangsuwan, B. Narupai, P. Sae-ung, S. Rodtamai, N. Rodthongkum, V. P. Hoven, Patterned poly(acrylic acid) Brushes containing gold nanoparticles for peptide detection by surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, Anal. Chem. 87 (2015) 10738–10746, https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00734.
[141] F. Ghasemi, M.R. Hormozi-Nezhad, M. Mahmoudi, A colorimetric sensor array for detection and discrimination of biothiols based on aggregation of gold nanoparticles, Anal. Chim. Acta 882 (2015) 58–67, https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.011.
[142] E. Jeyasekaran, S. Venkatachalam, Colorimetric detection of cysteine based on dispersion–aggregation mechanism of chitosan stabilized gold nanoparticles, Can. J. Chem. 97 (2019) 233–237, https://doi.org/10.1139/cjc-2018-0258.
[143] J. Wang, M. Jie, H. Li, L. Lin, Z. He, S. Wang, J.-M. Lin, Gold nanoparticles modified porous silicon chip for SALDI-MS determination of glutathione in cells, Talanta 168 (2017) 222–229, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.041.
[144] Y. Chen, X. Qin, C. Yuan, Y. Wang, Switch on fluorescence mode for determination of L-cysteine with carbon quantum dots and Au nanoparticles as a probe, RSC Adv. 10 (2020) 1989–1994, https://doi.org/10.1039/C9RA09019C.
[145] S. Tanwar, B. Sharma, V. Kaur, T. Sen, White light emission from a mixture of silicon quantum dots and gold nanoclusters and its utilities in sensing of mercury ions and thiol containing amino acid, RSC Adv. 9 (2019) 15997–166. 10.1039/c9ra02012h.
[146] A.M. Hafez, B.W. Wenclawiak, Development of a new porous gold SPME fiber for selective and efficient extraction of dodecanethiol followed by GC–MS analysis, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 1753–1758, https://doi.org/10.1007/s00216-012-6580-8.
[147] A.M. Hafez, Q.T. Hua, M.S.S. Adam, Time-of-flight secondary ion mass spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry studies of alkanethiol self-assembled monolayers on nanoporous gold surfaces, Surf. Interface Anal. 53 (2021) 21–30, https://doi.org/10.1002/sia.6869.
[148] H. Zhang, Z. Jia, Development of fluorescent FRET probes for "Off-On" detection of L-cysteine based on gold nanoparticles and porous silicon nanoparticles in ethanol solution, Sensors 17 (2017) 520, https://doi.org/10.3390/s17030520.
[149] Y. Bu, G. Zhu, S. Li, R. Qi, G. Bhave, D. Zhang, R. Han, D. Sun, X. Liu, Z. Hu, X. Liu, Silver-nanoparticle-embedded porous silicon disks enabled SERS signal amplification for selective glutathione detection, ACS Appl. Nano Mater. 1 (2018) 410–417, https://doi.org/10.1021/acsanm.7b00290.
[150] C. Li, DNA-functionlized silver nanoclusters as label-free fluorescent probe for the highly sensitive detection of biothiols and acetylcholinesterase activity, (2017) 8.
[151] S. Hajizadeh, K. Farhadi, M. Forough, R. Molaei, Silver nanoparticles in the presence of Ca2+ as a selective and sensitive probe for the colorimetric detection of cysteine, Anal. Methods 4 (2012) 1747-, https://doi.org/10.1039/c2ay05848k.
[152] Y. Zhou, W. Huang, Y. He, pH-Induced silver nanoprism etching-based multichannel colorimetric sensor array for ultrasensitive discrimination of thiols, Sens. Actuat. B Chem. 270 (2018) 187–191, https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.05.025.

[153] Z. Wu, W. Li, J. Chen, C. Yu, A graphene quantum dot-based method for the highly sensitive and selective fluorescence turn on detection of biothiols, Talanta (2014), https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.065.
[154] J.Y. Liang, L. Han, S.G. Liu, Y.J. Ju, N.B. Li, H.Q. Luo, Carbon dots-based fluorescent turn off/on sensor for highly selective and sensitive detection of Hg2+ and biothiols, Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc. 222 (2019), 117260, https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117260.
[155] H. Fu, Z. Ji, X. Chen, A. Cheng, S. Liu, P. Gong, G. Li, G. Chen, Z. Sun, X. Zhao, F. Cheng, J. You, A versatile ratiometric nanosensing approach for sensitive and accurate detection of Hg2+ and biological thiols based on new fluorescent carbon quantum dots, Anal. Bioanal. Chem. 409 (2017) 2373–2382, https://doi.org/10.1007/s00216-017-0183-3.
[156] S. Chen, C.-H. Xu, Y.-L. Yu, J.-H. Wang, Multichannel fluorescent sensor array for discrimination of thiols using carbon dot–metal ion pairs, Sens. Actuat. B Chem. 266 (2018) 553–560, https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.174.
[157] A. Mehta, A. Mishra, S. Basu, Optical detection of thiol drugs by core-shell luminous carbon dots—gold nanoparticles system, Plasmonics (2018), https://doi.org/10.1007/s11468-018-0744-0.
[158] Z. Yan, X. Qu, Q. Niu, C. Tian, C. Fan, B. Ye, A green synthesis of highly fluorescent nitrogen-doped graphene quantum dots for the highly sensitive and selective detection of mercury(II) ions and biothiols, (2016). 10.1039/C5AY03208C.
[159] D. Wu, G. Li, X. Chen, N. Qiu, X. Shi, G. Chen, Z. Sun, J. You, Y. Wu, Fluorometric determination and imaging of glutathione based on a thiol-triggered inner filter effect on the fluorescence of carbon dots, Microchim. Acta 184 (2017) 1923–1931, https://doi.org/10.1007/s00604-017-2187-2.
[160] H. Xu, J. Xiao, B. Liu, S. Griveau, F. Bedioui, Enhanced electrochemical sensing of thiols based on cobalt phthalocyanine immobilized on nitrogen-doped graphene, Biosens. Bioelectron. 66 (2015) 438–444, https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.011.
[161] A.B. Ganganboina, A. Dutta Chowdhury, R. Doong, N-doped graphene quantum dots-decorated V2O5 nanosheet for fluorescence turn off–on detection of cysteine, ACS Appl. Mater. Interfaces 10 (2018) 614–624, https://doi.org/10.1021/acsami.7b15120.
[162] S. Dou, J. Du, Q. Zhu, Z. Wang, Y. Wang, Q. Chen, N. Lu, Au nanoparticles/ZnO nanorods as SALDI-MS substrate for on-plate enrichment and detection of glutathione in real samples, Sens. Actuat. B Chem. 335 (2021), 129709, https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129709.
[163] C.-K. Chiang, N.-C. Chiang, Z.-H. Lin, G.-Y. Lan, Y.-W. Lin, H.-T. Chang, Nanomaterial-based surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides and proteins, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 21 (2010) 1204–1207, https://doi.org/10.1016/j.jasms.2010.02.028.
[164] M. Sabela, S. Balme, M. Bechelany, J.-M. Janot, K. Bisetty, A review of gold and silver nanoparticle-based colorimetric sensing assays, Adv. Eng. Mater. 19 (2017) 1700270, https://doi.org/10.1002/adem.201700270.
[165] A. Pallotta, A. Boudier, B. Creusot, E. Brun, C. Sicard-Roselli, R. Bazzi, S. Roux, I. Clarot, Quality control of gold nanoparticles as pharmaceutical ingredients, Int. J. Pharm. 569 (2019), 118583, https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118583.
[167] K. Saha, S.S. Agasti, C. Kim, X. Li, V.M. Rotello, Gold nanoparticles in chemical and biological sensing, Chem. Rev. 112 (2012) 2739–2779, https://doi.org/10.1021/cr2001178.
[168] F. Gao, Q. Ye, P. Cui, X. Chen, M. Li, L. Wang, Selective "turn-on" fluorescent sensing for biothiols based on fluorescence resonance energy transfer between acridine orange and gold nanoparticles, Anal. Methods 3 (2011) 1180, https://doi.org/10.1039/c1ay05073g.
[169] M. Kiguchi, S. Miura, T. Takahashi, K. Hara, M. Sawamura, K. Murakoshi, Conductance of single 1,4-benzenediamine molecule bridging between Au and Pt electrodes, J. Phys. Chem. C 112 (2008) 13349–13352, https://doi.org/10.1021/jp806129u.
[171] L. Wei, Y. Song, P. Liu, K. Xuejun, Polystyrene nanofibers capped with copper nanoparticles for selective extraction of glutathione prior to its determination by HPLC, Microchim. Acta 185 (2018) 321, https://doi.org/10.1007/s00604-018-2845-z.

Ainsi qu'il a été montré précédemment, les nanoparticules sont de plus en plus utilisées afin de créer des nanomatériaux dans le but d'identifier et de quantifier les thiols. En effet, ces molécules sont très réactives, présentes en faible concentration et dans des matrices complexes. Ces caractéristiques peuvent être en inadéquation avec les méthodes actuelles présentant des problèmes de sensibilité et de sélectivité, qui sont chronophages, utilisent des produits toxiques ou dangereux ou encore des appareillages couteux. La revue soumise montre la capacité des nanomatériaux à pallier ces différents problèmes. En effet, la comparaison à méthode analytique et détection équivalente, les nanomatériaux permettent de répondre aux différents inconvénients (tableau 1). Il apparait que l'usage de nanomatériaux permet une diminution de la LOD et une augmentation de la sélectivité et de la spécificité.

TABLEAU 1: APPORTS DES NANOMATERIAUX PAR RAPPORT AUX METHODES CLASSIQUES, POUR LA QUANTIFICATION DES THIOLS.

Analyte	Méthode classique	LOD (µM)	Inconvénient	Nanomatériaux	LOD (µM)	Apport	Réf
GSH/GSSG	Spectrophotométrie UV-vis	0.02	Méthode dérivative	Suivi en Spectrophotométrie UV-vis de l'agrégation des AuNP avec GSH	<0.5	Différenciation GSH / GSSG sans dérivation Meilleure LOD	[97,98]
Cys	Fluorimétrie	0.5	Chronophages (400 minutes)	Fluorimétrie : Recouvrement de fluorescence (en présence de Cys) de quantum dots quencher par AuNP.	0.012	25 minutes de prétraitement Meilleure LOD	[99,100]
GSH	HPLC détection UV-Vis	25	LOD non appropriée Méthode dérivative	Adsorption GSH sur nanofibres de polystyrène avec CuNP immobilisées. Désorption puis HPLC détection fluorescence	4.10^{-3}	Faible LOD	[101,102]

Ainsi, les nanomatériaux ont montré un réel intérêt dans la quantification de thiols. Cependant, comme le montre la revue, la majorité des méthodes décrites utilisent des

nanoparticules colloïdales qui présentent aussi des inconvénients. En effet, les nanoparticules en suspension ont une durée de stabilité limitée (inférieure à 3 semaine pour des nanoparticules d'or stabilisées par des ions citrate), sont très sensibles à leur environnement, peuvent nécessiter des étapes de traitement d'échantillon avant analyse et ne sont pas réutilisables. Le manque de stabilité oblige l'utilisation de ces nanomatériaux dans un laps de temps donné et nécessite de les synthétiser extemporanément. Cette réactivité est également une contrainte quant à l'utilisation de certaines matrices qui pourrait venir déstabiliser les nanoparticules et compromettre l'efficacité de la méthode. Enfin, comme il a été montré dans l'article 1, de nombreuses méthodes reposent sur l'agrégation des nanoparticules pour quantifier indirectement les thiols (notamment en spectrophotométrie UV-Vis ou fluorimétrie). Ainsi, ces méthodes sont à usage unique. Ceci est un frein à une industrialisation de la méthode pour une utilisation de routine. L'utilisation de méthodes basées sur l'utilisation de nanomatériaux est donc à nuancer puisque la réponse apportée aux méthodes dites classiques n'est pas entièrement satisfaisante.

L'utilisation de matériaux nanostructurés présente un réel avantage en termes de facilité d'utilisation, de traitement d'échantillon et de recyclage. En effet, ces dispositifs à base de nanomatériau permettent de s'affranchir des effets liés à la matrice mais également aux nanoparticules. Une fois immobilisées, les nanoparticules ne sont plus dépendantes de l'environnement et voient leur stabilité augmentée (de 3 semaines à plus d'un an [103]). Ces dispositifs représentent donc la stratégie la plus en adéquation avec la problématique liée aux thiols. Malgré cela, ces méthodes sont peu décrites dans la littérature, pour la quantification des thiols [104–106].

3. DEVELOPPEMENT DE MATERIAUX NANOSTRUCTURES

3.1. INTERETS DES MATERIAUX NANOSTRUCTURES

L'utilisation de nanomatériaux au service de ces dispositifs permet d'améliorer leurs performances en leur conférent de nouvelles propriétés directement liées aux nanoparticules utilisées [107–110]. Ces dispositifs sont appelés des dispositifs nanostructurés. Il convient dans un premier temps de définir ce terme comme étant un matériau dont au moins un des éléments constitutif à une de ses dimensions comprise entre 1 et 100 nm, selon la norme ISO TS/27687 [111,112]. Ces dispositifs présentent des comportements différents comparés à leur équivalent à l'échelle micro ou macroscopique. En effet, ils présentent une surface de contact nettement plus importante du fait du rapport surface/ volume élevé des nanoparticules. De plus, selon le choix du nanomatériau, ces dispositifs sont généralement plus réactifs ce qui a pour effet direct d'améliorer la limite de détection (LOD) des méthodes quantitatives associées. Enfin, les propriétés propres au nanomatériau permettent également d'augmenter les performances du dispositif. Par exemple, les nanotubes de carbones présentent de remarquables propriétés électroniques, mécaniques et structurales [113], les nanoparticules métalliques quant à elles, permettent une excellente conductivité [114]. Il est aussi possible de faire varier le ligand de surface des nanoparticules afin d'obtenir une interaction spécifique avec le ou les analyte(s) d'intérêt. Toutes ces propriétés ont pour but de créer des dispositifs innovants, plus sensibles et plus sélectifs que les matériaux de base.

L'étape clé dans la fabrication de ces dispositifs est l'incorporation des nanomatériaux au support ou au dispositif. C'est ce que l'on appelle la nanostructuration. Il existe plusieurs moyens de produire ces matériaux nanostructurés. La stratégie d'immobilisation utilisée dépend directement de la forme des nanoparticules (sphériques, cubiques, en bâtonnets, en étoile…), leur composition (organiques, métalliques, semi-conductrices…) ou l'uniformité du dépôt souhaitée. Les nanoparticules peuvent être divisées en deux groupes : organiques et inorganiques. Parmi les nanoparticules organiques, on peut citer les nanoparticules polymériques, les micelles, les liposomes ou encore les dendrimères. La famille des nanoparticules inorganiques comprend les nanoparticules de silice, les nanotubes de carbone, les quantum dots ou encore les nanoparticules métalliques (Or, argent, cuivre…).

Dans cette partie, différentes méthodes de dépôt vont être décrites. La méthode de nanostructuration se base soit sur un phénomène physique soit sur un phénomène

chimique. C'est cette dernière catégorie qui sera discutée puisque largement plus utilisée dans la litérature.

3.2. METHODES DE NANOSTRUCTURATION DE SURFACE

A) DIP-COATING

La méthode la plus simple à mettre en œuvre, mais également la moins couteuse, est la méthode dite de dip-coating [10]. Ce procédé largement utilisé dans les domaines de la santé et de l'agroalimentaire consiste à plonger le matériau dans une solution contenant entre autres des nanoparticules puis de le sécher afin d'obtenir une couche de dépôt auto assemblée appelé en anglais *Self Assembled Monolayer* (SAM). Cette méthode met en jeu un simple phénomène d'adsorption des molécules sur un substrat. Elle est donc simple et ne nécessite aucun appareillage spécifique.

B) LAYER-BY-LAYER

Le procédé dit *Layer-by-Layer* est également largement utilisé. Celui-ci consiste à immerger le matériau directement dans une solution contenant des polyélectrolytes anionique ou cationique pour conférer une charge de surface au matériau. Le matériau est ensuite plongé dans une solution de nanoparticules colloïdales afin de les y immobiliser par interactions ioniques avec la première couche. Enfin, une seconde couche de polyélectrolyte de charge opposée à la première est réalisée. Ces trois étapes sont réalisées plusieurs fois dans le but d'obtenir la densité d'immobilisation désirée. Des étapes de rinçage entre chaque solution sont réalisées dans le but d'éviter les contaminations.

Ce procédé est peu couteux et permet d'obtenir un dépôt homogène et applicable à un large panel de surfaces. Cependant, il est uniquement applicable aux nanoparticules

en suspension et est dépendant de la composition, de la concentration, de la force ionique et du pH des diverses solutions [9].

Les supports utilisables pour ce type de nanostructuration sont variés allant du métal aux polymères en passant par le verre mais encore quartz, silicone, etc. Ce large choix de supports est basé sur la condition d'avoir une surface capable de résister aux différents traitements appliqués lors de la nanostructuration (thermique, chimique, électrique …).

C) SPRAY-COATING

La méthode de *spray-coating* consiste à projeter par spray les nanoparticules sur le support désiré. On distingue les procédés thermiques avec un chauffage préalable des nanoparticules avant projection et les procédés non thermiques comme l'électrospray [11].

D) SPIN COATING

La technique de spin coating comporte 3 étapes : la première consiste à déposer la solution à immobiliser sur le support [12]. La seconde, permet d'étaler la solution grâce à la force centrifuge. Enfin, la dernière étape utilise la chaleur afin d'évaporer le solvant et d'engendrer une immobilisation des nanoparticules.

E) L'ELECTRODEPOT

L'électrodépôt, également connue sous le nom d'électrodéposition galvanique, est une technique de revêtement dans laquelle un métal ou un alliage est déposé à la surface d'un substrat [13]. Dans le cas qui nous intéresse, ce sont des nanoparticules magnétiques qui sont utilisées. Ce procédé nécessite deux électrodes dont une électrode

de travail et une contre électrode. Les électrodes sont ensuite trempées dans une solution contenant les nanoparticules et le matériau à nanostructuré activé par rinçage avec une solution choisie. Un champ électrique est ensuite appliqué afin d'immobiliser les nanoparticules.

Cette technique n'est applicable qu'aux nanoparticules métalliques et est dépendante du potentiel et du courant appliqué.

F) SOL-GEL PROCESS

Le procédé sol-gel permet de synthétiser du verre, de la céramique ainsi que des composés organo- minéraux à partir d'un précurseur en solution. Dans le cas des nanoparticules, celui-ci permet d'obtenir de fines couches de nanoparticules d'oxydes métalliques [115,116]. L'appellation sol-gel provient des termes « solution-gélification ». « Sol » réfère à une dispersion stable de nanoparticules colloïdales dans un liquide. Le « gel » est lui un réseau rigide et non déformable d'oxydes gonflés par le solvant et stabilisé par des liaisons chimiques type Van der Waals. Le procédé correspond donc au passage de « sol » en « gel ». Cette réaction est initiée par hydrolyse ce qui engendre la formation de groupes Métal-OH puis s'ensuit une condensation aboutissant à des liaisons métal-O-métal. Ce « gel » est finalement déposé sur le support souhaité et séché afin d'être immobilisé. On distingue deux voies : la voie inorganique avec pour précurseur un sel métalliques en solution aqueuse et la voie métallo-organique avec des précurseurs alcoxydes métalliques en solution organique.

Cette technique permet d'obtenir de fines couches de dépôts hautement poreux, rigide et thermiquement stable. Cependant, durant la phase de séchage, le dépôt rétrécit considérablement, ce qui fragilise le matériau [117].

Ce paragraphe montre les différentes manières de nanostructurer un support reposant sur des phénomènes chimiques ou physiques. Le choix de la méthode doit être en adéquation avec le matériau visé mais également les nanoparticules utilisées. Ces nanomatériaux représentent le point de départ de la nanostructuration.

3.3. NANOPARTICULES IMPLIQUEES DANS LA NANOSTRUCTURATION

Les avancées significatives dans le domaine des nanotechnologies ont permis le développement d'un grand nombre de nouveaux matériaux avec de nouvelles propriétés ou simplement menant à l'amélioration de propriétés déjà existantes. Les nanoparticules constituent l'élément de base de ces matériaux nanostructurés. Il existe une grande diversité de nanomatériaux utilisables pour cela avec des tailles et des formes diverses. Les plus utilisés et décrits sont les matériaux à base de nanoparticules métalliques ou de nanotubes de carbone. Les propriétés uniques de ces différents types de nanomatériaux leur confèrent de nouvelles caractéristiques optiques, catalytiques, électriques, magnétiques, thermiques, mécaniques ou diagnostiques. Ces caractéristiques rendent les nanomatériaux supérieurs et indispensables au développement de nouvelles sondes pour des applications biologiques, environnementales, etc. Ces applications qui en découlent sont principalement accès sur l'amplification du signal et la détection de molécules présentes en faible quantité. Le tableau 2 regroupe de manière non exhaustive différents exemples de matériaux nanostructurés utilisés à des fins analytiques. Il apparait que les nanomatériaux permettent d'atteindre des LOD intéressantes et sont applicables à un large panel de molécules.

TABLEAU 2 : EXEMPLES DE MATERIAUX NANOSTRUCTURES UTILISEES POUR LA QUANTIFICATION SPECIFIQUE D'ANALYTES.

Nanomatériau	Analyte	Principe	LOD	Réf
Nanotube de carbone	ADN, acide nucléique et purine	Immobilisation sur du verre de carbone pour une amplification du signal	100.10^{-6} nM	[118]
Nanoparticules d'argent	Glucose	Immobilisation sur une matrice de polystyrène. Activité catalytique des nanoparticules avec oxydation du glucose et suivi ampérométrique	5.10^{6} nM	[119]
CdSe/ZnS quantum dots	Morphine	Immobilisation sur membrane en nitrocellulose afin de marquer l'anticorps de la morphine	1 nM	[120]

Nanotubes de polymère (Polypyrrole fonctionnalisé par un acide carboxylique)	Thrombine	Immobilisation sur une micro électrode permettant une sélectivité pour la thrombine dans du plasma	50 nM	[121]
Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimère	Bactérie Gram +	Le dendrimère est fonctionnalisé pour être sélective des bactéries à gram +, analysée en turbidimétrie.	$2,3.10^6$ CFU/mL	[122]
Nanotubes de carbone fonctionnalisés par des micelles	Caféine	Immobilisation des nanotubes de carbone sur membrane en Nylon par dip-coating. Filtration de l'échantillon et adsorption de la caféine sur la membrane.	2 nM	[123]
Oxyde de Graphène	Atropine	Immobilisation sur un capillaire d'électrophorèse capillaire pour augmenter la sélectivité et la sensibilité.	2 µM	[124]

Ainsi, la diversité des applications précédemment décrites montre le champ immense de possibilité de nouveau matériaux. Les dispositifs nanostructurés présentent divers avantages par rapport à leur équivalent à l'état colloïdal notamment en termes de stabilité et de praticité. C'est ce type de dispositifs qui sera développé durant ce projet pour la capture sélective de thiols afin de répondre aux mieux aux lacunes des différentes méthodes décrites dans l'article 1. Pour cela, comme précisé précédemment, il faut définir une méthode de nanostructuration ainsi que le type de nanomatériaux utilisé.

4. HYPOTHESE DE TRAVAIL

L'objectif de ce travail est de quantifier les espèces thiolées contenues dans leur matrice d'origine (plasma, sang, boissons…). Cette quantification a été maintes fois décrite tout d'abord avec des méthodes classiques puis à l'aide de nanomatériaux. Ces méthodes souffrent des propriétés des thiols, à savoir une faible concentration, une stabilité dépendante de leur environnement et une haute réactivité. Une grande diversité de thiols existe rendant ainsi difficile la sélectivité au sein de ces matrices complexes. L'utilisation de nanomatériaux permet d'améliorer la sélectivité mais sont associés à d'autres problèmes liés aux nanoparticules elles-mêmes, tels que leur stabilité et les prés traitement associés. L'idée est donc de se servir des nanomatériaux et des avantages

associés en termes de sensibilité, sélectivité et spécificité tout en s'affranchissant des problèmes de stabilité. Pour cela, il est possible d'immobiliser ces nanoparticules sur un support afin d'augmenter leur stabilité et de les rendre indépendantes de l'environnement extérieur. L'intérêt d'un tel dispositif est de capturer spécifiquement ces thiols vis-à-vis d'autres molécules ne présentant pas ce groupement et pouvoir les identifier et quantifier (Figure 6). Le choix des AuNP semble le plus judicieux. En effet, la grande majorité des nanomatériaux utilisé pour la détection de thiols concerne les AuNP. Ce choix s'explique et se justifie par les interactions qu'il existe entre l'or (à l'état nanoparticulaire ou non) et la fonction thiol [125]. L'énergie liant ces deux groupements (40-50 kcal/mol [125]) est considérée comme covalente ou presque en fonction de la littérature. Ainsi, l'or semble un choix intéressant et son emploi à l'état nanoparticulaire et non macroscopique permet d'autres avantages. En effet, l'or à l'état nanométrique acquiert de nouvelles propriétés par rapport à l'or à l'échelle macroscopique [126] :

- Catalytiques dues aux phénomènes de surface (surface spécifique élevée)
- Optiques dues aux effets de confinement (résonance plasmonique de surface)
- Électroniques du fait du confinement quantique.
- De modification de surface par le biais de différents ligands.

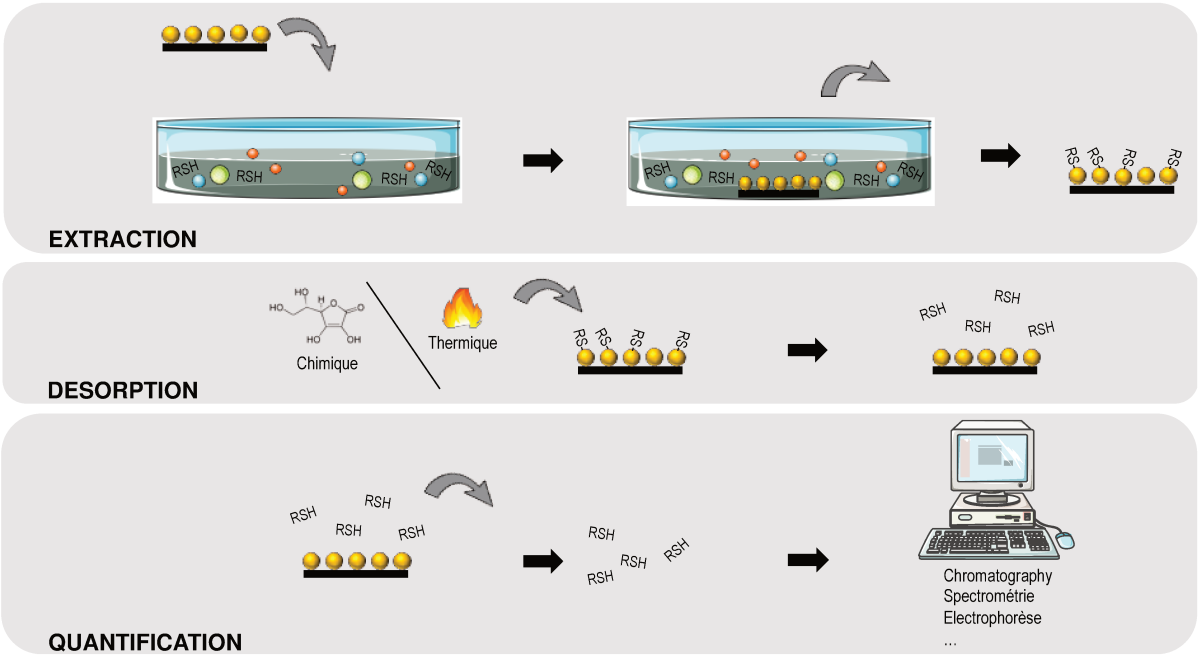


FIGURE 6: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DISPOSITIF NANOSTRUCTURE A BASE D'AUNP POUR LA CAPTURE ET L'ANALYSE SPECIFIQUE DE THIOLS.

En utilisant ces nanoparticules plutôt que l'or métallique, cela permettrait d'avoir un système spécifique des thiols au regard des autres molécules mais également d'obtenir une surface spécifique plus importante. Ceci génère un grand nombre de sites de liaison possible permettant une plus grande surface d'échange. Enfin, un des intérêts à utiliser l'or nanoparticulaire est le faible coût. En effet, les AuNP synthétisées au laboratoire sont, selon le mode de synthèse, moins onéreuses que l'or massif.

Ces AuNP constituent le cœur du dispositif nanostructuré. Les méthodes de nanostructuration pour développer le dispositif sont nombreuses comme le montre ce chapitre. Cette multiplicité est liée aux diverses possibilités de fonctionnalisation des AuNP. Parmi les méthodes décrites, la méthode du *layer-by-layer* est la plus utilisée car « simple » à mettre en œuvre, applicable à beaucoup de surface et permettant d'obtenir un dépôt homogène. C'est donc ce procédé qui sera adapté pour ce projet.

Le développement, la caractérisation ainsi que l'utilisation de ce dispositif à travers diverses applications seront développées dans les prochains chapitres.

CHAPITRE 2

1. LES SUPPORTS NANOSTRUCTURES

Au cours de ces dernières années, le nombre de publications décrivant l'incorporation de nanomatériaux dans différents domaines a augmenté de manière exponentielle. Les nanoparticules apparaissent en effet comme une réponse potentielle à certains problèmes des matériaux, capteurs ou sondes actuels en raison de leurs propriétés liées à l'échelle nanométrique. En effet, à ces tailles, les nanosystèmes peuvent présenter des propriétés intéressantes et utiles liées à leur surface spécifique, leur réactivité, leur stabilité, leur activité catalytique, leur biocompatibilité ou leur conductivité. Ainsi, la combinaison entre un matériau traditionnel et un nanomatériau permet d'offrir de nouvelles fonctionnalités au matériau d'origine. Pour cela, des progrès ont été faits afin de créer ce que l'on appelle des dispositifs nanostructurés [127].

L'arrivée de nouvelles propriétés dues à l'ajout de nanomatériaux à un matériau traditionnel a fait émerger de multitudes d'applications dans de nombreux domaines. Cela vient répondre à des problématiques non résolues par les méthodes traditionnelles ou simplement améliorer ce qui existe déjà. Les domaines d'applications sont variés allant du domaine agroalimentaire [128] au domaine médical [129] en passant par l'énergie [130]

L'un des principaux intérêts de l'utilisation de nanomatériau est d'augmenter les performances des méthodes analytiques actuelles pour la détection de molécules d'intérêt. Les applications qui en découlent sont fonctions des interactions qui existent entre l'analyte et les nanoparticules ou des propriétés intrinsèques aux nanoparticules. Parmi elles, on retrouve la Diffusion Raman Exaltée par Surface (SERS) utilisant des substrat nanostructurés, généralement métalliques (AuNP, AgNP ou CuNP) qui vont amplifier le signal des analytes faiblement concentrés [131,132]. Ces méthodes sont largement décrites et notamment pour la détection de petites molécules [133], d'oligonucléotides [134] et de protéines [135]. D'autres applications sont également largement décrites telles que l'utilisation de nanoparticules pour de la Résonance Plasmonique de Surface (SPR) [136], le revêtement de Microbalance à Cristal de Quartz (QCM) [137] ou encore l'immobilisation dans des barcodes moléculaires [138].

L'ensemble de ces systèmes tire profit des propriétés des nanoparticules afin de répondre à des exigences de plus en plus élevées concernant l'analyse de traces de macro et petites molécules. Ces nanocapteurs sont pour la plupart constitués de nanoparticules métalliques qui présentent des interactions lumière-matière intéressantes et des capacités à fixer spécifiquement certains types de ligands. Ceci permet le développement de nouvelles méthodes hautement sensibles et spécifiques.

Parmi les différentes applications décrites dans la littérature, il n'est pas rare de trouver des capteurs contenants des AuNP avec un ligand thiol pour la détection de molécules [139,140]. En effet, il est largement admis que l'interaction entre un groupement thiol et l'or (à l'état nanoparticulaire ou non) met en jeu une énergie de liaison proche de celle d'une liaison covalente (30-40 kcal/mol) [125]. La nature de la liaison Au-S a beaucoup été étudiée [125,141–143] et beaucoup d'applications en découlent. Celles-ci décrivent l'utilisation d'un ligand thiol qui va lier de façon quasi covalente les AuNP afin de créer une plateforme permettant la détection de molécules. C'est le choix du ligand thiol qui va conditionner l'application et notamment l'analyte ciblé. Les thiols peuvent également servir de point d'ancrage dans le but d'immobiliser les AuNP au sein du dispositif [144]. Il est cependant beaucoup plus anecdotique de trouver des dispositifs nanostructurés pour la détection de molécules thiolées. En effet, bien que la détection de ces molécules à l'aide de nanoparticules colloïdales soit largement développée (article 1 Chapitre 1), peu d'articles utilisent des matériaux nanostructurés.

Ce chapitre décrit le développement d'un dispositif nanostructuturé afin de répondre à cette problématique de quantification et d'identifications de molécules thiolées. Ce dispositif immobilise des AuNP au sein d'un dispositif en cellulose régénérée afin de détecter, de manière spécifique et sans pré-traitement, des thiols contenus dans différentes matrices, notamment biologiques (plasma de rat). Le dispositif sera aussi testé vis-à-vis de *S*-nitrosothiols afin d'étudier son comportement avec une molécule thiolée dont la fonction sulfhydrile serait déjà engagée dans une autre liaison de plus faible affinité. Ceci afin, dans un second temps, d'obtenir des éléments de réponse à la problématique des donneurs de NO décrite au chapitre 1.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. NANOPARTICULES D'OR

L'un des éléments essentiels de ce dispositif et qui en constitue la matière première sont les AuNP. Ces nanoparticules peuvent être synthétisées de différentes façons ou même achetées directement dans le commerce. De nombreuses méthodes de préparation des AuNP ont été rapportées, incluant à la fois des approches "*top-down*" (manipulation physique) et "*bottom-up*" (transformation chimique) [145]. La réduction chimique de sels d'or en présence d'agents stabilisateurs, pour générer des colloïdes d'or à l'état rédox (0) dans des milieux aqueux ou organiques, est l'une des méthodes de synthèse les plus courantes [146].

2.1.1. SYNTHESE

Parmi l'ensemble des ligands décrits pour la stabilisation des AuNP, les ions citrates sont les plus communément utilisés du fait de la simplicité du procédé de synthèse. La méthode a été mise au point par John Turkevich *et al.* en 1951 [147]. Celle-ci permet d'obtenir de manière simple des nanoparticules colloïdales sphériques de taille contrôlée en milieu aqueux. Le principe de ce protocole repose sur une réaction de cristallisation. Pour cela, un sel précurseur d'Au(III) est solubilisé dans l'eau sous la forme d'un complexe $[AuCl_4]^-$ auquel on ajoute des ions citrates afin de réduire Au(III) en Au(0). Ce phénomène d'oxydoréduction permet d'obtenir l'or à son état d'oxydation nul.

Le protocole de synthèse utilisé dans ce projet et maitrisé au sein du laboratoire est une adaptation du protocole de Turkevich. En effet, le stabilisant et le réducteur sont deux molécules distinctes. Le citrate de sodium (2,4 mmol) est utilisé comme stabilisant du sel d'or puis la réduction d'Au(III) (12,7 µmol) en Au(0) est obtenue par ajout de

borohydrure de sodium ($NaBH_4$, n = 20,0 µmol) (Figure 7). La réaction est effectuée sous atmosphère inerte (N_2) dans un réacteur de forme cylindrique (schlenk) avec une agitation de 250 rpm.

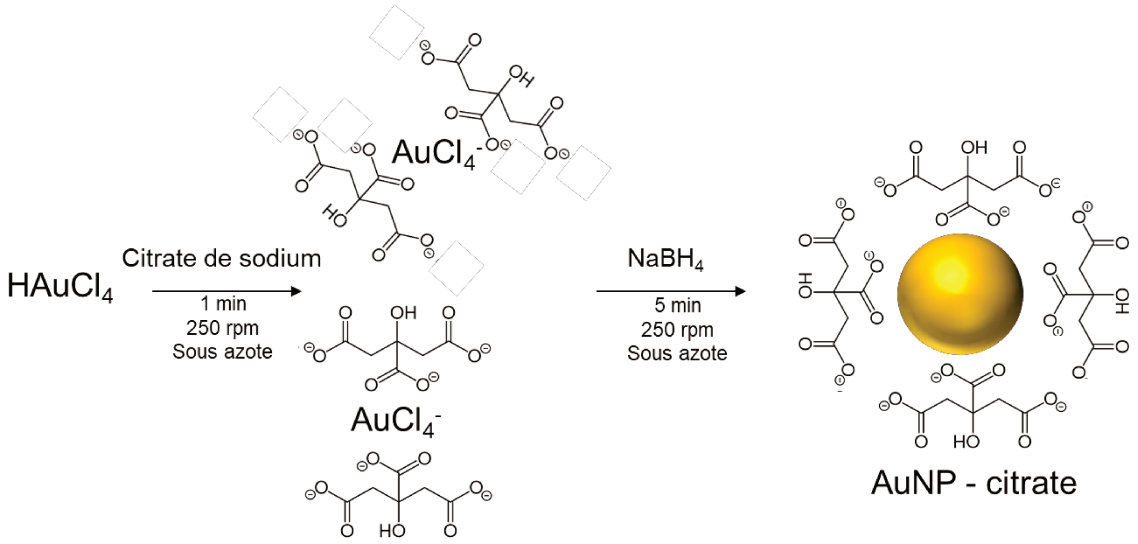


FIGURE 7: SYNTHESE DE NANOPARTICULES D'OR.

2.1.2. CARACTERISATION

Les AuNP colloïdales ainsi obtenues sont contrôlées et caractérisées à travers la mesure de différents paramètres physicochimiques :

- L'existence d'une bande de résonance plasmonique par mesure de l'absorbance de la solution d'AuNP en spectrophotométrie UV-Vis. Cette bande plasmon correspond à la longueur d'onde pour laquelle l'absorbance est la plus importante (λ_{max}), elle dépend de la taille des nanoparticules et est corrélée à la concentration (Figure 8A).
- Le diamètre hydrodynamique (D_h) des nanoparticules par mesure de la diffusion dynamique de la lumière (DLS) (Figure 8C). Ce D_h correspond au diamètre du corps métallique de la NP, son ligand et la couche de solvatation associée. La mesure se fait par mesure de la diffraction de la lumière par les nanoparticules du fait du mouvement brownien qui les animent. Selon la taille des NP, la lumière va

diffuser différemment. L'équation de Stokes-Einstein permet de relier le D_h de la nanoparticule à son coefficient de diffusion. Le résultat obtenu peut être exprimé selon 3 modes : en intensité, en nombre et en taille. Ceci permet une allure du profil de distribution des tailles des particules. La distribution fondamentale de taille obtenue par DLS est une distribution en intensité qui peut être ensuite convertie en une distribution en volume grâce à la théorie de Mie, puis en une distribution en nombre, ceci à condition de travailler avec des particules sphériques.

- Le diamètre de cœur (D_c) est obtenu par microscopie électronique à transmission et correspond au diamètre du cœur métallique dû uniquement à l'or (Figure 8B).
- Le potentiel zêta par électrophorèse laser Doppler, couplée à la DLS. Ce potentiel rend compte de la charge des nanoparticules, dû dans le cas des AuNP-citrate, aux charges négatives conférées par les ions citrates (Figure 8D). La mesure de cette charge consiste à soumettre les nanoparticules à un courant électrique qui va induire leur migration vers l'anode.

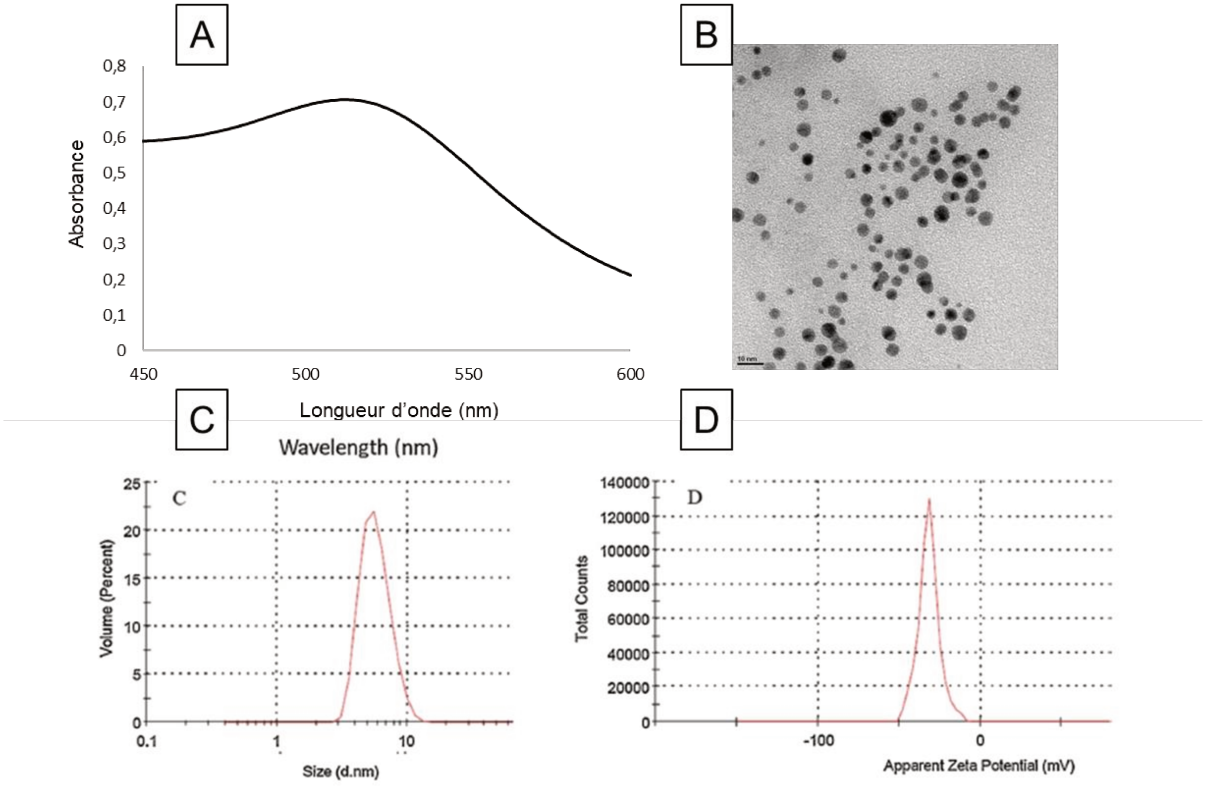


FIGURE 8: CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES AUNP COLLOÏDALE PAR SPECTROPHOTOMETRIE (A), TEM (B), DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE (C) ET ELECTROPHORESE LASER A EFFET DOPPLER (D).

La conformité des lots d'AuNP repose sur la mesure de ces paramètres (SPR, potentiel zêta et D_h et D_c) et leur conformité vis-à-vis des spécifications mises en place au sein du laboratoire tableau 3 [103]. Pour cela, les différents lots d'AuNP synthétisés sont contrôlés avec les techniques décrites précédemment (tableau 3). Une fois jugées conformes, elles peuvent être utilisées. Comparés aux spécifications, les lots utilisés présentent un potentiel zêta supérieur mais ceci n'influe pas sur l'efficacité de nanostructuration puisque les résultats obtenus sont reproductibles.

TABLEAU 3: CONTROLE QUALITE DES AUNP (EVALUE SUR 147 LOTS) PAR RAPPORT AUX SPECIFICATIONS MISES EN PLACE AU LABORATOIRE [103].

		Spécifications	Lots utilisés
Longueur d'onde de la SPR λ_{max} (nm)		514,0 ± 1.,	512,0 ± 2,0
Potentiel zêta (mV)		-32,6 ± 0,7	-20,0 ± 7,0
D_h (nm)	**Volume**	6,5 ± 0,9	6,2 ± 1,3
	Nombre	Non défini	5,2 ± 1,1
	Intensité	Non défini	7,1 ± 1,0
Diamètre de cœur (nm)		5,3 ± 1,1	

Ces AuNP constituent la matière première essentielle à la construction du dispositif nanostructuré. Celles-ci, une fois synthétisées et contrôlées seront immobilisées au sein du support choisi.

2.2. NANOSTRUCTURATION DES MEMBRANES

La création du dispositif nanostructuré nécessite des AuNP, un support sur lequel elles seront immobilisées ainsi qu'une technique de nanostructuration adaptée. Ces trois éléments sont détaillés ci-dessous.

2.2.1. LES MEMBRANES

Les membranes utilisées pour la nanostructuration sont composées d'une membrane en cellulose régénérée (Chromafil®) insérée dans un dispositif filtre seringue en polypropylène, le tout provenant de chez Macherey-Nagel. Les caractéristiques des membranes sont un diamètre de 2,2 cm pour une surface de 3,8 cm² (Figure 9). La porosité peut varier de 0,20 à 5,00 µm. Les filtres ont une capacité volumique, c'est-à-dire une contenance maximale, de 500 µL qui est fixé comme volume de travail pour l'ensemble de ce projet.

FIGURE 9: MEMBRANE EN CELLULOSE REGENEREE UTILISEE POUR LA NANOSTRUCTURATION.

Différentes porosités ont été étudiées : 0,20 µm, 0,45 µm, 0,80 µm, 1,20 µm et 5,00 µm.

2.2.2. LES NANOPARTICULES D'OR

Les nanoparticules synthétisées au sein du laboratoire sont stabilisées par des ions citrates, leur conférant une charge globale de surface négative (-20 ± 7 mV). La concentration des nanoparticules est calculée à partir de l'absorbance de leur bande plasmonique de surface grâce à la loi de beer Lambert et connaissant le coefficient d'absorbance molaire des AuNP (ε = 1.2 10^5 $M^{-1}.cm^{-1}$) [148]. Ainsi, sur l'ensemble des

147 lots synthétisés, la concentration moyenne en AuNP était de 58,9 ± 5,6 nM. Ces nanoparticules ont une stabilité d'environ 1 mois qui peut être augmenté à plus d'un an lorsqu'elles sont immobilisées sur un support, comme cela a déjà été démontré [149]. Ainsi, l'immobilisation permet d'une part d'augmenter la stabilité des AuNP mais également de s'affranchir des contraintes liées à l'environnement qui peuvent nuire, notamment en termes de méthodologie analytique.

2.2.3. Conditions de Nanostructuration

La procédure d'immobilisation utilisée est dérivée de la technique layer-by-layer décrite au chapitre 1. En effet, la technique du layer-by-layer est une succession de dépôts d'électrolytes aux charges opposées. Dans le cadre de ce projet, l'objectif est d'immobiliser le plus d'AuNP possible, l'ajout de plusieurs couches de polymère augmenterait le nombre d'AuNP au sein des couches mais rendrait inaccessible les précédents dépôts d'AuNP [149]. Celles-ci seraient donc non disponibles pour fixer de thiols. Ainsi, une seule couche de polyélectrolyte est déposée afin de conditionner la membrane et favoriser l'immobilisation des AuNP. La technique se décompose donc en deux étapes permettant l'immobilisation des nanoparticules synthétisées Figure 11.

La première concerne le conditionnement de la membrane (Figure 11A) permettant de conférer des charges positives à la membrane considérée comme chimiquement inerte. Pour cela, un polymère d'accroche chargé positivement est imprégné sur la membrane pendant 10 min. Cette étape de conditionnement de surface est réalisée une seule fois. Le polymère utilisé est le poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAH 10 mg/mL, pKa = 8,7), puisque au pH de travail (7,4) celui-ci possède des charges positives du fait de ses fonctions amine primaire (Figure 10). S'ensuit des étapes de rinçage composées de 10 mL d'eau ultrapure (>18.2 MΩ cm) et 10 mL de tampon Tris-HCL pH 7,4. Cette dernière étape a pour but d'ioniser le polymère afin de rendre disponible des charges positives pour l'encrage des AuNP.

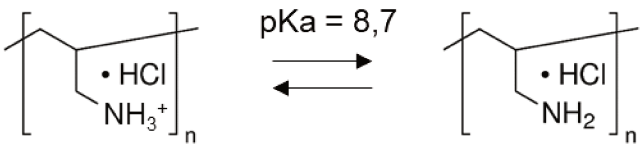


FIGURE 10: INFLUENCE DU PH SUR LA CHARGE GLOBALE DU PAH.

La seconde étape est la phase d'immobilisation des AuNP (Figure 11B). L'immobilisation des AuNP se fait par interactions électrostatiques entre les nanoparticules chargées négativement et le PAH chargé positivement. Pour cela, 500 µL d'une solution d'AuNP est déposée sur la membrane et laissée en contact pendant 10 min avant d'être éluée. La densité d'immobilisation est augmentée en réitérant les étapes de rinçage et de dépôt d'AuNP. Dans ce chapitre, des valeurs de 5 - 10 - 15 – 20 et 25 cycles d'AuNP ont été étudiés.

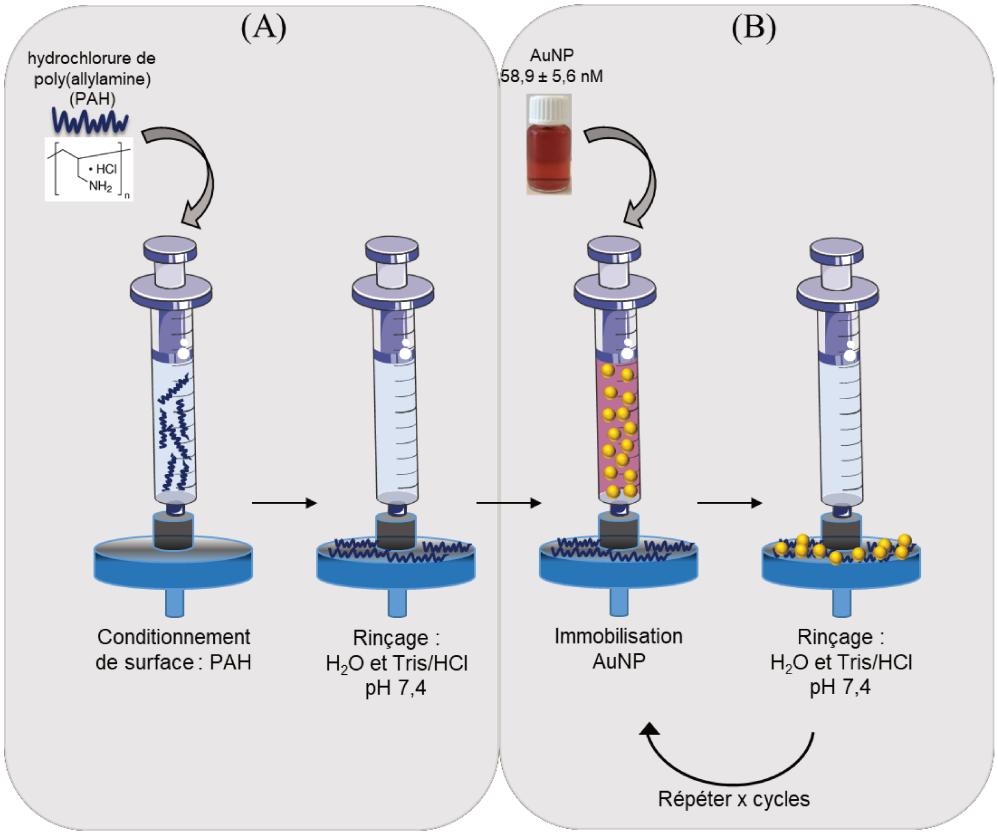


FIGURE 11: METHODOLOGIE D'IMMOBILISATION DES AUNP COLLOIDALES SUR UN FILTRE SERRINGUE, BASE SUR LES INTERACTIONS ELECTROSTATIQUES ENTRE LE POLYMERE D'ACCROCHE (CHARGE POSITIVEMENT) ET LES AUNP (CHARGEES NEGATIVEMENT).

La filtration de l'ensemble des solutions (PAH, Tris/HCl, AuNP et eau) se fait à l'aide d'un dispositif de mise sous vide. En effet, la résistance à l'écoulement engendrée par la construction de la nanostructuration de la membrane rend difficile la filtration manuelle. Cette technique a aussi vocation d'augmenter la production de filtres nanostructurés. Ainsi, 16 filtres nanostructurés peuvent être produits simultanément. La pression ainsi que le débit de la pompe à vide ne sont fixés, mais sans impact sur la reproductibilité des résultats.

2.3. CARACTERISATION DE LA NANOSTRUCTURATION

Les filtres ainsi nanostructurés sont étudiées à travers diverses techniques afin de caractériser chaque étape de la production. Ainsi, le dépôt de PAH, d'AuNP, le nombre de cycles et les temps de dépôts ont été analysés. Ceci afin de maîtriser et d'optimiser chaque paramètre.

2.3.1. QUANTIFICATION DES NANOPARTICULES D'OR IMMOBILISEES

Différents paramètres peuvent influer sur la quantité d'AuNP immobilisées tels que l'étape de conditionnement de la membrane ou le nombre de dépôts d'AuNP. Afin de déterminer les conditions optimales pour chaque paramètre, il convient de déterminer le nombre d'AuNP immobilisées correspondantes. Pour cela, la méthode de quantification des AuNP utilisées est adaptée d'une méthode développée et validée au sein du laboratoire (Figure 12) [150]. Brièvement, les filtres sont ouverts afin de récupérer la membrane, qui est ensuite découpée en morceaux et déposée dans une solution de Br_2 qui va oxyder les AuNP, passant de Au^0 à $AuCl_4^-$. Sous cette forme ionique, une paire d'ions va se former avec la Rhodamine B (Rho^+). Une solution de diisopropyléther est ajoutée au mélange réactionnel afin d'extraire la paire d'ions formée par extraction liquide-liquide en prélevant la phase organique. Cette phase organique est ensuite

évaporée à sec avec du diazote et les résidus redilués dans la phase mobile avant analyse en HPLC à 555 nm.

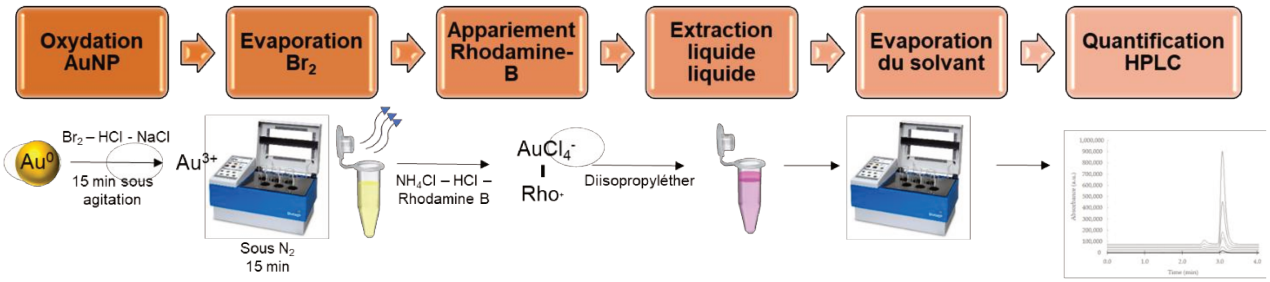


FIGURE 12: DOSAGE DE L'OR PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE PAR APPARIEMENT D'ION.

La quantité de nanoparticules immobilisées dépend également du temps de dépôt de chaque étape (PAH et AuNP). Selon la cinétique d'adsorption, la quantité déposée peut varier. Pour connaître le temps nécessaire à une complète interaction entre la membrane et les différents composés, une micro balance à cristal de quartz est utilisée.

2.3.2. Étude de l'adsorption des nanoparticules d'or par microbalance a cristal de Quartz (QCM)

La méthode QCM est basée sur les propriétés piézo-électriques d'un quart qui une fois parcouru par un champ électrique va vibrer dans un mode de résonance mécanique. Cette fréquence peut être mesurée en direct et varie proportionnellement à l'épaisseur et à la densité de masse déposée en surface du cristal. Les mesures QCM sont effectuées avec un instrument E1 QCM-D (Q-Sense, Suède) à une température de 21 °C et des cristaux de quartz recouverts d'or (50 nm, fréquence de résonance de 5 MHz) de Q-Sense sont utilisés. Les cristaux sont d'abord nettoyés à l'aide d'un nettoyeur à plasma (PDC-32G-2 Harris Plasma, États-Unis) pendant 15 min. Les différents dépôts (PAH et AuNP) sont ensuite réalisés à l'intérieur de la chambre QCM et introduits à un débit de 250 µL/min jusqu'à atteindre des fréquences stables. Le cristal est excité à sa fréquence fondamentale (environ 5 MHz) et l'observation se fait à la troisième harmonique (ν_3).

Cette technique appliquée à la membrane nanostructurée, en collaboration avec l'INSERM unité 1121 de Strasbourg, permet de déterminer le temps de dépôt nécessaire pour une interaction complète et maximale durant l'étape de conditionnement et d'immobilisation d'AuNP.

2.4. PRINCIPE DU DISPOSITIF

2.4.1. METHODOLOGIE

Une fois optimisé en termes de nanostructuration, le dispositif nanostructuré a pour vocation à être utilisé afin de lier spécifiquement les thiols et les analyser dans un second temps. C'est pourquoi, une fois nanostructuré, le dispositif est prêt à être utilisé selon la stratégie illustrée Figure 13. Celle-ci se divise en deux étapes et repose sur la forte affinité qu'il existe entre l'or et les thiols. La première, est une phase d'adsorption durant laquelle les thiols vont entrer en contact avec les AuNP immobilisées et s'y lier par formation de liaisons de forte énergie. Concrètement, 500 µL d'échantillon contenant les thiols sont filtrés à travers la membrane. Afin de déterminer la cinétique de formation de la liaison AuNP-thiol, différents temps d'imprégnation ont été testés : de 0 à 120 min.

La seconde étape, phase de désorption, consiste en une réaction par échange de ligand entre les thiols précédemment adsorbés et une molécule de plus forte affinité pour les AuNP. Cette molécule, le dithiothréithol, possédant 2 fonctions thiols, est couramment décrite dans la littérature pour de la désorption de thiols préalablement adsorbés sur des AuNP. Ainsi, 500 µL de dithiothréitol (DTT) (50 mM) sont filtrés avec un temps d'imprégnation de 0 min, correspondant à une filtration directe. Le relargage de thiols généré peut ensuite être caractérisé.

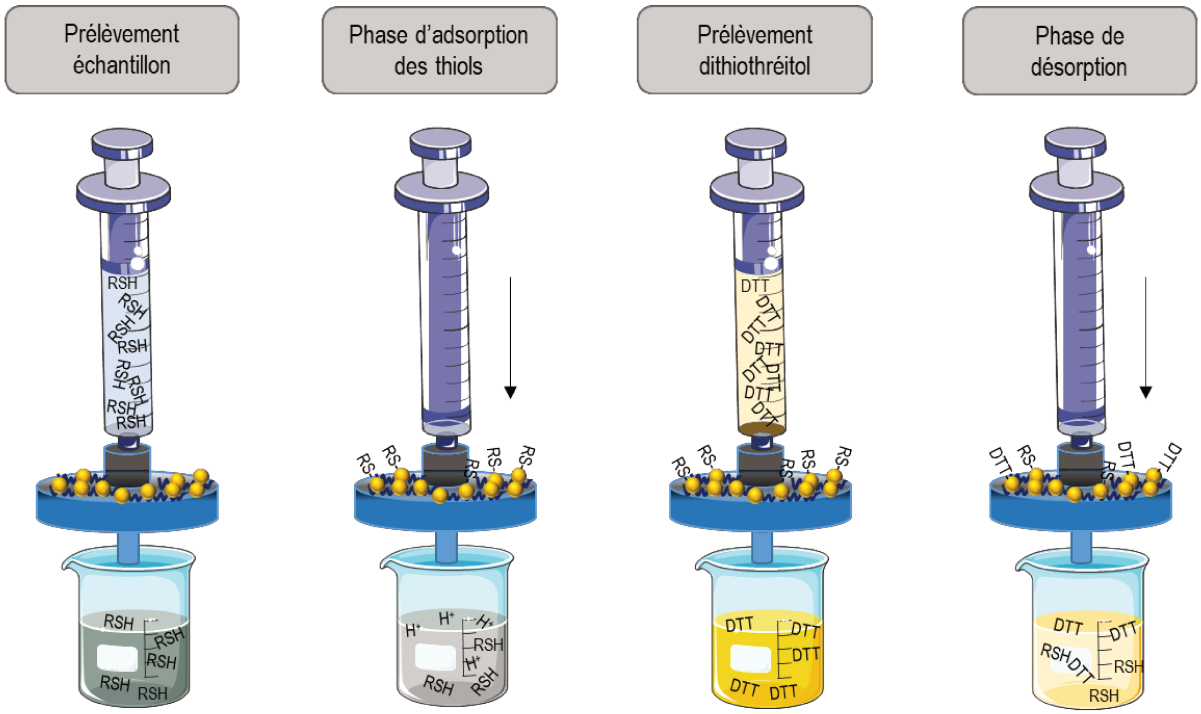


FIGURE 13: METHODOLOGIE D'UTILISATION DU DISPOSITIF NANOSTRUCTURE. PROCESSUS COMPOSE DE DEUX ETAPES (ADSORTPION ET DESORPTION) SUIVI D'UNE QUANTIFICATION DES ESPECES THIOLEES EN HPLC.

2.4.2. QUANTIFICATION ET IDENTIFICATION

Ces phases d'adsorption et de désorption de thiols constituent la méthodologie globale d'utilisation du dispositif et seront utilisées tout au long de ce projet que ce soit pour des matrices simple ou complexe comme le plasma. C'est également la même stratégie qui est appliquée pour la caractérisation du dispositif vis-à-vis des *S*-nitrosothiols.

2.5. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUE

L'étude de l'efficacité du dispositif sur échantillons biologiques a été réalisée sur du plasma de rat. Celui-ci provient de rats Wistar et est fourni par l'Animalerie du Campus

Brabois Santé (ACBS). Les expériences et le prélèvement ont été réalisés conformément aux lignes directrices de la Communauté européenne (2010/63/UE) pour l'utilisation des animaux de laboratoire. Des rats Wistar mâles de 280 à 350 g (Charles River, France) ont été utilisés. Pour obtenir les échantillons de sang artériel, les rats ont été anesthésiés (à partir de 15 minutes avant l'heure de prélèvement) avec de l'isoflurane (4 % dans du dioxygène 2 L/min). Après anticoagulation (500 UI d'héparine sodique, administration intraveineuse), une laparotomie a été pratiquée afin d'accéder à l'artère abdominale. Le sang a été prélevé directement dans l'artère par un court cathéter en PTFE (Intraflon 2, Vygon, France) et collecté dans des tubes Vacutainer (Becton Dickinson, USA) contenant de l'héparine-lithium. Le plasma est obtenu par centrifugation (10 000 x g, 15 min, 4 °C) et conservé à -80 °C. Les rats proviennent de la saisine BisNitroVivo APAFIS #15598-2018061619129620 v3.

L'objectif à terme du dispositif est de quantifier les thiols dans des matrices complexes telles que le plasma sans phase de prétraitement. Ainsi, une fois prélevé, le plasma est dilué au 1/10e dans la phase mobile et surchargé en NAC ou GSH (0 à 50 µM final). Cette dernière solution est ensuite directement filtrée à travers la membrane nanostructurée selon le protocole décrit précédemment. Pour cela, 500 µL sont filtrés directement à travers le dispositif et le filtrat est analysé par HPLC avec la méthode développée et décrite dans ce chapitre.

À chacune des deux étapes, la caractérisation lors de l'adsorption et de la désorption passe par l'identification et la quantification des thiols présents après filtration. Ainsi, pour déterminer les performances du dispositif, les filtrats sont analysés. La ou les méthodes utilisée(s) diffèrent en fonction des espèces présentes.

2.6. STRATEGIES ANALYTIQUES

La forte réactivité des thiols et *S*-Nitrosothiols engendre une multitude de réactions possibles (Figure 14). Ceci souligne la complexité des différents mécanismes mis en jeu. En fonction des espèces présentes, différentes stratégies analytiques seront

développées. L'ensemble de ces méthodes est détaillé ci-dessous. La présence de RSNO peut mener à des réactions de dénitrosation associées à la formation de deux radicaux : thiyl et NO. Ces molécules étant très peu stables et vont donc rapidement réagir afin de former des produits plus stables chimiquement. Dans le cas du radical thiyl ($RS^{\bullet}$), celui-ci peut reformer un thiol réduit ou réagir avec un autre thiol réduit pour former un thiol oxydé. Le NO qui possède une demi-vie de l'ordre de quelques secondes va rapidement générer des ions nitrites puis des ions nitrates.

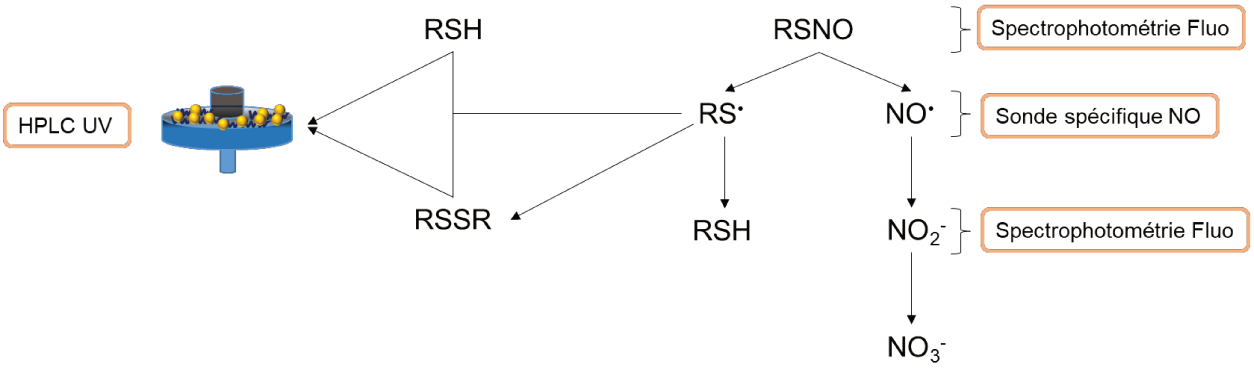


FIGURE 14: SCHEMA REACTIONNEL DES ESPECES THIOLEES ET NITROSEES ET LEUR METHODES ANALYTIQUES ASSOCIEES.

Chaque espèce présentée, dans la Figure 14, doivent être identifiées et quantifiées afin d'avoir une vision globale des phénomènes mis en jeu.

2.6.1. Quantification des thiols oxydés et réduits

La quantification des thiols a été réalisée de deux manières différentes : par méthode spectrophotométrie UV-vis et HPLC UV-vis. La première est une des premières méthodes de quantification de thiols réduits développée, la méthode d'Ellman qui met en jeu la réaction du groupement thiol avec un réactif : le 5,5-dithio-bis-(acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB) (Figure 15). Ce composé possède un pont disulfure qui, en

présence d'un thiol réduit, va se scinder en deux. L'une des parties de la molécule va se lier au thiol par son groupement thiol et l'autre, le 2-nitro-5-thiobenzoate (TNB_2^-) est détectable à 412 nm. Cette méthode est spécifique de la liaison thiol mais ne permet pas une spécificité entre les thiols.

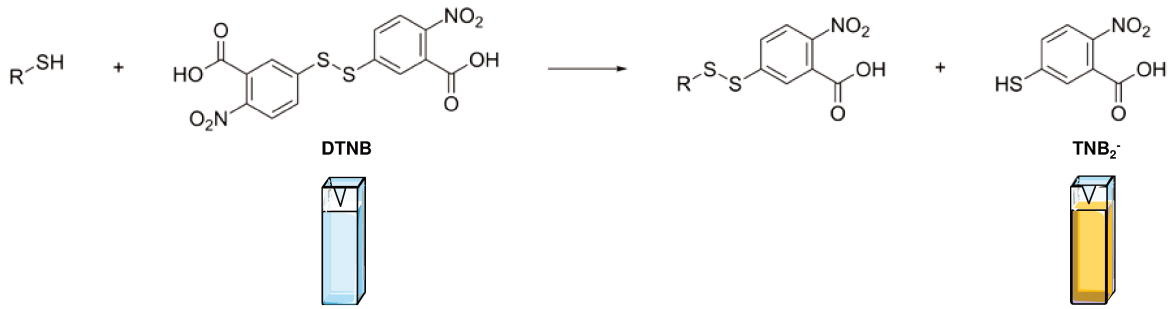


FIGURE 15: SCHEMA REACTIONNEL D'UNE MOLECULE THIOLEE AVEC LE REACTIF D'ELLMAN EN SPECTROMETRIE UV-VIS.

Pour quantifier et identifier NAC et GSH, une méthode HPLC en phase inverse par appariement d'ions a été développée et validée comme décrit dans ICH Q2(R1) [151]. La quantification est obtenue par appariement d'ions entre l'octylsulfate de sodium et les thiols et observée à 205 nm. Le système est composé d'une colonne C18 (250 mm, 4,6 mm et 5 µm de porosité), un four de colonne réglé à 40°C, une pompe à 2 mL/min et une boucle d'injection de 100 µL. La phase mobile est un mélange d'octylsulfate de sodium (10^{-3} M) et d'acétonitrile (97,0/3,0 V/V) à pH 3,0. L'élution se fait en mode isocratique et mène à des temps de rétention de 3,8 min et 5,5 min pour GSH et NAC respectivement (Figure 16).

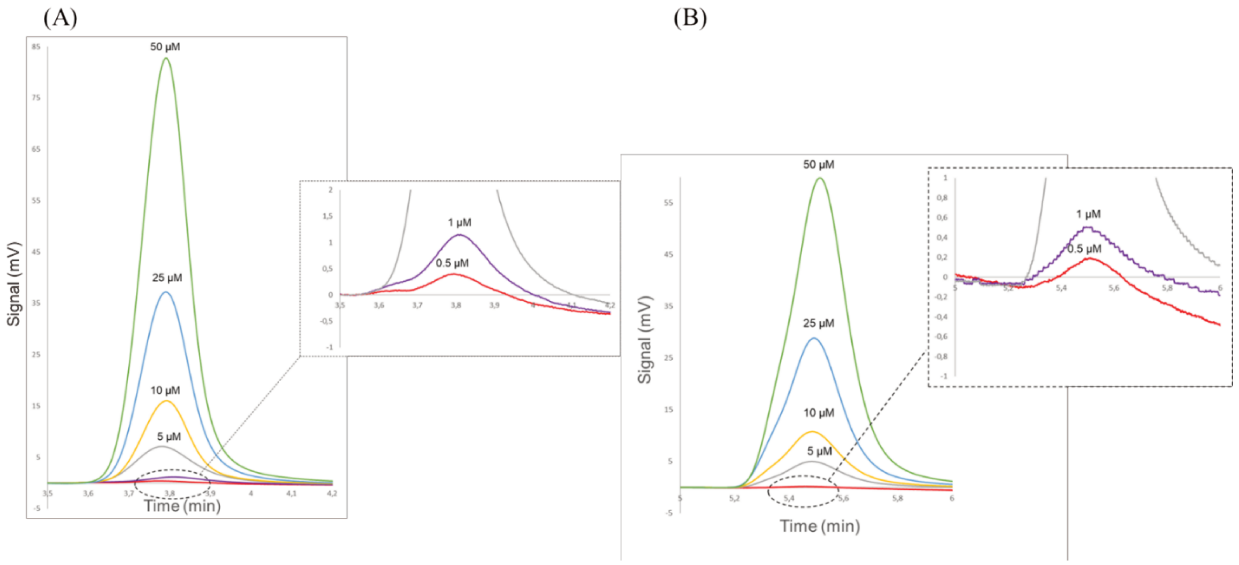


FIGURE 16: CHROMATOGRAMMES DE GSH (A) ET NAC (B) POUR DES CONCENTRATIONS COMPRISES ENTRE 0,5 ET 50,0 µM.

Pour la quantification du GSSG, la méthode HPLC utilisée s'inspire de celle décrite précédemment, avec un temps de rétention du GSSG à 8 min.

2.6.2. QUANTIFICATION NO, IONS NITRITES ET RSNO

Le NO peut être quantifié de manière directe avec une sonde spécifique. Cette quantification doit être faite rapidement afin d'éviter la conversion du NO en ion nitrite et nitrate. L'électrode permet de mesurer les variations de potentiels, induites par l'introduction de NO et proportionnelles à sa concentration. Cette sonde est composée d'une membrane polymérique perméable aux gaz et spécifique du NO. Le NO ayant traversé la membrane vient s'oxyder au contact de l'électrode de travail ce qui génère un potentiel électrique [152]. La sonde (ISO-NOP Macrosensor, World Precision Instruments) est reliée à un potentiomètre (TBR 1025 World Precision Instruments). L'acquisition des données est obtenue par le module d'enregistrement (Lab-Trax-4/16) couplé au logiciel LabScribe. La gamme d'étalonnage en NO• est obtenue à partir de la réduction du GSNO par des ions ascorbates et est comprise entre 5 et 100 µM.

La demie vie du NO étant très faible (quelques secondes), la quantification d'un de ses dérivés (ions nitrites et nitrates), permet une vision plus précise de la quantité de NO initialement présente. Pour cela, une méthode de spectrofluorimétrie est utilisée. Cette méthode se base sur la réaction entre un réactif non fluorescent, le 2,3-diaminonaphthalene (DAN), et l'ion nitrosonium (dérivé des ions nitrites) afin de former le 2,3-naphthotriazole (NAT), détectable en fluorescence à 570 nm avec une LOQ de 0,5 µM (Figure 17) [153]. La quantification des RSNO mets en jeu une étape supplémentaire impliquant du chlorure de mercure et visant à former des Ions nitrosonium.

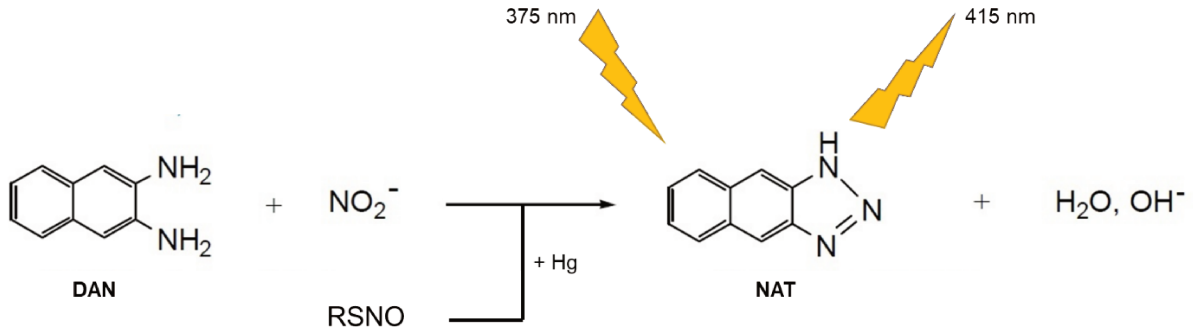


FIGURE 17: REACTIONS IMPLIQUEES DANS LE DOSAGE DES IONS NITRITE ET DES S-NITROSOTHIOLS DANS LE DOSAGE PAR LA METHODE FLUORIMETRIQUE DE DAN.

Brièvement, les échantillons sont dilués dans un tampon acéto-acétique (1,75 M ; pH = 2,5) pour un volume final de 200 µL. Pour le dosage selon Griess, 40 µL d'une solution de sulfanilamide 0,6 % (m/V), préparée dans de l'acide chlorhydrique (HCl) 0,4 M, sont ajoutés aux échantillons dilués. Après 3 minutes d'incubation à température ambiante, 10 µL de N-(1-Naphtyl) éthylènediamine (NED) 0,6 % (m/V), également préparé dans l'HCl 0,4 M, sont ajoutés. La mesure est réalisée après 5 minutes d'incubation à température ambiante à 570 nm avec un lecteur de microplaque EL-800 Biotek.

La mesure des RSNO repose sur le même dosage selon la méthode Griess-Saville. Une étape supplémentaire est ajoutée afin de dénitroser les RSNO et quantifier les ions nitrites ainsi générés. Pour cela, du chlorure de mercure à 0,2 % (m/V) est ajouté

à la solution de sulfanilamine. La concentration en RSNO est donc obtenue par différence entre la concentration mesurée en Griess-Saville, correspondant aux ions nitrites initialement dans le milieu, et celle mesurée en Griess avec les ions nitrites du milieu et ceux issus de la dénitrosation de RSNO (Figure 18).

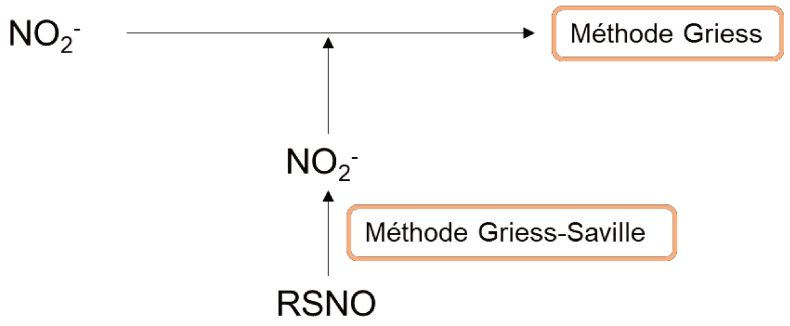


FIGURE 18: METHODE DE QUANTIFICATION DES ESPECES NITROSEES PAR LA METHODE DE GRIESS-SAVILLE.

Les gammes d'étalonnages pour la mesure d'ion nitrite et RSNO sont réalisées dans une solution tampon phosphate 0,15 M, pH 7,4 (PBS) avec du nitrite de sodium et du GSNO, respectivement (tableau 4).

TABLEAU 4: PARAMETRES DE VALIDATION DES COURBES STANDARD POUR LES S-NITROSOTHIOLS (RSNO) ET LES IONS NITRITES (NO_2-) DANS UN TAMPON PHOSPHATE PH 7,4 (N=3)

	Gamme d'étalonnage (µM)	Équation de droite	R^2
NO_2^-	0,1 – 2,0	Y = (1810 ± 138) x + (465 ± 73)	0,99
RSNO	0,1 – 2,0	Y = (1549 ± 156) x + (498 ± 173)	0,99

L'addition de l'ensemble de ces méthodes permet une vision globale des différentes espèces présentes afin d'appréhender les mécanismes mis en jeux et caractériser le dispositif nanostructuré.

3. DEVELOPPEMENT DU DISPOSITIF

3.1. CHOIX DU DISPOSITIF

L'objectif est de se servir de l'affinité existant entre les AuNP et les thiols afin de les adsorber de manière sélective et permettre leur quantification. Pour cela, une preuve de concept a été faite sur des AuNP colloïdales afin de rendre compte de la véracité de cette interaction.

Une solution de NAC à 30 µM a été mélangée à une suspention d'AuNP et la mesure en spectrophotométrie de la NAC restant en solution montre un taux de capture AuNP-NAC de 90%. Ces résultats encourageants confirment l'interaction entre les deux espèces et sont en adéquation avec la littérature mais sont contrebalancés par des contraintes techniques. En effet, un temps de centrifugation de 90 min à 42 000 g est nécessaire avant quantification des thiols restant en solution. Le surplus de NAC et les AuNP doivent être séparés avant analyse pour ne pas interférer lors de la mesure en spectrophotométrie. Dans le cas de la méthode d'Ellman, les spectres des AuNP et du TNB_2^- interfèrent l'un avec l'autre. À cela s'ajoute un problème de temps de stabilité des AuNP colloïdales, qui est d'environ un mois [103], et ce dans leur environnement de synthèse. Cela pose deux problèmes, leur utilisation dans ce laps de temps, ce qui ne permet pas de constituer un stock et des problèmes de stabilité en fonction de la matrice utilisée.

Comme cela a déjà été mentionné, pour pallier ces différents points, les AuNP peuvent être immobilisées sur un support. Sous cette forme, les AuNP sont indépendantes de l'environnement extérieur et leur stabilité est prolongée jusqu'à un an [149]. C'est pourquoi ce projet s'articule autour de la création d'un dispositif nanostructuré permettant de s'affranchir des inconvénients cités précédemment. Ce dispositif permet de tirer profit de la forte affinité entre les AuNP et les thiols à travers un système pratique à la façon d'une sonde.

Pour cela, un premier dispositif nanostructuré a été créé en immobilisant des AuNP sur des lames de verre en adaptant la méthode « *layer-by-layer* ». Ces lames ont été mises en contact, comme précédemment, avec une solution de NAC à 30 µM afin d'étudier son adsorption sur les NP. Il en ressort qu'il n'y a pas diminution de la NAC en solution comme c'était précédemment le cas avec les AuNP colloïdales. Ceci traduit une absence d'adsorption sur les AuNP immobilisées sur la lame. Parallèlement à cela, une augmentation du temps de demi-vie d'un facteur 10 (de 9h à 83,5 h) de la NAC a été mise en évidence par rapport au contrôle sans lame nanostructurée. Ceci a permis de démontrer les propriétés antioxydantes des nanoparticules immobilisées sur une surface [154]. La transposition de l'effet des AuNP sur les thiols par immobilisation sur lame de verre n'était donc pas un bon modèle. De plus, ce support ne constituait pas un dispositif facile à prendre en main et adapter aux traitements d'échantillons.

Ainsi, le cahier des charges a évolué vers un autre support possédant une organisation tridimensionnelle et permettant un traitement d'échantillon simple et rapide. Tout ceci afin d'obtenir une grande densité d'immobilisation et une meilleure surface spécifique et d'échange avec le milieu.

Parmi les matériaux couramment utilisés pour la nanostructuration, les substrats en papier ont suscité une attention particulière ces dernières années [155]. En effet, le papier est un matériau disponible de manière abondante, à faible cout, léger, recyclable et modulable sous différentes formes. De plus, sa structure poreuse et ses propriétés de surface rugueuses et absorbantes facilitent la fonctionnalisation de surface par des nanomatériaux ainsi que la diffusion d'analytes. Par ailleurs, les surfaces cellulosiques peuvent être modifiées avec divers groupements fonctionnels afin de leur conférer de nouvelles propriétés. Ces dernières années, la cellulose fonctionnalisée a beaucoup été utilisée pour la construction de systèmes diagnostique miniature tels que des systèmes de micro fluidique ou pour de l'extraction sélective à travers des dispositifs SPE (Solid Phase Extraction) [156,157]. Parmi les matériaux les plus décrits pour la fonctionnalisation de cellulose, on retrouve les métaux nobles [158], les oxydes de métaux [159], les nanomatériaux à base de carbone [160] et les polymères [161]. Les AuNP sont largement décrites pour la fabrication de matériau nanostructuré avec pour majorité une préparation par synthèse in situ, dip coating ou layer-by-layer [162]. Ces

deux dernières méthodes sont les plus répandues, car l'interaction entre la cellulose et des AuNP chargées négativements forme une liaison de forte affinité.

En se basant sur cela, une membrane en cellulose régénérée a été retenue comme support pour ce projet. Celle-ci est classiquement utilisée en laboratoire pour filtrer des échantillons tels que des solvants ou encore des préparations hospitalières. Ce matériau possède les mêmes propriétés que l'acétate de cellulose, à savoir un faible taux d'adsorption non spécifique et protéique (selon la fiche produit du constructeur), une compatibilité avec la plupart des solutions aqueuses, mais présente également une bonne résistance chimique aux solvants. C'est pour cela qu'il est couramment utilisé en prétraitement des échantillons en HPLC. De plus, ce dispositif présente une porosité permettant d'avoir une densité d'immobilisation plus importante du fait de la structuration de la membrane. Enfin, la membrane étant insérée dans un dispositif type filtre seringue en polypropylène, cela rend le traitement d'échantillon très simple grâce à une filtration directe des échantillons à l'aide d'une seringue. Ainsi, une fois les échantillons filtrés, seuls les thiols seraient adsorbés sur la membrane et retenus tandis que le reste serait élué.

Une fois le matériau choisi, les AuNP doivent y être immobilisées. Pour cela, deux solutions ont été envisagées. La première consiste en une immobilisation directe des AuNP sur la membrane par simple filtration. Or, comme cela a été dit précédemment, la cellulose interagit principalement de manière forte avec les composés chargés positivement. Ainsi, la seconde solution utilise un poly électrolyte positivement chargé afin de fixer la membrane et permettre un point d'ancrage pour les AuNP chargées négativement. Les AuNP sont ensuite déposées avec plusieurs dépôts pour former une couche de nanoparticules. Ce dernier procédé est une adaptation de la méthode layer-by-layer et se base sur des précédents travaux publiés au sein du laboratoire [163]. Les résultats obtenus après immobilisation d'AuNP sans phase d'accroche montrent une densité d'immobilisation de $7{,}2.10^{13} \pm 2{,}0\ 10^{13}$ AuNP/cm² avec un coefficient de variation d'environ 30%. Cela traduit des problèmes de reproductibilité et de stabilité du film formé. Ainsi, la seconde option, consistant à utiliser une phase d'accroche, a été retenue pour la suite du projet. Les différents paramètres entourant cette nanostructuration à savoir le poly électrolyte, le tampon utilisé lors des phases de rinçage et les temps de dépôts ont

été étudiés. Ceci à pour but de déterminer les paramètres menant à la plus grande densité d'immobilisation tout en restant reproductible.

3.2. CHOIX DES CONDITIONS ET DU MODE OPERATOIRE

La construction d'un film d'AuNP avec une molécule d'accroche utilise classiquement des polymères avec une charge opposée au nano objet à immobiliser. La question s'est donc posée du choix du polymère. Pour cela, une étude a comparé l'effet de deux polymères, PAH et Poly(éthylène imine) (PEI), et de deux solutions tampon, Tris/HCl 0,15 M et PBS 0,15 M, sur la densité d'immobilisation d'AuNP et la stabilité du film [163]. Il en ressort que la combinaison répondant le mieux aux deux critères cités ci-dessus est l'association du PAH avec le tampon Tris/HCl. En effet, il apparait que lors de la nanostructuration, l'utilisation de PBS à tendance à déstabiliser le film d'AuNP du fait de la présence d'ions phosphate. D'autre part, la PEI présente plus de charges ce qui conduit à des phénomènes d'agrégation altérant la stabilité du film. Le choix a alors été fait de travailler avec PAH et Tris/HCl pour la fabrication des membranes nanostructurées.

Pour chaque méthode, la nanostructuration s'opère par cycles d'AuNP, entrecoupés de rinçages à l'eau ultrapure et au tampon Tris/HCl pH 7,4. Le volume d'AuNP déposé est fixé à 500 µL, ce qui représente le volume maximal que peut contenir le filtre.

Pour déterminer le temps d'imprégnation de la membrane nécessaire à une interaction complète entre les différentes solutions et la membrane lors de la nanostructuration, des expériences en QCM ont été menées. Les variations de fréquences liées à l'ajout de PAH ou AuNP sur le cristal montrent un temps de stabilisation de 3 minutes nécessaire (Figure 19). Cela signifie qu'au-delà de ce laps de temps, il n'y a plus d'adsorption d'AuNP ou de PAH. Partant de ce constat, il a été déterminé qu'un temps de 3 minutes était nécessaire à une complète immobilisation de PAH et AuNP sur le cristal. Cependant, le cristal utilisé en QCM n'étant pas comparable

au matériau en cellulose de la membrane, notamment en termes de porosité, il a été décidé d'augmenter le temps de dépôts. En effet, il semble intuitif que la surface spécifique de la cellulose soit plus importante que celle du cristal. De ce fait, le temps d'adsorption a été augmenté pour s'adapter à la structure du matériau.

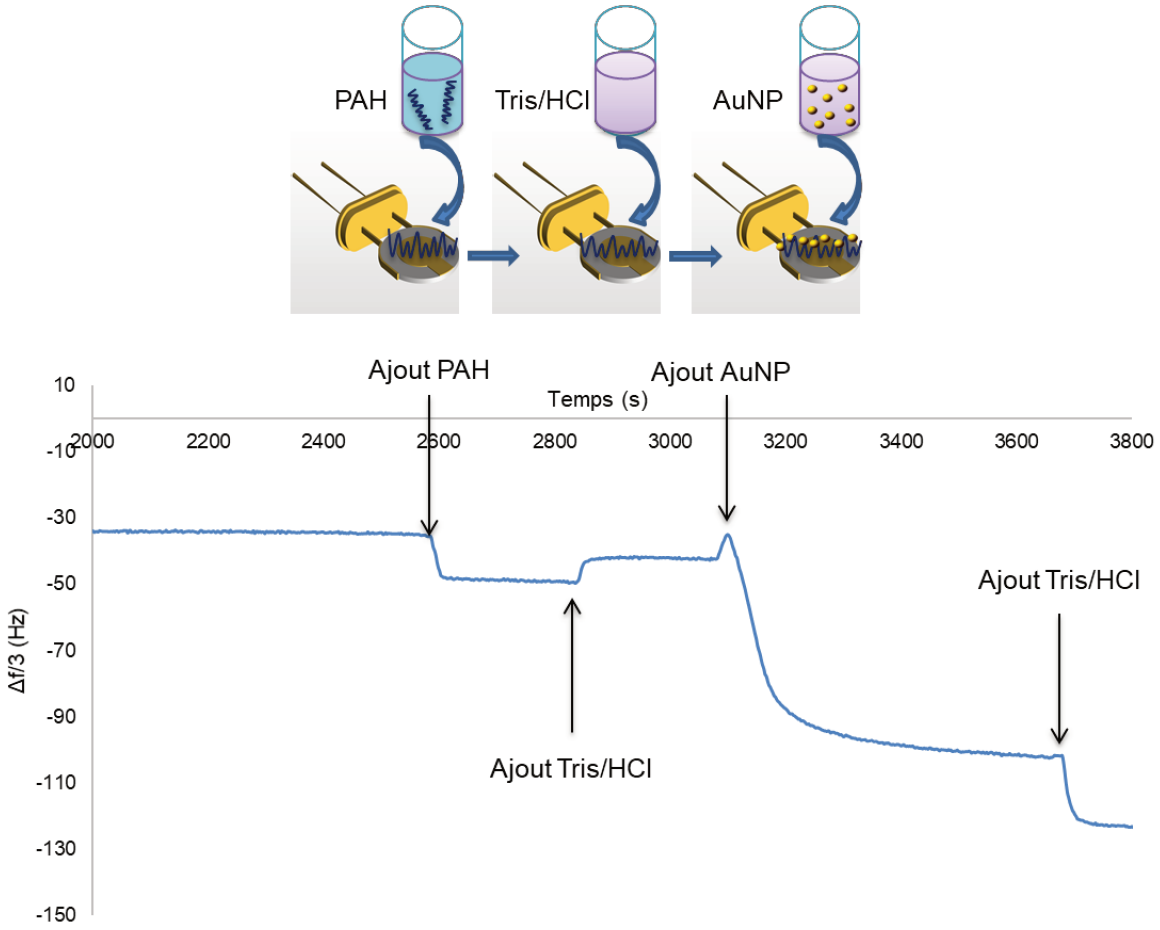


FIGURE 19: ETUDE DE LA VARIATION DE FREQUENCE SUR UN CRISTAL QUARTZ RECOUVERT D'OR AFIN D'ETUDIER LE TEMPS D'IMMOBILISATION DU POLYMERE D'ACCROCHE, DES AUNP ET DES RINÇAGES.

Le procédé d'immobilisation des filtres seringues utilise un système de mise sous vide permettant de filtrer les différentes solutions par dépression. Ce dispositif permet de produire jusqu'à 16 filtres simultanément avec une filtration facilitée ce qui représente un gain de temps. Ainsi, pour obtenir 16 filtres nanostructurés il faut environ 4h30 contre potentiellement le double sans l'assistance de la pompe à vide. Cela permet également de s'assurer une production reproductible. En effet, malgré la pression et le débit de la

pompe qui ne peuvent pas être réglés, les résultats de densité d'immobilisation montrent de faible coefficient de variation (10 %), indiquant une bonne reproductibilité. Ce type de dispositif est d'ailleurs couramment utilisé pour la fabrication et l'utilisation de cartouches SPE.

Les différents paramètres entrant en jeu lors du processus de nanostructuration ont été déterminés et fixés. Ainsi, les étapes d'immobilisation et de conditionnement consiste à déposer 500 µL d'AuNP/PAH pendant 10 minutes sur la membrane avec 15 dépôts d'AuNP. Les rinçages s'effectuent avec une solution de Tris/HCl pH 7,4. L'application de ce protocole permet d'obtenir une membrane nanostructurée dont la densité d'immobilisation, déterminée en HPLC, est de $3{,}6.10^{14} \pm 0{,}4\ 10^{14}$ AuNP/cm². Ceci correspond à une quantité d'AuNP dix fois supérieure à celle obtenue sans ajout de PAH avant les dépôts de nanoparticules. De plus, le coefficient de variation de 10% (contre 30 % sans PAH) traduit une meilleure reproductibilité des résultats.

La méthode de fabrication des membranes nanostructurées une fois développée, celle-ci a pu être appliquée à différentes membranes. En effet, les membranes en celluloses régénérée peuvent avoir différentes tailles de pores. Ce paramètre pouvant influer sur la surface spécifique du matériau et donc l'efficacité d'immobilisation, différentes porosités ont été testées afin de déterminer la meilleure membrane. Les critères décisionnels sont la densité d'immobilisation mais également la capacité d'adsorption en thiols.

3.3. INFLUENCE DE LA POROSITE DE LA MEMBRANE

Sachant que la porosité pourrait avoir une influence sur les interactions d'une part, et engendrer de la rétention non spécifique, et sur la surface spécifique du matériau (donnée non fournie par le fabricant). Une étude de l'effet de la porosité sur l'efficacité des membranes a été effectuée. Pour cela, des membranes en cellulose régénérée de porosités différentes ont été testées (0,2 à 5,0 µm). Le protocole de dépôt est le même que celui décrit précédemment, c'est-à-dire 15 cycles d'AuNP. Les résultats présentés

Figure 20 montrent une capacité d'immobilisation plus importante pour les membranes avec une porosité de 0,45 µm ($3{,}2.10^{14} \pm 2.6.10^{13}$) puis de celles à 5,0 µm ($1{,}5.10^{14} \pm 5{,}9.10^{12}$) déterminé avec la méthode HPLC décrite précédemment. Les autres membranes (0,2 - 0,8 -1,2 µm) montrent une densité d'immobilisation 10 fois inférieure, équivalent à 10 dépôts d'AuNP sur la membrane 0,45 µm. De manière surprenante, il n'existe pas de lien entre surface spécifique du matériau et densité d'immobilisation. Ceci pourrait s'expliquer par des différences d'épaisseur des membranes mais ces données ne sont pas fournies par le fabricant.

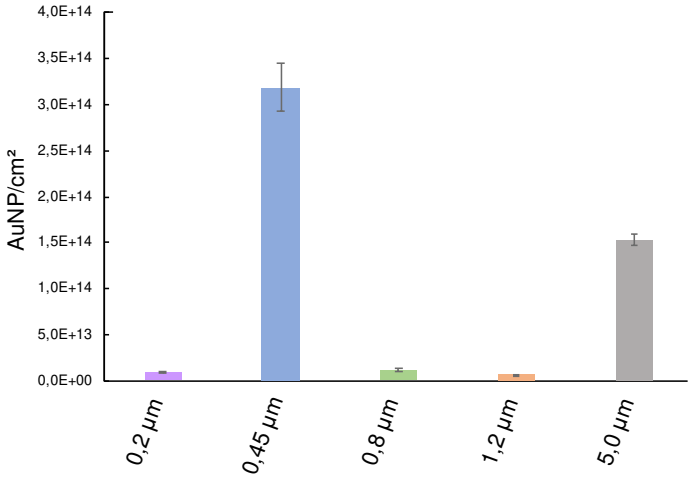


FIGURE 20: COMPARAISON DE LA DENSITE D'IMMOBILISATION EN AUNP PAR CM² EN FONCTION DE LA POROSITE DES MEMBRANES NANOSTRUCTUREES APRES 15 DEPOTS D'AUNP (N = 3).

La saturation des différentes membranes en AuNP a également été étudiée en faisant varier le nombre de dépôts d'AuNP (Figure 21). Il apparait que la saturation des membranes est déjà atteinte au bout de 15 dépôts d'AuNP. Ainsi, les études d'efficacité d'adsorption des différentes membranes nanostructurées seront effectuées avec 15 dépôts d'AuNP afin d'avoir une densité d'immobilisation maximale en un minimum de cycles. En effet, la facilité et le temps de fabrication sont des paramètres importants en

termes de productivité. Concrètement, plus il y a de cycles d'AuNP plus il y a de résistance à la filtration des solutions, ce qui a un impact direct sur la durée de fabrication.

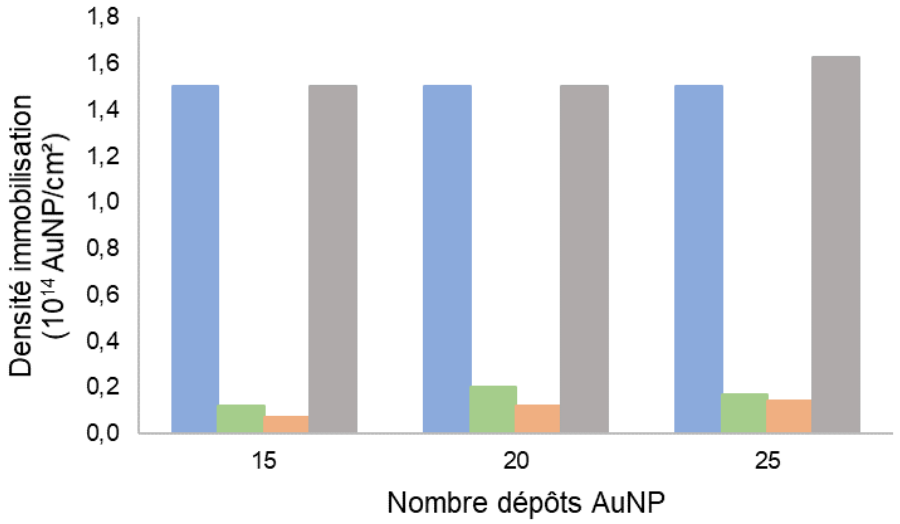


FIGURE 21: ETUDE DE LA DENSITE D'IMMOBILISATION EN AUNP PAR CM2 DE MEMBRANES NANOSTRUCTUREES EN FONCTION DU NOMBRE DE DEPOTS D'AUNP (N = 1) POUR UNE POROSITE 0,45 µM (BLEU), 0,80 µM (VERT), 1,20 µM (ORANGE) ET 5,00 µM (GRIS).

Selon le second critère de décision, afin de déterminer la meilleure porosité, les capacités d'adsorption en thiol des différentes membranes ont été étudiées. Pour cela, 600 nmol de NAC (500 µL) sont filtrées à travers la membrane et la capacité d'adsorption en NAC est déterminée par HPLC (Figure 22). Le graphique montre dans un premier temps que la capacité maximale d'adsorption en NAC de chaque membrane est atteinte. De plus, aucune relation entre porosité, densité d'immobilisation et saturation de membrane apparait.

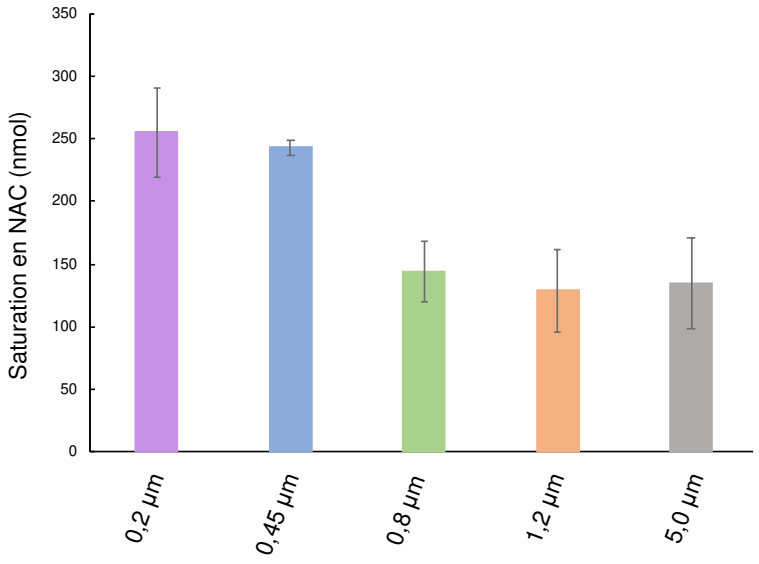


FIGURE 22: COMPARAISON DE LA CAPACITE MAXIMALE D'ADSORPTION EN NAC DES MEMBRANES NANOSTRUCTUREES EN FONCTION DE LEUR POROSITE.

Considérant l'ensemble des résultats, le filtre 0,45 µm apparait comme le meilleur choix. En effet, il présente la plus grande densité d'immobilisation en AuNP ainsi que la plus grande capacité d'adsorption de thiol. De plus, les écarts types obtenus pour la capacité d'adsorption sont faibles contrairement aux autres membranes, traduisant une meilleure reproductibilité des résultats. Enfin, d'un point de vue productivité, les filtres 0,45 µm permettent une durée de production plus courte. En effet, la résistance lors de la filtration étant liée à la porosité, plus celle-ci est élevée, moins il y a de difficultés à filtrer. C'est donc ce dispositif qui sera utilisé tout au long de ce projet.

3.4. INFLUENCE DU TEMPS DE CONTACT AUNP-THIOL

Afin d'assurer la répétabilité des résultats, il est nécessaire d'harmoniser le temps de filtration des espèces thiolées sur la membrane. En effet, la littérature fait état d'un désaccord à ce propos avec des résultats allant de quelques secondes à 1h pour former la liaison Au-SH [142,164,165]. Une cinétique de temps de dépôt a été réalisé et les

filtrats analysés, avec la méthode HPLC décrite précédemment, afin de déterminer le temps nécessaire pour former la liaison or-thiol. Pour cela, différents temps d'imprégnation de la membrane nanostructurée, avec de la NAC, ont été testés pour étudier le taux de capture en fonction du temps de contact (Figure 23). Il apparait que la liaison AuNP-thiol s'opère de manière instantanée puisqu'il n'y a aucune différence significative entre les différents temps sur le taux d'adsorption. Ainsi, pour l'ensemble de ce projet, la filtration des divers échantillons est donc réalisée instantanément sans temps de pose. Ces résultats ont également permis de fixer le temps d'imprégnation du DTT, lors de la phase de relargage, à 0 min.

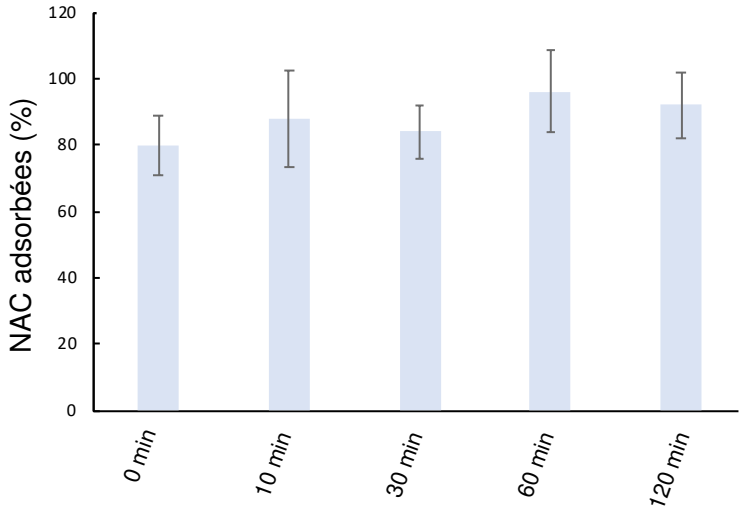


FIGURE 23: CINETIQUE DE FORMATION DE LA LIAISON AU-S AVEC UNE SOLUTION DE NAC 50 µM (500 µL).

Différents paramètres opératoires tels que le choix de la membrane, les conditions d'immobilisation d'AuNP ou encore le temps de filtration ont été étudiés et fixés afin de permettre une homogénéisation des différentes études. Ceci a permis d'obtenir un dispositif et un mode opératoire standardisé. La membrane nanostructurée ainsi produite peut ainsi être utilisée afin d'en déterminer, dans un premier temps, son efficacité et ses performances quant à la capture de molécules thiolées.

Comme décrit dans le chapitre 1 de ce manuscrit, les thiols existent sous différentes formes : oxydés, réduits ou liés au NO (problématique des donneurs de NO) (Figure 14). Selon l'espèce présente les stratégies d'application et les mécanismes mis en jeu diffèrent. Leur comportement vis-à-vis de la membrane peut en être modifié. C'est pourquoi ce chapitre est scindé en deux parties, traitant chacune de l'étude du comportement et l'évaluation des performance du dispositif choisi vis-à-vis de RSH et de RSNO respectivement.

4. ARTICLE 2 : GOLD NANOSTRUCTURED MEMBRANES TO CONCENTRATE LOW MOLECULAR WEIGHT THIOLS, A PROOF OF CONCEPT STUDY

Le dispositif nanostructuré, composé d'une membrane en cellulose régénérée, se base sur l'existence de fortes énergies de liaisons entre l'or et la fonction thiol. Ce postulat a été utilisé afin de répondre à une problématique liée aux lacunes de nombre de méthodes analytiques développées pour la quantification de thiols. Ce dispositif a pour ambition de simplifier le traitement d'échantillons, de permettre une détection d'espèces très peu concentrées et d'éviter les interférences avec d'autres composés et entre les différents thiols.

La preuve de concept de ce dispositif se décompose en 3 parties. La première a pour objectif de mettre en lumière la formation d'une liaison de coordination entre AuNP et RSH au sein de la membrane. Pour cela, des études en microscopie électronique ont été menées afin de prouver l'interaction entre les thiols et les AuNP au sein de la membrane.

La seconde partie a pour objectif d'évaluer les performances du dispositif à l'adsorption de thiols. Pour cela, deux thiols modèles (NAC et GSH) ont été sélectionnés et filtrés à travers la membrane. Ces molécules ont été choisies, car le GSH est un thiol naturellement présent dans l'organisme tandis que NAC est une substance active à effets thérapeutiques. Les thiols adsorbés sont ensuite relargués par ajout de DTT, présentant une plus forte affinité pour les AuNP. Cet échange de ligand permet de désorber les thiols

afin de les analyser à l'aide de la méthode HPLC développée et validée pour ce projet. La caractérisation de ces deux étapes, adsorption et désorption, est cruciale pour une meilleure connaissance du dispositif et de ses performances mais également pour des applications sur échantillons réels.

C'est cette application sur matrice biologique qui fait l'objet de la troisième partie de cette preuve de concept. Pour cela, du plasma de rat est utilisé et surchargé ou non de NAC et GSH. L'objectif est d'étudier l'effet d'une matrice complexe, contenant des thiols de manière endogène, sur les phases d'adsorption et de relargage du dispositif. La membrane a également été utilisée pour déterminer la quantité de GSH présente naturellement dans le plasma.

L'ensemble de ces travaux a abouti à la publication d'un article dans *Journal of Chromatography B* [166], proposant l'étude de ce dispositif nanostructuré s'étendant de son développement à son application sur matrices simple (solutions tampons) et plus complexe (plasma).

Journal of Chromatography B 1198 (2022) 123244

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jchromb

Gold nanostructured membranes to concentrate low molecular weight thiols, a proof of concept study

Margaux Berthou [a], Arnaud Pallotta [a,b], Jordan Beurton [a], Thomas Chaigneau [a], Athanassia Athanassiou [c], Christophe Marcic [d], Eric Marchioni [d], Ariane Boudier [a,b], Igor Clarot [a,b,*]

[a] Université de Lorraine, CITHEFOR, F-54000 Nancy, France
[b] Nanocontrol, F-54000 Nancy, France
[c] Smart Materials, Istituto Italiano di Tecnologia, via Morego 30, 16163 Genova, Italy
[d] Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Gold nanoparticles
Nanostructuration
Thiols quantification
Biological matrix
Extraction device

ABSTRACT

Thiols are very important molecules in the biomedical field involved for example in redox homeostasis. Their detection and quantification remain difficult due to their poor stability (oxidation) linked to their strong reactivity towards other thiols (by the formation of S-S bonds) or other interfering molecules in the medium. Cellulose membranes with immobilized gold nanoparticles (AuNP) were developed to capture and quantify thiols in simple and complex matrices. This device was first optimized and characterized in terms of nanostructuration and thiol adsorption. *N*-Acetylcysteine (NAC) and reduced glutathione (GSH), chosen as model molecules, were filtered through the device demonstrating a maximal adsorption capacity of 270 and 60 nmol respectively. In a second step, the adsorbed species were subjected to ligand exchange using a more reactive thiol, dithiothreitol. The results showed release rates of approximately 90% for NAC and GSH. Finally, the amount of endogenous GSH in rat plasma was determined without any pretreatment. For the first time to our knowledge, a nanostructured device for the capture, selective and sensitive quantification of thiols is proposed. This device is easy to handle and overcomes matrix effects. Moreover, the very large concentration factor induced by this technology will be a valuable asset to decrease the quantification limits of analytical methods.

1. Introduction

Molecules bearing thiol groups are very usual compounds in biologicals matrices. Biologicals fluids contains many aminothiols such as glutathione, cysteine and homocysteine being the most common. These are molecules well known to limit the production of free radicals such as reactive nitrogen / oxygen species. They also can act as antioxidant thanks to their -SH group. One of the major endogenous low molecular weight thiols with recognized antioxidant properties in human body is glutathione (GSH). In blood it is mainly present in its reduced form (GSH) compared to the oxidized form (GSSG). In tissues, GSH maintains intracellular redox activities and is a key biomarker of different diseases such as cancer or blood pathologies [1]. Analyzed physiological concentrations of GSH in blood and plasma is highly variable. Levels ranging from 100 μM to 10 mM and from 0.6 μM to 100 μM, respectively for blood and plasma, have been reported [1,2]. Considering the importance of such a molecule, several analytical methods were developed to analyze thiols and more particularly GSH. One of the first to be developed was the Ellman's Method [3]. It is a simple spectrophotometric quantification implying the reaction of thiols with 5,5′-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) leading to the formation of 2-nitro-5-thiobenzoate detected at 412 nm in simple matrices (water, buffers …). However, this method does not allow to identify and differentiate different thiols mixed in a sample and its high limit of quantification (LOQ around 3 μM) may be also an issue when compared to the plasma concentrations mentioned above. Finally, this method is not applicable for thiols in complex samples due to matrices effects [4,5].

Numerous methods were developed to overcome this problem [6–8]. GSH have been analyzed in different matrices using non-separative methods such as spectrophotometry, spectrofluorimetry or amperometry [9–11]. These direct methods are simple but have major drawbacks such as their lack of specificity and selectivity. Separative methods were

* Corresponding author.

https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123244
Received 7 January 2022; Received in revised form 28 March 2022; Accepted 1 April 2022
Available online 9 April 2022
1570-0232/© 2022 Published by Elsevier B.V.

developed to separate GSH from other thiols in complex matrices. High-performance liquid chromatography [12] and capillary electrophoresis [13,14] coupled to UV–Vis spectrophotometry or fluorimetry are the most used separative techniques for biological thiol quantifications. Even if these methods allow to reach interesting limit of quantifications (5 pM for GSH [12]), they present also other drawbacks. Indeed, they often use harmful chemicals and toxic solvents, require several pre-treatment steps or are difficult to implement as they often use derivatized molecules [7,13] to increase separation selectivity or detection sensitivity.

Gold nanoparticles (AuNP) are widely used in various fields, like healthcare as vectors [15] or in biosensors [16–18] for examples. Their current wide use is explained by their remarkable properties. These nanoparticles are biocompatible, easily synthesizable (single-step synthesis without organic solvents [19]) and have very low production costs. One of the numerous interesting properties of AuNP is their capacity to link thiols through their sulfhydryl (SH) functional group. The gold-thiol bond strength is close to a covalent bond (40–50 kcal.mol^{-1}) allowing facilitated linkage with these molecules [20,21] leading to thiol evaluation in various matrices without time-consuming extraction steps. Ghasemi *et al.* [22] have worked on colorimetric sensors based on AuNP aggregation when the particles were in contact with thiols. The major drawback of colloidal AuNP lays in their stability directly linked to physicochemical conditions such as pH and ionic strength, which strongly limit their use in biological samples [23]. Overcoming these limitations can be achieved through the immobilization of the nanoparticles. AuNP can be easily immobilized on supports using several deposition methods such as dip coating [19] or spraying [24]. The immobilization of AuNP on a surface leads to many advantages such as an increase of AuNP stability under physicochemical condition mimicking physiology (salt concentrations, pH, proteins …) or new material properties, antioxidant activity for example [25] . Bubniene *et al.* [26], described the immobilization of AuNP-citrate on mica sheets. In this work, the anchoring of the nanoparticles on the support was ensured by electrostatic interactions with a cationic polymer. The amount of AuNP immobilized per unit area can be easily controlled through the modulation of AuNP concentration in the suspension used to build the device. Material nanostructuration can generate an easy-to-handle device. For example, Markina *et al.* [27] developed a gold nanoparticle-based paper for the evaluation of GSH in human skin. They described a very interesting and simple thiol sensor, but the sensitivity obtained (6.9 μM) was inadequate for plasma evaluation.

The goal of this work was to develop a specific and sensitive nanostructured device for simple adsorption, desorption and quantification of fragile and low concentrated thiols without problematic sample treatment. The principle consisted in the immobilization of highly reactive gold nanoparticles on commercial cellulosic membranes. As a proof of concept, model thiols were analyzed (reduced glutathione (GSH) and *N*-acetylcysteine (NAC)) in a simple matrix. After validation, rat plasma was supplemented and filtered through the nanostructured membrane to study the behavior of the device and test the analytical method with real complex matrices. To the best of our knowledge, this device was the first of its kind and was able to specifically capture, concentrate and quantify low molecular weight thiols without any denaturation pre-analytical step and without use of harmful chemicals or toxic solvents.

2. Experimental section

2.1. Reagents and samples

All reagents and solvents were of analytic grade and used without further purification. KCl was purchased from Carl Roth. Citric acid and KH_2PO_4 were purchased from Labosi. Methanol and Na_2HPO_4 were purchased from Carlo Erba. $K_2S_2O_8$, NaOH 30%, NaCl and HCl 1.0 M were purchased from VWR Chemicals. Phosphate buffer saline solution (PBS) was prepared as follows: [Na_2HPO_4] = 6.68 mM, [KH_2PO_4] = 1.47 mM, [NaCl] = 138.00 mM, and [KCl] = 2.68 mM, the final pH was adjusted to 7.4 with HCl 12 M. Tris-HCl buffer was obtained by dissolving 18.16 g of Tris in 1 L of H_2O, the pH was adjusted to pH = 7.4 with HCl 12 M. Ultrapure deionized water (>18.2 MΩ cm) was used for the preparation of all solutions. Poly(allylamine hydro-chloride) (PAH) (average molecular weight of 17,500 g.mol^{-1}, pKa = 8.7) was purchased from Sigma Aldrich. Gold chloride salt ($HAuCl_4$), sodium citrate, sodium borohydride, glutathione (GSH), *N*-acetylcysteine (NAC), dithiothreitol (DTT), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 2-amino-2-hydroxymethyl-1.3-propanediol (Tris), dibroma (Br_2), rhodamine B, diisopropyl ether, dithio-5,5′-bis(nitro-2-benzoic) acid (DTNB) were from Sigma-Aldrich. Hydrochloric acid, sodium hydroxide, ammonium chloride and sodium chloride were sourced from the VWR chemicals supplier.

For animals and plasma sampling protocol, all experiments were performed in accordance with the European Community guidelines (2010/63/EU) for the use of experimental animals. Male Wistar rats between 280 and 350 g (Charles River, France) were provided by the ACBS (Animalerie Campus Brabois Santé) laboratory animal house. To obtain arterial blood samples, rats were anesthetized (starting 15 min before sample time) with isoflurane (4% in oxygen 2 L.min^{-1}). After anticoagulation (500 UI of heparin sodium, intravenous administration), a laparotomy was performed in order to access the abdominal artery. Blood was obtained directly from the artery through a short PTFE catheter (Intraflon 2, Vygon, France) and collected in Vacutainer (Becton Dickinson, USA) tubes containing heparin lithium. Plasma was obtained after centrifugation (10 000 × *g*, 15 min, 4 °C) and keep at − 80 °C.

2.2. AuNP synthesis

Citrate stabilized AuNP were synthetized in aqueous solution according to our previous work[28]. Briefly, 1.0 mL of $HAuCl_4$ solution (10 mg.mL^{-1}) was added into 90 mL of water and 2.0 mL of 55 mM sodium citrate was added under inert atmosphere (N_2). The solution was stirred for 1 min then 1.0 mL of 19.5 mM $NaBH_4$ was added and the solution was stirred for 10 min under N_2. The resulting 90 ± 3 nM (λ max 514 ± 1 nm) suspension of nanoparticles was stored in the dark at 4 °C during a maximum period of 20 days [28]. For all experiments, AuNP with hydrodynamic diameter of 6.5 ± 0.9 nm (core diameter 5.3 ± 1.1 nm) and anionic charge (zeta potential) of − 32.6 ± 0.7 mV were used. See Supplementary Information Section S1 for more information on methods used to characterize the synthesized batches used in this study.

2.3. Preparation and characterization of nanostructured membranes

The immobilization supports used were commercial Chromafil cellulosic membranes (CM) (Diameter 25 mm and pore size of 0.20, 0.45, 0.80 and 1.20 μm). Nanostructurated membrane (NM) construction was realized under pressure and was illustrated in Fig. 1. AuNP (negatively charged) were embedded on the device through electrostatic bonds with a cationic polymer.

A first activation step was realized by pushing a 10 mg.mL^{-1} PAH solution in Tris buffer (0.15 M; pH = 7.4) through the membranes for 10 min. Membranes were rinsed for 3 min with Tris solution and nanostructured using AuNP-citrate colloidal suspension (90 nM). A final rinse with Tris was then realized and the last two steps of this process were repeated fifteen times to achieve a high immobilization density (number of AuNP per cm^2 of membrane). Before used, a final rinse with water was realized.

Gold quantification was adapted from a method developed and validated in our laboratory [29] for colloidal AuNP. NM were extracted from the device and cut, then fragments containing AuNP were oxidized with 1.0 mL of a solution of HCl-NaCl-Br_2 (1.000 M – 0.300 M – 0.025 M respectively) during 15 min (stirred at 600 rpm on a Vibramax 100

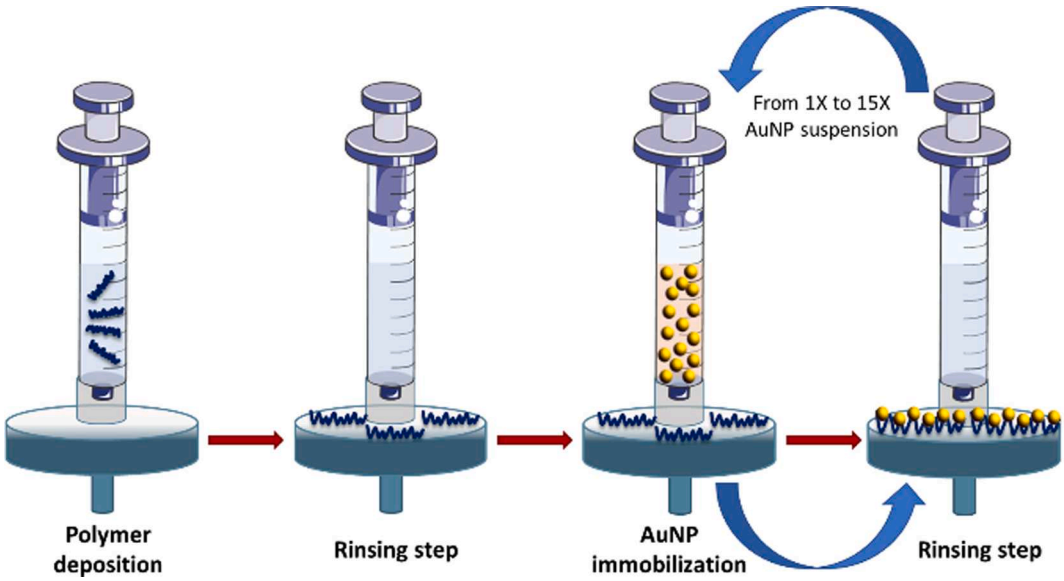


Fig. 1. Schematic illustration of the membrane nanostructuration process.

(Heidolf Instruments)). Four hundred microliters of the suspending solution were then partially evaporated using a Turbovap (Biotage) at 40 °C under inert gas (N_2, 4 psi) for 20 min. 200 μL of NH_4Cl solution (30 % m/V), 100 μL of 6 M HCl and 100 μL of Rhodamine B solution (0.084 μM) were added. To extract the ion-pair formed between tetrachloroaurate anion and Rhodamine B, 300 μL of diisopropyl ether was finally added. Tubes were agitated for 3 min at 1500 rpm and centrifuged (Mini Spin Plus, Eppendorf) 3 min at 12100 × *g*. One hundred and fifty microliters of the supernatant (organic phase containing the Au species) were withdrawn, completely evaporated (Turbovap, 5 min, N_2 3 psi) and the dried residue was dissolved in HPLC mobile phase (150 μL) before injection and rhodamine B quantification by HPLC-Visible detection [29]. HPLC analysis were performed on a Shimadzu LC-20 system constituted by the following modules: degasser, quaternary pump (LC 20AD), autosampler (SIL 20AC), Oven and UV–Visible detector (SPD20A). The column and pre-column (Macherey Nagel Nucleosil 100–3 C18, 150/4.6) were thermostated at 40 °C, the mobile phase consisted on a binary mixture of acetonitrile and 0.1% trifluoroactic acid aqueous solution (25/75, V/V). The injection volume was 100 μL. The detector was set at 555 nm and the pump at a flow rate of 1.0 $mL.min^{-1}$.

The surface of nanostructured supports was observed using a Scanning Electron Microscope (SEM) of the FIB (Focused Ion Beam) type and without sample metallization, reference Helios Nanolab 600i and FEI brand. The ion emitting gallium source was set to 20 kV. Infra-red (IR) spectra were acquired using a Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR) Spectrum Two (Perkin-Elmer) in Attenuated Total Reflexion mode (ATR). X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) was performed using an electron spectrometer (Lab2, Specs, Berlin, Germany) equipped with a monochromatic X-ray source (set at 1253 eV) and with a hemispherical energy analyzer (Phoibos, HSA3500, also from Specs). The applied voltage of the Mg Kα X-ray source was set at 12 kV and the applied current at 7 mA. The pressure in the analysis chamber was $\approx 10^{-9}$ mbar. The large area lens mode was used for both wide and narrow scans. Peakfit V 4.12 was used to fit curves. Parameters were set as follow: smoothing using the Savitsky-Golay equation (1.5%) and linear baseline with two points (3%).

2.4. Thiol quantification

Thiol quantification was performed by ion-pair reversed phase HPLC or classical Ellman's reaction. For GSH-NAC separation, the HPLC system consisted of a Spectrasystem pump P1000XR equipped with a Spectraseries AS100 injector and coupled to a Gilson UV–VIS-155 detector set at 205 nm. A C18 Thermo Scientific ODS Hypersil column (250/4.6 mm, 5 μm particle diameter) and a Nucleosil EC 4/3 NUCLEODUR C18 HTec precolumn (5 μm) heated at 40 °C was used. The injection volume was 100 μL. The mobile phase consisted of a mixture of octyl sodium sulfate (10^{-3} M, pH 3.0) and acetonitrile (ACN) (97.0/3.0 V/V) with a flow rate of 2.0 $mL.min^{-1}$. The method was validated as described by ICH Q2(R1) [30], see Supplementary Information Section S2 (Table S1) for more information on validation parameters. For Ellman's reaction, 100 μL of 5,5′-dithio-bis(2-nitrobenzoic) acid solution (1.0 mM) in PBS were added to 500 μL of each sample. This mixture was incubated 10 min at room temperature protected from light then absorbances were read at λ = 412 nm (linearity between 3 and 32 μM).

2.5. Nanostructured device performance evaluation

All RSH solutions (NAC and GSH) were prepared either in PBS buffer (0.148 M; pH = 7.4) or in HPLC mobile phase (octyl sodium sulfate (10^{-3} M, pH 3.0): ACN (97.0:3.0 V/V).

Thiol adsorption. The preliminary study of colloidal AuNP/NAC interactions was performed using solutions obtained by mixing 665 μL gold nanoparticle suspension and 42 μL of 860 μM NAC. These solutions were incubated at room temperature up to 30 min. Samples were centrifuged at 42,000 × *g* for 90 min at 4 °C (Stratos Heraeus Biofuge centrifuge) and remaining thiols were quantified in the supernatant using Ellman's method.

RSH adsorption on NM was performed by filtering 500 μL of RSH solution (from 1.0 to 50.0 μM) on CM (negative control) and NM. The quantification of the remaining free reduced thiols was performed on the filtrate by previously described HPLC method.

For plasma validation, RSH solutions were prepared in phosphate buffer (0.05 M; pH = 2.5) and diluted (1:10) in rat plasma (from 1.0 to 50.0 μM). Then, 500 μL of samples were filtered on CM (negative control) and NM without further purification. The quantification of reduced thiols was performed on the filtrate by previously described HPLC method.

Thiol desorption. Thiols desorption from membranes was realized using dithiothreitol (DTT). Five hundred microliters of 50 mM DTT (corresponding to 25 μmol) were filtered through CM or NM. The quantification of reduced thiols was performed on the filtrate by previously described HPLC method. Desorption protocol was repeated until a complete release of adsorbed molecules was obtained.

3. Results and discussion

3.1. Device development and characterization.

3.1.1. Nanostructuration optimization

Based on our previous immobilization methodology [25], a nanostructured cellulosic membrane (NM) was developed. A polycation monolayer of polyallylamine hydrochloride (PAH) was first deposited to create a positively charged surface to successively embed the negatively charged AuNP through electrostatic bonds, up to 15 depositions.

Four different porosity filters (0.20, 0.45, 0.80 and 1.20 µm) were evaluated to determine the best one according to AuNP density. Results showed that 0.45 µm membranes embedded at least 100 times more AuNP than the three others ($3.6 \pm 0.4 \times 10^{14}$ versus $0.010 \pm 0.001 \times 10^{14}$, $0.12 \pm 0.01 \times 10^{14}$, $0.07 \pm 0.003 \times 10^{14}$ AuNP.cm^{-2} for 0.20, 0.80 and 1.20 µm respectively). Immobilized AuNP on 0.45 µm membranes were also quantified as a function of the number of depositions [29]. Results are shown in Fig. 2A. The average quantity of AuNP per cm^2 of device increased proportionally with the number of depositions. No saturation was observed during the construction process. Immobilization parameters were selected based on a previous study from our lab [31]. PAH associated with Tris buffer allowed the best compromise between stability and AuNP immobilization. The PAH first layer is a critical point for the nanostructuration architecture. NM tested without polycation solution pre-treatment showed 10 times less AuNP immobilized ($7.2.10^{13} \pm 2.0.10^{13}$ AuNP/cm^2). Additionally, without PAH, a lack of stability was observed leading to AuNP desorption and membrane destruction. Compared to our previously published work, the 3D meshing of the cellulose membrane allowed the immobilization of about 10 times more AuNP compared to the recovery of a glass substrate (3.8×10^{13} AuNP.cm^{-2}) [25]. This quantity highlighted the interest of using a cellulosic membrane as a substrate to maximize AuNP immobilization. As the number of embedded AuNP increased, the specific surface exchange with analytes should increase accordingly.

Images of CM and NM (15 AuNP deposition steps) are shown in Fig. 2B and C, respectively. SEM performed on nanostructured filters (Fig. 2D) showed the 3D structure formed by the cellulose 0.45 µm pores that constitutes the support. AuNP were also observed on the surface of the membrane (examples with arrows on Fig. 2D). The presence of gold was also assessed using SEM coupled with Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS). Details of the atomic composition showed the energy signature of gold atoms (Fig. 2E) and confirm that AuNP were deposited on the membrane.

The first PAH deposition step was determined to be a key point. The density of immobilized AuNP was found to be at least 5 times lower than NM without polymer deposition ($0.7 \pm 0.2 \times 10^{14}$ AuNP.cm^{-2}) and a high relative standard deviation value (28%) was obtained (n = 3) indicating a problematic lack of reproducibility in nanostructuration.

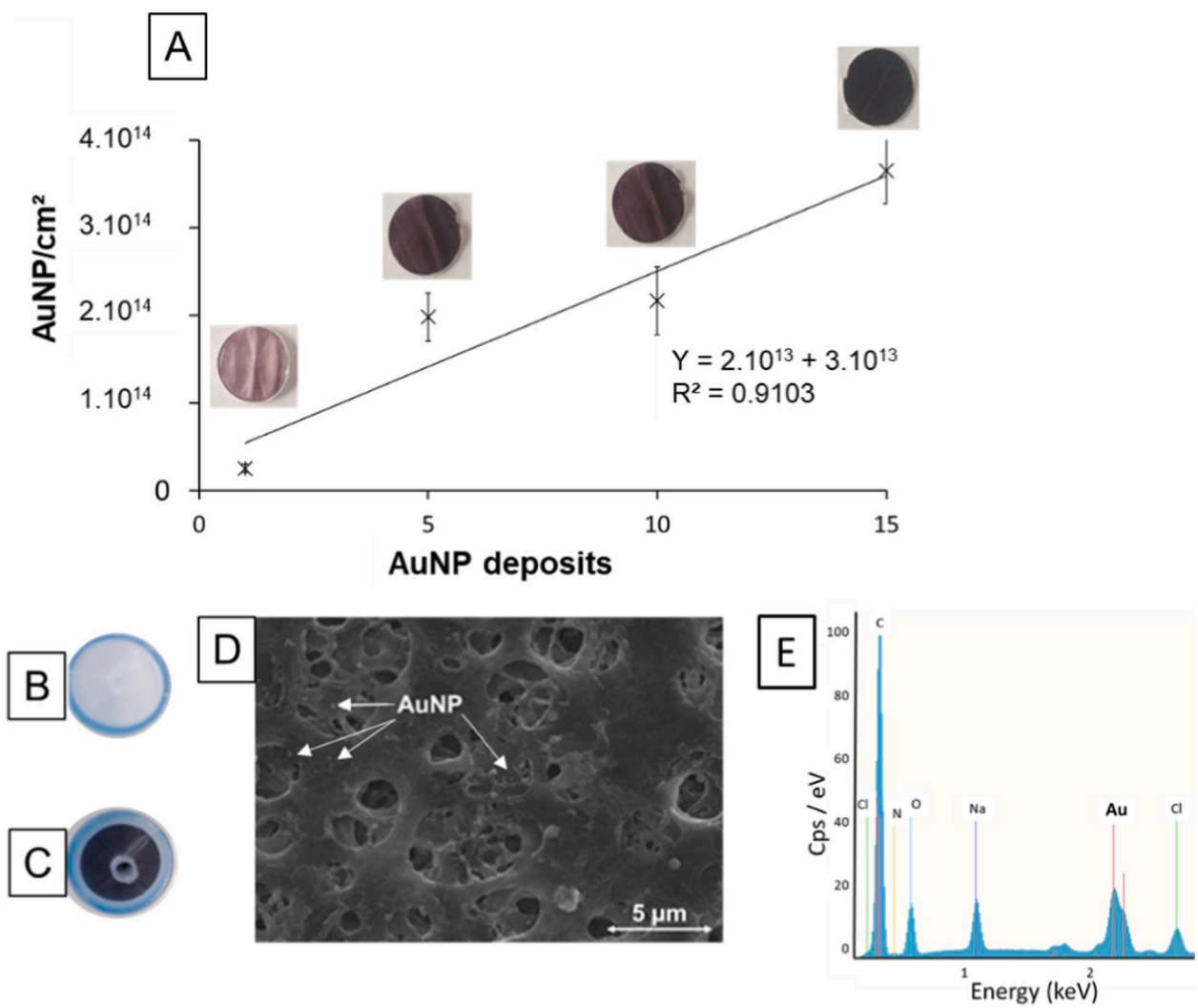


Fig. 2. Gold nanoparticle quantification and pictures of corresponding nanostructured membranes as a function of the of AuNP deposition (A). Images of a CM (B) and NM after 15 deposition steps (C). SEM realized on NM (D) and corresponding analysis of the atomic composition by Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (E).

Such results were in accordance with a non-homogeneous coating that could lead to misfunctioning devices or underestimated results.

In addition, as it was previously demonstrated [19], such embedded AuNP showed a huge improvement in their stability and allowed a long-time storage of the device. Gold quantification on newly manufactured devices and after 6 months of storage showed no significant difference, $3.6 \pm 0.4 \times 10^{14}$ AuNP.cm^{-2} versus $3.7 \pm 0.7 \times 10^{14}$ AuNP.cm^{-2} respectively. This gives it the ability to be mass-produced and reduce inter-batch variations.

3.1.2. Device characterization with adsorbed RSH.

NAC and GSH were chosen to evaluate NM specific adsorption capacities as they are widely used and described in the literature [32]. Five hundred microliters of 50 μM of each thiol (corresponding to 25 nmol) were deposited on NM. Device membranes were then analyzed in Fourier-Transform InfraRed spectroscopy (FTIR). The spectrum corresponding to GSH exposed device presented peaks corresponding to transmittance bands form carboxylic acid (3417 cm^{-1}, 1527 cm^{-1}, 1260 cm^{-1}), amine (2935 cm^{-1}) and primary amido (1642 cm^{-1}) groups (Fig. 3). These bands corresponded to functional groups present in GSH molecules and were not detected on pure NM. Similarly, NAC coated device spectrum showed peaks corresponding to transmittance bands of carboxylic acid (3436 cm^{-1}, 1723 cm^{-1}, 1261 cm^{-1}), amine (2928 cm^{-1}) and primary amido (1650 cm^{-1}) groups indicating NAC adsorption (Fig. 3).

NM were characterized to investigate the presence of adsorbed thiols through Au-S bounding, as it is well known that compounds can also interact with AuNP thanks to other functional groups [33]. Ellman's reagent (DTNB) was filtered through the device. Should NAC or GSH be linked to AuNP thanks to amine or carboxylic acid groups, their free -SH groups would reduce DTNB reagent and the resulting molecule would be then quantified at 412 nm. For each condition, measured absorbance was below LOQ of Ellman's method (3.2 μM). This LOQ corresponded to 1.6 nmol of thiols in 500 μL, meaning that > 96% of thiols (1.6 of 25 nmol deposited) were adsorbed thanks to their -SH group to AuNP.

Finally, the chemical and electronic structure of NM with adsorbed GSH was further analyzed by XPS. Nanostructurated membranes displayed peaks for C, N and Au. C and N corresponded to cellulose and/or PAH signatures and were therefore non-specific. On the contrary, Au peaks at 84 and 87 meV were specific to metallic gold (redox state: Au_0) (data not shown) and confirmed the immobilization of AuNP on NM. Thiols exposed NM (GSH and/or NAC) showed an XPS peak at 154 meV, corresponding to sulfur atoms (Fig. 4A).

Concomitantly, a right shift occurred on Au peaks. Two contributions were found for the two Au binding energy (Au 4f7/2 and Au 4f5/2): Au0 and Au-S (Fig. 4B). The Au 4f7/2 component of the peak at lower binding energy (83.9 meV) was attributed to metallic gold (Au_0), the latter Au 4f7/2 binding energy (84.6 meV) can be associated to Au atoms bounded to S atoms. Similar shift was observed for Au4f5/2 with an energy of 87.6 meV for Au_0 and a binding energy for Au-S of 88.4 meV. Those two shifts are representative of a binding between Au and S [34].

All the previous characterization results demonstrated that NM were able to capture thiols and more precisely with the help of Au-S bounds as expected. This innovative nanostructured device has to be now evaluated in terms of practical use and performances (efficiency and loading capacity).

3.2. First approach

To demonstrate the interest of a nanostructured support, preliminary

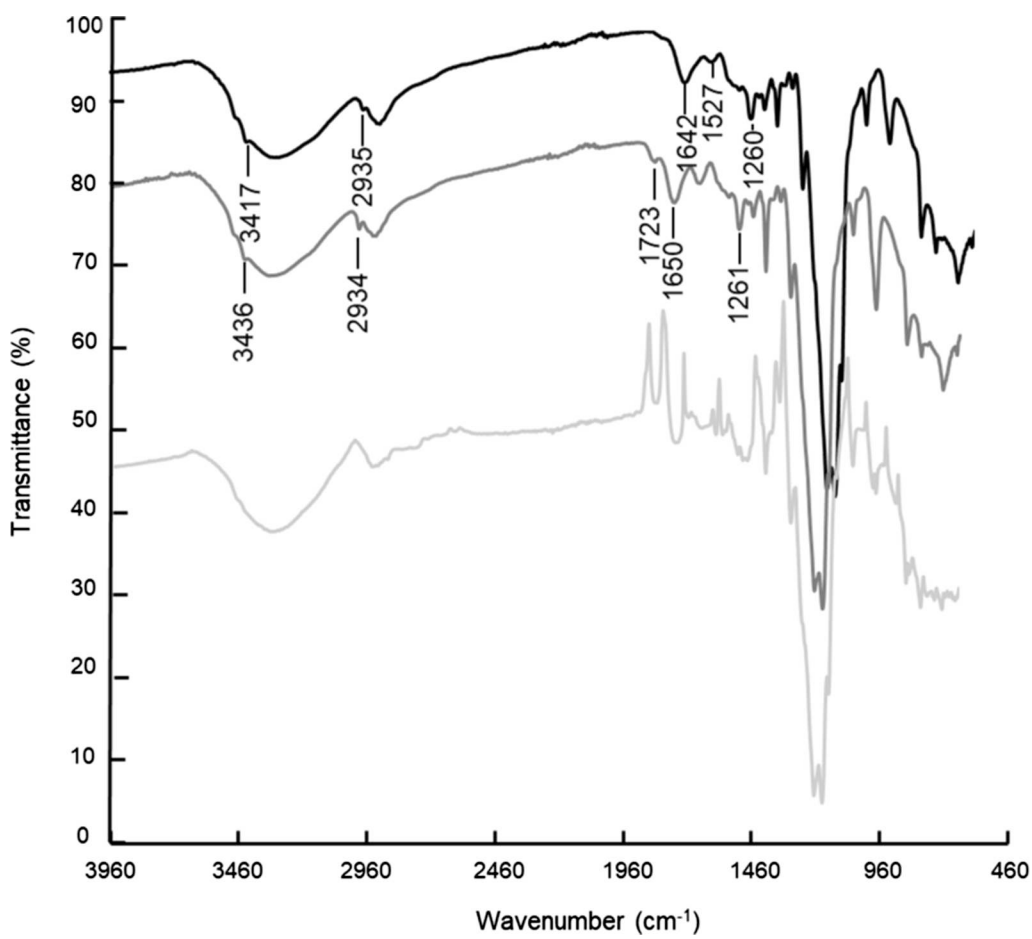


Fig. 3. IR spectra of nanostructurated membrane NM after GSH adsorption (black), after NAC adsorption (dark grey) and CM (light grey).

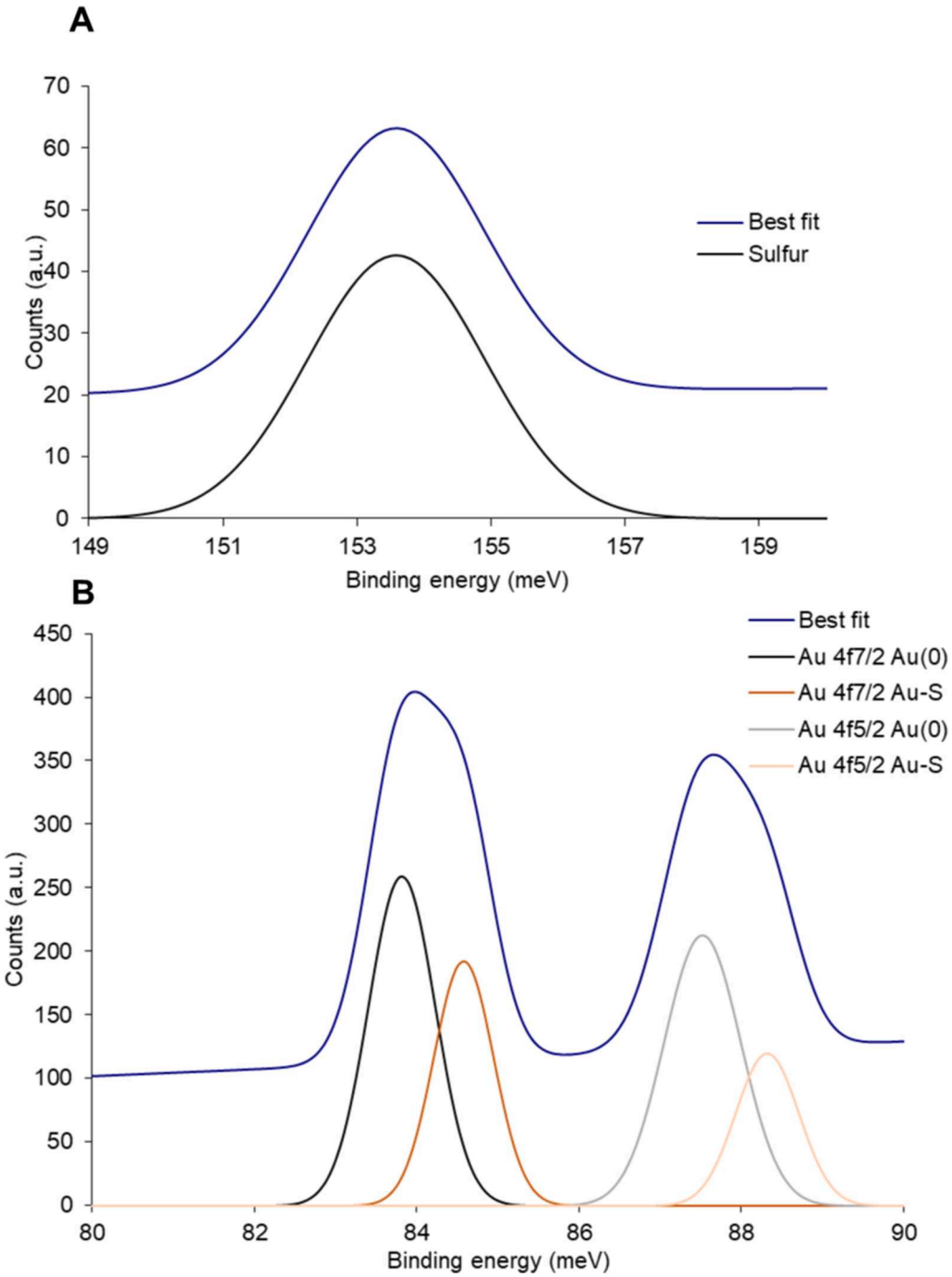


Fig. 4. XPS spectra of NM with GSH adsorbed representing (A) sulfur peak and (B) Au4f peaks.

tests have been performed with classical suspensions of colloidal AuNP. As a first approach, the reactivity of a 90 ± 3 nM AuNP suspension was evaluated with NAC, chosen as model thiol, at a known concentration (50 μM in PBS) and at room temperature. After centrifugation (0 to 90 min), remaining thiols in the supernatant were quantified using Ellman's method to estimate the quantity of thiol adsorbed on AuNP. As illustrated in Figure S3A (Supplementary information, section S3), the addition of AuNP in the media, compared with negative controls (no AuNP), lead to a 90% decrease in NAC concentration. This demonstrated the ability of colloidal AuNP to adsorb thiols, which was consistent with our previous results for similar molecules and associated RSNO [35]. Interaction between colloidal AuNP and thiols was found effective for thiol capture but relied on a time-consuming sample treatment (i.e. at least 90 min centrifugation). As a first conclusion, the quantification and the identification of adsorbed thiols cannot be considered without further processing samples or using immobilized nanoparticles. The contact time between AuNP and NAC was studied (Figure S3B) and indicated that the incubation time of the thiol species in the nanoparticle suspension does not influence the global thiol adsorption. As illustrated in Figure S3B, an instantaneous capture rate was observed whatever the contact time under study and led to the possibility of direct filtration of thiol solution through a NM.

3.3. Adsorption and desorption performances

A direct filtration (without any pretreatment time) of 500 μL of 50

μM thiols (corresponding to 25 nmol) was realized with the NM. After HPLC quantification of filtrates, NM was demonstrated to capture 90.7 ± 5.4% and 99.5 ± 0.2% of NAC and GSH respectively. To directly quantify adsorbed thiols, a desorption step was imagined. Two different solutions were considered: desorption based on the reduction of Au-S bound with a strong reducing agent ($NaBH_4$) or through RSH ligand exchange using the dithiol DTT. The first solution was rapidly aborted because of very problematic chromatographic interferences. For the second desorption method, DTT was supposed to have a better affinity for AuNP due to its two thiol groups associated with a low molecular weight. In the literature, DTT was demonstrated to bind to AuNP gold core with a bond-energy higher than 100 $kcal.mol^{-1}$ when both its thiol groups were involved in the linking [36]. To compare, classical thiols usually bond to AuNP gold core with an energy of 40 to 50 $kcal.mol^{-1}$ [20,21]. This energy difference allows DTT to preferentially link to AuNP in place of other thiols [36]. The preferential oxidized form of DTT corresponds to the cyclization through an intramolecular S-S bound, limiting the creation of heteromolecular oxidized dithiols (i.e. DTT-SR dimers). This leads DTT to be the best candidate to I) thiol desorption and II) thiol identification, widely described to chemically desorb thiol molecules from AuNP [33].

For desorption, 500 μL of DTT 50 mM (corresponding to 25 μmol) were filtered through the NM containing adsorbed thiols (NAC and GSH as described in the previous step) and the filtrate was analyzed by HPLC. This operation was repeated until complete desorption and results are shown in Fig. 5.

NAC and GSH total releases were achieved after 3 and 6 desorption steps, with a release rate of 89.3 ± 11.4% and 92.1 ± 5.1% of adsorbed thiols, respectively. Even if both thiols were totally desorbed from NM, it required twice the number of desorption steps for GSH compared to NAC. Two hypotheses were raised to explain this matter. i) The steric hindrance difference between NAC and GSH avoids DTT to access the AuNP surface when GSH is absorbed. ii) An affinity difference for AuNP between NAC and GSH. This showed that desorption step must be optimized for each adsorbed thiol, in terms of DTT concentration, repetition number, and contact time. As a first step of optimization, a longer contact time of DTT was consider as Tsai *et al.* had demonstrated that maximal thiol desorption could be obtained after a contact time of several hours [36]. However, one-hour contact time led to very similar results as instantaneous deposition of DTT. The second step was to improve DTT concentration, and a 1 step method (500 μL of 50 mM DTT – or 75 μmol) did not achieved the same desorption rate (31.6 ± 3.4% of desorption) as the 3 steps method (3 times 500 μL of 50 mM DTT – or 3 times 25 μmol).

Evaluation of capture capacity of NM of more complex samples was assessed. Binary mixture of the two thiols (500 μL of 50 μM of both NAC and GSH, corresponding to 25 nmol each) were deposited on NM and quantified before and after the last desorption step. Only 59.0 ± 5.0% of NAC and 50.0 ± 5.6% of GSH were adsorbed when both thiols were deposited. GSH structure and molecular weight is supposed to cause a more important steric hindrance that could prevent NAC to bind on AuNP surface as previously mentioned. The total adsorbed quantity was similar compared to a single thiol adsorption and no competition effect was observed between NAC and GSH indicating the device capacity to trap any low molecular weight thiols in a similar pattern.

After desorption, it appeared that NAC and GSH, when mixed, presented a different behavior to DTT exposition. NAC was preferentially desorbed (83.7 ± 10.1%). Surprisingly, more that 50% of GSH remained adsorbed to NM. Molecules with amino or amido functional groups lead to a stronger adsorption of thiols to AuNP [33]. Fig. 5 already showed that NAC desorption was facilitated compared to GSH (with 3 times more amino/amido functional groups than NAC). Indeed, only 3 DTT desorption steps (75 μmol) were required to completely desorb NAC compared to 5 steps (125 μmol) for GSH. The presence of amine functional groups appeared to play a key role in desorption compared to adsorption [37]. It is also suggested that there is a chain-length dependence for thiol binding gold. Lateral interactions between thiols are stronger for high molecular weight thiols, making their desorption more difficult [37,38]. This desorption step may be optimized by pH modification. It was shown that pH higher than amine pKa (pKa = 8.75) can modify GSH conformation and decrease its affinity for Au [33]. But in the case of our device, it could also lead to a partial destruction of the nanostructured membrane due to drastic pH conditions (pH > 11), so this option was not investigated in this paper.

The maximum adsorption capacity of NM was evaluated by repeated filtration of RSH solutions. Results are illustrated on Fig. 6 and show that the device maximum capacity (the highest quantity of adsorbed thiols) was 270.0 ± 6.5 nmol and 60.7 ± 3.9 nmol of NAC and GSH, respectively. This corresponded to 410 and 90 molecules of respectively NAC and GSH adsorbed for each AuNP on NM, a very interesting result

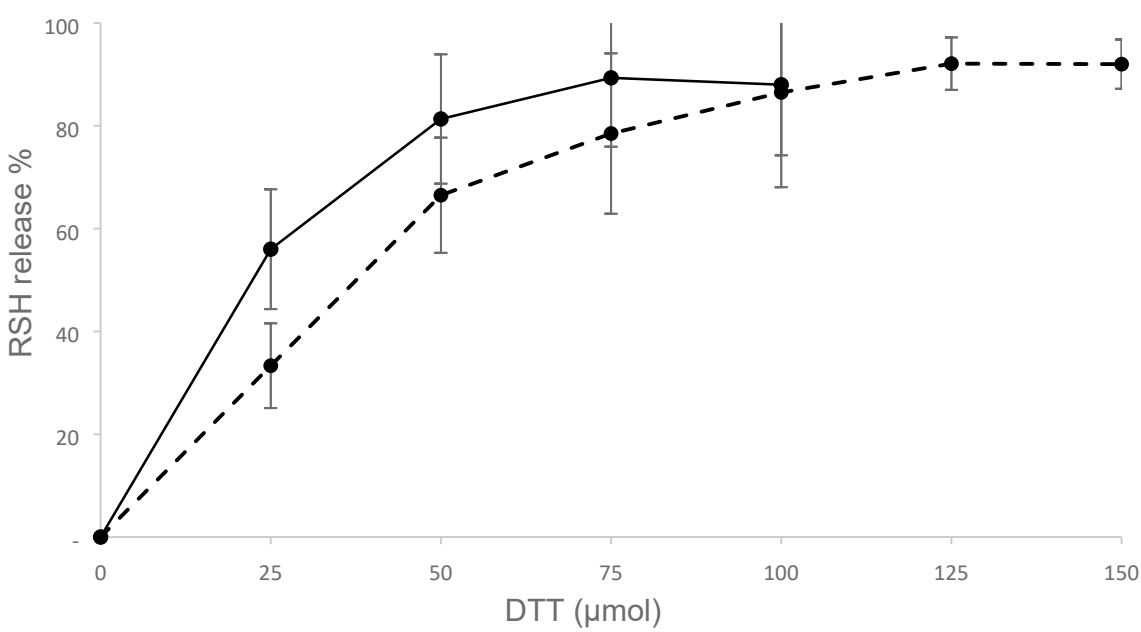


Fig. 5. RSH release study from NM: release percentage of previously adsorbed GSH (dotted line) and NAC (continuous line) as a function of DTT quantity filtered.

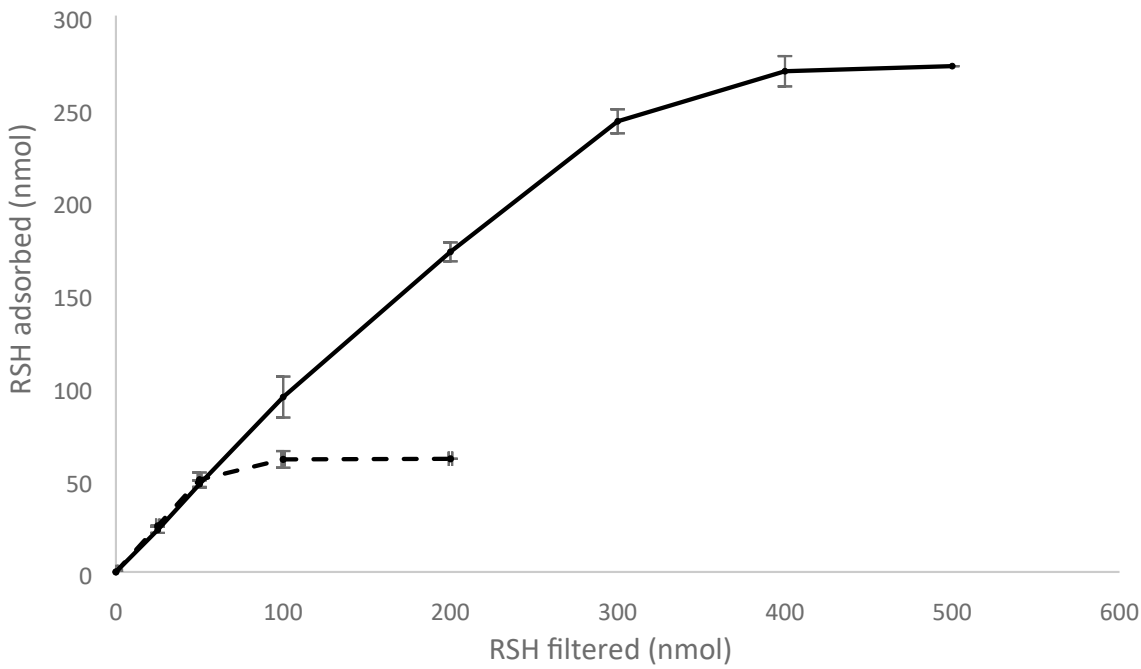


Fig. 6. Saturation study of the NM with NAC (plain line) and GSH (dotted line).

because it is of the same order as the 550 molecules of NAC adsorbed by each AuNP when not immobilized i.e. in colloidal suspension.

It was previously shown that NAC and GSH behaved differently in terms of desorption, but this appeared to be also the case in terms of NM maximal capacity. The maximal GSH capacity was almost four times lower than NAC capacity. This indicated, as previously stated, that the structural difference between NAC and GSH (molecular weight, functional groups, induced steric hindrance…) played a key role in the ability of the device adsorption. It also gave clue to further response of NM for other low molecular weight thiols adsorption. The integrity of the nanostructured membrane was studied by quantifying the gold after the adsorption and desorption steps. The amount of gold found on the membrane as the different steps are completed is constant ($1.5 \pm 0.1 \times 10^{14}$), an amount of the same order of magnitude as that evaluated before use.

These primordial development steps indicate that the device is effective for the capture and specific release of thiols with good yields. Tests with a similar desorption volume (1.5 mL) but with a larger deposition volume (15 mL) show that the adsorption and desorption efficiencies remained unchanged (>95%) and allowed us to achieve a sample concentration with a factor of 10. The filtered volume can be much larger and allows us to imagine very high concentration factors, potentially beyond 100 000 (work in progress), thus allowing the quantification of thiols in very low concentration without any prior sample treatment.

3.4. Application to biological samples

The device developed in this work was designed to capture low molecular weight thiols in complex matrices with a two-step analytical strategy. As a first proof of concept, rat plasma was chosen as plasma contains multiple compounds and molecules that can interfere with thiols (thiol bearing proteins, amino acids, oxidazing molecules …). When working with plasma samples, a classical deproteinization step is usually required before HPLC injection. Current deproteinization methods usually involve the use of chemical products such as acidic [39] or organic solvents [40] to precipitate and then remove proteins by centrifugation before analysis. The preanalytical steps could interfere with thiol stability considering the high reactivity of SH functional groups. The pretreatments could modify the GSH/GSSG balance and generate an over or underestimation of one of the species. Surprisingly, direct injection of blank plasma filtered through NM did not induce any high-pressure issues due to protein clogging in the HPLC system. The high reactivity of AuNP toward proteins coupled to the filtration ability of the device led to a direct deproteinization process, decreasing pretreatment time, avoiding dilution steps or medium modification [41,42]. Rat plasma were spiked with thiols from 1.0 to 50.0 μM and, after filtration/desorption on NM, samples were analyzed in HPLC. The NM was first validated for GSH and NAC. Linearity (1.0 – 50.0 μM, n = 3) was evaluated with linear regression models ($\alpha = 0.05$, y= (15.5 ± 0.7) × + (54.0 ± 29.5) and y= (6.5 ± 0.7) × + (-11.4 ± 4.3) for GSH and NAC respectively). Slopes were in the same order than those described in Supporting Information Section S2 (HPLC validation in plasma for NAC and GSH) indicating that the nanostructured devices were usable whatever thiol concentrations in the studied range. Repeatability and accuracy were evaluated on the entire linearity range (3 concentrations, 10.0, 25.0 and 50.0 μM, n = 3). For repeatability, results obtain were 100.0 ± 4.3 % for GSH and 100.0 ± 9.7 % for NAC. Finally, LOD and LOQ were similar as those calculated for HPLC quantification in plasma (S2). Up to 84.0 ± 5.9% of NAC and 90.5 ± 4.2% of GSH (50 μM each) were adsorbed from spiked plasma (S2). Direct RSH quantification after DTT desorption step was performed as previously described in the development part. A maximum release of 69.3 ± 6.1% and 78.0 ± 8.3% was obtained for NAC and GSH, respectively. The desorption rates were slightly lower than the ones calculated in simple matrices as illustrated in Table 1. This showed that thiol adsorption appeared to be independent from experimental conditions compared to desorption which remained challenging.

Table 1
Amount of NAC and GSH (spiked in mobile phase or rat plasma) adsorbed and desorbed from 25 nmol initially deposited on the NM.

		Capture (nmol)	Release (nmol)
NAC	Mobile phase	22.7 ± 1.4	20.0 ± 2.6
	Rat plasma	21.0 ± 1.5	14.6 ± 1.3
GSH	Mobile phase	24.9 ± 0.1	22.9 ± 1.3
	Rat plasma	22.6 ± 1.1	17.6 ± 1.9

Finally, the physiological GSH rat plasma concentration was determined using NM. Plasma GSH concentration was calculated versus plasma calibration curve to be 10.4 ± 1.0 μM (5.2 ± 0.5 nmol in 500 μL) (Supplementary information, Figure S4). This value was in accordance with the ones described in the literature [1,2] without any preanalytical steps and/or harmful chemicals. In addition, no interfering peaks were visible on chromatograms as only desorbed GSH and DTT were observed. Hence, this device is perfectly adapted for agri-food matrices with very low thiol concentrations (ng.L^{-1}). As an example, Lavigne *et al.* [43] described a wine GSH concentration of 20 μg.L^{-1}. Five hundred milliliters of this wine filtrated through our NM and eluted with 500 μL DTT would lead to a 1000 times concentration ratio with a GSH quantity of 33 nmol. This advantage will allow the direct quantification of low concentration thiols and avoid LOD/LOQ issues.

4. Conclusion

A gold nanostructured membrane was developed for the first time for specific and sensitive thiols quantification. The device was created by coating of gold nanoparticles on a cellulosic membrane, and then characterized through various techniques. The first part of this study was a proof of concept that aimed to demonstrate the capacity of the device to specifically interact with thiol molecules by forming an Au-S bond. This bond energy is nearly covalent and allows a specific adsorption of these molecules. Thiol adsorption was studied with two model thiols: NAC and GSH that are commonly used in literature. The two thiols were successfully adsorbed in a first step and then released from the device, in a second step, by ligand exchange reaction using a dithiol molecule. Characterization of the two steps was achieved by HPLC. This specific pretreatment method allows to specifically concentrate thiols and is designed for biological samples: no matrix effect, thiol preservation, easily handled. The strong bound between gold and thiol also avoid stability issues (through -SH oxidation essentially) occurring with current thiol analytical methods. Furthermore, the volume needed to desorb leads to a potential analyte concentration.

CRediT authorship contribution statement

Margaux Berthou: Investigation, Validation, Writing – original draft. **Arnaud Pallotta:** Methodology, Validation, Writing – original draft. **Jordan Beurton:** Investigation. **Thomas Chaigneau:** Investigation. **Athanassia Athanassiou:** Resources. **Christophe Marcic:** Writing – review & editing. **Eric Marchioni:** Writing – review & editing. **Ariane Boudier:** Project administration, Writing – original draft. **Igor Clarot:** Conceptualization, Methodology, Project administration, Supervision, Writing – original draft.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Authors would like to thank the Faculty of Pharmacy of Nancy and its Plateforme de Mesures Physico-Chimiques for FTIR measurements as well as Dr. François Dupuis for providing the rat plasma.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123244.

References

[1] A. Meister, Glutathione metabolism and its selective modification, J. Biol. Chem. 263 (1988) 17205–17208, https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)77815-6.
[2] E.Y. Park, N. Shimura, T. Konishi, Y. Sauchi, S. Wada, W. Aoi, Y. Nakamura, K. Sato, Increase in the protein-bound form of glutathione in human blood after the oral administration of glutathione, J. Agric. Food Chem. 62 (2014) 6183–6189, https://doi.org/10.1021/jf501338z.
[3] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, Arch. Biochem. Biophys. 82 (1959) 70–77, https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6.
[4] B. Halliwell, M. Whiteman, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? Br. J. Pharmacol. 142 (2004) 231–255, https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776.
[5] D. Giustarini, A. Milzani, I. Dalle-Donne, R. Rossi, Detection of S-nitrosothiols in biological fluids: a comparison among the most widely applied methodologies, J. Chromatogr. B 851 (2007) 124–139, https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.031.
[6] W. Zhu, G. Jiang, L. Xu, B. Li, Q. Cai, H. Jiang, X. Zhou, Facile and controllable one-step fabrication of molecularly imprinted polymer membrane by magnetic field directed self-assembly for electrochemical sensing of glutathione, Anal. Chim. Acta 886 (2015) 37–47, https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.036.
[7] X. Dai, Z.-F. Du, L.-H. Wang, J.-Y. Miao, B.-X. Zhao, A quick response fluorescent probe based on coumarin and quinone for glutathione and its application in living cells, Anal. Chim. Acta 922 (2016) 64–70, https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.04.003.
[8] C. Xie, D. Zhong, X. Chen, A fragmentation-based method for the differentiation of glutathione conjugates by high-resolution mass spectrometry with electrospray ionization, Anal. Chim. Acta 788 (2013) 89–98, https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.06.022.
[9] N.N. Sazhina, Determination of antioxidant activity of various bioantioxidants and their mixtures by the amperometric method, Russ. J Bioorg. Chem. 43 (2017) 771–775, https://doi.org/10.1134/S1068162017070147.
[10] N. Fu, H. Wang, M. Li, G. Zheng, H. Zhang, S. Liang, Spectrofluorimetric determination of thiols in biological samples with a new fluorescent probe 3-maleimidylbenzanthrone, Anal. Lett. 38 (2005) 791–802, https://doi.org/10.1081/AL-200051025.
[11] L. Kukoc-Modun, M. Biocic, N. Radić, Determination of penicillamine, tiopronin and glutathione in pharmaceutical formulations by kinetic spectrophotometry, Acta Pharmaceutica 71 (2021) 619–630, https://doi.org/10.2478/acph-2021-0038.
[12] S. Melnyk, M. Pogribna, I. Pogribny, R.J. Hine, S.J. James, A new HPLC method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma aminothiols using coulometric electrochemical detection11This work was funded by a grant from the FDA-Office of Women's Health, J. Nutr. Biochem. 10 (1999) 490–497, https://doi.org/10.1016/S0955-2863(99)00033-9.
[13] J. Hodáková, J. Preisler, F. Foret, P. Kubáň, Sensitive determination of glutathione in biological samples by capillary electrophoresis with green (515nm) laser-induced fluorescence detection, J. Chromatogr. A 1391 (2015) 102–108, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.062.
[14] W. Jin, X. Li, N. Gao, Simultaneous determination of tryptophan and glutathione in individual rat hepatocytes by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection at a carbon fiber bundle−Au/Hg dual electrode, Anal. Chem. 75 (2003) 3859–3864, https://doi.org/10.1021/ac0207022.
[15] A. Llevot, D. Astruc, Applications of vectorized gold nanoparticles to the diagnosis and therapy of cancer, Chem. Soc. Rev. 41 (2012) 242–257, https://doi.org/10.1039/C1CS15080D.
[16] S.M. Taghdisi, N.M. Danesh, P. Lavaee, M. Ramezani, K. Abnous, An aptasensor for selective, sensitive and fast detection of lead(II) based on polyethyleneimine and gold nanoparticles, Environ. Toxicol. Pharmacol. 39 (2015) 1206–1211, https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.04.013.
[17] E. Mele, G.C. Anyfantis, D. Fragouli, R. Ruffilli, A. Athanassiou, Localized synthesis of gold nanoparticles in anisotropic alginate structures, RSC Adv. 4 (2014) 20449, https://doi.org/10.1039/c4ra02183e.
[18] G. Maiorano, E. Mele, M.C. Frassanito, E. Restini, A. Athanassiou, P.P. Pompa, Ultra-efficient, widely tunable gold nanoparticle-based fiducial markers for X-ray imaging, Nanoscale. 8 (2016) 18921–18927, https://doi.org/10.1039/C6NR07021C.
[19] A. Pallotta, M. Parent, I. Clarot, M. Luo, V. Borr, P. Dan, V. Decot, P. Menu, R. Safar, O. Joubert, P. Leroy, A. Boudier, Blood compatibility of multilayered polyelectrolyte films containing immobilized gold nanoparticles, Part. Part. Syst. Charact. 34 (2017) 1600184, https://doi.org/10.1002/ppsc.201600184.
[20] H. Häkkinen, The gold–sulfur interface at the nanoscale, Nature Chem. 4 (2012) 443–455, https://doi.org/10.1038/nchem.1352.
[21] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, Chem. Rev. 105 (2005) 1103–1170, https://doi.org/10.1021/cr0300789.
[22] F. Ghasemi, M.R. Hormozi-Nezhad, M. Mahmoudi, A colorimetric sensor array for detection and discrimination of biothiols based on aggregation of gold nanoparticles, Anal. Chim. Acta 882 (2015) 58–67, https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.011.
[23] N. Khlebtsov, L. Dykman, Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies, (2011) 25.
[24] D. Tejero-Martin, C. Bennett, T. Hussain, A review on environmental barrier coatings: history, current state of the art and future developments, J. Eur. Ceram. Soc. 41 (2021) 1747–1768, https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2020.10.057.

[25] J. Beurton, I. Clarot, J. Stein, B. Creusot, C. Marcic, E. Marchioni, A. Boudier, Long-lasting and controlled antioxidant property of immobilized gold nanoparticles for intelligent packaging, Colloids Surf. B: Biointerfaces 176 (2019) 439, https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.030.
[26] U. Bubniene, M. Ocwieja, B. Bugelyte, Z. Adamczyk, M. Nattich-Rak, J. Voronoyic, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Deposition of gold nanoparticles on mica modified by poly(allylamine hydrochloride) monolayers, Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp. 441 (2014) 204–210, https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.08.058.
[27] M. Markina, N. Stozhko, V. Krylov, M. Vidrevich, K.h. Brainina, Nanoparticle-based paper sensor for thiols evaluation in human skin, Talanta 165 (2017) 563–569, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.012.
[28] A. Pallotta, A. Boudier, P. Leroy, I. Clarot, Characterization and stability of gold nanoparticles depending on their surface chemistry: Contribution of capillary zone electrophoresis to a quality control, J. Chromatogr. A 1461 (2016) 179–184, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.031.
[29] A. Pallotta, V. Philippe, A. Boudier, P. Leroy, I. Clarot, Highly sensitive and simple liquid chromatography assay with ion-pairing extraction and visible detection for quantification of gold from nanoparticles, Talanta 179 (2018) 307–311, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.11.016.
[30] ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology, European Medicines Agency. (1996).
[31] A. Pallotta, I. Clarot, J. Beurton, B. Creusot, T. Chaigneau, A. Tu, P. Lavalle, A. Boudier, Analytical strategy for studying the formation and stability of multilayered films containing gold nanoparticles, Anal. Bioanal. Chem. 413 (2021) 1473–1483, https://doi.org/10.1007/s00216-020-03113-6.
[32] K. Erkkila, S. Kyttanen, L. Dunkel, Y.H. Lue, C. Wang, A.P. Sinha-Hikim, R. S. Swerdloff, N-acetyl-L-cysteine (NAC) restores GSH-GSSG ratio and prevents human male germ cell apoptosis, J. Androl. (2006) 51.
[33] D.-H. Tsai, M.P. Shelton, F.W. DelRio, S. Elzey, S. Guha, M.R. Zachariah, V. A. Hackley, Quantifying dithiothreitol displacement of functional ligands from gold nanoparticles, Anal. Bioanal. Chem. 404 (2012) 3015–3023, https://doi.org/10.1007/s00216-012-6418-4.
[34] F. Vitale, I. Fratoddi, C. Battocchio, E. Piscopiello, L. Tapfer, M.V. Russo, G. Polzonetti, C. Giannini, Mono- and bi-functional arenethiols as surfactants for gold nanoparticles: synthesis and characterization, Nanoscale Res. Lett. 6 (2011) 103, https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-103.
[35] J. Tournebize, A. Boudier, A. Sapin-Minet, P. Maincent, P. Leroy, R. Schneider, Role of gold nanoparticles capping density on stability and surface reactivity to design drug delivery platforms, ACS Appl. Mater. Interfaces. 4 (2012) 5790–5799, https://doi.org/10.1021/am3012752.
[36] D.-H. Tsai, T.J. Cho, F.W. DelRio, J.M. Gorham, J. Zheng, J. Tan, M.R. Zachariah, V.A. Hackley, Controlled formation and characterization of dithiothreitol-conjugated gold nanoparticle clusters, Langmuir 30 (2014) 3397–3405, https://doi.org/10.1021/la500044y.
[37] L. Kankate, A. Turchanin, A. Gölzhäuser, On the release of hydrogen from the S−H groups in the formation of self-assembled monolayers of thiols, Langmuir 25 (2009) 10435–10438, https://doi.org/10.1021/la902168u.
[38] R.G. Nuzzo, B.R. Zegarski, L.H. Dubois, Fundamental studies of the chemisorption of organosulfur compounds on gold(111). implications for molecular self-assembly on gold surfaces, J. Am. Chem. Soc. 109 (1987) 733–740, https://doi.org/10.1021/ja00237a017.
[39] Y. Wang, Y. Xie, M. Bernier, I.W. Wainer, Determination of free and protein-bound glutathione in HepG2 cells using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 3533–3537, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.06.027.
[40] A.F. Loughlin, G.L. Skiles, D.W. Alberts, W.H. Schaefer, An ion exchange liquid chromatography/mass spectrometry method for the determination of reduced and oxidized glutathione and glutathione conjugates in hepatocytes, J. Pharm. Biomed. Anal. 26 (2001) 131–142, https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00402-2.
[41] D. Tsikas, M. Schmidt, A. Böhmer, A.A. Zoerner, F.-M. Gutzki, J. Jordan, UPLC–MS/MS measurement of S-nitrosoglutathione (GSNO) in human plasma solves the S-nitrosothiol concentration enigma, J. Chromatogr. B 927 (2013) 147–157, https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.01.023.
[42] K. Kowalska, M. Zalewska, H. Milnerowicz, The application of capillary electrophoresis in the determination of glutathione in healthy women's blood, J Chromatogr Sci. 53 (2015) 353–359, https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu035.
[43] V. Lavigne, A. Pons, D. Dubourdieu, Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection: changes in concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging, J. Chromatogr. A 1139 (2007) 130–135, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.083.

Au travers de cet article, il a été montré le développement et l'efficacité des membranes nanostructurées pour la capture de molécules thiolées. Dans le contexte global de ce projet de thèse, cet article a permis une preuve de concept de l'efficacité de la membrane vis-à-vis de deux thiols modèles.

Les analyses en spectroscopie soulignent la présence de soufre au niveau de la membrane mais permettent également de montrer une forte énergie de liaison entre les AuNP et le soufre de la fonction thiol. Ces premières données viennent confirmer l'efficacité du dispositif vis-à-vis de l'interaction aux molécules thiolés.

Les études sur NAC et GSH ont permis de déterminer une capacité maximale d'adsorption pour chaque thiol et d'étudier la compétitivité entre NAC et GSH. La phase de désorption étudiée par filtration de DTT montre une désorption complète des thiols adsorbés avec un profil de relargage similaire pour NAC et GSH. Ces deux étapes (adsorption et désorption) ont permis de mettre en lumière les performances du dispositif mais aussi la notion d'effet thiol dépendant. En effet, la NAC est mieux adsorbée mais également plus rapidement désorbée que le GSH. Lors d'un mélange des deux thiols, cela se traduit par une adsorption préférentielle de NAC aux dépends de GSH. Ainsi cette partie permet de souligner une notion de différence d'affinité entre les différents thiols et les AuNP.

Enfin, l'application sur du plasma de rat, a souligné l'efficacité du dispositif dans une matrice complexe. Les résultats d'adsorption et de désorption sont semblables à ceux obtenus avec les thiols modèles, suggérant qu'il n'existe aucun effet matrice dans ce cas précis. De plus, la détermination de la concentration de GSH endogène par filtration directe du plasma non surchargé (après analyse en HPLC) souligne la simplicité d'utilisation et de traitement d'échantillon. À titre d'exemple, une méthode d'analyse du GSH dans le plasma a été développée par Denzoin *et al.*. Celle-ci comprend des étapes de prétraitement du plasma, comprenant une déprotéinisation, une modification de pH et une dérivatisation avec l'Ortho-phthalaldehyde pour détection en HPLC fluo. Les résultats donnent une concentration en GSH plasmatique de 4,51 ± 1,00 µM. Cette valeur est en deçà de celle trouvée à l'aide du dispositif, soulignant l'effet des prétraitements sur la concentration en analytes.

Ainsi, au regard de ces résultats, le dispositif permet, par sa spécificité pour les thiols, de les capturer et éluer la matrice de contenance. La liaison entre AuNP et thiol permet d'engager les électrons des thiols et diminue ainsi leur réactivité. Enfin, la phase de désorption engendre une concentration des thiols, permettant d'atteindre les limites de détection des différentes méthodes analytiques.

Les précédents résultats concernent uniquement les thiols réduits. Or, l'analyse des thiols engagés dans une liaison avec le NO (*S*-Nitrosothiols) présente un intérêt majeur notamment dans la problématique des donneurs de NO. En effet, ces RSNO constituent un réservoir et un transporteur de NO, seulement l'acheminement du NO a son site d'action est conditionné par le passage des différentes barrières et fluides. Ce comportement vis-à-vis des différents fluides et barrières biologiques dépend de la nature de thiol liant le NO. Le choix du thiol est susceptible de modifier la pharmacocinétique du RSNO et donc son efficacité. C'est dans ce contexte que les membranes nanostructurées semblent intéressantes. C'est pourquoi, la partie qui suit propose une étude du comportement des RSNO vis-à-vis des membranes nanostructurées.

5. ÉTUDE DE L'EFFICACITE DU DISPOSITIF VIS-A-VIS DES *S*-NITROSOTHIOLS

La problématique soulevée précédemment de passage de barrière et de pharmacodynamique du NO et de son porteur thiolé RSH demeure un réel challenge à l'heure actuelle. En effet, pour comprendre et connaitre la pharmacocinétique des différents RSNO, il faut être capable de quantifier et suivre les espèces présentes (RSNO, RSH, NO, ions nitrites, ions nitrates et thiol oxydé : RSSR) dans chaque compartiment biologique. Cette quantification permettrait de caractériser le devenir des différents RSNO dans l'organisme et déterminer le meilleur candidat pour l'acheminement de NO et la meilleure biodisponibilité. Ces différentes mesures sont freinées par le manque de méthode unique, simple et rapide dans l'ensemble des compartiments sanguins. De plus, la multitude d'espèces présentes dans ces matrices, liée à la faible concentration en thiols engendre des problèmes analytiques.

La réactivité des AuNP colloïdales vis-à-vis des RSNO a été démontrée, engendrant la rupture homolytique de la liaison RS-NO aboutissant à la formation de deux radicaux $RS^{\bullet}$ et $NO^{\bullet}$. En effet, l'énergie de liaison or-thiol est deux fois supérieur à celle de la liaison RS-NO (40 kcal/mol *vs.* 20 kcal/mol) [167], favorable, donc à une dénitrosation et à la captation de la partie thiyl par les AuNP. Cette réactivité a notamment été mise à profit par deux équipes de chercheurs afin d'une part d'identifier les sites de S-nitrosylation et S-glutathionylation de protéines et de quantifier indirectement du GSNO dans du plasma recomposé [168,169]. Ces travaux ont montré des difficultés analytiques telles que des limites de quantification inappropriées aux concentrations en GSNO physiologique (10 nM à 10 mM selon la situation pathologique [170–172] *vs.* LOD à 100 nM) ou des problèmes de discrimination des divers RSNO.

Dans ce contexte, les membranes nanostructurées apparaissent comme une potentielle solution aux différents problèmes cités. L'objectif est donc d'étudier l'influence de la partie nitrosée sur le comportement et l'efficacité du dispositif. En effet, l'immobilisation des AuNP pourrait engendrer des modifications de leur réactivité face aux RSNO.

5.1. PREUVE DE CONCEPT

Pour démontrer l'efficacité des filtres nanostructurés dans le contexte global des RSNO, la méthodologie appliquée consiste à utiliser le filtre afin de dénitroser les RSNO par simple contact avec les AuNP. Les thiols seraient adsorbés sur la membrane et le NO ainsi que ses dérivés seraient filtrés sans être retenus et analysés dans le filtrat (Figure 24).

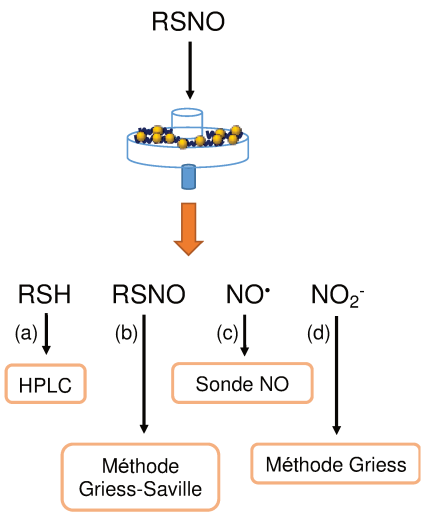


FIGURE 24: METHODOLOGIE ANALYTIQUE APRES FILTRATION DES RSNO A TRAVERS LE FILTRE NANOSTRUCTURE POUR QUANTIFIER LES RSH (A), RSNO (B), NO (C) ET IONS NITRITES (D).

Pour cela deux stratégies analytiques sont menées de front, la première avec le dispositif nanostructurés en étudiant la capacité d'adsorption de la partie thiolée des RSNO (Figure 24 a).

La seconde stratégie concerne la quantification de ce qui n'aurait pas interagi avec la membrane, à savoir : NO, les ions nitrites générés et les RSNO n'ayant potentiellement pas réagi. Dans le cas du NO, ce gazotransmetteur présente une demi-vie très courte (quelques secondes), deux méthodes de quantifications sont donc envisagées : directe ou indirecte. La quantification directe du NO se fait avec une sonde spécifique qui mesure les variations de potentiels générés par la présence de NO (Figure 24 c). La quantification indirecte du NO consiste à doser les ions nitrites NO_2^- générés afin de revenir à la quantité de NO initiale (Figure 24 d). Pour cela, la méthode utilisée est une méthode utilisant le réactif de Griess et permettant de former, en présences d'ions nitrites, une molécule (NAT) émettant en fluorescence à 570 nm. Enfin, les RSNO n'ayant pas réagi avec la membrane seront quantifiés par la méthode de Griess-Saville, permettant de dénitroser puis quantifier en fluorescence les ions nitrites générés (Figure 24 b).

L'assemblage de l'ensemble de ces méthodes mènent à une caractérisation complète de l'ensemble des espèces présentes. Cette stratégie a donc été appliquée aux membranes nanostructurées.

5.1.1. CINETIQUE D'INTERACTION AVEC LA MEMBRANE

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la cinétique de dénitrosation des RSNO au contact des AuNP. En effet, la littérature fait état d'une réaction instantanée avec des AuNP colloïdales [168,169]. Il est donc nécessaire de vérifier ce postulat avec les AuNP immobilisées. Pour cela, la réactivité des filtres nanostructurés vis-à-vis des RSNO a été testée en fonction du temps de contact avec la membrane. 500 µL de solution de S-nitroso-N-acétylcystéine (NACNO) à 6 µM en tampon PBS sont filtrés à différents temps (0,25h, 0,5h et 2h). Un contrôle est réalisé en utilisant un filtre non nanostructuré (témoin négatif). Le filtrat de chaque filtre (nanostructurés ou non) est analysé afin de quantifier les ions nitrites et les RSNO. Les résultats montrent qu'après 15 min de contact avec la membrane nanostructurée, la quantité en NACNO retrouvé dans le filtrat est inférieure à la LOQ de la méthode (10 nM) tandis qu'environ 90 % (87 ± 3 %) de NACNO est retrouvé après filtration à travers le filtre témoin (Figure 25).

En parallèle, la quantification des ions nitrites montre une augmentation de leur concentration (de 0 µM à t = 0, juqu'à 5,5 ± 0,2 µM, 5,3 ± 0,5 µM et 5,0 ± 0,5 µM à t = 0,25 h, 0,5h et 2h respectivement). Cette augmentation est proportionnelle à la quantité de RSNO ayant réagi avec la membrane. Cela traduit la forte réactivité du dispositif vis-à-vis des RSNO, engendrant une rupture homolytique de la liaison S-NO avec captation de la fraction RS^- et libération du NO (et de ses dérivés).

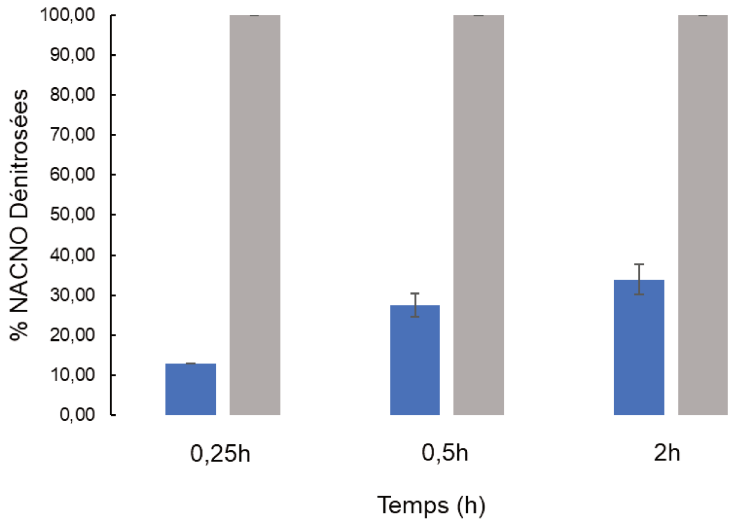


FIGURE 25: ETUDE DE L'INTERACTION ENTRE NACNO (6 µM) ET LA MEMBRANE NANOSTRUCTUREE EN FONCTION DU TEMPS DE CONTACT (GRIS) PAR ANALYSE DES RSNO DANS LE FILTRAT (N = 3). LE CONTROLE EST REALISE DANS UN FILTRE SANS AUNP (BLEU).

Il apparait que la dénitrosation par les AuNP immobilisées semble être un processus rapide (inférieur à 15 minutes). Des essais ont donc été menés avec une filtration directe de NACNO et GSNO afin de mettre en évidence le caractère instantané de la réaction comme c'est le cas pour les RSH. Des solutions de NACNO et GSNO à 6 µM ont donc été filtrées directement (t = 0 min) à travers un filtre nanostructuré et un filtre témoin non nanostructuré. Les valeurs de la Figure 26 sont calculées par rapport au témoin NACNO ou GSNO avant filtration. Les résultats mettent en évidence une interaction RSNO-membrane instantanée avec une concentration résultante en NACNO nulle (< LOQ) et une diminution d'environ 90 % pour GSNO (Figure 26). L'analyse de la concentration en RSNO après filtration sur filtres témoins montre qu'il n'existe aucune interaction entre la membrane seule et RSNO ni aucun effet du matériau (cellulose régénérée).

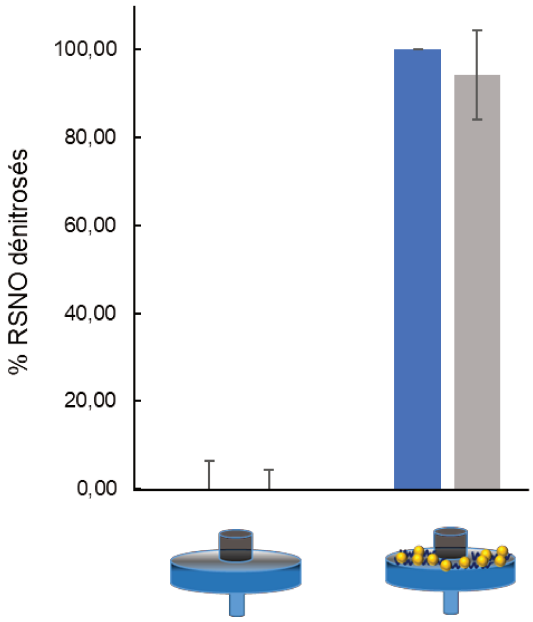


FIGURE 26: ETUDE DE L'INTERACTION PAR FILTRATION DIRECTE DE NACNO (BLEU) ET GSNO (GRIS) SUR UN FILTRE NANOSTRUCTURE ET FILTRE TEMOIN, PAR ANALYSE DES RSNO PRESENTS DANS LE FILTRAT (N = 3).

Ces résultats témoignent de la réactivité des AuNP immobilisées, au sein de la membrane, vis-à-vis des RSNO. La cinétique de cette réaction est instantanée et entièrement due à la présence des AuNP. En effet, la filtration à travers un filtre nanostructuré n'a montré aucune interaction. Il a donc été montré la capacité du dispositif à dénitroser les RSNO mais pas à capter la partie thiolée.

5.1.2. CAPACITE DENITROSANTE DE LA MEMBRANE

Après avoir démontré la rupture instantanée de la liaison SNO et la libération de $NO^{\bullet}$, il reste à prouver que la partie thiolée libérée est bien adsorbée par la membrane et non relarguée dans le filtrat. Pour cela, on s'intéresse d'une part à la quantification directe du radical $NO^{\bullet}$ à l'aide d'une sonde spécifique au NO et de l'autre à la quantification des RSH.

La quantification du NO se fait par le biais d'une sonde spécifique à NO. Pour cela, la fiche constructeur de la sonde à NO atteste de sa spécificité, pour s'assurer de la véracité de ces données, la spécificité a été testée au sein du laboratoire avec les ions nitrites et nitrates ainsi qu'une autre espèce radicalaire : l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS). Aucun signal n'est induit suite à l'introduction de ces espèces, confirmant la spécificité de la sonde pour le NO. Cela signifie que les signaux induits par la sonde sont dus uniquement à la présence de NO. La seconde partie du clivage de la liaison S-NO, radical thiyl, est quantifiée en HPLC UV-vis avec la méthode décrite précédemment.

L'étude consiste à filtrer 500 µL de GSNO 40 µM (20 nmol) dans du PBS à travers un filtre nanostructuré, sans temps de pose, et de quantifier dans le filtrat les différentes espèces potentiellement présentes ($NO^{\bullet}$, GSH, GSSG et GSNO). Il apparait que les concentrations en GSH et GSSG sont en dessous de la LOQ de la méthode (0,5 µM) tandis qu'une concentration en GSNO de 8,5 µM est déterminée. La détection via l'électrode à NO montre une libération de 34 µM de NO. La membrane nanostructurée permet donc la dénitrosation de 78,8 % du GSNO présent suivi d'une adsorption de la totalité des thiols libérés. Parallèlement, la quantité de NO quantifiée est concomitante à la quantité de thiol adsorbés. Ces résultats confirment l'adsorption de la partie thiolée suite à la dénitrosation du GSNO.

Ces différentes études ont permis de démontrer la réactivité des AuNP immobilisées face aux RSNO. Cette réaction se fait de manière instantanée et génère la formation de deux radicaux : thiyl et NO. La partie thiolée est directement adsorbée sur la membrane tandis que le NO est libéré dans le milieu sans interaction avec la membrane. La réactivité du dispositif vis-à-vis de NACNO et GSNO semble être similaire, à cette concentration (6 µM), puisqu'environ 100% de chaque espèce est dénitrosée. Ces résultats viennent compléter ceux obtenus précédemment avec les thiols seuls et démontrent l'efficacité de la membrane nanostructurée avec les *S*-nitrosothiols avec un comportement semblable. De la même manière que précédemment avec les RSH, les performances du dispositif avec une matrice complexe ont été étudiées.

5.2. APPLICATION DU DISPOSITIF A UNE MATRICE BIOLOGIQUE : PLASMA

Les études précédentes démontrent le comportement et l'efficacité du dispositif vis-à-vis des RSNO dans une matrice simple qu'est le PBS. En se replaçant dans le contexte global de ce projet, et notamment l'étude de la pharmacodynamique des différents donneurs de NO en milieu biologique, il convient d'étendre la preuve de concept de ces filtres dans des matrices biologiques.

Les membranes nanostructurées ont été testées avec du plasma, provenant de rats adultes mâles Wistar, supplémenté en GSNO à la même concentration que précédemment. Pour cela, le plasma est dilué au 1/10 dans du PBS puis supplémenté en GSNO pour une concentration finale de 40 µM (20 nmol) et filtré à travers les filtres (nanostructuré et témoin). Conformément à ce qui avait été fait avec les RSNO modèles, le filtrat est analysé par la méthode de Griess et de Griess-Saville. Les résultats (n = 1) sont regroupés sur la Figure 27 en parallèle des résultats obtenus en matrice simple (tampon PBS). L'analyse du filtrat montre que 15,9 µM de GSNO (8 nmol) n'ont pas interagi avec la membrane tandis que 1,9 µM d'ions nitrites (1 nmol) ont été libérées dans le filtrat. Cela traduit une dénitrosation incomplète des RSNO (61,5 %). Ce résultat semble inférieur à celui calculé en matrice simple précédemment (78,8 %) mais nécessite d'être réalisé en n = 3 afin de confirmer cette tendance. De plus, si on considère qu'environ 12 nmol de GSNO ont été dénitrosées, cela correspond à autant en NO et en RSH. Cependant, seule 1 nmol d'ions nitrites est quantifiée. Cela souligne un problème de quantification de NO. Pour un dosage complet, il faudrait quantifier en parallèle NO et ses dérivés.

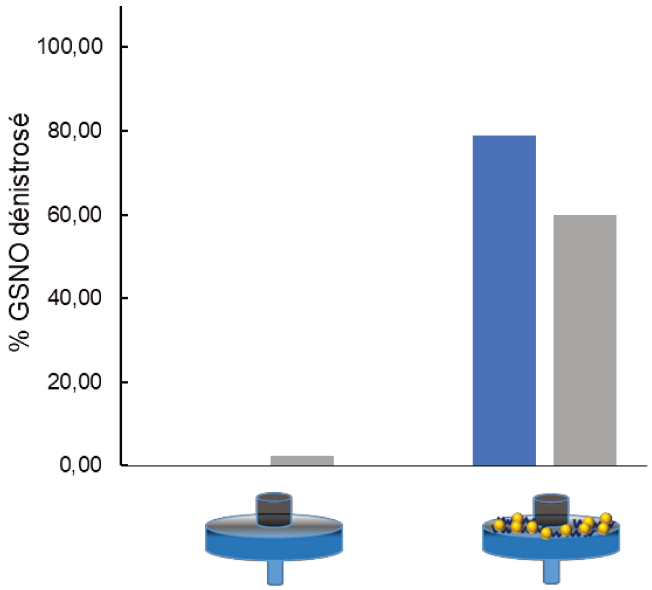


FIGURE 27: COMPARAISON DE L'INTERACTION GSNO/AUNP IMMOBILISEES EN FONCTION DE LA MATRICE : PBS (BLEU) ET PLASMA (GRIS), AVEC TEMOINS SUR FILTRE NON NANOSTRUCTURES PAR ANALYSE DU GSNO DANS LE FILTRAT (N = 1).

L'étude de l'efficacité du dispositif dans du plasma montre une légère diminution de la capacité de dénitrosation des AuNP. De plus, la quantification des ions nitrites n'est pas en accord avec la quantité de GSNO dénitrosé. Cela peut s'expliquer par la quantification indirecte du NO.

Les résultats suggèrent la possibilité d'utiliser le dispositif pour quantifier le GSNO endogène (120 à 180 nM [173]). En effet, bien que la concentration en GSNO soit très faible, il est possible de concentrer l'échantillon à travers le dispositif. Sachant qu'il a été montré, lors du développement du dispositif avec RSH, qu'il fallait 2,5 mL de DTT pour désorber environ 92 % du GSH adsorbé. Il est possible d'imaginer filtrer environ 10 mL de plasma afin d'adsorber suffisamment de GSNO pour avoir une concentration supérieure à la LOQ de la méthode HPLC (0,5 µM) lors de l'analyse du relargage. Cependant, il a été montré la propriété dénitrosante du filtre aboutissant à la capture des thiols relargués ainsi que les thiols déjà présents dans la matrice. Pour obtenir une mesure exacte de la concentration en GSNO endogène, il faudrait bloquer la fonction SH des thiols dans l'échantillon. Ainsi, seuls les thiols issus du clivage de la liaison S-NO seraient. Pour cela, il est possible d'utiliser le N-ethylmaleimide (NEM) afin de bloquer la

fonction thiol des RSH « libre » (Figure 28). D'autres molécules peuvent également servir car classiquement utilisées pour former des liaisons de forte affinité avec la fonction thiol : Iodoacétamide ou encore methyl methanethiosulfonate. Cette stratégie est valable à condition que l'énergie d'activation de la liaison entre l'agent bloquant et le thiol soit supérieur à celle entre Au-S.

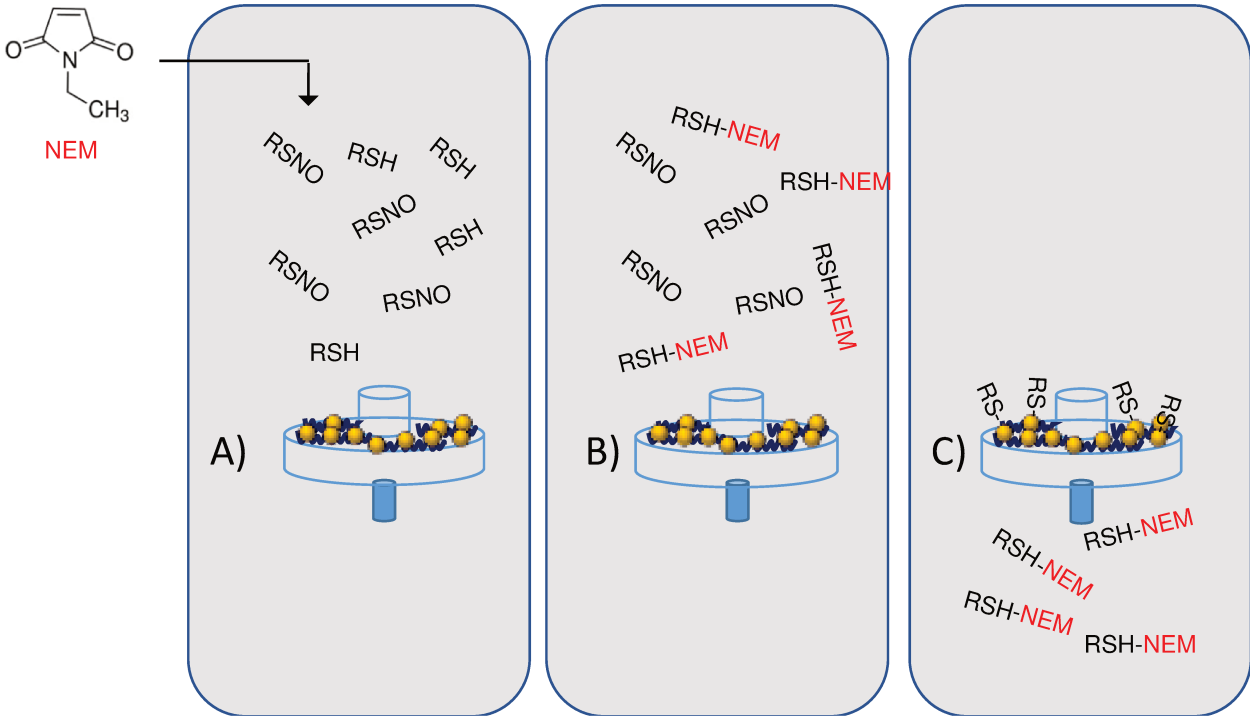


FIGURE 28: ILLUSTRATION DE L'UTILISATION DU NEM AVANT FILTRATION D'UNE SOLUTION CONTENANT RSH ET RSNO (A) POUR BLOQUER LES FONCTIONS THIOL DES RSH (B) ET ADSORBER UNIQUEMENT LESTHIOLS ISSUS DE LA DENITROSATION (C).

6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours des dernières années, de nombreux nanomatériaux ont été développés pour la capture sélective d'analytes et notamment de thiols. Ces dispositifs montrent des performances supérieures aux procédés classiques, sans nanomatériaux, mais présentent des inconvénients. En effet, le fait d'utiliser des nanoparticules colloïdales engendre des problèmes de stabilité dans le temps et vis-à-vis de l'environnement (pH, température, espèces présentes…). Ces différents facteurs obligent à mettre en place

des étapes de prétraitement ou limitent les applications en fonction des matrices. De plus, ces dispositifs sont à usages unique et très dépendant des propriétés des nanomatériaux eux-mêmes.

Pour pallier ces problèmes de stabilité et augmenter la praticité des méthodes, l'immobilisation des nanoparticules est une solution largement décrite. Parmi les supports utilisés pour créer des matériau nanostructurés, la littérature fait état de la cellulose, notamment pour la préconcentration d'analytes [155]. Ce matériau est bon marché, facilement structurable et présente une porosité intéressante pour les échanges avec différents milieux. De plus, parmi les dispositifs mis au point, les méthodes de nanostructuration sont diverses (par couplage galvanique [174], electropolymérisation [175], électrodéposition [176] …). Cependant, aucune de ces méthodes n'est décrite pour la détection de thiols.

Parmi les dispositifs nanostructurés développés pour l'analyse de thiols, la littérature fait majoritairement état d'immobilisation d'AuNP sur des supports de SALDI et MALDI-MS (*Surface/matrix assisted laser desorption/ionisation*) ou encore sur des capillaires d'électrophorèse pour détection directe [177–179]. Ces méthodes permettent d'atteindre des limites de quantification très basses (de l'ordre du nanomolaire). Néanmoins, l'immobilisation se fait directement sur le matériel de la méthode analytique ce qui représente un support couteux. Plus récemment, des chercheurs ont mis au point des seringues en polypropylène modifiée avec des AuNP pour la détection de GSH. Ce dispositif est moins onéreux et facile à nanostructurer. La méthode d'immobilisation utilisée consiste à activer la surface, en utilisant divers solvants, puis fonctionnaliser le matériau avec des fonctions thiols pour immobiliser les AuNP. Les auteurs obtiennent une seringue nanostructurée sur la partie inférieure qui n'est pas en contact avec le piston. En effet, lors de ce projet, il a pu être montré lors de la fabrication des membranes que les seringues utilisées pour faire passer les liquides à travers le filtre avaient tendance à accrocher des AuNP. Seulement ces nanoparticules immobilisées sont « arrachées » lors du passage du piston. Ceci expliquerait que seule la partie basse de la seringue contienne des AuNP. On peut donc se questionner sur la stabilité de la couche d'AuNP sur le support.

Ainsi, notre dispositif répond aux diverses problématiques soulevées par les méthodes précédemment citées. En effet, il utilise un support simple, facilement modifiable et utilisable et offre une grande surface d'échange entre les AuNP et l'environnement du fait de la porosité de la membrane. En effet, les filtres seringues sont déjà utilisés en routine dans beaucoup de laboratoires, rendant ainsi le dispositif simple et pratique d'utilisation. Le traitement d'échantillon en est ainsi nettement raccourci avec une simple filtration. De plus, le procédé de nanostructuration, dérivé du layer-by-layer, est un procédé communément utilisé, qui ne nécessite pas d'appareillage particulier et utilise une matière première bon marché (cellulose régénérée). Il est possible d'imaginer une industrialisation de ce procédé avec des pousses seringues automatiques par exemple, afin de produire les filtres à plus grande échelle.

Les résultats obtenus montrent l'efficacité des membranes nanostructurées pour l'adsorption et la désorption de thiols et de *S*-Nitrosothiols. Il apparait que malgré les différences des deux approches en termes de mécanismes (adsorption ou dénitrosation), les taux de captures sont similaires avec un comportement thiol dépendant. De plus, l'application à du plasma de rat, comme première approche en matrice complexe, permet d'envisager l'utilisation de ce dispositif à d'autres matrices. Le tableau 5 résume l'ensemble des résultats principaux obtenus avec les deux espèces thiolées (RSH et RSNO). Aucune différence majeure n'apparait en termes d'adsorption dans chacune des deux matrices. Ceci souligne une transposabilité des deux approches une fois dénitrosation des RSNO. Le dispositif est donc un outil simple et pratique permettant d'analyser différentes matrices sans prétraitement avec un effet de concentration de l'échantillon adapté aux traces de thiols.

TABLEAU 5: RECAPITULATIFS DES DONNEES D'ADSORPTION OBTENUES AVEC RSNO ET RSH DANS MATRICE SIMPLE ET PLASMA.

		RSH	RSNO (n=1)
Cinétique d'adsorption		Instantanée	Instantanée
Adsorption PBS (%)	NAC/NACNO	90,7 ± 5,4	100,0
	GSH/GSNO	99,5 ± 0,2	78,8
Adsorption plasma (%)	NAC/NACNO	84,0 ± 4,9	/
	GSH/GSNO	90,5 ± 4,2	61,5

Ces résultats ont permis de souligner une différence de comportement thiol dépendant vis-à-vis de la membrane. En effet, à saturation, chaque AuNP peut adsorber environ 400 molécules de NAC contre seulement 100 de GSH. Ces résultats suggèrent qu'en jouant sur la quantité d'AuNP immobilisées, on puisse augmenter les performances d'adsorption du dispositif. Or, il a été montré que la saturation en AuNP de la membrane, telle qu'elle est présentée dans ce chapitre, est atteinte. Pour augmenter la capacité d'immobilisation, il est envisageable de disposer des filtres nanostructurés en série et ainsi gagner en sensibilité.

Ainsi, le dispositif tel qu'il est présenté dans cette partie n'est pas figé et peut parfaitement s'adapter à la matrice visée. En effet, l'utilisation de matrices agroalimentaires possédant des thiols volatils en très faible quantité (de l'ordre du ng/L) amène d'autres possibilités de traitement d'échantillon et de stratégie d'adsorption/désorption. La concentration en thiol étant jusqu'à 1000 fois inférieur à celle des thiols dans les fluides biologiques, une adaptation de la taille de la membrane est possible. De plus, le caractère volatil des thiols permettrait une désorption thermique des composés. Pour cela, l'immobilisation d'AuNP sur des fibres SPME ou une diminution du précédent dispositif à une simple membrane nanostructurée pour adsorption et désorption thermique par évaporation de l'échantillon est envisageable.

CHAPITRE 3

1. THIOLS VOLATILS ET METHODES ASSOCIEES

Le terme molécule volatiles désigne des composés présentant une pression de vapeur élevée à température ambiante. Cette grande famille regroupe des composés présents au niveau biologiques, environnemental ou agroalimentaire. Ces espèces ont la capacité de se volatiliser à température ambiante et pression atmosphérique. À l'échelle microscopique, cela se traduit par la capacité d'une substance à se vaporiser. Cette volatilité dépend de l'état (liquide ou solide), du type de solvant contenant la molécule ou encore du type de groupements présents. En effet, la présence d'un groupement aromatique favorise le caractère volatile d'une molécule. Ces composés sont généralement associés à une odeur. Par exemple, le corps humain sécrète un large panel de composés volatils de diverses classes chimiques telles que des aldéhydes, cétones, alcools, hydrocarbures, composés soufrés et azotés [180]. D'un point de vue environnemental et industriel, ces espèces volatiles sont connus sous le nom Composés Organiques Volatils (COV) et sont très controversés et décrits pour leurs potentiels effets cancérigènes (benzène, dichlorométhane…). Enfin, dans le monde de l'agroalimentaire, ces composés volatils sont d'origine organique et caractérisés par leur fort pouvoir olfactif. Ces espèces appartiennent là encore à différentes classes chimiques tels que les hydrocarbures, les aldéhydes, les acides, alcool, ester, thiols… La particularité de ces molécules volatiles est qu'elles exercent leur pouvoir olfactif à très faible concentration, voire à l'état de traces, sauf dans le cas des épices et des aromates.

L'investigation de ces molécules volatiles connait un essor depuis quelques années menant au développement de méthodologies analytiques. Parmi les plus courants, l'utilisation d'un spectromètre de masse (MS) [180] qui est toujours couplé à une technique séparative telle que de la chromatographie gazeuse (GC) [182].

En effet, ces techniques sont parfaitement adaptées à l'application aux molécules volatiles. Peut également s'ajouter l'utilisation d'une fibre SPME (Solid Phase Micro Extraction) afin de pré concentrer l'échantillon avant analyse en GC, par exemple [183].

Dans la littérature, la méthode majoritairement décrite pour l'analyse de composés volatils est la GC-MS. Par exemple, celle-ci est utilisée pour quantifier les molécules volatiles présentes dans différents yaourts afin de déterminer l'influence de l'étape de fermentation sur le caractère doux ou acide du produit [184]. Cette technique a également permis à Ulrich *et al.* de déterminer le profil aromatique des différentes variétés de fraises [185]. Malgré la prépondérance de l'utilisation de la GC pour ces composés, la littérature fait également état de l'usage de chromatographie liquide. Wu et son équipe ont ainsi développé une méthode d'identification des composés phénoliques présents dans le café en fonctions de différents paramètres de torréfaction. La quantification des espèces volatiles est réalisée en HPLC couplée à une masse en tandem (MS-MS) [186]. L'utilisation de MALDI/SALDI-MS est également décrite dans la littérature pour l'identification de ces molécules. Par exemple, une équipe de chercheurs a utilisé cette technique afin de déterminer la structure de différentes huiles essentielles pour les mettre en relation avec leur activité biologique [187]. Enfin, la complexité des matrices et la diversité des molécules présentes dans celle-ci mène parfois à l'utilisation d'une SPME avec une fibre permettant après chauffage de l'échantillon, de capturer uniquement les composés volatils. Ainsi, des chercheurs ont étudié avec cette technique les profils aromatiques de différents miels afin de mettre en évidence d'éventuelles contaminations extérieures [188]. L'identification de ces composés s'est faite en associant la SPME à une désorption thermique afin d'être analysé en GC-MS.

Cette liste non exhaustive montre l'ensemble des méthodes les plus couramment utilisées afin d'analyser ces molécules au caractère volatile. En effet, ces méthodes sont différentes des méthodes classiques telles que la spectrophotométrie ou encore l'électrophorèse capillaire ou HPLC qui sont peu adaptées aux propriétés de ces composés.

Les thiols font partie des composés volatiles et cette fonction thiol leur confère des propriétés olfactives et gustatives. Parmi les thiols les plus connus dans le domaine agroalimentaire, on retrouve le 3-mercaptohexanol (3MH) responsable du goût du pamplemousse, le 2-furfurylthiol (2FFT) responsable du goût du café torréfié dans le café à faible concentration qui peut, à des concentrations plus élevées engendrer une odeur

indésirable. Le 4-sulfanyl-4-méthylpentan-2-ol (4MSPOH) apporte une odeur citronnée tandis que le 3-mercaptohexyl acétate (3MHA) à une odeur de fruit de la passion. Enfin, le goût indésirable de type amine peut être lié à la présence de méthylbutéthiol (MB).

D'un point de vue analytique, les thiols sont des composés nécessitant des méthodologies complexes du fait de leurs réactivités et des niveaux de concentration extrêmement faibles qu'il est nécessaire d'atteindre pour être en mesure de doser ces molécules au niveau de leur seuil de perception. Darriet et Tominaga ont été les premiers en 1995 à isoler les thiols volatiles dans le vin à travers une méthode de dérivatisation utilisant un dérivé mercurique afin d'être détectable en GC-MS [189]. Cependant, le réactif utilisé est très toxique et polluant et la méthode était chronophage. Par la suite d'autres agents de dérivatisation ont été testés afin d'atteindre les limites de quantification adéquates [190]. Enfin, la démocratisation des méthodes chromatographiques couplées à de la spectrométrie de masse a permis de simplifier les procédures [191–193]. Malgré l'utilisation de ces méthodes, la sensibilité et la sélectivité vis-à-vis de ces thiols restent un challenge.

Ainsi, les méthodes développées pour l'analyse de composés volatils et notamment de thiols utilisent des appareillages comme de la chromatographie couplée à de la spectrométrie de masse. Afin de gagner en sensibilité et en sélectivité, des étapes d'extraction, comme de la SPME, sont utilisés du fait des matrices souvent complexes qui contiennent ces composés.

Cette technique permet d'extraire et de concentrer des molécules d'intérêt avec analyse en chromatographie couplée ou non à un spectromètre de masse sans utiliser de solvant. La SPME est composée d'une tige métallique avec à l'extrémité une tige flexible de silice sur laquelle est greffée la phase stationnaire qui varie selon sa composition et sa taille (exemple : Polyiméthylsiloxane PDMS, acrylate…). L'extraction se fait par interaction entre les analytes et la fibre par contact directe dans le liquide ou par extraction dans l'espace de tête d'un flacon et évaporation de l'échantillon. Cette phase d'adsorption est régie par un type de fibre, un temps et une température d'extraction. Il s'ensuit l'étape d'analyse par désorption thermique des analytes

directement dans l'injecteur de la chromatographie. Parmi les déclinaisons on retrouve l'extraction par sorption sur Barreau aimanté idéal pour l'extraction liquide/liquide puisque le barreau aimanté, recouvert d'un polymère (du PDMS le plus souvent) est plongé dans l'échantillon pour l'extraction et associé à une désorption thermique ou liquide (idéal pour les composés thermosensible) [194,195]. Pour chaque technique, le phénomène d'extraction est gouverné par des modèles mathématiques prenant en compte le coefficient de distribution de l'analyte entre sa matrice et la fibre, le volume de la fibre et d'échantillon ainsi que la concentration initiale de l'analyte. Tous ces paramètres permettent de calculer la concentration d'analyte extrait. En pratique, c'est la molécule d'intérêt qui influence le choix de la fibre. Pour les composés volatils à l'état de trace il est conseillé d'utiliser une fibre divinylbenzène/carboxen/PDMS [196] ou PDMS [197].

Malgré cela les techniques mise en œuvre, la faible concentration et la faible stabilité de ces molécules, associée au temps de prétraitement génèrent des problèmes analytiques. Dans ce contexte, l'utilisation de la membrane nanostructurée permettrait de rapidement adsorber les composés thiolés afin de les « bloquer », pour pallier les problèmes de stabilité, et de les quantifier. Cette quantification ne peut pas être faite avec la méthode HPLC décrite dans le chapitre 2 pour toutes les raisons citées précédemment. Ainsi, le dispositif sera couplé à une extraction en SPME suivi d'une quantification en GC-MS. Ce type de méthodologie a en effet déjà fait ses preuves puisqu'elle est mainte fois décrite dans la littérature. D'autre part, le caractère volatile des thiols a fait évoluer le dispositif vers une structure pouvant être fermée hermétiquement, afin d'éviter toute évaporation d'analyte menant à des erreurs de quantification.

Le dispositif présenté dans ce chapitre est une transposition de celui présenté dans le chapitre 2 car il est composé de la même membrane en cellulose régénérée mais insérée non plus dans un filtre seringue mais dans un tube centrifugable. Cela permet de conserver le filtrat après filtration à travers la membrane nanostructurée dans un environnement clos afin qu'il n'y ait aucune perte. Les spécificités de ce dispositif se trouve au niveau du mode de filtration qui ne se fait plus à l'aide d'un piston mais avec une force centrifuge. De plus, la surface de la membrane est 10 fois inférieure à celle du précédent dispositif. Tous ces changements peuvent influer sur les performances du

dispositif au niveau de la nanostructuration ou de l'interaction avec les thiols. Ainsi, ce chapitre décrit le développement de ce nouveau dispositif, l'étude de l'adsorption et de la désorption de thiols afin de les comparer au précédent dispositif. Enfin, la membrane sera appliquée des matrices réelles (vin rouge, vin rosé, bière) pour évaluer le dispositif avec des échantillons complexes.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. MEMBRANES

Les membranes utilisées pour la nanostructuration proviennent de chez Corning. Ce sont des membranes Costar® Spin-X® filtres centrifugables en cellulose régénérée avec un tube en polypropylène Figure 29. La membrane possède un diamètre de 0,7 cm pour une surface de 0,4 cm². Les filtres ont un volume de travail, c'est-à-dire une contenance maximale au-dessus et en dessous du filtre, de 500 µL qui est fixé comme volume de dépôt pour l'ensemble de ce projet.

FIGURE 29: MEMBRANE EN CELLULOSE REGENEREE DANS LE DISPOSITIF CENTRIFUGEABLE.

La membrane en cellulose régénérée présente une porosité de 0,45 µm comme le précédent dispositif. Les différences entre les deux membranes sont au niveau de la taille de la membrane (3,1 cm² vs. 0,4 cm² pour le filtre centrifugable) et du mode de filtration. Le développement de ce nouveau dispositif s'est donc basé sur une adaptation de la précédente méthode de nanostructuration.

2.2. NANOSTRUCTURATION

La procédure d'immobilisation se base sur celle développée et décrite au Chapitre 2 (Figure 30), à savoir en utilisant un polymère chargé positivement afin de créer une phase d'accroche permettant d'interagir avec les AuNP. Pour cela, un polymère d'accroche chargé positivement, le poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAH 10 g/L ou 1 g/L) est déposé sur la membrane pendant 10 min avant d'être centrifugé à l'aide d'une

micro-centrifugeuse (Eppendorf Mini Spin Plus). Cette étape de conditionnement de surface est réalisée une seule fois. Il s'ensuit des étapes de rinçage avec 500 µL d'eau ultrapure (>18.2 MΩ cm) et 500 µL de tampon Tris-HCL pH 7,4. Cette dernière étape a pour but d'ioniser le polymère afin de rendre disponible des charges positives pour l'encrage des AuNP. Enfin, 500 µL d'une solution d'AuNP (60 nM) sont déposés sur la membrane et laissés en contact pendant 10 min avant d'être centrifugés. L'immobilisation des AuNP est obtenue par interactions électrostatiques entre les AuNP chargées négativement et le PAH chargé positivement. La densité d'immobilisation est augmentée en réitérant les étapes de rinçages et de dépôt d'AuNP. Dans ce chapitre, des valeurs de 15 et 30 cycles d'AuNP ont été étudiés afin d'évaluer la saturation de la membrane.

Les conditions de réglage de la micro-centrifugeuse permettent des vitesses de centrifugation allant de 500 × *g* et 14 000 × *g*. L'élution des échantillons est effectuée à 14 000 × *g* pendant 1 min pendant toute la phase de développement du dispositif.

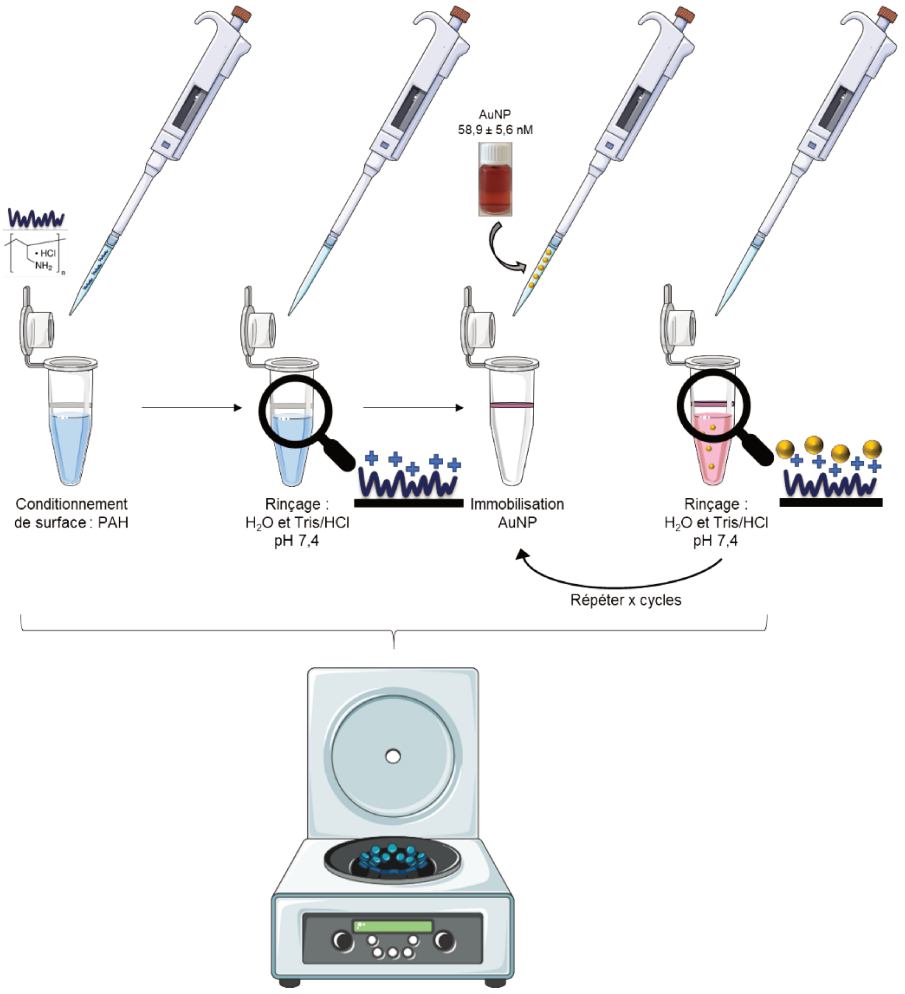


FIGURE 30: METHODOLOGIE D'IMMOBILISATION DES AUNP COLLOÏDALES SUR UN FILTRE CENTRIFUGEABLE BASE SUR LES INTERACTIONS ELECTROSTATIQUES ENTRE LE POLYMERE D'ACCROCHE (CHARGE POSITIVEMENT) ET LES AUNP (CHARGEES NEGATIVEMENT).

Les membranes ainsi nanostructurées avec les différents paramètres testés (concentration en PAH et nombre de cycles) devront être caractérisées afin de déterminer leur densité d'immobilisation. Ces données ont pour but de mettre en évidence les paramètres permettant la plus grande immobilisation d'AuNP.

2.3. CARACTERISATION

La méthode de quantification des AuNP immobilisées sur les membranes centrifugables est identique à celle décrite au chapitre 2 pour la quantification sur membrane filtre seringue. Brièvement, la membrane est récupérée, découpée en morceaux et déposée dans une solution de dibrome qui va oxyder les AuNP. Sous cette forme ionique, l'or va interagir avec la Rhodamine B afin de former une paire d'ions, qui après extraction, est quantifiable HPLC en phase inverse associée à une détection UV-vis à 555 nm. La méthode est décrite de manière détaillée dans l'article 2.

Cette quantification permet de déterminer les paramètres de nanostructuration permettant d'obtenir la plus grande densité d'immobilisation. La membrane ainsi sélectionnée sera utilisée tout au long du projet.

2.4. ÉVALUATION DES PERFORMANCES DU DISPOSITIF

Les performances d'adsorption et de désorption du filtre centrifugeable sélectionné ont été évaluées à travers l'utilisation d'un thiol modèle : NAC. Ce thiol a été choisi en se basant sur les travaux du chapitre 2. Le but étant d'évaluer les performances du dispositif, afin de le comparer au précédent, seul un des deux thiols modèles décrit au chapitre 2 a été utilisé. Or, NAC avait montré de meilleurs résultats en termes d'adsorption et désorption, c'est pourquoi il a été préféré au GSH. L'objectif n'étant pas ici d'étudier le caractère thiol dépendant de la membrane.

Ainsi, une solution de NAC (diluée dans la phase mobile de la méthode HPLC) est déposée à raison de 500 µL sur la membrane et laissée 10 minutes au contact de celle-ci (Figure 31). Le dispositif est ensuite centrifugé à l'aide d'une micro centrifugeuse à 14 000 × *g* pendant 1 minute et analysé en HPLC à l'aide de la méthode décrite au chapitre 2.

Les conditions opératoires de centrifugation sont choisies afin de permettre une filtration des échantillons sans problème de résistance due à la nanostructuration. L'autre critère est le temps de filtration, celui-ci ne doit pas être trop long afin d'éviter une dégradation des molécules. Enfin, le temps d'imprégnation de la membrane est fixé à 10 minutes comme c'est le cas lors de l'étape de nanostructuration. Ce temps est différent de celui avec le filtre seringue (0 min) puisque la configuration du dispositif ne permet pas une imprégnation complète de la membrane mais seulement en surface. Pour ces raisons le temps a été modifié afin de permettre une mise en contact suffisante entre membrane et échantillons.

L'étape de désorption est réalisée suivant le même mode opératoire avec des dépôts de 500 µL de DTT 50 mM suivis d'une centrifugation et analyse du filtrat en HPLC.

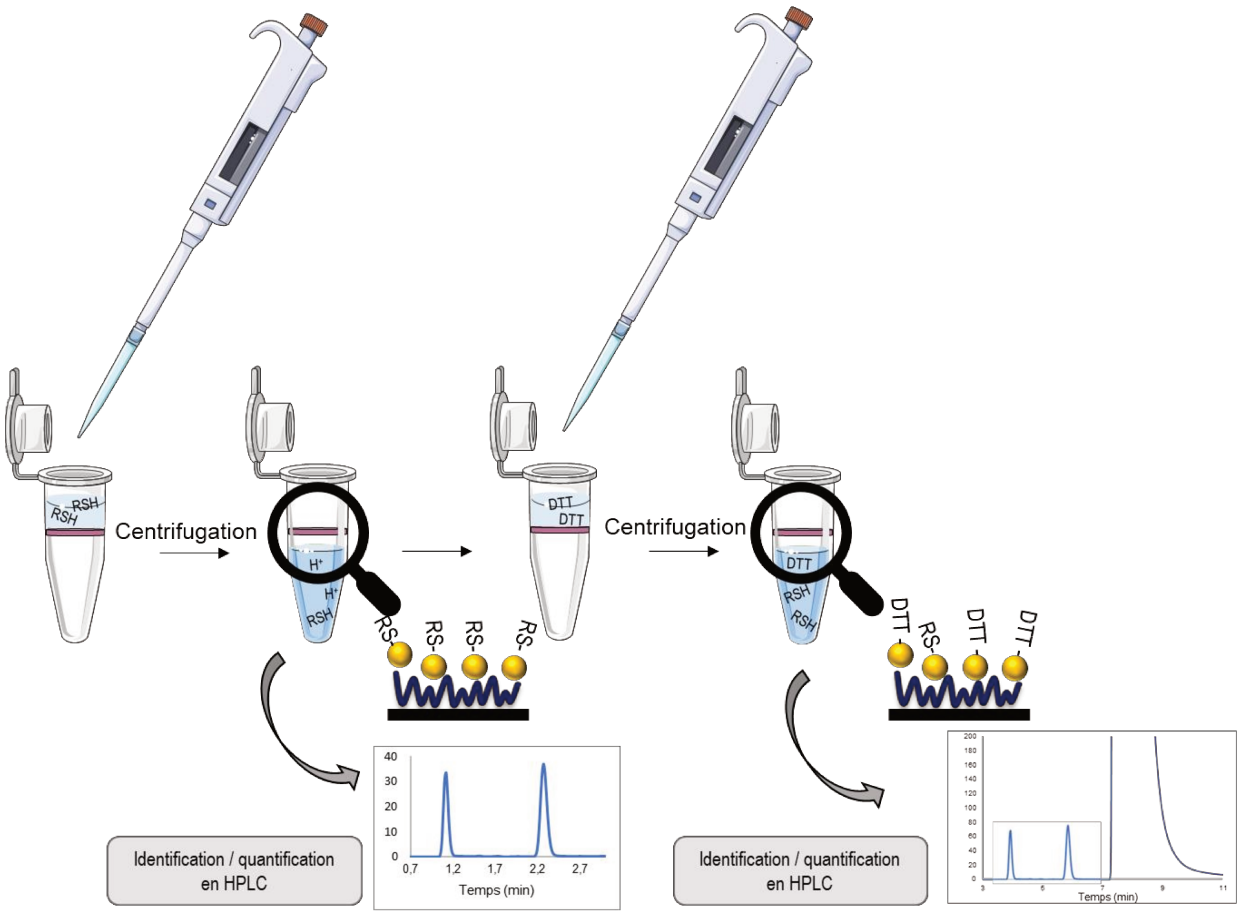


FIGURE 31: MMETHODOLOGIE D'UTILISATION DU DISPOSITIF NANOSTRUCTURE CENTRIFUGEABLE AVECS PBS. LE PROCESSUS SE DECOMPOSE EN DEUX ETAPES (ADSORPTION ET DESORPTION) SUIVIES D'UNE QUANTIFICATION EN HPLC.

L'évaluation des capacités d'adsorption et de désorption du dispositif permet de comparer le dispositif nanostructuré centrifugeable et le filtre nanostructuré seringue. De plus, les résultats obtenus permettront une adaptation aux matrices complexes notamment en termes de concentration de thiol ajoutée à ajuster vis-à-vis de la saturation en thiol calculée.

2.5. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ALIMENTAIRES

L'application du dispositif nanostructuré à des matrices alimentaires liquides utilise 5 types de matrices : de l'eau, un mélange eau éthanol 12% (V/V), du vin rouge, du vin rosé et de la bière (Kronenbourg™). Ces différentes matrices sont surchargées avec 3 thiols différents : le 3MHA, 3MH et le 2FFT, à raison d'un thiol par matrice et à une concentration finale d'un 1 mg/mL (correspondant à 5,7 µM, 7,4 µM et 8,8 µM pour 3MHA, 3MH et 2FFT). Ces thiols sont déjà naturellement présents dans les matrices telles que le vin ou la bière mais à des concentrations très faible (de l'ordre du ng/L). Ces matrices contenant des thiols sont déposées (500 µL) sur le filtre et laissées en contact 10 min avec la membrane. Une fois ce temps écoulé, l'échantillon est filtré à travers la membrane à l'aide d'une micro centrifugeuse (5000 × *g* pendant 1 min). Cette étape de dépôt et centrifugation est répétée 4 fois afin d'obtenir un volume total filtré de 2,0 mL correspondant à 2 mg de thiols filtrés. L'analyse du filtrat se fait comme suit : le filtrat est récupéré afin d'y ajouter 8,0 mL d'eau et 10 µL de 3-octanol (étalon interne). Ce mélange est ensuite analysé grâce à une méthode SPME couplée à une GC et de la spectrométrie de masse (SPME GC-MS) (Figure 32). Cette méthode sera décrite ultérieurement.

La désorption chimique utilisant du DTT suit la même stratégie à savoir dépôt de 2,0 mL (en 4 fois 500 µL) de DTT 50 mM avec 10 min de temps de contact suivi d'une filtration par centrifugation. Le filtrat est ensuite complété avec 8,0 mL d'eau et 10 µL de 3-octanol afin d'être analysé en SPME GC-MS (Figure 32 B).

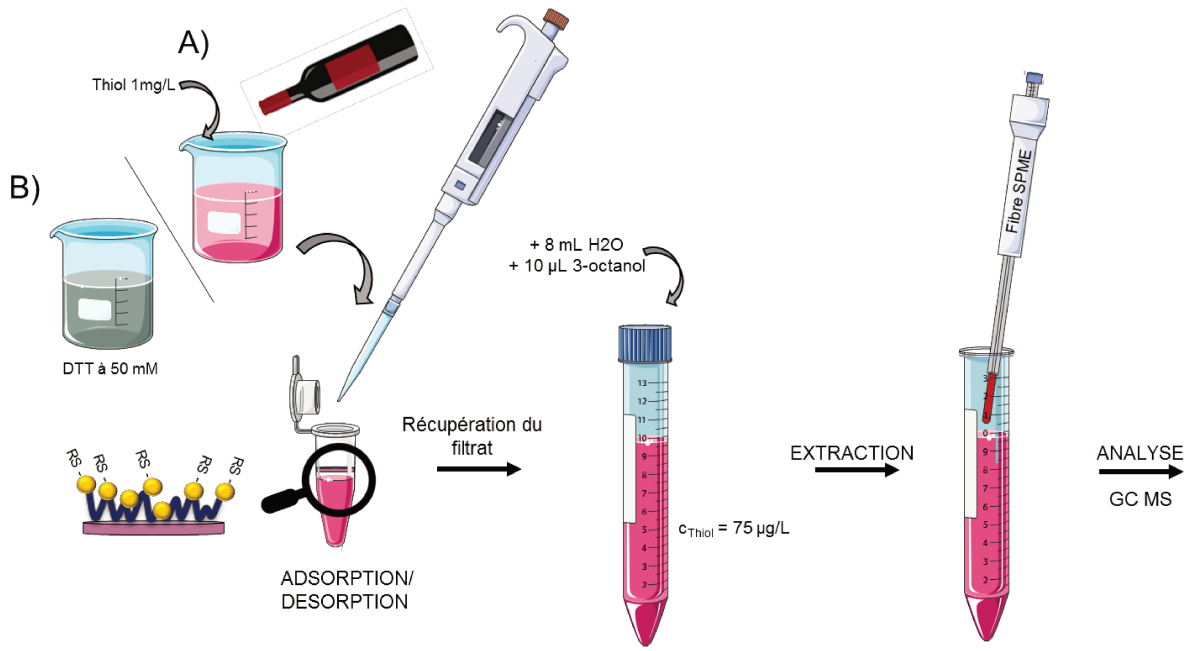


FIGURE 32: METHODOLOGIE D'UTILISATION DU DISPOSITIF NANOSTRUCTURE CENTRIFUGEABLE AVECS PBS. LE PROCESSUS SE DECOMPOSE EN DEUX ETAPES (ADSORPTION ET DESORPTION) SUIVIES D'UNE QUANTIFICATION EN SPME GC-MS.

Comme mentionné dans l'introduction, l'analyse des filtrats, afin de caractériser les étapes d'adsorption et de désorption, ne peut pas être faite avec la méthode HPLC développée pour la quantification de NAC et GSH du fait de la volatilité des composés thiolés. Pour cela, une méthode GC couplée à de la spectrométrie de masse a été utilisé en collaboration avec l'entreprise TwistAroma basée à Strasbourg.

2.6. QUANTIFICATION

La méthode utilisée pour quantifier la NAC lors du développement du dispositif est la méthode HPLC par appariement d'ion décrite développée et validée dans l'article 2.

Les thiols volatils présents dans les différentes boissons sont analysés par SPME GC-MS. La méthode est la suivante : les échantillons (après ajout d'eau et de 3-octanol) sont positionnés dans un incubateur chauffé à 40 °C pendant 10 minutes, suivi de 50

minutes d'extraction avec une fibre SPME. La fibre SPME est ensuite désorbée pour injection en GC-MS.

La méthode GC comprend un gradient comme suit : 2 minutes 40°C – 10 °C/min pendant 21 minutes – 250 °C pendant 7 minutes. Le débit d'hydrogène est de 8 mL/min au plus bas et 38 mL/min au plus élevé et celui de l'air est de 50 mL/min. Le spectromètre de masse est en mode scan, le détecteur est à 280 °C. Les analyses ont été réalisées avec un système de GC Agilent 7890B couplé à une MS Agilent 5977A MSD également couplée à un détecteur à chimioluminescence au soufre (SCD) Agilent. La fibre SPME utilisée est une fibre commerciale (divinylbenzene (DVB), carboxen (CAR), PDMS) de 2 cm avec un passeur automatique Gerstel.

La capacité d'adsorption des cartouches a été évaluée par étalonnage interne avec l'injection de 3-octanol. Le ratio entre le résultat obtenu sur le filtrat après adsorption ou désorption et celui de la solution déposée permet d'obtenir un pourcentage d'adsorption/désorption.

Des mesures avec un détecteur spécifique des molécules soufrées ont été réalisés. Pour cela, un détecteur de chimioluminescence de soufre (DCS) est employé. Celui-ci permet de provoquer des réactions d'oxydation et de réduction, à travers l'injection d'oxygène et d'hydrogène, afin de former du dioxyde de soufre (SO_2) puis du monoxyde de soufre (SO). Ces molécules sont ensuite envoyées vers une chambre de réaction comprenant un flux d'ozone. La collision entre les deux espèces génère une émission lumineuse détectée par un photomultiplicateur et permettant une quantification des molécules soufrées et plus particulièrement thiolées dans le cas présent.

3. DEVELOPPEMENT DU DISPOSITIF

3.1. CHOIX DU DISPOSITIF

Le dispositif tel qu'il est présenté au chapitre précédent permet une utilisation simple grâce à une filtration directe de l'échantillon. Celui-ci est parfaitement adapté aux échantillons biologiques qui, après prélèvement, peuvent être directement filtrés puis analysés. Or, les thiols dans les matrices alimentaires présentent un caractère volatil et sont très peu concentrés (de l'ordre du ng/L). Afin de coller au mieux à ces propriétés, un autre dispositif nanostructuré a été imaginé. Celui-ci est composé d'une membrane en cellulose régénérée, identique à celle des filtres seringues décrits précédemment, incorporée dans un dispositif tube centrifugable. L'objectif de ces dispositifs est multiple :

- Simplifier la méthode de production avec un procédé semi-automatisé par le biais d'une mini centrifugeuse pour filtrer les différents liquides. Procédé plus standardisé et potentiellement industrialisable.
- Miniaturisation du dispositif (Figure 33) en adéquation avec les faibles concentrations en thiols rencontrés.
- Dispositif clos afin d'éviter toute possibilité d'évaporation de la matrice comme cela peut être le cas avec l'alcool par exemple.

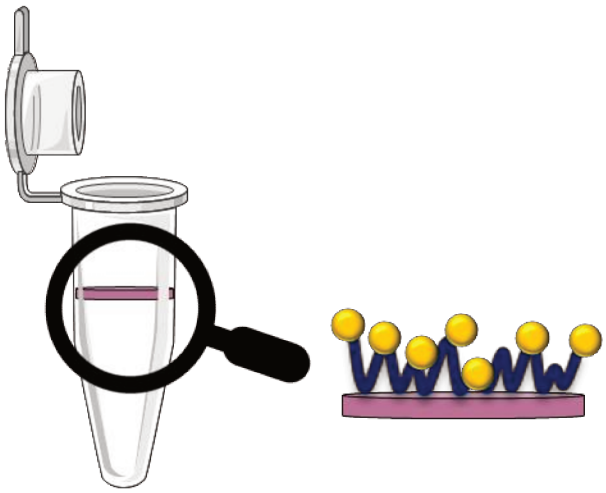


FIGURE 33: MEMBRANE NANOSTRUCTUREE CENTRIFUGEABLE.

3.2. NANOSTRUCTURATION

Pour nanostructurer ce dispositif, la méthode utilisée est la même que celle décrite pour les filtres seringues. Du fait de la taille réduite de la membrane (10 fois plus petite que le filtre seringue), différentes conditions ont été testées. Deux concentrations en PAH (1 g/L et 10 g/L) ont été utilisées afin d'adapter la concentration en polymère à la taille de la membrane. De plus, le nombre de cycles d'AuNP a été augmenté à 30 pour étudier la saturation en AuNP. L'or immobilisé sur les différentes membranes obtenues est quantifié par HPLC (méthode décrite précédemment) afin de déterminer les conditions permettant d'obtenir la plus grande densité d'immobilisation (tableau 6).

TABLEAU 6: ETUDE DE LA DENSITE D'IMMOBILISATION EN AUNP PAR CM² EN FONCTION DE DEUX PARAMETRES : LA CONCENTRATION EN PAH ET LE NOMBRE DE DEPOTS D'AUNP.

	Nombre de dépôts d'AuNP	**Nombre de AuNP / cm²**
PAH à 1 g/L	15	$6{,}13.10^{15}$
	30	$1{,}06.10^{16}$
PAH à 10 g/L	15	$7{,}54.10^{15}$
	30	$8{,}30.10^{15}$

Les résultats montrent des densités d'immobilisation similaires avec 1 ou 10 g/L de PAH et 15 ou 30 cycles de dépôts d'AuNP. Ces résultats suggèrent que le PAH est amené en excès puisqu'un changement de concentration n'influence pas la densité d'immobilisation en AuNP. De plus, la quantité d'AuNP immobilisées ne variant pas pour 15 ou 30 dépôts, cela signifie que la saturation de la membrane est atteinte avec au plus 15 cycles.

Ainsi, pour des raisons de comparaisons, la condition 10 g/L de PAH et 15 cycles d'AuNP sera utilisée pour le reste de ce projet. En effet, ces conditions sont les mêmes

que celles des filtres seringues et permettront de comparer les performances des deux types de dispositifs entre eux.

Il apparait que ces membranes permettent d'immobiliser 10 fois plus d'AuNP que sur les filtres seringues (10^{15} *vs.* 10^{14}) sur une surface 10 fois inférieure (0,4 cm² *vs.* 3,1 cm²). Puisque la densité d'immobilisation seule ne permet pas d'évaluer l'efficacité de la membrane vis-à-vis des thiols, des tests d'adsorption et de désorption de thiols ont été réalisés. Les performances de ce dispositif seront comparées aux filtres seringue.

3.3. EVALUATION DE L'EFFICACITE DE LA MEMBRANE

L'efficacité des membranes est déterminée vis-à-vis de leur capacité à adsorber et désorber des thiols. Pour cela, une solution de NAC 50 µM (500 µL) est filtrée à travers la membrane à l'aide d'une micro centrifugeuse pendant 60 secondes à 14000 × g. Le filtrat est ensuite analysé à l'aide de la méthode HPLC décrite et validée dans l'article 2.

Les résultats montrent que 15 ± 1 nmol de NAC ont été adsorbées ce qui correspond à un taux d'adsorption de l'ordre de 60 % de la NAC initialement déposée. En comparant les filtres seringues (10^{14} AuNP/cm² pour une surface 3,1 cm²) et les filtres centrifugeables (10^{15} AuNP/cm² et 0,4 cm²), l'adsorption en NAC sur le filtre centrifugeable apparait plus faible avec une densité d'immobilisation plus importante.

Par la suite, la saturation de la membrane a été évaluée par ajouts successifs de NAC 25 nmol sur le filtre et analyse des filtrats. Il apparait que la membrane nanostructurée est saturée en NAC avec 27 nmol (Figure 34) contre 270 nmol pour les filtres seringues. Ainsi, la membrane centrifugable présente une capacité d'adsorption maximale dix fois inférieure à celle du filtre seringue alors que sa densité d'immobilisation est dix fois supérieure.

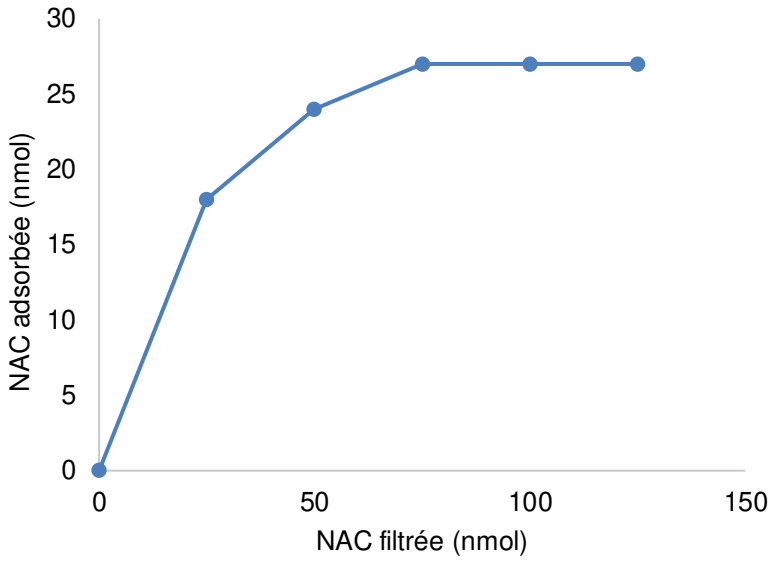


FIGURE 34: ETUDE DE LA SATURATION DE LA MEMBRANE NANOSTRUCTUREE PAR AJOUTS SUCCESSIFS DE 25 NMOL DE NAC (500 µL 500 µM) (N = 1).

Ces résultats posent des questions quant à l'organisation des AuNP au sein du filtre. L'hypothèse émise pour expliquer cette différence d'efficacité d'adsorption repose sur la différence de densité d'immobilisation. En effet, en immobilisation dix fois plus denanoparticules sur un support dix fois plus petit, il peut y avoir un encombrement stérique des AuNP entre elles. De manière très schématique, ce phénomène diminuerait le nombre de sites de liaisons possibles pour les thiols en rendant inaccessibles certaines AuNP (Figure 35). Ce constat est corroboré par l'observation d'une difficulté de filtration de certains échantillons à travers le filtre nanostructuré lors de certaines manipulations. En effet, une trop grande quantité d'AuNP pourrait avoir pour effet de colmater partiellement le filtre et donc rendre plus difficile le passage d'échantillon. Afin d'obtenir un élément de réponse à cette hypothèse, il faudrait immobiliser sur la membrane la même quantité d'AuNP que sur les filtres seringue (10^{14} AuNP/cm²) et étudier l'adsorption de NAC afin de comparer les résultats. Si la quantité de NAC adsorbés apparaissait identique (270 nmol) cela permettrait de souligner un problème d'encombrement stérique des AuNP. Dans le cas contraire, l'hypothèse se tournerait vers des différences d'adsorption dues à la méthode de filtration par centrifugation.

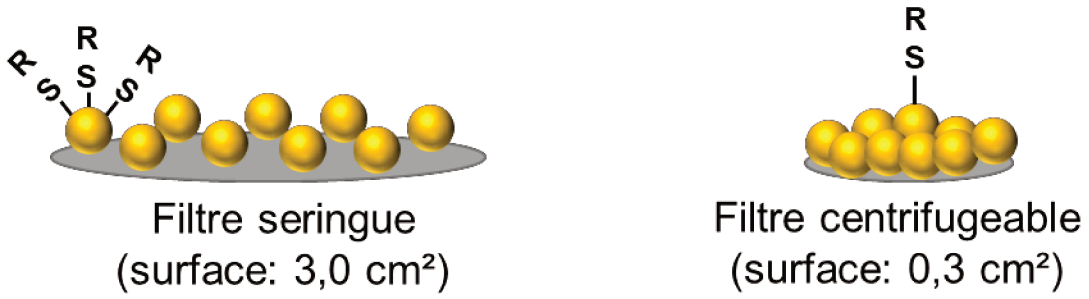


FIGURE 35: ILLUSTRATION DU PHENOMENE D'ENCOMBREMENT STERIQUE DES AUNP SUR LES DIFFERENTS MEMBRANES NANOSTRUCTUREES.

La seconde hypothèse émise pour expliquer le taux d'adsorption plus faible réside dans la vitesse de centrifugation. En effet, il est possible que celle-ci influe sur la possibilité d'interaction entre les thiols et la membrane mais également sur la stabilité des molécules.

La vitesse a donc été modifiée en la faisant varier de 14000 $\times$ *g* à 1 $\times$ *g*, correspondant à une filtration sous vide sans centrifugation (similaire aux filtres seringues). La Figure 36 met en évidence l'influence de la vitesse de centrifugation sur l'adsorption des thiols. En effet, plus la vitesse diminue plus le taux d'adsorption augmente, passant d'environ 60 % à 95 % pour 14000 et 1 $\times$ *g* respectivement. Ceci illustre l'importance du contact thiol-membrane. Bien que l'adsorption se fasse de manière instantanée, comme cela a déjà été démontré, il faut tout de même une mise en contact suffisante entre les thiols et les AuNP. Il semblerait que l'utilisation d'une centrifugeuse ne permet pas une imprégnation totale suffisamment longue de la membrane. Ces différences résident aussi dans le dispositif lui-même. En effet, les filtres centrifugeable ne permettent pas une imprégnation de la membrane comme c'est le cas pour les filtres seringue présentant un volume d'imprégnation englobant la membrane. Le volume déposé sur ces nouveaux filtres reste en surface de la membrane et ne la traverse qu'au moment de la centrifugation ce qui parait insuffisant.

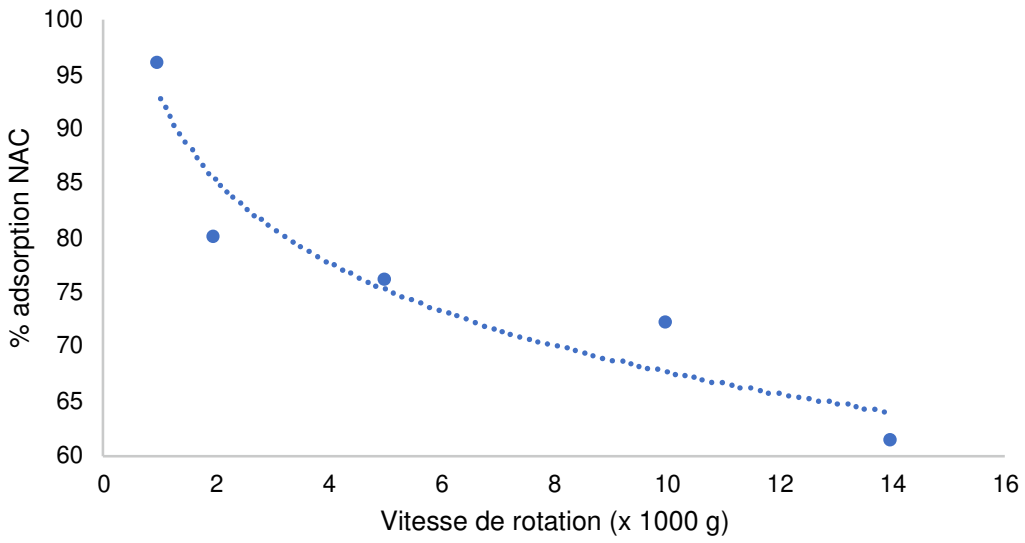


FIGURE 36: EVOLUTION DU POURCENTAGE D'ADSORPTION DE NAC SUR LA MEMBRANE NANOSTRUCTUREE EN FONCTION DE LA VITESSE DE ROTATION DE LA CENTRIFUGEUSE (N = 1).

L'étape de relargage a été réalisée conformément à ce qui a été décrit dans l'article 2, c'est-à-dire par échange de ligand avec le DTT qui présente une meilleure affinité pour les AuNP. La vitesse de centrifugation a été réglée à 5 000 g. En effet, il a été montré qu'une vitesse de centrifugation trop élevée diminuait l'efficacité d'adsorption mais à trop faible vitesse (≤ 1 000 g) il y a des problèmes de filtration. Une vitesse intermédiaire a donc été choisi tout en permettant une élution efficace et rapide des échantillons.

Les résultats de l'étape de désorption ont été comparés avec ceux obtenus avec les filtres seringues (Figure 37). Il apparait que le relargage complet s'opère en une étape de plus qu'avec les filtres seringues (4 *vs.* 3) avec un profil de relargage identique. L'efficacité du relargage est également modifiée puisqu'elle est 15 % moins importante, correspondant à environ 11 nmol de NAC. L'hypothèse d'une vitesse de centrifugation trop importante, soulignée précédemment, pourrait aussi impacter l'efficacité de désorption.

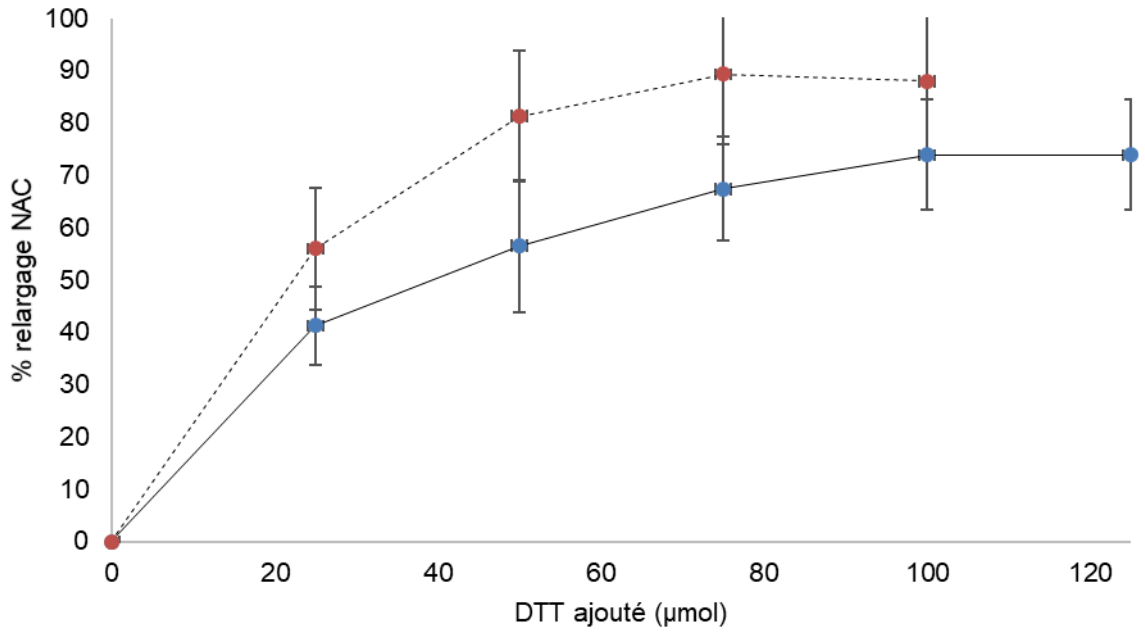


FIGURE 37: COMPARAISON DE L'EFFICACITE DE RELARUAGE DE NAC ADSORBEES SUR LE FILTRE CENTRIFUGEABLE (BLEU ET TRAIT PLEIN) ET FILTRE SERRINGUE (ORANGE POINTILLES).

Ainsi, ce nouveau dispositif a montré des résultats encourageants pour la capture et le relargage de NAC. Ces travaux ont permis de mettre en évidence un aspect intéressant de densité d'immobilisation. En effet, le fait d'immobiliser plus d'AuNP n'est pas proportionnel à une augmentation de l'efficacité du dispositif. Il est possible que ceci soit vrai jusqu'à une certaine densité d'immobilisation qui une fois dépassée mène à un colmatage de la membrane. Une densité d'immobilisation trop importante influe sur le nombre de sites de liaison disponibles pour les thiols.

À ceci s'ajoute le mode de filtration et notamment les conditions qui semblent influer sur l'interaction AuNP-thiol. La vitesse de centrifugation apparait comme étant un paramètre crucial que ce soit lors de la fabrication des filtres nanostructurés ou pendant les étapes de capture et relargage de thiols. Une filtration par centrifugation semble diminuer l'efficacité d'adsorption/désorption des thiols à la membrane mais n'a aucun effet sur la densité d'immobilisation. Cela peut s'expliquer par la différence d'imprégnation. En effet, dans le cas des thiols, le temps de contact avec la membrane et la centrifugation est fixé à 10 minutes. Bien que ce temps soit adapté de celui utilisé

pour les filtres seringue (instantanée). Les modes d'imprégnation diffèrent, les filtres seringue possède une « chambre de filtration » permettant une imprégnation totale et lente de la membrane. Ceci n'est pas le cas des filtres centrifugable pour lesquelles les échantillons restent en surface au moment du dépôt avant d'être élués par centrifugation. Ainsi, il serait intéressant d'appliquer différents temps de dépôts de NAC sur la membrane afin d'évaluer la cinétique d'adsorption.

4. APPLICATION A DES MATRICES AGROALIMENTAIRES

L'évaluation des performances des filtres centrifugeables nanostructurés a été étudiée avec 3 thiols couramment rencontrés dans le domaine alimentaire : le 3MHA, 3MH et le 2FFT (Figure 38). Les solutions de thiols ont été préparées dans 5 matrices différentes : eau, vin rouge, eau-éthanol (12 % V/V), vin rosé et bière.

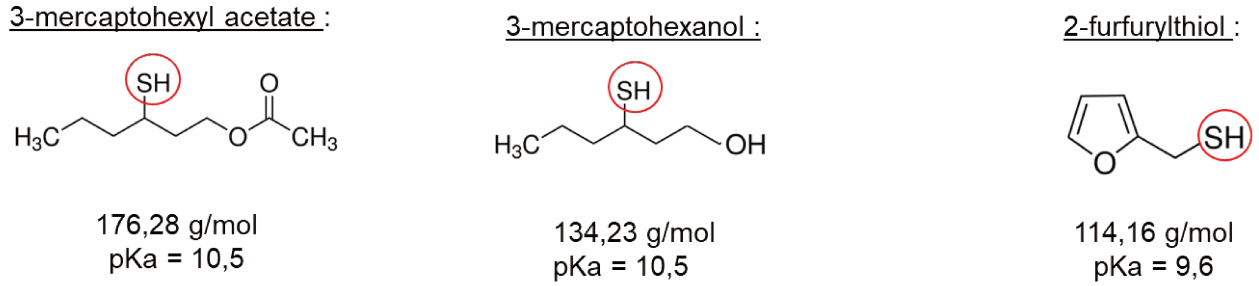


FIGURE 38: STRUCTURE CHIMIQUE DES THIOLS VOLATILS ETUDIES.

L'adsorption de thiols est effectuée par filtration de 4 fois 500 µL de thiol (60 sec à 1 000 g) à 5,7 µM, 7,4µM et 8,8 µM pour 3MHA, 3MH et 2FFT respectivement (correspondant à 11,3 nmol, 14,9 nmol et 17,5 nmol de 3MHA, 3MH et 2FFT). Ces concentrations ont été choisies afin d'être en dessous de la saturation de la membrane. Le filtrat est prélevé et ajouté à 8 mL d'une solution aqueuse contenant l'étalon interne, le 3-octanol, pour une concentration finale de 75 µg/L. La quantification des thiols réduits libres restants a été effectuée par extraction dans le filtrat avec une fibre SPME et analyse

par la méthode GC-MS décrite précédemment. La désorption est effectuée selon le même mode opératoire, par filtration de 4 fois 500 µL de DTT 50 mM (correspondant à 100 µmol) et analyse du filtrat contenant l'étalon interne par la méthode SPME-GC-MS décrite précédemment (Figure 39).

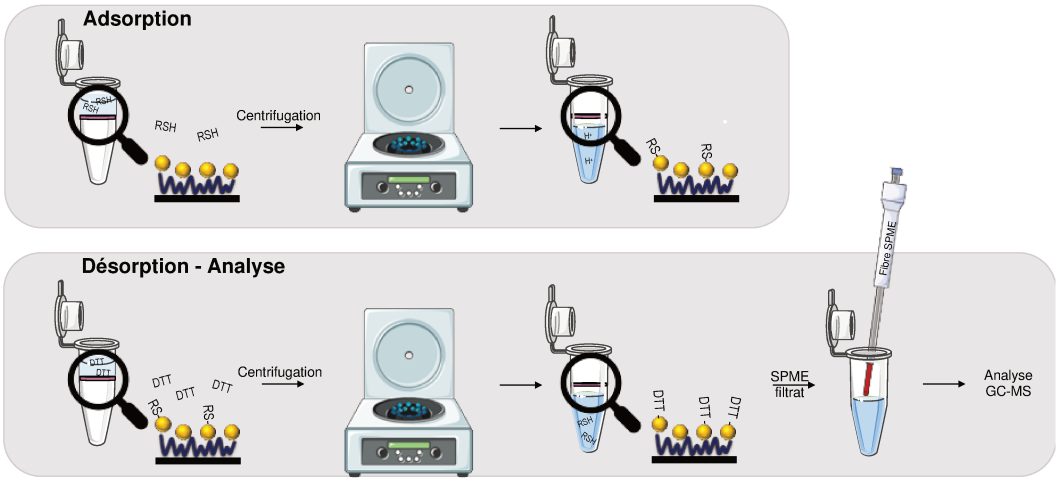


FIGURE 39: PRINCIPE D'ANALYSE EN SPME-GC-MS APRES ADSORPTION ET DESORPTION DU LE FILTRE CENTRIFUGEABLE.

La filtration directe de 2 mL de chaque thiol, dans les différentes matrices, à travers la membrane nanostructurée a permis de déterminer des capacités d'adsorption (Figure 40). L'étape de désorption s'opérant en filtrant 2 mL de 500 µL de DTT 50 mM a conduit à l'obtention d'une capacité de désorption en fonction du thiol et de la matrice de dissolution (Figure 41).

Les figures 40 et 41 montrent les pourcentages de thiols adsorbés ou désorbés après passage sur la membrane, récupération et analyse du filtrat. Ces résultats sont classés par matrice de dissolution (eau, vin rouge, eau + éthanol, vin rosé ou bière) et par thiol ajouté (3MHA en bleu, 3MH en orange ou 2FFT en gris). Par exemple, Figure 40, après dépôt de 11,3 nmol de 3MHA, dissout dans l'eau, sur le filtre, le filtrat est récupéré et analysé selon le protocole décrit plus haut. 5,1 nmol de 3MHA sont retrouvées dans le filtrat ce qui signifie que 6,2 nmol ont été adsorbées sur la membrane correspondant à 55 %. La même méthodologie est appliquée pour l'ensemble des résultats.

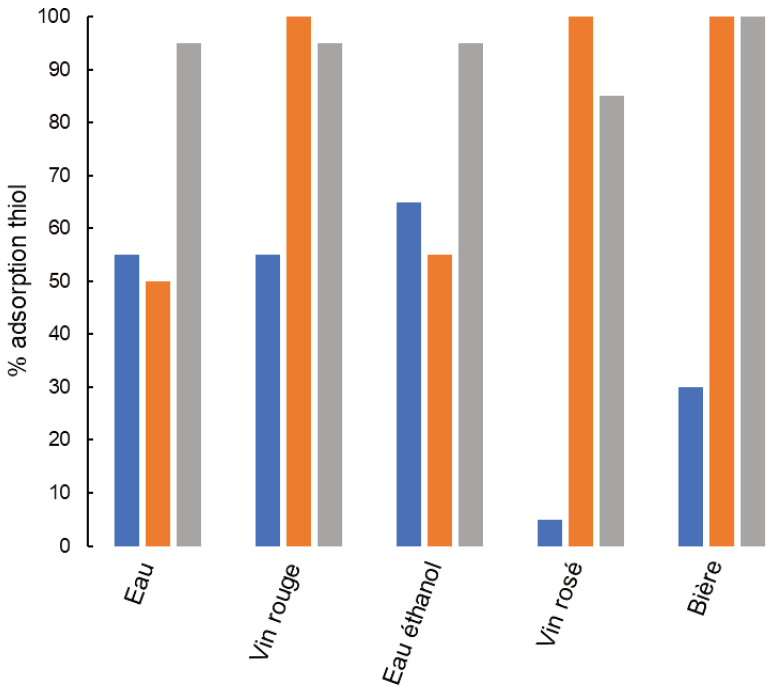


FIGURE 40: ETUDE DE L'ADSORPTION DE THIOLS SUR LA MEMBRANE NANOSTRUCTUREE : 3MHA (BLEU), 3MH (ORANGE) ET 2FFT (GRIS).

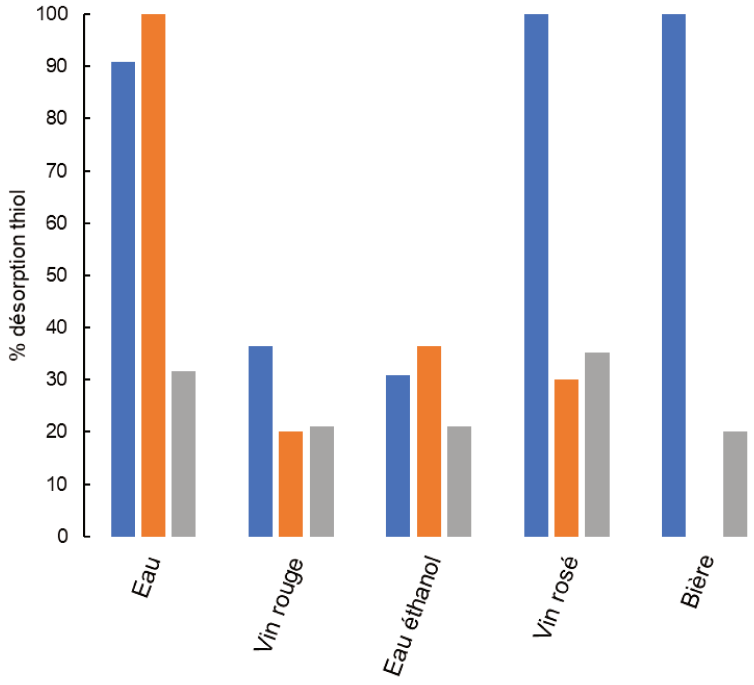


FIGURE 41: ETUDE DE RELARGAGE DES THIOLS DE LA MEMBRANE NANOSTRUCTUREE PAR RAPPORT AU POURCENTAGE PRECEDEMMENT ADSORBE : 3MHA (BLEU), 3MH (ORANGE) ET 2FFT (GRIS).

Les précédents résultats peuvent être analysés de deux manières différentes, en s'intéressant à l'influence du thiol sur ces deux étapes ou en regardant l'effet de la matrice.

4.1. INFLUENCE DU THIOL

De la même façon que dans le chapitre 2, il apparait que l'adsorption et la désorption sont dépendantes de la structure moléculaire du thiol (Figure 38). Ainsi, le 3MHA présente un taux d'adsorption à la membrane moins important que le 3MH et le 2FFT quelle que soit la matrice, allant de 60 % à 5 %. C'est le 2FFT qui apparait avoir la plus haute affinité pour les AuNP, car son taux d'adsorption varie de 85 à 100 % en fonction de la matrice de dissolution. Enfin, le 3MH a un profil intermédiaire avec une adsorption similaire au 3MHA dans l'eau et eau-éthanol et similaire au 2FFT pour les vins et la bière. Ces différents constats peuvent s'expliquer par la structure chimique des différentes molécules (Figure 38). En effet, il est possible d'établir une relation entre structure et affinité d'adsorption expliquée par un phénomène d'encombrement stérique. Le 3MHA à la structure la plus déployée et le taux d'adsorption le plus faible alors que le 2FFT a une structure plus linéaire après son groupement thiol et possède une capacité d'adsorption élevée et constante. Le 3MH, qui résulte d'une réaction d'estérification du 3MHA, présente un profil d'adsorption intermédiaire et une structure entre celle des 2 autres composés. De plus, la position du groupement thiol au sein de la molécule semble influer sur l'adsorption. En effet, dans le cas du 3MHA et 3MH, la fonction thiol se situe au milieu de la chaine carbonée ce qui pourrait augmenter l'encombrement stérique et diminuer le nombre de sites de liaison AuNP accessible (Figure 42).

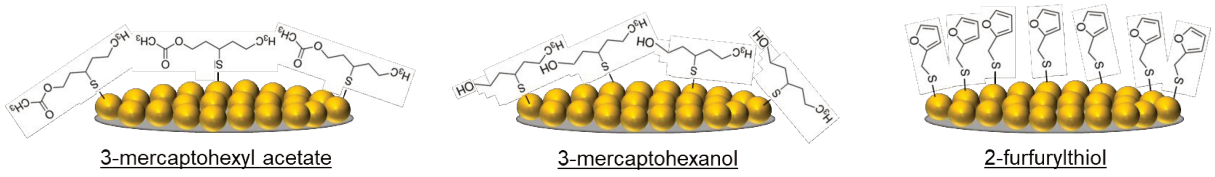


FIGURE 42: REPRESENTATION THEORIQUE DE L'ENCOMBREMENT STERIQUE ENGENDRE PAR LE 3MHA, 3MH ET 2FFT LORS DE L'ADSORPTION SUR LA MEMBRANE NANOSTRUCTUREE. REPRESENTATION

La désorption des thiols précédemment adsorbés semble également impactée par la structure du thiol. L'efficacité de désorption est inversement proportionnelle à la masse molaire des thiols avec une désorption plus importante du MHA. Ces résultats sont contraires à ceux observés lors de l'étape d'adsorption.

Lors de cette étape de désorption deux hypothèses pouvaient être émises :

- La présence d'un plus fort encombrement stérique rend plus difficile l'accès pour le DTT au site de liaison et donc diminue l'efficacité de désorption. De plus, la présence d'autres groupements fonctionnels renforce la stabilité du thiol pour la surface.
- Il existe une différence d'affinité pour les AuNP vis-à-vis des thiols et les thiols les moins désorbés sont ceux présentant une plus grande affinité.

Le constat ici est que l'encombrement stérique et donc la masse molaire n'affecte pas la désorption puisque plus le composé à une masse molaire importante plus il est retenu. De plus, la présence d'un groupement acide carboxylique ne semble pas influer sur la liaison AuNP-3MHA. Ces résultats de désorption suggèrent donc des différences d'affinité entre les trois thiols volatils testés avec dans l'ordre d'affinité : 3MHA > 3MH > 2FFT. Ces conclusions ont également été faites dans la littérature par Tsai *et al.*, qui ont étudié les différences d'efficacité de désorption par le DTT sur deux thiols liés aux AuNP aux structures différentes : Polyéthylène glycol thiolé (20 kDa structure linéaire) et albumine bovine (66,5 kDa structure en hélice) [141]. Leurs résultats montrent que le déplacement n'est pas dépendant de l'encombrement stérique mais de l'affinité pour le substrat. Ils ont aussi montré que l'affinité est dépendante de la présence de groupement fonctionnels mais également de l'environnement (pH, liaisons voisines). A des pH acides, c'est-à-dire inférieurs au pKa des thiols (entre 8 et 10), la désorption est favorisée. Le 2FFT, qui par sa conformation longitudinale, présente plus de degrés de liberté et va générer une organisation créant des interactions intermoléculaires de type Van der walls. Ceci tend à stabiliser le composé (1 kcal/mol pour chaque carbone) et forme une sorte de monocouche autour de la membrane nanostructurée [198].

Considérant l'adsorption et la désorption, il semble que l'hypothèse de l'affinité se confirme. En effet, si on considère lors de la première étape une plus grande affinité du

2FFT pour les AuNP comparé au 3MHA, ceci est corroboré par la plus faible désorption observée. Pour confirmer cela, il faudrait déterminer les constantes d'affinité de chaque thiol pour les AuNP.

Ainsi, il serait intéressant de déterminer l'affinité des différents thiols pour les AuNP. Cela permettrait de pouvoir prédire en amont le comportement de ces thiols vis-à-vis de la membrane. Pour ce faire, différentes méthodes sont envisageables. Il est possible de calculer la constante de dissociation à l'équilibre (K_D) en utilisant le modèle de Langmuir permettant d'évaluer l'affinité entre molécules [199]. Des méthodes plus expérimentales sont également envisageables comme par exemple l'utilisation d'une QCM avec un revêtement en or. Ceci permettrait d'étudier la cinétique d'adsorption des différents thiols afin d'en déduire des notions d'affinité. Enfin, de manière plus complexe, un dispositif de Microscopie à Force Atomique (AFM) avec une pointe possédant un revêtement en or. L'analyse d'une surface fonctionnalisée avec les différents thiols, pourrait permettre de déterminer les différentes énergies de surface. Dans ces deux derniers cas, l'or utilisé serait sous forme macroparticulaire et non nanoparticulaire ce qui peut engendrer un biais puisque les propriétés de l'or dans chacune des deux dimensions diffèrent.

4.2. INFLUENCE DE LA MATRICE

La matrice de dissolution du thiol à une influence sur les étapes d'adsorption et de désorption aux AuNP. Cet effet matrice est essentiellement dû au pH. Il apparait que l'adsorption des thiols est favorisée par des pH acides tels que ceux de la bière (environ 4) et du vin (3,1 à 3,3). Lorsque les thiols sont dilués dans des matrices au pH moins acide (eau et eau-éthanol), l'adsorption est moins importante.

Ce constat est valable uniquement pour l'étape d'adsorption puisque la désorption se fait dans une solution tamponnée à pH 7,4 pour chaque condition. Cependant, il ressort que la désorption dans les matrices avec un taux d'adsorption élevé est moins efficace. C'est le cas par exemple du 3MH dans la bière qui a un taux d'adsorption de

100% mais l'étape d'échange de ligand avec le DTT n'a pas permis de désorber le composé (Figure 41). La différence d'affinité AuNP-DTT et 3MH-DTT semble trop faible pour obtenir une adsorption préférentielle du DTT sur les AuNP. Pour augmenter cette capacité de désorption, différentes solutions sont envisageables :

- L'utilisation d'un thiol avec une affinité plus importante pour les AuNP. Par exemple une molécule présentant 3 fonctions thiols.
- Désorption des thiols de la membrane par le biais d'un réducteur afin de réduire la liaison Au-SR.
- Désorption thermique en utilisant un thermodésorbeur.

5. CONCLUSION

Le dispositif présenté dans ce chapitre est une adaptation du filtre seringue développé au chapitre 2. Les différences entre les deux dispositifs se situent au niveau du mode de filtration des échantillons et de la taille de la membrane. Les membranes sont-elles dans le même matériau (cellulose régénérée) avec une porosité de 0,45 µm. Or, des comportements différents sont observés, tant au niveau de la nanostructuration que de la capture de thiols (tableau 7). Ce type de dispositif permet d'optimiser le procédé de nanostructuration en le rendant semi-automatisé grâce à l'utilisation d'une centrifugeuse. Contrairement au précédent dispositif (filtre seringue) qui se compose de 3 parties à savoir le filtre, une seringue et un récipient pour récupérer le filtrat, celui-ci se résume à une seule partie. Le fait d'avoir une seule unité peut présenter un intérêt dans la manipulation des thiols volatils. Cependant, l'étude des performances avec la NAC montre des disparités par rapport au dispositif filtre seringue. Celles-ci semblent essentiellement dues aux différences de procédé et notamment le mode de passage des échantillons. Ces paramètres influent sur les échanges molécules-membrane et montrent que la transposition entre les deux systèmes (filtre centrifugable et seringue) n'est pas si simple.

TABLEAU 7: COMPARAISON DES DEUX TYPES DE DISPOSITIFS NANOSTRUCTURES : FILTRE SERINGUE ET CENTRIFUGEABLE.

	Filtre seringue	**Filtre centrifugeable**
Membrane	Cellulose régénérée porosité 0,45 µm	Cellulose régénérée porosité 0,45 µm
Surface de membrane	3,1 cm²	0,4 cm²
Mode de filtration des échantillons	Manuelle avec système de mise sous vide	Semi-automatique avec mini centrifugeuse
Densité d'immobilisation (PAH 10 g/L – 15 cycles AuNP)	10^{14}	10^{15}
Capacité d'adsorption maximale NAC (nmol)	270	27
Désorption NAC avec DTT (%)	88 ± 14	74 ± 11

Les résultats préliminaires obtenus sur des thiols volatils dans des matrices alimentaires semblent prometteurs. Les efficacités d'adsorption obtenues sur thiol modèle (NAC) peermettent d'imaginer des capacités de saturation similaires en matrice complexe en fonction du composé et de la matrice. La désorption est toutefois différente avec les thiols volatils. En effet, la capacité maximale de désorption de la NAC en matrice simple est de 11 nmol alors que celle-ci est d'environ 5 nmol pour le 3MHA, 3MH et 2FFT. Comme cela a déjà été dit, ceci peut s'expliquer par des différences d'affinité. Les thiols volatils dans les matrices alimentaire étant très faiblement concentrés. Il serait intéressant de pouvoir augmenter cette capacité de désorption. Pour cela, il est envisageable de passer d'une désorption chimique à une désorption thermique. En effet, cette méthode de désorption est celle la plus couramment utilisée pour les composés volatils et notamment les thiols [183,200].

Un tel dispositif pourrait être utilisé afin de quantifier les thiols endogènes présents dans les matrices déjà testées telles que la bière ou le vin. La capacité de concentration d'échantillon du dispositif permettrait de palier les faibles concentrations tandis que la liaison or-thiol permet de s'affranchir des problèmes de stabilité de ces composés. À titre

d'exemple, le 3MH est présent dans le vin à des concentrations allant jusqu'à 300 nM [190]. Ainsi, la méthode développée dans ce chapitre permettant de détecter des nmoles de composé, en passant 30 mL de vin à travers le filtre nanostructurée (9 nmoles adsorbées) et en relarguant avec 2 mL de DTT ([3MH] = 4 µM) il serait possible de quantifier le 3MH déjà présent dans ce type de matrices.

Le dispositif permet ainsi une concentration de l'échantillon, s'affranchit de la matrice lors de l'analyse et ne nécessite aucun pré traitement. Des essais sur échantillons réels non surchargées devront donc être effectués afin de confirmer les performances du dispositif vis-à-vis des méthodes déjà développées. Il est également nécessaire de travailler avec des solutions contenants plusieurs thiols volatils, comme c'est le cas dans l'ensemble des matrices alimentaires, afin d'étudier les éventuels effets de compétition. En effet, il a été montré que la présence de différents thiols dans une même matrice avait une influence sur l'adsorption et la désorption au DTT en comparaison avec chaque thiol seul [141]. Enfin, il serait intéressant d'utiliser directement une fibre SPME fonctionnalisée avec des AuNP couplée à une thermodésorption pour simplifier et s'affranchir de la désorption thermique.

CHAPITRE 4

1. PROBLEMATIQUE DES DONNEURS DE NO

Le monoxyde d'azote est un gazotransmetteur très réactif et qui présente un haut taux de diffusion du fait de sa taille (1 nm et 30 g/mol). Ce radical est présent au niveau cellulaire à des concentrations allant du picomolaire jusqu'au micromolaire [201]. Cet écart de concentrations est majoritairement dû à des problèmes analytiques. En effet, le NO est une espèce très réactive possédant une demi-vie très courte, de l'ordre de 2 ms à 2 s en milieu intravasculaire et extravasculaire respectivement [202]. Les propriétés physico-chimiques du NO rendent difficile le développement d'une méthode de quantification utilisable en routine, rapide et simple.

D'un point de vue physiologique le NO est produit au niveau de l'endothélium par la nitric oxide synthase (eNOS) [203] mais également par le biais de la nitric oxide synthase inductible (iNOS) [204] à travers les macrophages, les plaquettes ou les cellules musculaire lisses vasculaire. Ce second système intervient à haute ou faible concentration de NO dans des situations pathologiques. NO joue un rôle essentiel dans le maintien des fonctions cardiovasculaires par le biais de différentes voies :

- Il induit une vasorelaxation [205]
- Il participe au maintien du tonus vasculaire en agissant sur la relaxation des muscles lisses vasculaires [60].
- Il maintient l'homéostasie vasculaire notamment en régulant l'agrégation plaquettaire ou en inhibant l'adhésion des monocytes [61–63].

Concernant l'aspect pathologique, l'altération de la biodisponibilité du NO représente un facteur impliqué dans de nombreuses pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose, l'angor ou encore l'hypertension artérielle [206]. Ces maladies sont associées à une diminution de la synthèse endothéliale de NO se produisant naturellement avec l'âge [207]. À l'inverse une production anarchique et importante de NO est produite par des stimuli pro inflammatoire [208].

Pour pallier les déficits en NO et ainsi contrebalancer les effets associés, une supplémentation en NO peut être mise en place. Celle-ci peut se faire avec des dérivés nitrés (trinitrine, mono- ou dinitrate d'isosorbide) qui sont des prodrogues sources de NO ou encore des complexes inorganiques métal-NO (nitroprussiate de sodium). La prise continue de ces dérivés nitrés est associée à une diminution de l'amplitude de la plupart de leurs effets, c'est le phénomène de tolérance.

L'alternative possible est l'association du NO avec une molécule thiolée par liaison de forte affinité afin de porter le NO et le restituer au niveau de son site d'action, c'est ce que l'on appelle un *S*-nitrosothiol (RSNO). Pour cela, il existe de manière endogène des RSNO tels que le *S*-nitrosoglutathione (GSNO) ou la *S*-nitrosoalbumine (AlbNO), constituant un réservoir de NO *in vivo*. Cette quantité de NO est mobilisable par rupture de la liaison S-NO *via* des enzymes (par exemple gamma-glutamyltranspeptidase, GGT, spécifique à GSNO ou la protéine disulfure isomérase, PDI, non spécifique), des thiols de bas poids moléculaire, des cations divalents ou un réducteur (acide ascorbique). Ces RSNO permettent de transporter le NO mais également d'augmenter sa demi-vie (5,5 h dans le cas de l'AlbNO et de 45 min à 2 h pour le GSNO [70]) et sont peu ou pas toxiques et n'induisent pas de phénomène de tolérance. Parmi les autres RSNO pouvant être formés, il existe la S-nitroso-N-acétylcystéine (NACNO), la *S*-nitrosocystéine (CysNO) avec des demi-vie de 500 et 0,5 h respectivement [72]. Cette stratégie thérapeutique et donc prometteuse et a déjà fait l'objet de différents essais cliniques [72].

Le choix du meilleur candidat médicament doit tenir compte de différents paramètres : mécanisme de passage de barrière, temps de demi-vie, relargage du NO, comportement vis-à-vis des différentes enzymes dénitrosantes et interactions avec les autres thiols. Toutes ces propriétés sont régies par la partie RSH du RSNO et dépendent donc de ses propriétés physico-chimiques [71]. Les pharmacocinétiques des RSNO sont donc complexes puisque propres à chaque RSH et potentiellement croisées avec celle des autres RSNO (Figure 43). En effet, différentes réactions peuvent avoir lieu entre RSH, RSNO, protéines et nitroprotéines :

- Réactions de nitrosation (RSH + NO → RSNO) ou dénitrosation (RSNO → RSH + NO),

- Transnitrosation ($_1$RSNO + $_2$RSH → $_2$RSNO + $_1$RSH)
- Réduction (RSH + RSH → RSSR)
- Nitrosylation (Protéine + NO → PNO)

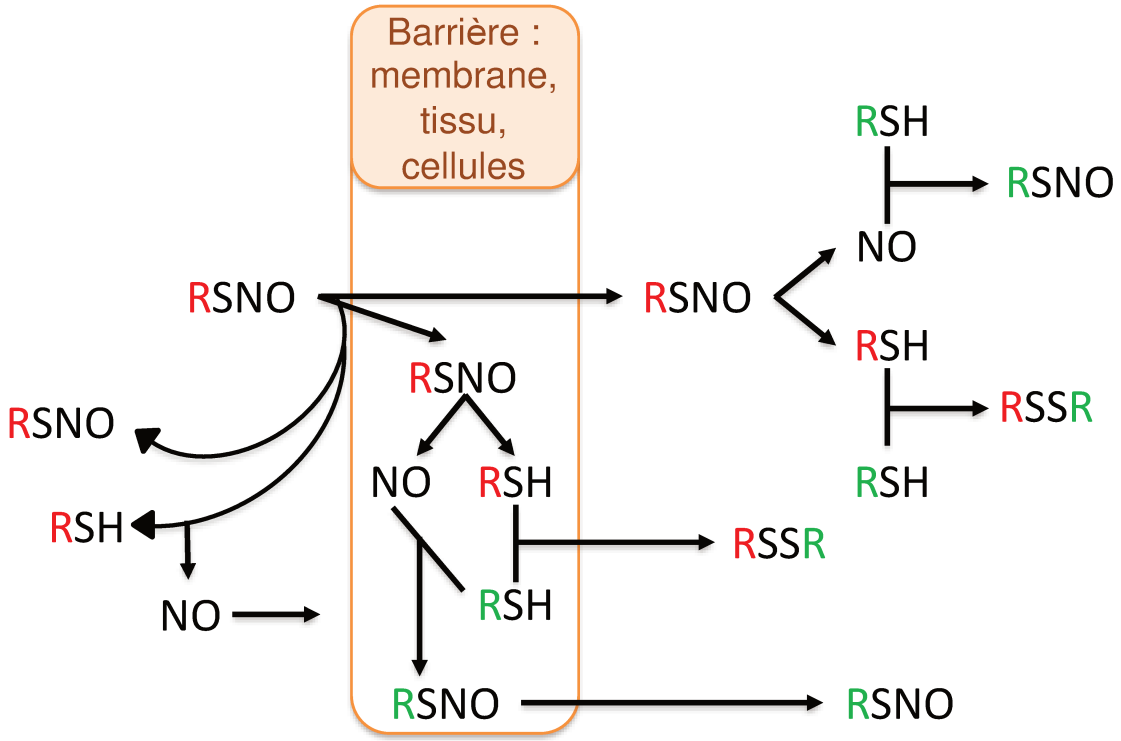


FIGURE 43: PRESENTATION DES DIFFERENTS MECANISMES POSSIBLE DE PASSAGE DE BARRIERE POUR UN RSNO.

Le suivi de chaque RSNO dans les compartiments tels que le sang, l'intima ou encore la média, de chaque espèce (RSH, RSNO, protéine, PNO, NO ions nitrites et nitrates) permettrait de définir le devenir des différents RSNO et ainsi déterminer le ou les meilleurs pour une utilisation thérapeutique. Pour cela, il faut être capable de quantifier les acteurs de ces RSNO et notamment les RSH. Les études menés en ce sens ne s'intéressent qu'à la quantification des RSNO et non aux RSH associés. Pour ce faire, de nombreuses techniques ont été développées : spectrophotométrie UV-Vis [172], HPLC [209], GC-MS [210], fluorimétrie [211] … La plupart des méthodes reposent sur la conversion du RSNO en ions nitrites par l'action du chlorure de mercure ou sa réduction en NO et ses dérivés. Les méthodes de quantification directe sont peu nombreuses [212] ce qui représente un biais de mesure au vu de la réactivité et de la demi-vie de ces

espèces. Une alternative consiste à quantifier la partie RSH après clivage. Les méthodes décrites sont des méthodes de dérivation, donc indirecte [213]

À l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode unique pour quantifier de manière directe rapide et efficace les RSH dans les différents milieux biologiques concernés. Comme décrit au Chapitre 1, les méthodes actuelles possèdent des étapes de pré traitement aboutissant à un allongement de la méthode et de l'intégrité des thiols ce qui impacte leur concentration. De plus, la sélectivité entre les différents thiols et leur identification reste un réel challenge puisque la majorité des stratégies développées reposent sur une interaction avec leur groupement SH, commun à tous les thiols. Enfin, la complexité des matrices de travail engendre des problèmes de sélectivité.

L'objectif de ce chapitre est donc d'appliquer le dispositif filtre seringue nanostructuré afin de répondre à cette problématique de donneur de NO et plus particulièrement les mécanismes de passage de barrière. La stratégie consiste à utiliser un modèle de barrière intestinale et d'étudier le comportement de RSH et RSNO (GSH, GSNO, NACNO et NAC) vis-à-vis de cette membrane. Pour cela, des cellules Caco-2 ont été utilisées, afin de simuler la barrière intestinale, dans un dispositif représentant la lumière intestinale et le compartiment sanguin (Transwell®). La membrane nanostructurée sera utilisée afin de filtrer directement chaque compartiment afin de quantifier des RSH adsorbés. L'avantage présenté ici repose sur un affranchissement vis-à-vis de la matrice par rétention des thiols uniquement et l'absence de pré traitement.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. FILTRES

Les filtres utilisés pour la capture de thiols dans les différents compartiments sont les filtres seringues nanostructurés décrits au chapitre 2 à savoir une membrane en

cellulose régénérée de porosité à 0,45 μm. Cette membrane a été nanostructurée avec 1 cycle de PAH 10 g/L suivi de 15 cycles de 500 μL d'AuNP 60 nM.

Le dispositif a pour objectif de capture les RSH présents dans chaque compartiment (sanguin, intestinal et cellulaire) et les quantifier par relargages afin de rendre compte de la distribution des espèces à travers la barrière intestinale et des mécanismes d'échanges existants. L'avantage de cette technique est de s'affranchir des contraintes de stabilité des thiols, en engageant la fonction SH dans une liaison Au-S, et de la matrice, en séparant les thiols de leur milieu. En effet, les précédents résultats montrent qu'aucun effet matrice n'est observé après filtration de plasma de rat.

L'étude de la perméabilité vis-à-vis de la membrane s'effectue avec un modèle *in vitro* classiquement utilisé pour l'étude des mécanismes de transports intestinaux.

2.2. MODELE DE BARRIERE INTESTINALE

Le modèle de barrière intestinale comprend un dispositif compartimenté en deux avec une partie mimant la lumière intestinale et l'autre le compartiment sanguin avec comme séparation une barrière cellulaire correspondant à la barrière intestinale. Parmi les cellules décrites comme étant utilisables pour former un modèle de barrière intestinale, on retrouve par exemple les Caco-2 ou les HT29 [214]. Ce sont les Caco-2 qui sont le plus largement utilisées.

2.2.1. CELLULES CACO-2

Les cellules Caco-2 (pour Cancer Coli-2) sont issues d'un adénocarcinome colique humain et constituent une lignée cellulaire tumorale [215]. Dans certaines conditions, elles présentent des propriétés fonctionnelles et morphologiques similaires à des entérocytes. En effet, elles vont se différencier en formant une monocouche de cellules à jonction serrées polarisées possédant des microvillosités et exprimant des

transporteurs et des enzymes semblables à celles d'un entérocytes (lactase aminopeptidase N, sucrase isomaltase et dipeptidylpeptidase IV) [216]. Ainsi, l'étude de l'adsorption sur cellules Caco-2 cultivées en monocouche permet d'évaluer la perméabilité intestinale d'un composé chimique, c'est-à-dire sa capacité à traverser la paroi intestinale pour rejoindre la circulation sanguine et se distribuer dans l'organisme.

Pour reproduire au mieux les conditions intestinales, les Caco-2 sont cultivées sur une membrane perméable insérée dans un dispositif reproduisant les conditions environnementales de la barrière intestinale.

2.2.2. DISPOSITIF TRANSWELL®

Le dispositif Transwell® est classiquement utilisé afin d'étudier le transport de divers composés à travers une barrière biologique. La barrière étudiée ici est la barrière intestinal, mimée par la monocouche de cellules Caco-2. Le dispositif se décompose en trois parties :

- Le compartiment apical simulant la lumière intestinale avec un volume de 0,5 mL (Figure 44 A),
- Le compartiment cellulaire avec les Caco-2 disposées sur un insert composé d'une membrane en polycarbonate d'une porosité de 0,4 µm et d'une surface de 1,12 cm^2 (Figure 44 C)
- Le compartiment basolatéral mimant le compartiment sanguin avec un volume de 1,5 mL (Figure 44 B).

Les compartiments basolatéral et apical sont séparés par la couche de cellules permettant ainsi d'étudier le passage de l'un à l'autre par interaction avec les cellules et la perméabilité de la barrière.

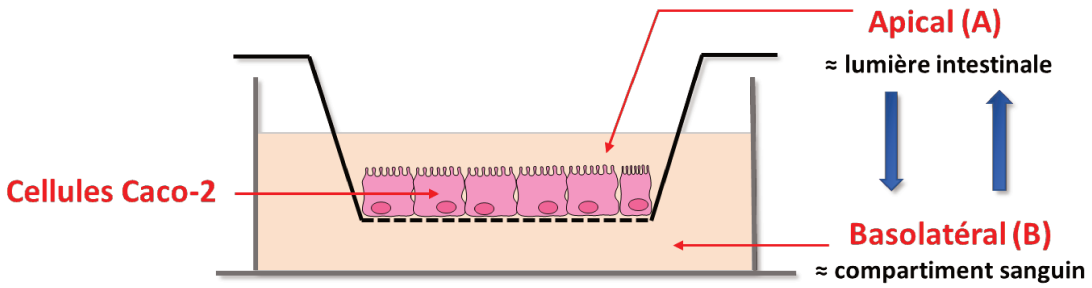


FIGURE 44: SCHEMA DU DISPOSITIF TRANSWELL® DECOMPOSE EN 3 PARTIES : LE COMPARTIMENT APICAL SIMULANT LA BARRIERE INTESTINAL (A), LE COMPARTIMENT BASOLATERAL SIMULANT LE COMPARTIMENT SANGUIN (B) ET LE COMPARTIMENT CELLULAIRE FORME PAR LES CELLULES CACO-2 (C).

2.2.3. OBJECTIF

L'objectif de ce dispositif et d'identifier les acteurs impliqués dans la pharmacocinétique de deux RSNO (NACNO et GSNO) lors du passage de la barrière intestinale pour atteindre la circulation systémique. Pour cela différentes espèces (NAC, GSH, NACNO et GSNO) seules ou en mélanges ont été déposées dans le compartiment apical. En s'appuyant sur des résultats précédents [217], après 4 h d'incubation, les trois compartiments ont été prélevés (apicale, basolatérale et cellulaire) afin de procéder à la quantification de chaque espèce. Ce bilan de matière permet de suivre le devenir des RSH/RSNO lors du franchissement de barrière. Le but est d'apporter des réponses quant au(x) meilleur(s) choix thérapeutique(s) pour la supplémentation en NO.

2.2.4. MISE EN PLACE DU DISPOSITIF TRANSWELL®

Les cellules sont décongelées (cryotube de 1 mL à 10^6 cellules/mL) puis transvasées dans 9 mL de milieu complet Caco-2 préalablement chauffé à 37 °C. Le milieu complet est composé de Minimum Essential Medium Eagle (EMEM) supplémenté avec 20 % de sérum de veau fétal décomplémenté, 1 % de non-essential Amino Acid

(NEAA), 1 % de Pénicilline (10000 u) et Streptomycine (10 mg/mL), 1 % pyruvate de sodium (100 mM).

Le mélange cellules / milieu complet est centrifugé 5 minutes à 300 $\times$ *g* et le culot est récupéré et resuspendu dans un flasque avec du milieu préchauffé à 37 °C et placé dans un incubateur à 37 °C et 5 % de CO_2. Les cellules sont ensuite ensemencées dans une plaque 96 puits, 24 h avant le début de la manipulation en Transwell®, à raison de 2.10^4 cellules par puits.

Pour l'expérience en Transwell® les cellules sont ensemencées à 1.10^6 cellules dans chaque insert, eux-mêmes disposés dans des plaques 12 puits. Le milieu complet est changé tous les deux jours durant la première semaine de culture correspondant à la phase de prolifération cellulaire. Durant la deuxième semaine le milieu est changé quotidiennement, correspondant à la phase de différenciation. La formation de la barrière cellulaire est suivie en mesurant la résistance électrique transépithéliale (TEER) à l'aide d'un Milicell-Electrical Resistance system (Millipore, USA). L'intégrité de la barrière est validée au-delà de 500 Ω.cm².

Le jour de l'utilisation des Transwell® pour l'étude, soit 2 semaines après le dépôt des cellules dans les puits, le milieu de culture est remplacé par une solution tampon HBSS pour toute la durée de l'expérience. Cette solution est présente dans le milieu apical et basolatéral à hauteur de 0,5 mL et 1,5 mL respectivement. Une fois le milieu changé, les espèces à étudier sont déposées dans le compartiment apical et laissées à incuber durant 4 h à 37 °C et une agitation de 500 rpm. Ce temps d'incubation est basé sur des précédents travaux au sein du laboratoire visant à étudier l'absorption intestinal de RSNO [217]. Les conditions de dépôt des différentes espèces sont les suivantes :

- NAC 100 µM
- GSH 100 µM
- NAC 50 µM + GSH 50 µM
- NACNO 100 µM
- GSNO 100 µM
- NACNO 50 µM + GSNO 50 µM.

À la fin du temps d'incubation, les différents compartiments peuvent être prélevés afin de procéder au dosage des différentes espèces.

2.3. STRATEGIE ANALYTIQUE MISE EN PLACE DANS CHAQUE COMPARTIMENT

La stratégie de quantification des différentes espèces présentes est fonction du compartiment. En effet, le milieu intracellulaire ne sera pas étudié de la même manière que le compartiment apical et basolatéral. Les techniques associées seront donc adaptées (Figure 45).

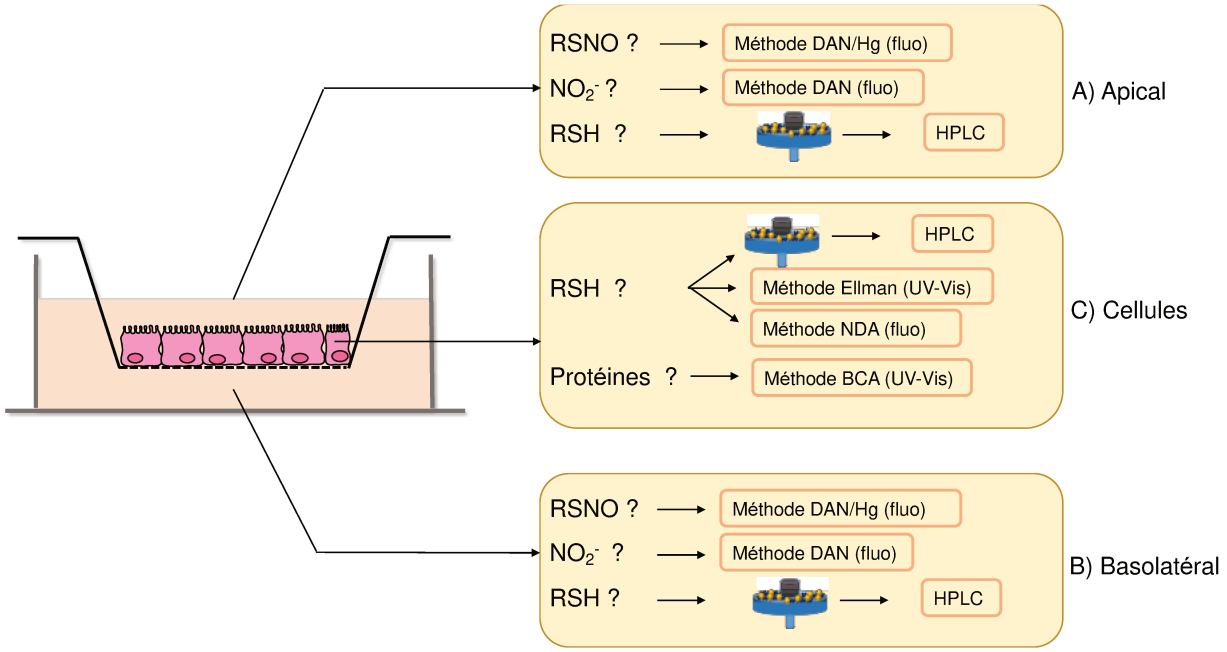


FIGURE 45: STRATEGIE ANALYTIQUE MISE EN PLACE POUR LA QUANTIFICATION DES DIFFERENTES ESPECES (RSH, RSNO, IONS NITRITES ET PROTEINES) EN FONCTION DU COMPARTIMENT CONSIDERE (APICAL, BASOLATERAL ET CELLULAIRE).

2.3.1. COMPARTIMENT APICAL ET BASOLATERAL

Dans les compartiments apical et basolatéral on s'intéresse à la quantité de RSNO, d'ions nitrites et de RSH présents (Figure 45 A et B), en utilisant les techniques suivantes :

Quantification des RSH :

La quantification des thiols réduits s'effectue de la façon suivante : chaque milieu est filtré à travers le filtre nanostructuré afin d'adsorber les thiols présents. Ces thiols sont ensuite relargués par ajout de DTT, afin de réaliser un échange de ligand et le relargage est analysé en HPLC. La méthode utilisée est la même que celle décrite au chapitre 2, permettant d'identifier et quantifier NAC et GSH. Les étapes de relargage sont effectuées jusqu'à désorption maximale des thiols sur le filtre.

Quantification des RSNO :

La mesure des RSNO repose sur la méthode spectrofluorimétrique DAN/Hg reposant sur leur dénitrosation et la quantification des ions nitrites générés. Cette méthode est décrite au chapitre 2. Cette technique ne permet pas d'identifier de quel type de RSNO il s'agit.

Quantification des ions nitrites :

Les ions nitrites sont des dérivés du NO qui peuvent être quantifiés en spectrofluorimétrie afin de rendre compte de la quantité initiale de NO. La méthode utilisée est la méthode utilisant le réactif de DAN, décrite au chapitre 2.

La quantification des RSH, RSNO et des ions nitrites dans le compartiment basolatérale et apicale permet une vision globale des différentes espèces présentes et rends compte de leur capacité à diffuser à travers la barrière cellulaire. La mesure en milieu intracellulaire est quant à elle plus complexe.

2.3.2. COMPARTIMENT INTRACELLULAIRE

Le traitement des cellules Caco-2 pour la quantification nécessite une étape de lyse cellulaire. Pour cela, le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées avec 1,0 mL de tampon PBS. Une fois le PBS retiré, 250 µL d'acide perchlorique 3,3 % (V/V) sont ajoutés dans chaque puits pour lyser les cellules. Les lysats sont récupérés et centrifugés à 10 000 × *g* pendant 15 minutes à 4 °C. Les surnageants sont prélevés (200 µL) afin d'y ajouter du NaOH 40 % avant une dilution au 1/5 dans un tampon (HCl 0,1 M-EDTA 2,0 mM ou tampon phosphate 0,1 M-EDTA 5 mM pH 7,5 pour le dosage de GSH et d'Ellman respectivement). C'est cette dernière solution qui sert de base aux différentes quantifications. Les espèces étudiées dans ce compartiment sont les RSH ainsi que les protéines (Figure 45 C).

Quantification des RSH :

La quantification des thiols a été réalisée de deux manières différentes : par méthode spectrophotométrie UV-vis et HPLC UV-vis. La première est une des premières méthodes de quantification de thiols réduits développée, la méthode d'Ellman qui met en jeu la réaction du groupement thiol avec un réactif : DTNB. Cette méthode a déjà été décrite au chapitre 2.

La seconde méthode pour la quantification et l'identification de NAC et GSH est la méthode HPLC décrite et développée au chapitre 2 également.

Enfin, la dernière méthode utilisée est une méthode spectrofluorimétrique spécifique du GSH. Celle-ci repose sur la formation d'un adduit fluorescent entre le GSH et le 2,3-naphtalène dicarboxaldéhyde (NDA) (Figure 46). Les paramètres de fluorescence sont les suivants : λ_{exc} = 485 nm et λ_{em} = 528 nm. Après l'étape de lyse, 60 µL de la solution contenant les cellules et le tampon HCl-EDTA sont déposés dans une plaque 96 puits avant d'y ajouter 120 µL de tampon borate 0,4 M pH 9,2 et 20 µL du réactif NDA. Le mélange est laissé 25 minutes sur glace à l'abri de la lumière avant d'effectuer la mesure de l'intensité de fluorescence.

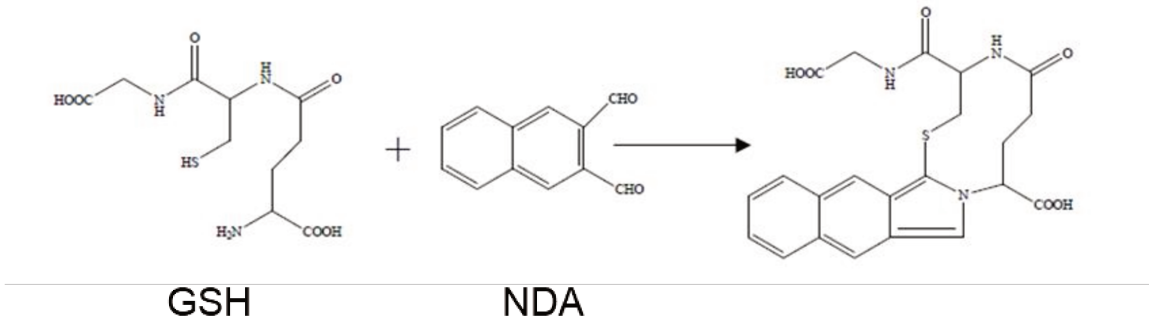


FIGURE 46: RÉACTION SUPPORT DU DOSAGE DU GSH PAR LE 2,3-NAPHTALÈNE DICARBOXALDÉHYDE (NDA).

Les gammes d'étalonnages pour la mesure du GSH sont réalisées dans du NaOH 0,1 M avec de la NDA (tableau 8).

TABLEAU 8: PARAMETRES DE VALIDATION DE LA COURBE STANDARD POUR DU GSH DANS UN TAMPON PHOSPHATE/HCL- 0,1 M + EDTA-2MM (N = 10).

	Gamme d'étalonnage (µg/mL)	Équation de droite	r^2
BSA	25 – 1000	$Y = (7{,}9.10^{-3} \pm 0{,}4.10^{-3})\ x + (4{,}2.10^{-2} \pm 3{,}4.10^{-2})$	0,99

Quantifications des protéines :

Les protéines intracellulaires ont été quantifiées afin de s'assurer d'une uniformité entre les différents tapis cellulaires dans chaque Transwell®. Ce dosage repose sur la réaction entre les protéines et l'ion Cu^{2+} qui va être réduit en Cu^{+} (réaction de Biuret) en milieu alcalin. L'ion formé réagit avec l'acide bicinchoninique (BCA) engendrant un produit de réaction de couleur pourpre détectable en spectrophotométrie UV-Vis à 562 nm (Figure 47). Le complexe se produit en présence de protéine à condition que celle-ci possède les acides aminés suivants : Cys, Cystine, Tryptophane et Tyrosine.

Techniquement, le dosage s'effectue en ajoutant aux échantillons (25 µL), contenant des protéines, un réactif de travail (200 µL) composé du réactif A (carbonate de sodium, bicarbonate de sodium, acide bicinchoninique et tartrate de sodium dans NaOH 0,1 M) et du réactif B (Sulfate de cuivre à 4 % m/V) dans des proportions de 50 pour 1 (V/V) de A et B respectivement.

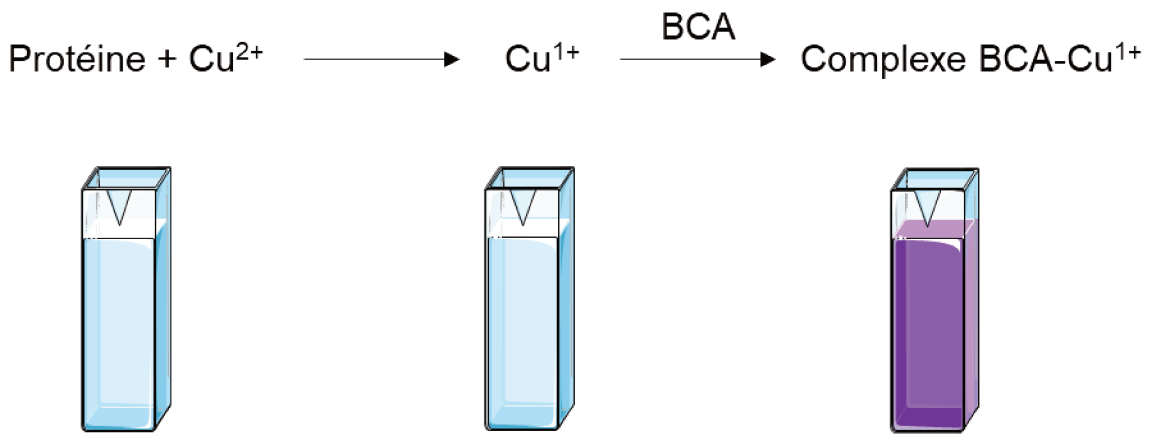


FIGURE 47: REACTION SUPPORT DU DOSAGE DES PROTEINES EN PRESENCE DE CUIVRE (2) PAR L'ACIDE BICINCHONINIQUE (BCA) ABOUTISSANT A LA FORMATION D'UN COMPLEXE VIOLET DETECTABLE EN SPECTROPHOTOMETRIE UV-VIS.

Les gammes d'étalonnages pour la mesure des protéines sont réalisées dans le lysat cellulaire avec du BCA (Tableau 9).

TABLEAU 9: PARAMETRES DE VALIDATION DES COURBES STANDARD POUR DU GSH DANS UN TAMPON PHOSPHATE HCL-0,1 M, EDTA-2 MM (N=10)

	Gamme d'étalonnage (µM)	Équation de droite	r^2
GSH	0,65 – 3,25	$Y = (6{,}0.10^{-5} \pm 1.010^{-5})\ x + (1.3 \pm 0.4)$	0,98 ± 0,02

2.3.3. CALCUL DU POURCENTAGE D'EXTRACTION DANS L'HBSS

L'application du dispositif nanostructuré aux différents milieux du Transwell® pose des questions en termes d'effet matrice et notamment d'influence sur l'adsorption et la désorption des thiols à la membrane. En effet, les capacités d'adsorption et de désorption déterminées au chapitre 2 en matrice simple peuvent être différentes en fonction de la matrice.

Pour évaluer ces paramètres, du milieu complet en condition Transwell®, c'est-à-dire après 4 h d'incubation avec les cellules Caco-2, est prélevé. Les différentes espèces étudiées (NAC, GSH, NACNO et GSNO) sont ajoutées à la même concentration que dans l'expérience Transwell® (100 µM ou 50 µM pour les molécules seules ou en mélange). Ces solutions sont filtrées à travers des membranes nanostructurées (n=3)

afin d'étudier la capacité d'adsorption des thiols dans l'HBSS. La désorption est également caractérisée par relargage avec du DTT 50 mM jusqu'à relargage complet.

Les taux d'adsorption et de désorption calculés pour chaque espèce ou mélange d'espèce constituent la capacité du dispositif en HBSS. Ils permettent de calculer un pourcentage d'extraction. Ces pourcentages peuvent être appliqués aux résultats, obtenus lors de l'études des mécanismes de transport à travers la barrière cellulaire, afin de rendre compte de la quantité de chaque espèce initialement présente avant filtration.

Ainsi, l'application de l'ensemble des techniques décrites précédemment et notamment le filtre nanostructuré, a pour objectif de faire un bilan des espèces impliquées dans les mécanismes de passage de barrières des thiols/*S*-nitrosothiols. L'utilisation du dispositif nanostructuré a pour ambition de permettre une quantification simple et unique des thiols dans ces différentes matrices que sont le milieu de culture et les cellules.

3. RESULTATS

3.1. POURCENTAGE D'EXTRACTION

Il est largement admis que chaque matrice peut avoir un effet sur l'efficacité d'une méthode. De ce fait, la question s'est posée de l'influence du milieu HBSS sur les phases d'adsorption et de désorption de notre dispositif nanostructuré. Dans le chapitre 2, la matrices plasma de rat n'avait présenté aucun effet comparé à la matrice PBS. En effet, les résultats obtenus en termes d'adsorption et de désorption de thiols n'étaient pas significativement différents.

Les capacités de capture et de relargage du dispositif vis-à-vis de l'HBSS ont été évaluées. Pour cela, le milieu HBSS utilisé lors des expériences Transwell® après 4 h d'incubation a été prélevé afin d'y ajouter à postériori les thiols étudiés (NAC et GSH) seuls ou en mélange binaire aux mêmes concentrations que pour l'étude du passage de barrière (50 nmol). Ce mélange une fois filtré est analysé avec la méthode HPLC pour la

quantification de thiol afin de déterminer un taux d'adsorption. Le taux de désorption est quant à lui calculé par filtration successives de DTT 50 mM (500 µL) et analyse des différents filtrats. L'ensemble des résultats obtenus permettent de déterminer un pourcentage d'adsorption et de désorption pour chaque thiol dans l'HBSS à travers le filtre (Tableau 10). L'addition des deux pourcentages permet d'aboutir à un facteur correctif correspondant à un taux d'extraction dans le milieu considéré. Il apparait au regard des résultats que seule la désorption est impactée par la matrice HBSS. En effet, dans le cas de NAC et GSH filtrés séparément la désorption est significativement inférieure à celle en PBS (89,3 ± 11,4 % et 92,1 ± 5,1 % pour NAC et GSH). Le comportement lorsque les deux thiols sont mélangés est également différent pour NAC avec un taux de désorption diminué, comparé à celui dans du PBS (83,7 ± 10,1 %) tandis que celui de GSH est similaire avec environ 50% de molécules relarguées.

TABLEAU 10: DETERMINATION DES POURCENTAGES D'EXTRACTION POUR NAC, GSH ET NAC + GSH EN MILIEU HBSS APRES 4H D'INCUBATION DANS LE DISPOSITIF TRANSWELL® ET FILTRATION A TRAVERS LA MEMBRANE NANOSTRUCTUREE.

Thiol	Thiols filtrés (nmol)	Thiols adsorbés (%)	Thiols désorbés (%)	Facteur correctif d'extraction
NAC	50	91,4 ± 6,4	54,8 ± 13,5	2,0
GSH	50	88,6 ± 9,2	67,1 ± 10,6	1,7
NAC	50	88,0 ± 7,0	41,0 ± 4,5	2,8
+	+	+	+	+
GSH	50	88,6 ± 9,2	49,5 ± 2,5	2,3

Le taux d'extraction permet de remonter à la quantité initiale de thiols présents au sein d'un échantillon en HBSS, connaissant uniquement la quantité relarguée après désorption. Par exemple, si la quantité de NAC retrouvée après 5 étapes de relargages au DTT est de 25 nmol, cela signifie que la matrice initiale en HBSS en contenait 2 fois plus, donc 50 nmol.

Concernant les étapes de relargage, outre la quantité désorbée, le profil de désorption est différent de celui obtenu en matrice PBS et plasma de rat (Figure 48). Pour rappel, la désorption maximale de NAC et GSH dans les deux précédentes matrices était atteinte en respectivement 3 et 5 filtrations de DTT 50 mM. Dans le milieu HBSS ce

nombre est augmenté à 5 pour NAC tandis qu'il est plus bas pour GSH avec 4 étapes nécessaires. Dans le cas de NAC et GSH filtrés simultanément, 6 étapes sont nécessaires pour désorber l'ensemble des deux thiols. Ces résultats traduisent encore une fois l'influence du milieu HBSS sur les performances du dispositif.

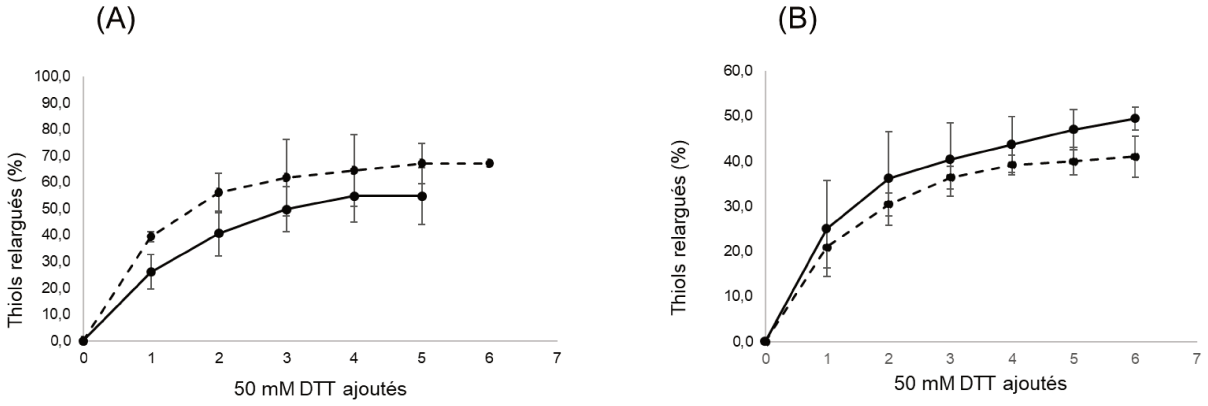


FIGURE 48: CINETIQUE DE RELARGAGE APRES ADSORPTION DE NAC ET/OU GSH DANS LE MILIEU HBSS.

La connaissance de ces facteurs correctifs permet de nettement simplifier l'analyse des thiols lors des expériences de passage de barrière en Transwell®. En effet, cela permet de filtrer les différents compartiments afin d'adsorber les thiols et bloquer leur fonction SH pour empêcher leur oxydation et étudier uniquement la phase de relargage. Les résultats obtenus seront ensuite pondérés par les facteurs correctifs afin de déterminer la quantité initiale de chaque thiol. Le but est de s'affranchir de l'analyse en HPLC de la matrice HBSS et réaliser uniquement les analyses sur le relargage en matrice PBS.

Ainsi, l'ensemble des résultats présentés par la suite seront ceux après application du facteur correctif d'extraction. Il est bien sûr évident que ce facteur devra être validé sur toute la gamme de concentrations de travail.

3.2. ARTICLE 3, NANOSTRUCTURATED MATERIAL CONTRIBUTION TO THIOL QUANTIFICATION IN INTESTINAL MIMICKING MEDIA

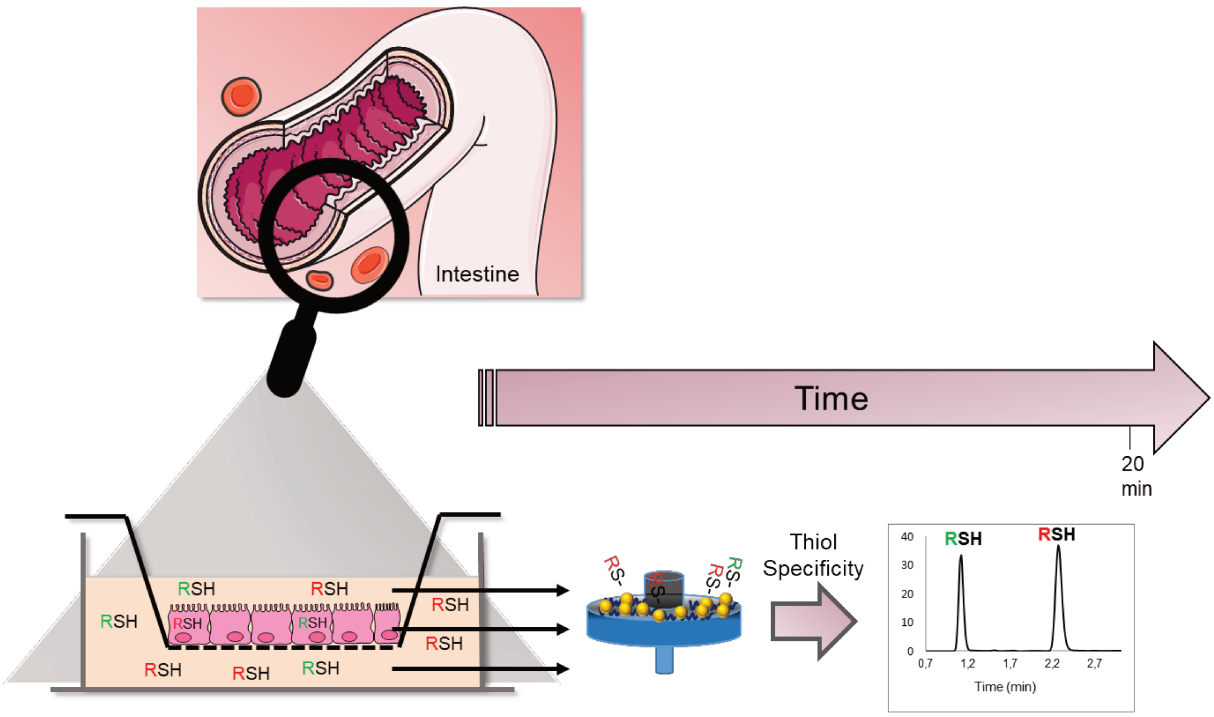
Le dispositif nanostructuré peut être utilisé afin d'extraire les thiols de leur milieu et les quantifier. Ceci permet une harmonisation de méthode peut importe la matrice et une comparaison directe des résultats. Le filtre a été appliqué au dispositif Transwell® afin d'étudier le devenir des RSH une fois dans le compartiment apical et les échanges entre les différents milieux. Le but est d'étudier les mécanismes de diffusion des différentes espèces dans un modèle *in vitro* de barrière intestinale. L'ensemble de ces travaux fait l'objet d'une publication qui sera prochainement soumise dans le *Journal of Pharmaceutical Analysis*.

Nanostructurated material contribution to thiol quantification in intestinal mimicking media

Margaux Berthou[1], Arnaud Pallotta [1,2], Caroline Gaucher[1], Isabelle Fries[1], Ariane Boudier[1,2] and, Igor Clarot [1,2].

1 Université de Lorraine, CITHEFOR, F-54000 Nancy, France

2 Nanocontrol, F-54000 Nancy, France



Abstract

Thiol are key biological molecules involved in many physiological functions such as redox homeostasis. Many methodologies have been applied for the detection of thiol in human biological fluid to either evaluated concentration or drug pharmacokinetic. Therefore, detection and quantification remain difficult due to thiol properties and containing matrices leading to misunderstanding phenomenon and discrepancies in thiol concentrations reference and pathological values. In this work, a simple nanostructurated membrane (NM) was applied to thiol extraction in biological mimicking fluids. The device was prepared within a polymer functionalization of the cellulosic membrane to embedded AuNP through electrostatic interaction. The ability of the nanostructurated membrane to enrich thiol molecules containing in biological samples was evaluated through an intestinal model barrier. The results showed an ability of the device to quantify two model thiols, glutathione and *N*-acetylcysteine, in intestinal mimicking media to monitor each species as it moves into the systemic circulation. NAC and GSH shows crossing barrier capacity through transcellular pathway. Putting together, NAC demonstrated an

influence on GSH permeation. Finally, NM was applied for intracellular thiol quantification and has demonstrated its ability to quantify endogenous GSH without any other pretreatment. Through this study we used a specific thiol device and postulated that it can be use for a unique and rapid tool for thiol quantification in biologicals matrices.

Keywords: Gold nanoparticles; Nanostructuration; Thiols quantification; Biological matrix; Extraction device.

1. Introduction

Redox homeostasis within cells and biological fluids is maintaining through different mechanisms including presence of pro and anti-oxidants species. Among them, thiols are considered as major anti-oxidant species due to their high reactivity. For example, reduced glutathione (GSH) allows the cellular detoxification of heavy metals such as mercury [1], the reduction of peroxides (glutathione peroxidase) [2,3], the reduction of disulfide bridges between cellular proteins [4] and the detoxification of aromatic organic compounds (glutathione S-transferase) [5,6]. Thiol are also involved in Nitric Oxide (NO) transport to increase its half-life (from sec to few hours [7]) and act as NO storage and carrier. In that way, pharmacokinetics parameters depend on the thiol part of the *S*-Nitrosothiol formed. It has been demonstrated that decrease of GSH concentration is associated with age and some diseases (diabetes [8], cardiovascular diseases [9], brain disorders [10], sepsis [11]…). To avoid GSH protection decrease, different therapeutics strategies to restore GSH pool are needed. Among these solutions, one can find oral administration of GSH or a prodrug of GSH, the well-known N-acetylcysteine [12]. These strategies are highly impacted by low bioavailabilities of GSH and NAC (50% [13] and 6-10 % [14] respectively). To improve tissue distribution of GSH or NAC, drug delivery systems were developed [15–17]. Very few of these works have moved from research into clinic applications because of bioavailability and assimilation problems [18,19]. Whether for its important role at cellular and extracellular level or for GSH supplementation development, there is a real necessity to quantify these thiolated molecules in biological sample. These quantifications are especially challenging for GSH statue evaluation, prediction of some diseases factor or pharmacokinetic study of GSH drugs or prodrugs.

The dominant and most widely used approach for thiol quantification in complex matrix are methods combined with a derivatization protocol [20–22]. Among these methods, 5,5′-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) [23], naphtalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA) [24] and o-phthaldehyde (OPA) [25] are by far the most commonly used derivatizing agents for thiol quantification in HPLC [23], spectrophotometry UV-Vis [26] or fluorimetry [27]. One drawback of derivatization is that reaction efficiency is easily influenced by sample matrix Other direct methods were developed. Whether direct or indirect, these methods present basic limitations in terms of complexity, sample processing and times, and number of thiols simultaneously quantitated. These long process times are in contrast with thiol

poor stability and/or lack of selectivity, leading to potential inaccurate analytical results. For example, contradictory GSH concentrations in blood were reported in literature (ranging from 100 µM to 10 mM) highlighting analytical issues concerning thiols quantification. To the best of our knowledge, it does not exist a rapid simple method applicable to the different body compartment (blood, urine, cells, membranes …) and in accordance with matrix complexity and thiols properties.

For several years, addition of nanomaterial to current methods for thiol sensing has increase [28,29]. Despite the increase of selectivity and sensitivity, there is still some drawbacks mainly due to colloidal state of nanomaterial [30]. Thus, nanomaterial immobilization to create a nanostructurated material have attracted increasing attention as thiol pre-concentration. Among these devices, Solid-Phase Extraction (SPE) have gained general acceptance to accomplish separation from matrix and analyte enrichment prior to detection [31,32].

In this work, a nanostructurated device for thiol extraction was applied to an intestinal model barrier, which is the first limiting barrier for vascular bioavailability. The method is based on high affinity between SH group and Gold Nanoparticles (AuNP) trapping on a cellulose filter. The device was used to quantify and follow two different thiols (GSH and NAC) in an in vitro system containing different complex mediums. For that, Caco-2 cells in a Transwell device were used as barrier intestinal model to study diffusion and crossing barrier characteristics of NAC and GSH. This model is greatly described in literature as a tool to evaluate adsorption of drugs or elucidate pathways transport mechanisms [33]. For this purpose, a cellulosic membrane embedded in a syringe filter was developed by our group [34] for a direct and unique filtration and isolation of thiol in each compartment. After investigation of matrix effects on the nanostructurated membrane (NM), the device was successfully applied to thiol extraction in a model intestinal barrier followed by HPLC identification and quantification with a developed and validated method.

2. Material and methods

2.1. Materials and reagents

All reagents and solvents were of analytic grade and used without further purification. KCl was purchased from Carl Roth. Citric acid and KH_2PO_4 were purchased from Labosi. Methanol and Na_2HPO_4 were purchased from Carlo Erba. $K_2S_2O_8$, NaOH 30%, sodium chloride (NaCl), Trisma base (Tris), sodium hydroxide (NaOH), Hydrochloric acid, ammonium chloride, Mercuric chloride ($HgCl_2$), orthophosphoric acid and sodium tetraborate were purchased from VWR Chemicals. Phosphate buffer saline solution (PBS) was prepared as follows: [Na_2HPO_4] = 6.68 mM, [KH_2PO_4] = 1.47 mM, [NaCl] = 138.00 mM, and [KCl] = 2.68 mM, the final pH was adjusted to 7.4 with HCl 12 M. Tris-HCl buffer was obtained by dissolving 18.16 g of Tris in 1 L of H_2O, the pH was adjusted to pH = 7.4 with HCl 12

M. Ultrapure deionized water (> 18.2 MΩ cm) was used for the preparation of all solutions. Poly(allylamine hydro-chloride) (PAH) (average molecular weight of 17,500 g.mol-1, pKa = 8.7) was purchased from Sigma Aldrich. Gold chloride salt ($HAuCl_4$), sodium citrate, sodium borohydride, glutathione (GSH), *N*-acetylcysteine (NAC), dithiothreitol (DTT), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), sodium octylsulfate, 2-amino-2-hydroxymethyl-1.3-propanediol (Tris), dithio-5,5'-bis(nitro-2-benzoic) acid (DTNB) were from Sigma-Aldrich. Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), foetal bovine serum. (FBS), sodium pyruvate, penicillin 10 000 $U.mL^{-1}$ and streptomycin 10 mg.mL−1 mix, trypsin, non-essential amino acids, glutamine, Hank's Balanced Salt Solution (HBSS Ca^{2+}/Mg^{2+}), sodium nitrate ($NaNO_3$), 2,3-diaminonaphthalene (DAN), propranolol hydrochloride, furosemide salt, triethylamine, 2-(Nmorpholino)ethanesulfonic acid (MES), Igepal CA-630, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and neocuproine were purchased from Sigma. Sodium nitrite ($NaNO_2$) was from Merck and acetonitrile was from Biosolve.

2.2. Thiols and AuNP synthesis

All RSH solutions (NAC and GSH) were prepared in PBS buffer (0.148 M; pH = 7.4).

Citrate stabilized AuNP were synthetized in aqueous solution according to our previous work [35]. Briefly, 1.0 mL of $HAuCl_4$ solution (10 mg/mL) was added into 90 mL of water and 2.0 mL of 55 mM sodium citrate was added under inert atmosphere (N_2). The solution was stirred for 1 min then 1.0 mL of 19.5 mM $NaBH_4$ was added and the solution was stirred for 10 min under N2. The resulting 90 ± 3 nM (max 514 ± 1 nm) suspension of nanoparticles was stored in the dark at 4°C during a maximum period of 20 days [35]. For all experiments, AuNP with hydrodynamic diameter of 6.5 ± 0.9 nm (core diameter 5.3 ± 1.1 nm) and anionic charge (zeta potential) of -32.6 ± 0.7 mV were used.

2.3. Caco-2 cells culture and cytocompatibility

Intestinal Caco-2 cells (ATCC® HTB-37™) were grown in complete medium consisting of EMEM supplemented with 10% (v/v) of FBS, 4 mM of glutamine, 100 U/mL of penicillin, 100 U/mL of streptomycin, 1% (v/v) of non-essential amino acids. Cells were cultivated at 37 °C under 5% CO2 (v/v) in a humidified incubator. Caco-2 cells were seeded in 96-wells plates at 2 × 104 cells/well 24 h before experiment. They were then exposed to each S-nitrosothiol (from 10 to 100 µM) for 24 h at 37 °C, complete medium being used as control. Cytocompatibility was assessed through metabolic activity with the 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The absorbance of extracted formazan crystals was read at 570 nm with a reference at 630 nm (EL 800-microplate reader, Bio-TEK Instrument, Inc®, France). Metabolic activity in control condition was considered as 100%.

2.4. Preparation of nanostructurated membranes

The immobilization supports used were commercial Chromafil cellulosic membranes (CM) (Diameter 25 mm and pore size 0.45 µm). Nanostructurated membrane (NM) construction was realized based on our previous work [34]. AuNP (negatively charged) were embedded on the device through electrostatic bonds with a cationic polymer: PAH. Briefly, a first activation step was realized by pushing a 10 mg/mL PAH solution in Tris buffer (0.15 M; pH = 7.4) through the membranes for 10 min. Membranes were rinsed for 3 min with Tris solution and nanostructured using AuNP-citrate colloidal suspension (90 nM). A final rinse with Tris was then realized and the last two steps of this process were repeated fifteen times to achieve a high immobilization density (number of AuNP per cm^2 of membrane). Before used, a final rinse with water was realized.

2.5. Intestinal permeability of thiol

Thiol intestinal permeability and exchanges mechanisms accros the Caco-2 monolayer were evaluated using cell culture inserts (Transwell®, Corning, USA, membrane with 0.4 µm pore size, 1.12 cm^2 area) disposed in a 12-wells plate.

The complete medium was replaced every two days during the first week of cell proliferation. During the second week, the medium was replaced every day until the differentiated cell monolayer was formed (14–15 days). The formation of the barrier was followed by transepithelial electrical resistance (TEER) measurement using a Millicell®- Electrical Resistance system (Millipore, USA) and validated for TEER values higher than 500 $\Omega.cm^2$.

After 14-15 days of culture, medium was replaced by HBSS at pH 7.4. Thiol (in mixture or not) at a final concentration of 100 µM was deposited in apical comportment and left to incubate during 4h under orbital shaking (500 rpm) at 37°C. After 4 h entire volume of each compartment was collected in Eppendorf tubes for the different analysis. For intracellular thiol quantification, cells were lysed in 250 µL of perchloric acid 3,3 % (V/V).

In the apical and basolateral medium, thiol was quantified and identified in HPLC with UV-vis detection and *S*-nitrosothiols with spectrometer with fluorimetric detection. In intracellular medium, thiol was quantified and identified in HPLC method with UV-vis detection and in spectrometer with UV-Vis and fluorimetric detection using Ellman reagent and 2,3-Naphtalene dicarboxaldehyde (NDA) respectively.

At the end of the study, the integrity of the intestinal cell monolayer was checked by measuring the TEER value and the permeability of sodium fluorescein (5 µM), a marker of low paracellular permeability. A TEER value higher than 300 Ω.cm2 as well as a 5% of fluorescein permeability validated the integrity of the intestinal monolayer at the end of the experiment [36,37].

2.6. Nanostructurated membranes

Thiol adsorption. RSH adsorption on NM was performed by filtering all the compartment volume (500 µL for apical and 1500 µL for basolateral) containing RSH solution on NM.

Thiol desorption. Thiols desorption from membranes was realized using dithiothreitol (DTT). Five hundred microliters of 50 mM DTT (corresponding to 25 µmol) were filtered through NM. The quantification of reduced thiols released was performed on the filtrate by HPLC method. Desorption protocol was repeated until a complete release of adsorbed molecules was obtained.

Extraction rate in cellular medium. As cellular medium can influence thiol adsorption and/or desorption, an extraction rate was calculated. RSH (respectively NAC 50 nmol/ GSH 50 nmol/ NAC 25 nmol + GSH 25 nmol) were dissolved in cellular medium, directly or after 4 h incubation time with Caco-2 cells, and filtered through the NM. Filtrates were analyzed with the developed and validated HPLC method to determine thiol adsorption and desorption capacities of the NM in cellular medium. Addition of both percentages lead to an extraction rate corresponding to thiol amount extract and release from the device from an initial sample. These extraction rate have been applied to obtain results from thiol HPLC method.

2.7. Thiols quantification

HPLC method. Thiol quantification was performed by ion-pair reversed phase HPLC. For GSH-NAC separation, the HPLC system consisted of a Spectrasystem pump P1000XR equipped with a Spectraseries AS100 injector and coupled to a Gilson UV-VIS-155 detector set at 205 nm. A C18 Thermo Scientific ODS Hypersil column (250/4.6 mm, 5 µm particle diameter) and a Nucleosil EC 4/3 NUCLEODUR C18 HTec precolumn (5 µm) heated at 40 °C was used. The injection volume was 100 µL. The mobile phase consisted of a mixture of octyl sodium sulfate (10-3 M, pH 3.0) and acetonitrile (ACN) (97.0/3.0 V/V) with a flow rate of 2.0 mL/min. The method was validated as described by ICH Q2(R1) [38], validation parameters were described in a previous study [34].

For basolateral and apical compartment, mediums were directly filtered through the NM. For intracellular medium, cells were lysed directly on the Transwell membrane with perchloric acid 3,3 % (V/V) and centrifuge during 15 min at 10000 g and 4 °C. Supernatant with cellular medium was collected and diluted in phosphate buffer solution (1:5 V/V). The obtain solution was filtered through the NM. In both case, thiols were only quantified after the different release steps using the previous described HPLC method. Calculated extraction rates were applied to the different results to access to initial thiol quantity in Transwell.

Spectrometer methods. To compare our NM, two traditional thiol quantification methods were used as they are commonly used for thiol quantification in biologicals matrices.

For Ellman's reaction, 40 µL of 5,5′-dithio-bis(2-nitrobenzoic) acid solution (1.0 mM) in PBS were added to 200 µL of each sample. This mixture was incubated 10 min at room temperature protected from light then absorbances were read at $\lambda = 412$ nm (linearity between 3 and 32 µM). Ellman standard curves of GSH were: $y = (0.0066 \pm 0.0035)\ x + (0.0666 \pm 0.0313)$.

For NDA's reaction, 120 µL of borate buffer and 20 µL of NDA in absolute ethanol were added to 60 µl of apical, basolateral and intracellular medium. The mixture was incubated for 25 min at 0°C and protected from light before reading fluorescence intensity at $\lambda_{exc} = 485$ nm and $\lambda_{em} = 528$ nm (linearity between 0.65 and 3.25 µM). NDA standard curves of GSH were: $y = (6.10^{-5} \pm 1.10^{-5})\ x + (0.34575 \pm 0.44276)$.

2.8. Study of interaction between NM and Albumine/Histidine

To evaluate NM interaction with albumin or histidine, Albumine 0.4 g/L and histidine 50 µM, both in PBS, where quantified before and after filtration through the NM with the above described methods. Two different spectrophotometric method were used. For albumin quantification, Bicinchonique Acid Assay (BCA) was used. This method relies on Cu^{2+} reduction into Cu^{+} in presence of protein (at alkaline pH) followed by complex formation between bicinchonique acid and Cu^{+} that absorbed at 562 nm. Briefly, 200 µL of mixture between reagent A and B (50/1 V/V), supplied in BCA kit, were added to 25 µL of sample in 96-wells plates. Plate was incubated 30 min at 37°C. Absorbance was read at 570 nm with a microplate spectrophotometer, EL 800 BioTek. Standard curves of Albumine were realized in NaOH 0.1 M: $y = (0.00078 \pm 0.00004)\ x + 0.04172 \pm 0.03408$.

Histidine was quantify using Pauly assay: 2.0 mL of sulfanilic acid + 1.0 mL of sodium nitrite 5 % (m/w) were added to the1 mL of work solution (containing histidine in PBS) and incubated at 25 °C for 5 min. Then, 3 mL of sodium carbonate (10 %) was added and absorbance was rea at 530 nm (linearity between 38.7 and 386.7 µM).

3. Results and discussion

3.1. Transwell device implementation

Based on previous works, our NM was employed to directly quantify thiol in a barrier intestinal model to study RSH permeability in a context of vascular bioavailability. Indeed, thiol presents major role maintaining redox homeostasis or as carrier for certain species (for example nitric oxide). Understanding RSH pharmacokinetic and in particular in terms of barrier crossing is a real challenge. We aim apply our NM to bridge some gaps about RSH biological crossing barrier mechanisms for bioavailability. For

that, Caco-2 cell line was used as a model of the intestinal epithelial barrier. This model has been widely used in that way because of its advantageous properties. Caco-2 cell can spontaneously differentiate into a monolayer of cells with many properties typical of adsorptive enterocytes with brush border layer as found in the small intestine. In this paper, Caco-2 cells were cultured on permeable filter insert, for 2 weeks, to improve their morphological and functional differentiation into a polarized monolayer that can mimic steric conditions in the intestine. This barrier model is part of a Transwell device divided into 3 parts: apical compartment simulating intestinal lumen, intestinal barrier formed by Caco-2 and basolateral medium simulating blood compartment. Thiols studied (NAC and GSH) was deposited in the apical compartment for 4 h incubation at 37 °C and 5% (V/V) CO_2. After 4 h, each compartment was collected and filtered through the NM.

3.2. Determination of extraction rate

As it was previously showed, matrix can influence NM performances in term of adsorption and desorption. Therefore, matrix effects were evaluated in HBSS without incubation time with Caco-2 cells containing 50 nmol of NAC or GSH. Results summarized in Figure 1 show adsorption capacity of 91.4 ± 6.4 % and 88.6 ± 9.2 % for NAC and GSH respectively. These results are similar to those in PBS and rat plasma described in a previous work [34]. Capture capacity on more complex samples with binary mixture of both thiols (500 µL of 50 µM of both NAC and GSH, corresponding to 25 nmol each) was evaluated. After filtration through the NM, 88.0 ± 7.0 % and 88.6 ± 9.2 %, of NAC and GSH respectively, were adsorbed. Desorption was evaluated with several DTT filtration (500 µL of DTT 50 mM) and filtrates were analyzed in HPLC to obtain a desorption rate based on previous adsorbed thiols. Addition of adsorption and desorption percentage represents extraction rate in HBSS.

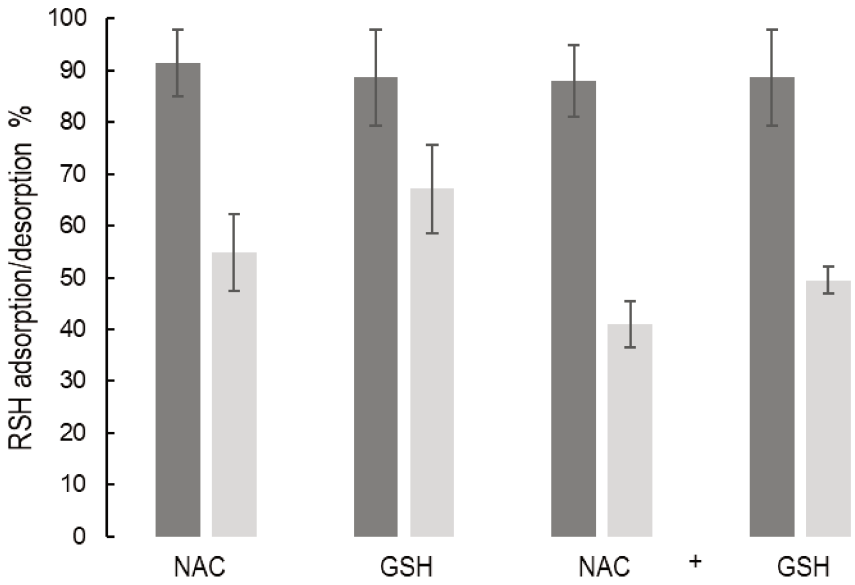


FIGURE 1: EVALUATION OF NAC AND/OR GSH EXTRACTION RATE IN HBSS WITHOUT INCUBATION TIME (N=3) INCLUDING EXTRACTION DURING ADSORPTION STEP (DARK GREY CURVE) AND DESORPTION STEP (LIGHT GREY).

To evaluate Caco-2 influence on extraction rate, HBSS was incubated during 4h with Caco-2 cells and NAC and/or GSH were added, as previously describe. Results appears non-significantly different compare to those in HBSS without cells incubation.

Addition of adsorption and desorption capacities led to an extraction rate. For all condition, extraction rates were evaluated to be 2.2 ± 0.5. For example, an extraction rate of 2 means that finding quantity of NAC after all desorption steps was half of the one filtrated through the NM. These extractions rates were evaluated on 2 other concentrations, 200 µM and 50 µM of NAC and/or GSH in cells medium, corresponding to 100 nmol and 25 nmol respectively. Only results with 100 µM of thiol(s) are presented because this concentration corresponds to deposited concentration in Transwell device.

For all experiments, medium containing thiols were filtrated through the device and only desorption steps were characterized in HPLC. Obtains results were incremented with corresponding extraction rate to determine initial thiol concentration in apical or basolateral compartment.

3.3. Evaluation of NM specificity

When considering desorption efficiency in HBSS, it appears that only 50 % was desorbed from the NM. Presence of other molecules on the NM could explain changes in desorption profile. It has been demonstrated that molecule with lower AuNP affinity was first desorbed and thus decreases high affinity molecule release. To asses this aspect, interaction with other biologicals molecules was investigated. Two molecules were tested: albumin, which present thiol function on Cys34 residue, and Histidine, an, essential amino acid with an amino and carboxyl group. Albumine was quantify using BCA spectrophotometric method while Histidine quantification was done with Pauly spectrophotometric

method. Quantification of Albumine and Histidine solutions before and after filtration through the NM shows no significant difference of concentration. These results show similar absorbance before and after filtration (absorbance before and after filtration of 0.107 and 0. 111 for histidine and 0.1688 and 0.1617 for albumin). It means that there is no interaction between Albumine or histidine and the NM. This highlight the specificity of the NM for thiol groups against other functional groups. For Albumine which present a thiol group, absence of interaction can be explain by conformation issues. Indeed, it has been demonstrated that the helix form of albumin does not allow access of the thiol function to AuNP. AuNP-SH interaction can only takes place with a previous denaturation of the protein [39,40]. Thus, there is no competitive interaction with molecule without thiol and high molecular weight thiol. Low desorption decrease was not due to unwanted interactions.

3.4. Thiols behavior through intestinal barrier

Thiol (NAC or GSH) was diluted in HBSS (0.5 mL of 100 µM concentration corresponding to 50 nmol deposited in apical compartment for 4h incubation (37 °C / 5 % CO_2). For binary mixture of NAC and GSH, final concentration was 100 µM, i.e. 50 µM of each (corresponding to 25 nmol). After 4h, mediums were collected separately. One part of each medium was used for RSNO quantification, the other part was directly filtered through a NM to adsorbed presents thiols.

<u>NM quantification after simple RSH deposition in apical compartment.</u>

For RSH quantification, thiols were adsorbed on the device by direct filtration of mediums and release with filtration of DTT 50 mM (500 µL for each step). DTT, a two-thiol containing molecule, released NAC and GSH from AuNP by ligand exchange due to its better affinity. Desorption protocol was repeated until a complete release of adsorbed molecules was obtained.

Obtains desorption results have been weighted with previous corrective factor calculated. This allows determine initial thiol quantity before NM filtration and give a global vision of each species present in each compartment. Results for NAC and GSH quantity in apical and basolateral compartment are resumed in Figure 2.

Each thiol was permeated (6.0 ± 2.4 % and 77.4 ± 30.3 % for NAC and GSH) with a higher permeation of GSH than NAC. After 4 h of permeability, all initial amount (50 nmol) of GSH was found with 30.6 ± 5.7 % remaining in apical compartment. For NAC deposition, mass balance in both compartments was incomplete with 17.2 ± 4.3 % of initial NAC quantify (one of which 11.2 ± 3.6 in apical compartment). There is a loss of 82.8 % of NAC deposited in apical compartment. This missing can be trapped inside the cell monolayer. Therefore, cells were lysed in culture insert and thiols were quantified through NM filtration and desorption steps. Quantities of NAC found inside the cells were 1.4 ± 0.7 nmol representing 2.7 ± 1.4 % of initial deposited amount. Mass balance for GSH deposition was

complete with 108.0 ± 30.81 % quantified in bot compartments. Nevertheless, GSH amount in cells was evaluated and shows an intracellular amount of 1.11 ± 0.29 nmol of GSH, corresponding to 2.2 ± 0.6 % of initial deposited GSH.

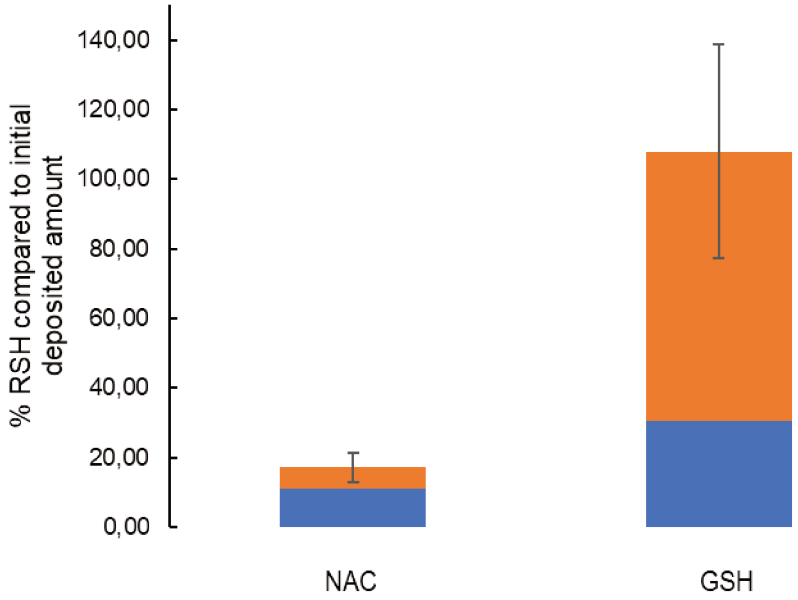


FIGURE 2: QUANTIFICATION IN APICAL (BLUE) AND BASOLATERAL (ORANGE) COMPARTMENT OF NAC OR GSH AFTER 4 H OF EXPOSURE TO 50 NMOL (N=3). RESULTS ARE EXPRESSED IN RELATION TO INITIAL DEPOSITED AMOUNT OF THIOL.

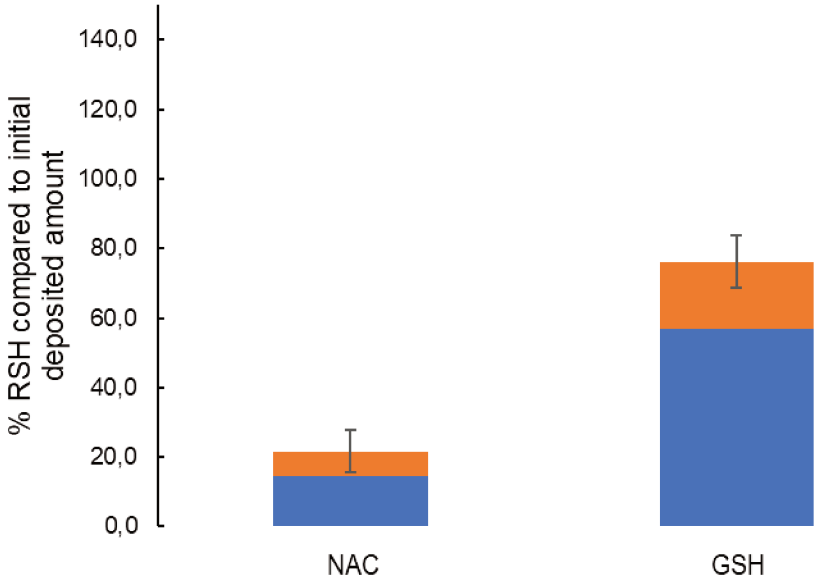


FIGURE 3: QUANTIFICATION IN APICAL (BLUE) AND BASOLATERAL (ORANGE) COMPARTMENT OF NAC AND GSH AFTER 4 H OF EXPOSURE TO 50 NMOL (25 NMOL OF EACH) (N=3). RESULTS ARE EXPRESSED IN RELATION TO INITIAL DEPOSITED AMOUNT OF THIOL.

NM quantification after mixture RSH deposition in apical compartment.

Influence of the presence of two thiols on permeability and thiol repartition was investigated by deposing NAC and GSH at a final concentration of 100 µM (25 nmol of each). NAC permeability and distribution in each compartment was similar to that with only NAC deposition (21.6 ± 6.0 % against 17.2 ± 4.3 % when not in mixture). There was still a large amount missing leading to an intracellular thiol quantification. Results shows that cell compartment contained 2.5 ± 1.0 nmol of NAC and 2.5 ± 0.8 nmol of GSH corresponding to 10.2 ±3.9 % and 9.9 ± 3.0 % respectively. For GSH, mass balance appears incomplete (76.2 ± 7.6 %) but not significantly different compared to GSH deposition without NAC (108.0 ± 30.81 %). There was also 4 times decrease of GSH permeation in basolateral compartment associate to 2 times increase of apical GSH amount. This highlights a GSH distribution modification in presence of NAC, whose distribution remains unchanged with or without GSH.

Intracellular GSH concentration in cells

As it is naturally present in cells, GSH should be present in intracellular medium event for NAC deposition. After NAC deposition and filtration of cellular media through NM, thiols release was realized with DTT and analyzed in HPLC. In addition to NAC signal on chromatogram, GSH release were observed. As it was not deposited in apical compartment, this quantity corresponds to endogenous GSH amount in cells. For NAC deposition endogenous GSH concentration was found to be 1.0 ± 0.1

µM. This amount is in accordance with literature values which are around 0.5 and 10 µM [41–43] without any preanalytical steps and/or harmful chemicals.

Positioning of NM compared to other methods

Two current analytical methods used for thiols analysis, Ellman and NDA, were applied to the previous tested Transwell conditions. Ellman method allows to quantify total thiol concentration whereas NDA is specific of GSH. These methods were used to compare our device with common thiol sensing methods. For thiol measurement with GSH deposition (single or in mixture) results obtain were similar to those found with our NM: 26.0 ± 0.8 nmol of GSH in apical compartment after 50 nmol GSH deposited against 30.6 5.7 nmol found with the NM. For GSH and NAC deposition, Ellman method gives 51.0 ± 0.8 nmol in apical compartment while 49.7 ± 12.3 were found with the NM. NDA method for specific GSH quantification, shows results in disagreement with those found with our NM and also with Ellman method. For example, quantification of GSH in apical compartment after 50 nmol deposition without NAC was 30.6 ± 5.7 nmol, 26.0 ± 0.8 nmol and 5.22 ± 0.5 nmol for NM, Ellman and NDA methods respectively. However, NDA quantification can't be lower than Ellman because of its specificity for one thiol. This methods comparison allows to highlights complexity of thiols analysis in different complex matrices. In fact, here, two methods are needed to quantify 2 different thiols with two derivatives reagents. NM utilization appears to be fast, easy to use thiols specific and selective and applicable to various matrices compared to current methods.

In that respect, the NM was applied to 3 different media without any other pretreatment, derivative reagent or harmful solvent. Methodology was as follow, first thiol extraction from original matrix followed by DTT release associated to HPLC identification and quantification. This led to an overview of thiols diffusion and repartition in each compartment with one single device, allowing a direct comparison between results. As an example, without NM, quantification of GSH would have required addition of different methods to obtain a complete characterization of each medium. GSH quantification in intestinal media could be done with an enzymatic colorimetric detection [44], in enterocytes with a derivative HPLC method [45] and plasma with spectrophotometer UV-Vis [46], liquid chromatography coupled or not with mass spectrometer [47,48].

4. Conclusion

Since its discovery, GSH has been shown to play ubiquitous roles in most living cells and its major functions are tightly connected to redox homeostasis. Whether it be for GSH diagnosis, to predict some diseases or evaluate new drug distribution and efficiency, accurate thiol quantification in each biological sample (cells, blood or intestinal lumen …) is crucial. In this context a previous developed

nanostructurated device was tested in a model intestinal barrier to study its behavior towards GSH and NAC quantification in an *in vitro* context of diffusion to systemic circulation. This specific pretreatment method allows to specifically extracted thiols from each biological sample with a unique and easy handled device … The strong bound between gold and thiol avoid stability issues (through -SH oxidation essentially) occurring with current thiol analytical methods. This specific and rapid extraction allow a complete thiols quantification in each matrix leading to a global vision of mechanisms involved in the passage of the mimicking intestinal barrier. These promising results suggest that our nanostructurated device could be used on real samples to study thiol pharmacokinetic after oral administration for supplementation.

References

[1] Up-regulation of glutathione synthesis in rat kidney by methyl mercury: Relationship to mercury-induced oxidative stress, Biochemical Pharmacology. 50 (1995) 1719–1724. https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)02075-6.

[2] E. Nagababu, F.J. Chrest, J.M. Rifkind, Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase, Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj. 1620 (2003) 211–217. https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00537-8.

[3] Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes* | Biochemistry, (n.d.). https://pubs-acs-org.bases-doc.univ-lorraine.fr/doi/abs/10.1021/bi00906a038 (accessed February 15, 2022).

[4] S.C. Lu, Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies, The FASEB Journal. 13 (1999) 1169–1183. https://doi.org/10.1096/fasebj.13.10.1169.

[5] R.C. Strange, P.W. Jones, A.A. Fryer, Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology, Toxicol Lett. 112–113 (2000) 357–363. https://doi.org/10.1016/s0378-4274(99)00230-1.

[6] Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology - PubMed, (n.d.). https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.bases-doc.univ-lorraine.fr/10416260/ (accessed February 15, 2022).

[7] J.S. Stamler, D.I. Simon, J.A. Osborne, M.E. Mullins, O. Jaraki, T. Michel, D.J. Singel, J. Loscalzo, S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds., Proc Natl Acad Sci U S A. 89 (1992) 444–448.

[8] M. Lagman, J. Ly, T. Saing, M. Kaur Singh, E. Vera Tudela, D. Morris, P.-T. Chi, C. Ochoa, A. Sathananthan, V. Venketaraman, Investigating the causes for decreased levels of glutathione in individuals with type II diabetes, PLoS One. 10 (2015) e0118436. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118436.

[9] F. Vargas, I. Rodríguez-Gómez, R. Pérez-Abud, P. Vargas Tendero, Y. Baca, R. Wangensteen, Cardiovascular and renal manifestations of glutathione depletion induced by buthionine sulfoximine, Am J Hypertens. 25 (2012) 629–635. https://doi.org/10.1038/ajh.2011.240.

[10] F. Gu, V. Chauhan, A. Chauhan, Glutathione redox imbalance in brain disorders, Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 18 (2015) 89–95. https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000134.

[11] G. Biolo, R. Antonione, M. De Cicco, Glutathione metabolism in sepsis, Crit Care Med. 35 (2007) S591-595. https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000278913.19123.13.

[12] R. Ruffmann, A. Wendel, GSH rescue by N-acetylcysteine, Klin Wochenschr. 69 (1991) 857–862. https://doi.org/10.1007/BF01649460.

[13] A. WITSCHI, S. REDDY, B. STOFER, B. LAUTERBURG, THE SYSTEMIC AVAILABILITY OF ORAL GLUTATHIONE, European Journal of Clinical Pharmacology. 43 (1992) 667–669. https://doi.org/10.1007/BF02284971.
[14] M.C. dos S. Tenório, N.G. Graciliano, F.A. Moura, A.C.M. de Oliveira, M.O.F. Goulart, N-Acetylcysteine (NAC): Impacts on Human Health, Antioxidants. 10 (2021) 967-. https://doi.org/10.3390/antiox10060967.
[15] J. Wen, Y. Du, D. Li, R. Alany, Development of water-in-oil microemulsions with the potential of prolonged release for oral delivery of L-glutathione, Pharm Dev Technol. 18 (2013) 1424–1429. https://doi.org/10.3109/10837450.2012.734518.
[16] M. Rosenblat, N. Volkova, R. Coleman, M. Aviram, Anti-oxidant and anti-atherogenic properties of liposomal glutathione: studies in vitro, and in the atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice, Atherosclerosis. 195 (2007) e61-68. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.05.012.
[17] D. Giustarini, A. Milzani, I. Dalle-Donne, D. Tsikas, R. Rossi, N-Acetylcysteine ethyl ester (NACET): a novel lipophilic cell-permeable cysteine derivative with an unusual pharmacokinetic feature and remarkable antioxidant potential, Biochem Pharmacol. 84 (2012) 1522–1533. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.09.010.
[18] D. Buonocore, M. Grosini, S. Giardina, A. Michelotti, M. Carrabetta, A. Seneci, M. Verri, M. Dossena, F. Marzatico, Bioavailability Study of an Innovative Orobuccal Formulation of Glutathione, Oxid Med Cell Longev. 2016 (2016) 3286365. https://doi.org/10.1155/2016/3286365.
[19] J.K. Kern, D.A. Geier, J.B. Adams, C.R. Garver, T. Audhya, M.R. Geier, A clinical trial of glutathione supplementation in autism spectrum disorders, Med Sci Monit. 17 (2011) CR677-682. https://doi.org/10.12659/msm.882125.
[20] C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras, A. Zotou, Ethyl propiolate as a post-column derivatization reagent for thiols: Development of a green liquid chromatographic method for the determination of glutathione in vegetables, Analytica Chimica Acta. 690 (2011) 122–128. https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.003.
[21] J. Hodáková, J. Preisler, F. Foret, P. Kubáň, Sensitive determination of glutathione in biological samples by capillary electrophoresis with green (515nm) laser-induced fluorescence detection, Journal of Chromatography A. 1391 (2015) 102–108. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.062.
[22] D. Fracassetti, N. Lawrence, A.G.J. Tredoux, A. Tirelli, H.H. Nieuwoudt, W.J. Du Toit, Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method, Food Chemistry. 128 (2011) 1136–1142. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.001.
[23] M. Özyürek, S. Baki, N. Güngör, S.E. Çelik, K. Güçlü, R. Apak, Determination of biothiols by a novel on-line HPLC-DTNB assay with post-column detection, Analytica Chimica Acta. 750 (2012) 173–181. https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.03.056.
[24] L. Diez, E. Martenka, A. Dabrowska, J. Coulon, P. Leroy, Assessment of in situ cellular glutathione labeling with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde using high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 827 (2005) 44–50. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.02.007.
[25] J.T. Michaelsen, S. Dehnert, D. Giustarini, B. Beckmann, D. Tsikas, HPLC analysis of human erythrocytic glutathione forms using OPA and N-acetyl-cysteine ethyl ester: Evidence for nitrite-induced GSH oxidation to GSSG, Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 877 (2009) 3405–3417. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.043.
[26] R. OWUSU-APENTEN, Colorimetric Analysis of Protein Sulfhydyl Groups in Milk: Applications and Processing Effects, Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 45 (2005) 1–23. https://doi.org/10.1080/10408690590900126.

[27] Q. Wang, H. Wang, Y. Ding, X. Qiao, K. Peng, X. Lin, S. Wang, [A novel fluorophotometric method for assaying free glutathione of both reduced and oxidized in plasma], Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi. 25 (2005) 1834–1838.
[28] Y.-L. Cao, Y. Li, F. Zhang, J.-Z. Huo, X.-J. Zhao, Highly sensitive 'naked-eye' colorimetric detection of thiourea using gold nanoparticles, Anal. Methods. 7 (2015) 4927–4933. https://doi.org/10.1039/C5AY00558B.
[29] C.-W. Chang, W.-L. Tseng, Gold Nanoparticle Extraction Followed by Capillary Electrophoresis to Determine the Total, Free, and Protein-Bound Aminothiols in Plasma, Anal. Chem. 82 (2010) 2696–2702. https://doi.org/10.1021/ac902342c.
[30] Y. Zhang, Y. Li, X.-P. Yan, Photoactivated CdTe/CdSe Quantum Dots as a Near Infrared Fluorescent Probe for Detecting Biothiols in Biological Fluids, Anal. Chem. 81 (2009) 5001–5007. https://doi.org/10.1021/ac900394e.
[31] O. Mompó-Roselló, M. Vergara-Barberán, E.F. Simó-Alfonso, J.M. Herrero-Martínez, In syringe hybrid monoliths modified with gold nanoparticles for selective extraction of glutathione in biological fluids prior to its determination by HPLC, Talanta. 209 (2020) 120566. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120566.
[32] A.-Z. ZHANG, F.-G. YE, J.-Y. LU, Z. WEI, Y. PENG, S.-L. ZHAO, Preparation and Characterization of Polymer Solid-phase Microextraction Monolith Modified with Gold Nanoparticles, Chinese Journal of Analytical Chemistry. 39 (2011) 1247–1250. https://doi.org/10.1016/S1872-2040(10)60464-1.
[33] T. Lea, Caco-2 Cell Line, in: K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, H. Wichers (Eds.), The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models, Springer, Cham (CH), 2015. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500149/ (accessed May 16, 2022).
[34] M. Berthou, A. Pallotta, J. Beurton, T. Chaigneau, A. Athanassiou, C. Marcic, E. Marchioni, A. Boudier, I. Clarot, Gold nanostructured membranes to concentrate low molecular weight thiols, a proof of concept study, Journal of Chromatography B. 1198 (2022) 123244. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123244.
[35] A. Pallotta, A. Boudier, P. Leroy, I. Clarot, Characterization and stability of gold nanoparticles depending on their surface chemistry: Contribution of capillary zone electrophoresis to a quality control, Journal of Chromatography A. 1461 (2016) 179–184. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.031.
[36] S.I. Khan, E.A. Abourashed, I.A. Khan, L.A. Walker, Transport of harman alkaloids across Caco-2 cell monolayers, Chem Pharm Bull (Tokyo). 52 (2004) 394–397. https://doi.org/10.1248/cpb.52.394.
[37] B. Srinivasan, A.R. Kolli, M.B. Esch, H.E. Abaci, M.L. Shuler, J.J. Hickman, TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems, J Lab Autom. 20 (2015) 107–126. https://doi.org/10.1177/2211068214561025.
[38] ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology, (n.d.).
[39] D.-H. Tsai, M.P. Shelton, F.W. DelRio, S. Elzey, S. Guha, M.R. Zachariah, V.A. Hackley, Quantifying dithiothreitol displacement of functional ligands from gold nanoparticles, Anal Bioanal Chem. 404 (2012) 3015–3023. https://doi.org/10.1007/s00216-012-6418-4.
[40] D.-H. Tsai, F.W. DelRio, A.M. Keene, K.M. Tyner, R.I. MacCuspie, T.J. Cho, M.R. Zachariah, V.A. Hackley, Adsorption and Conformation of Serum Albumin Protein on Gold Nanoparticles Investigated Using Dimensional Measurements and in Situ Spectroscopic Methods, Langmuir. 27 (2011) 2464–2477. https://doi.org/10.1021/la104124d.
[41] D.P. Jones, J.L. Carlson, P.S. Samiec, P. Sternberg, V.C. Mody, R.L. Reed, L.A. Brown, Glutathione measurement in human plasma. Evaluation of sample collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC, Clin Chim Acta. 275 (1998) 175–184. https://doi.org/10.1016/s0009-8981(98)00089-8.

[42] M. Deponte, Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes, Biochim Biophys Acta. 1830 (2013) 3217–3266. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018.
[43] D. Montero, C. Tachibana, J. Rahr Winther, C. Appenzeller-Herzog, Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated, Redox Biol. 1 (2013) 508–513. https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.10.005.
[44] H. Uchida, Y. Nakajima, K. Ohtake, J. Ito, M. Morita, A. Kamimura, J. Kobayashi, Protective effects of oral glutathione on fasting-induced intestinal atrophy through oxidative stress, World Journal of Gastroenterology. 23 (2017) 6650–6664. https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i36.6650.
[45] G.K. Reid, A.J. Berardinelli, L. Ray, A.R. Jackson, A.S. Neish, J.M. Hansen, P.W. Denning, Timing of developmental reduction in epithelial glutathione redox potential is associated with increased epithelial proliferation in the immature murine intestine, Pediatr Res. 82 (2017) 362–369. https://doi.org/10.1038/pr.2017.49.
[46] K. Ngamchue, Rapid Method for the Quantification of Reduced and Oxidized Glutathione in Human Plasma and Saliva | Analytical Chemistry, Analytical Chemistry. 89 (2017) 2901–2908. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04186.
[47] S. Melnyk, M. Pogribna, I. Pogribny, R.J. Hine, S.J. James, A new HPLC method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma aminothiols using coulometric electrochemical detection11This work was funded by a grant from the FDA-Office of Women's Health., The Journal of Nutritional Biochemistry. 10 (1999) 490–497. https://doi.org/10.1016/S0955-2863(99)00033-9.
[48] D. Tsikas, M. Schmidt, A. Böhmer, A.A. Zoerner, F.-M. Gutzki, J. Jordan, UPLC–MS/MS measurement of S-nitrosoglutathione (GSNO) in human plasma solves the S-nitrosothiol concentration enigma, Journal of Chromatography B. 927 (2013) 147–157. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.01.023.

3.3. APPLICATION AUX RSNO

Afin d'étudier le comportement de deux RSNO, NACNO et GSNO, vis-à-vis de la barrière intestinale, le modèle Transwell® a été utilisé.

Dans le cas des RSNO, cela permet de savoir s'ils franchissent la barrière intestinale afin de rejoindre la circulation systémique pour délivrer le NO. Ainsi, NACNO et GSNO ont été déposés dans le compartiment apical seuls ou en mélange binaire avec à chaque fois 50 nmol de chaque espèce.

La partie NO a été étudiée en quantifiant son dérivé l'ion nitrite. En effet, la demi-vie du NO étant très faible et l'expérience durant 4 h, la probabilité d'avoir du NO sous sa forme radicalaire est très faible. La technique utilisée est celle décrite dans la partie matériel et méthodes, à savoir la méthode fluorimétrique employant le réactif de DAN.

Les espèces nitrosées (RSNO) ont été quantifiées en utilisant la méthode fluorimétrique de DAN/Hg. Cette méthode ne permet pas de quantifier chaque RSNO de manière sélective mais indique seulement la quantité de RSNO totale.

Enfin, les RSH pouvant provenir de la dénitrosation des RSNO seront quantifiés par filtration à travers la membrane nanostructurée et analyse des différents relargages avec le DTT. Comme expliqué précédemment, ces résultats seront pondérés du facteur correctif afin de remonter à la quantité de RSH initialement présente dans le Transwell®. De plus, il a été démontré au chapitre 2, la propriété dénitrosante de la membrane nanostructurée. Cela signifie que la filtration d'un RSNO engendre sa rupture homolytique et l'adsorption du RSH résultant. Ainsi, il faudra prendre en compte cela dans les bilans de matière et soustraire la quantité de RSNO de celle trouvée en RSH avec le filtre seringue.

L'ensemble de ce raisonnement analytique est résumé Figure 49. Celle-ci sera appliquée à l'analyse du compartiment apical et basolatéral. L'étude du milieu cellulaire sera décrite dans une seconde partie.

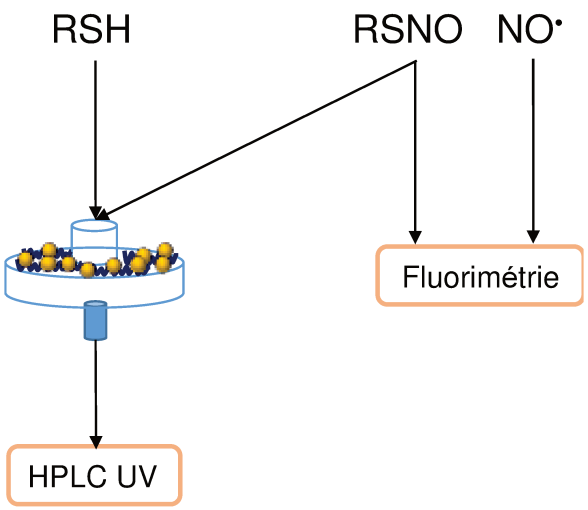


FIGURE 49: METHODE ANALYTIQUE APPLIQUEE A LA QUANTIFICATION DES RSNO, RSH ET IONS NITRITES DANS LE MILIEU APICAL ET BASOLATERAL.

3.3.1. ÉTUDE DE LA COMPOSITION DU COMPARTIMENT APICAL ET BASOLATERAL

Considérons dans un premier temps l'étude de chaque RSNO déposé indépendamment dans le compartiment apical. NACNO et GSNO ont été apportés à hauteur de 50 nmol à chaque fois.

Après quantification des différentes espèces, les résultats sont exprimés par rapport à la quantité de RSNO déposée au départ (Figure 50). Par exemple, si 40 nmol de NACNO + RSH sont quantifiées dans les deux milieux, cela correspond à 80 % de ce qui avait été initialement déposé.

Les résultats montrent qu'après 4 h d'incubation la majorité des RSNO se sont dénitrosés en GSH ou NAC. Ces thiols ont majoritairement diffusé vers le compartiment basolatéral (4,8 ± 2,3 % de NAC et 31,6 ± 8,8 % de GSH). Dans le cas de NAC, la diffusion est totale puisqu'aucune molécule n'est présente dans le compartiment apical. Différents travaux de recherches ont démontré que le passage de barrière de GSH et NAC s'opérait par diffusion passive avec un passage transcellulaire majoritaire [217,218]. Au regard du bilan de matière global pour chaque espèce, il apparait qu'environ 90 % de la NAC et 40 % du GSH déposés ne sont pas dans le compartiment basolatéral ou apical.

Cela suggère l'hypothèse d'un passage intracellulaire des différentes espèces ou une dégradation. Dans ce second cas, des chercheurs ont mis en évidence une dégradation du GSH par la γ-glutamyl transférase et des peptidases au niveau de la membrane de la bordure en brosse à la surface des cellules épithéliales intestinales engendrant sa décomposition en Cys, glycine et glutamate [219,220]. Cette hypothèse pourrait expliquer le bilan de matière incomplet en GSNO/GSH.

Parmi la part sous forme de RSNO, la quantité présente est très faible dans le compartiment apical (3,6 ± 0,2 nmol de NAC et 3,6 ± 0,4 nmol de GSH). La quantité présente dans le milieu basolatéral apparait non significative (0,7 ± 0,6 nmol de NACNO et 0,3 ± 0,2 nmol de GSNO), traduisant l'absence de passage de la barrière sous cette forme nitrosée.

Enfin, la quantité d'ions nitrites a été quantifiée et montre pour NACNO que 7,0 ± 0,9 nmol sont présentes dans le milieu apical, contre 3,5 ± 1,0 nmol dans le basolatéral. L'addition de la quantité dans les deux milieux devrait être similaire à la quantité de NAC retrouvées puisque NAC et NO est issue de la rupture homolytique de NACNO. Or, il y a plus de NO dans le milieu que de NAC. Cette différence peut être due à la présence d'ions nitrites endogène dans les compartiments, qui proviendrait des cellules Caco-2. Le constat est inverse pour GSNO, car 6,7 nmol d'ions nitrites sont quantifiées pour 28,1 nmol de GSH. L'hypothèse ici va dans le sens d'une absorption des ions nitrites libérés par les cellules CaCo-2 ou d'un biais de quantification du NO par les ions nitrites uniquement. En effet, les ions nitrites possèdent une demi-vie de quelques heures contrairement à environ 48 h pour les ions nitrates. Pour une caractérisation complète, il aurait fallu quantifier également les ions nitrates en complément comme cela a déjà été fait lors d'une précédente étude. Cependant, le but premier du dosage du NO dans ces expériences est de vérifier que l'on obtient les mêmes résultats que ceux de la précédente publication sur l'étude des RSNO en Transwell® afin de pouvoir les comparer et montrer l'intérêt des filtres seringues dans ce contexte.

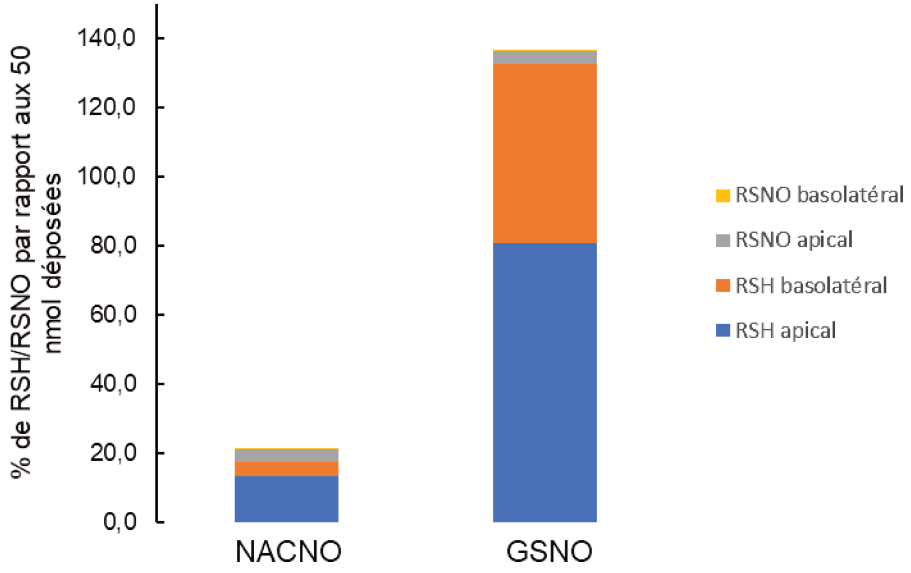


FIGURE 50: BILAN DE MATIERE ET REPARTITION DE RSNO ET RSH APRES DEPOT DE NACNO (50 NMOL) OU GSNO (50 NMOL) DANS LE COMPARTIMENT APICAL APRES 4H D'INCUBATION A 37 °C.

Afin d'étudier l'influence de la présence de plusieurs RSNO dans le milieu intestinal et notamment sur la diffusion à travers la barrière intestinale, NACNO et GSNO ont été déposés simultanément dans le milieu apical, à hauteur de 50 nmol chacun (Figure 51). L'objectif ici est de montrer un potentiel passage préférentiel de l'une ou l'autre molécule, par comparaison à leur comportement seul, mais également de mettre en évidence l'existence ou non de phénomène de transnitrosation.

Les résultats de l'étude d'un mélange équimolaire de NACNO et GSNO dans les différents milieux après 4 h d'incubation montrent des différences de comportement des RSNO en mélange et seuls. En effet, la quantité de GSNO et GSH quantifiée dans le milieu basolatéral et apical est augmentée d'environ 50 % avec une majorité sous forme de GSH répartie entre les deux milieux. La quantité de NAC est également augmentée, passant de 5 % de NAC dans l'apical et le basolatéral quand déposé seul, à environ 17 % en mélange. L'augmentation du nombre de NAC et GSH dans les différents milieux peut s'expliquer par le fait que la quantité totale de RSNO déposées est deux fois

supérieure à celle des RSNO seuls (100 nmol *vs*. 50 nmol). L'hypothèse est que la quantité de RSNO ayant diffusé dans les cellules ayant atteint un maximum, les RSNO restant se retrouvent dans le milieu apical ou basolatéral qui en voit donc sa concentration augmenter. La seconde hypothèse avancée concerne la production de GSH par l'intermédiaire de NAC. En effet, au Chapitre 1, nous avions évoquées les différentes voies de synthèse du GSH et l'une d'elles correspond à la désacétylation de la NAC pour former de la Cys qui elle-même produit du GSH. Ainsi, en mettant de la NAC/NACNO dans le milieu cellulaire, cela pourrait servir à produire du GSH, ce qui expliquerait en partie la grande quantité de GSH retrouvée. D'autres articles suggèrent que la concentration en GSH intracellulaire est régulée par d'un côté la synthèse de GSH et de l'autre l'efflux de la cellule [221]. Dans notre cas, une trop forte concentration dans le compartiment cellulaire pourrait mener à la fuite vers le compartiment extracellulaire. Le mécanisme d'efflux est encore largement discuté dans la litérature mais des chercheurs ont montré l'implication de multidrug resistance-associated proteins (Mrp) et de la protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), permettant de réguler la concentration en GSH. Leurs fonctions ainsi que leurs mécanismes sont encore peu décrits [222–224]. L'association entre une synthèse de GSH à partir de NAC et un efflux vers le milieu extracellulaire pourrait donc expliquer la quantité de GSH/GSNO supérieure à 100 % retrouvée.

Enfin, le bilan de matière de GSNO est complet contrairement à celui de NACNO, pour lequel il manque environ 80 % de ce qui a été déposé. Cette quantité manquante peut se trouver au niveau cellulaire ou avoir été consommée pour former du GSH, comme expliqué précédemment.

D'autre part, en s'intéressant à la quantité de RSNO par rapport à leur équivalent dénitrosé, les résultats vont dans le sens d'une dénitrosation quasi-totale que ce soit pour NACNO et GSNO (91,8 %). Parmi cette faible quantité sous forme de RSNO, la majorité est retrouvée dans le milieu apical puisque le nombre de moles dans le milieu basolatérale apparait non significatif (0,3 ± 0,3 nmol). Ce constat montre une non-perméation de la barrière cellulaire par les RSNO.

Enfin, la quantité en ions nitrites (premier degré d'oxydation stable de NO) a été déterminée comme étant de 10,5 ± 2,3 nmol dans le milieu apical et 4,9 ± 1,0 nmol dans le basolatéral. Cette quantité est largement inférieure au nombre de moles de RSH retrouvé (74,9 nmol dans les deux compartiments). Ceci ne traduit pas la rupture homolytique de RSNO en RSH et NO puisque les quantités de RSH et ions nitrites ne sont pas équivalentes. L'explication de ce bilan de matière incomplet peut venir d'un biais concernant la quantification du NO comme cela a déjà été discuté précédemment.

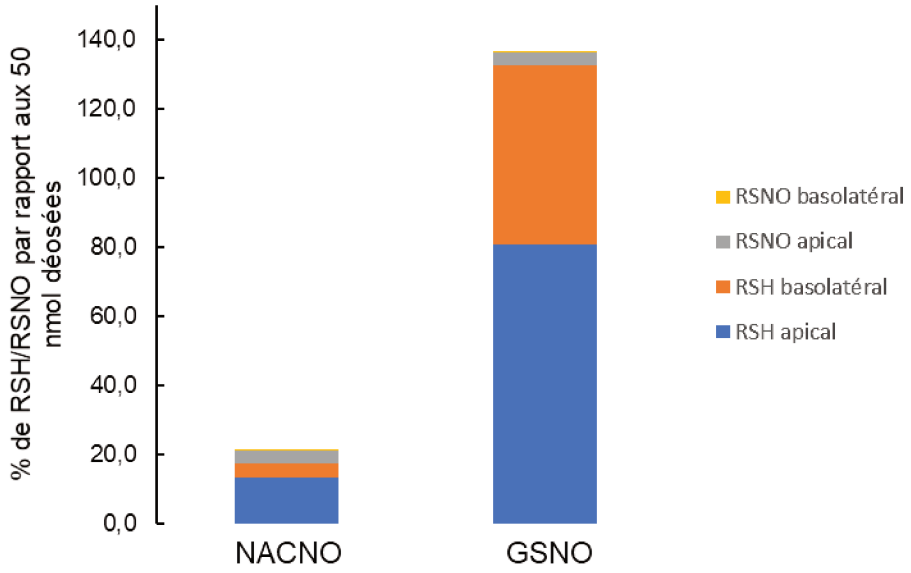


FIGURE 51: BILAN DE MATIERE ET REPARTITION DE RSNO ET RSH APRES DEPOT DE NACNO (50 NMOL) ET GSNO (50 NMOL) DANS LE COMPARTIMENT APICAL APRES 4H D'INCUBATION A 37 °C.

3.3.2. ÉTUDE DE LA COMPOSITION DU COMPARTIMENT INTRACELLULAIRE

La quantification des espèces thiolées dans le milieu intracellulaire a été réalisée après lyse des cellules à l'aide d'acide perchlorique 3,3 % (V/V), centrifugation pour séparer les protéines et dilution dans un tampon PBS. Le milieu est ensuite directement filtré à travers le dispositif nanostructuré et l'étude des relarguages au DTT permettent de déterminer la quantité de chaque thiol relargué. Les résultats ont permis de mettre en

évidence la quantité de NAC et/ou GSH présente dans les cellules CaCo-2 (Tableau 11). Il apparait dans un premier temps que les quantités retrouvées ne permettent pas de compléter le bilan de matière des thiols retrouvés par rapport à ce qui avait été deposé initialement. En effet, les bilans de matière, au regard des 3 compartiments, sont incomplets pour NACNO (seule ou en mélange) mais également pour GSNO déposé seul. Ces résultats sont en contradiction avec l'hypothèse selon laquelle les thiols manquants seraient dans les cellules. Cependant l'hypothèse d'une utilisation de NAC et/ou NACNO pour former de la cystéine reste valable (voir Figure 3 Chapitre 1), notamment pour lutter contre le stress oxydant engendré par l'incubation des cellules avec le milieu HBSS pendant 4 h.

TABLEAU 11: QUANTIFICATION DES THIOLS INTRACELLULAIRES A TRAVERS LE DISPOSITIF NANOSTUCTURE (N = 3).

Thiol et quantité déposée dans le milieu apical	Thiols dans milieu intracellulaire (nmol)	Thiols dans milieu apical (nmol)	Thiols dans milieu basolatéral (nmol)	Total différents milieux (nmol)
NACNO 50 nmol	1,93 ± 0,51	0 ± 0	4,79 ± 2,32	6,72 ± 2,38
GSNO 50 nmol	0,80 ± 0,60	24,56 ± 2,35	31,62 ± 8,75	56,98 ± 9,01
NACNO 50 nmol + GSNO 50 nmol	2,22 ± 0,43	13,30 ± 4,40	3,9 ± 2,2	19,42 ± 4,94
	1,31 ± 0,46	80,70 ± 20,10	52,0 ± 13,20	134,01 ± 24,05

De plus, la quantification en HPLC du GSH après ajout de NACNO dans le milieu apical a permis de mettre en évidence la quantité de GSH intracellulaire des cellules CaCo-2. Le GSH n'ayant pas été apporté de manière exogène dans le milieu, la quantité trouvée correspond à la concentration endogène. Cette concentration a été trouvée comme étant de 1,5 ± 0,3 µM de GSH, contre des valeurs entre 0,5 et 10,0 µM dans la littérature [225–227]. Ceci démontre la capacité du filtre nanostructuré à quantifier le glutathion intracellulaire à son niveau physiologique par une simple filtration à travers le filtre et sans utiliser de produit CMR ou de pré-traitement long et pouvant jouer sur la stabilité des thiols.

4. CONCLUSION

Les expériences en Transwell® avec barrière cellulaire ont permis, grâce aux filtres nanostructurés de mettre en évidence différents comportements suite aux dépôts de NACNO et GSNO seuls (50 nmol) ou en mélange (50 nmol de chaque). La mise en évidence des différents acteurs impliqués dans le passage de barrière cellulaire semble montrer un comportement thiol dépendant. Il apparait dans un premier temps que la majorité des RSNO déposés sont dénitrosés. Parmi ces RSH libérés, NAC est 6 fois moins concentrée dans le compartiment apical et basolatéral comparé à GSH. Ce constat peut s'expliquer par une biodisponibilité par voie orale faible de NAC (6 à 10 %), une forte liaison aux protéines (66 à 97 %) et une capacité à former de la Cys pour entrer dans la voie de synthèse du GSH [228]. Tout ceci pourrait expliquer le faible taux de NAC/NACNO retrouvé dans le compartiment basolatéral et apical mais également le taux élevé de GSH/GSNO dans le cas d'un mélange NACNO/GSNO déposé. Il semble que la présence de NAC conditionne la synthèse ou l'efflux extracellulaire de GSH, menant à un bilan de matière supérieur à 100 %. Sans NAC, le GSH diffuse majoritairement à travers la membrane cellulaire mais une partie reste internalisée dans les cellules. Enfin, que ce soit pour NACNO et GSNO, la diffusion vers le compartiment basolatéral est significativement nulle peu importe les conditions de dépôts tandis que leurs équivalents non nitrosés (RSH) diffusent largement.

L'application du dispositif nanostructuré a permis une étude des RSNO et RSH impliqués dans la pharmacocinétique de NACNO et GSNO à travers un modèle de barrière intestinale. La membrane permet d'adsorber les thiols présents sous forme RSH ou RSNO, bloquant ainsi leur fonction SH et les rendant stables pour une quantification ultérieure. De plus, l'extraction des RSH/RSNO de leur matrice d'origine permet d'éviter des interférences analytiques avec la méthode HPLC utilisée. Enfin, le dispositif permet une étude avec une méthode unique et simple applicable aux différents compartiments (cellulaire, sanguin et intestinal). Tout ceci répond aux différentes problématiques soulevées concernant l'absence d'une méthode uniformisée pour le dosage des thiols dans diverses matrices et qui ne souffrent pas des différents problèmes maintes fois cités

dans ce manuscrit (limites de quantification élevée, spécificité, temps de pré traitement…).

Par ces expériences, il apparait que le dispositif nanostructuré développé et décrit dans ce manuscrit est applicable à des échantillons réels et notamment à l'application pour le suivi d'espèces dans différents milieux. Tout ceci s'insère dans le contexte, déjà décrit, de l'étude des donneurs de NO. Grâce aux résultats obtenus et les caractéristiques physicochimiques des deux RSNO (Tableau 12), il apparait que, par voie orale, NACNO ne permet pas une diffusion importante à travers le milieu basolatéral contrairement à GSNO. Cependant, au regard de ses propriétés physico chimiques, NACNO présence une demi-vie importante (500 h) ce qui la rend stable et un log de P (correspondant au coefficient de partage entre une phase organique et aqueuse) plus proche de zéro traduisant un caractère hydrophile mais également légèrement lipophile pour le passage de membrane. Le GSNO quant à lui a une plus faible demi-vie associée à un coefficient de partage plus faible, mais il diffuse plus largement à travers la membrane cellulaire. L'utilisation par voie orale de NACNO et GSNO en mélange semble donc une alternative intéressante puisque stimulant la production et le passage de GSH dans le milieu basolatéral.

TABLEAU 12: DEMI-VIE ET LOG P DE NACNO ET GSNO EN CONDITIONS BIOLOGIQUES.

RSNO	Log P	T1/2 (h)	pKa $_{thiol}$	Réf
NACNO	-0,46	500,00	9,5	[72]
GSNO	-2,12	0,75 – 2,00	8,7	[53]

Ces conclusions sont à compléter par l'études d'autres donneurs de NO tels que CysNO et SNAP ou encore des RSNO de haut poids moléculaire tels que l'albNO. Pour ce dernier, l'étude ne pourra pas se faire de manière directe. En effet, des essais d'adsorption d'albumine sur le filtre (au niveau de la Cys 34) ont été réalisés et montrent une absence d'adsorption étant dû à la réticulation de la protéine et l'inaccessibilité du thiol. Pour ce faire, il faut, au préalable, dénaturer la protéine avec du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) par exemple pour modifier la conformation de l'albumine et permettre son adsorption [141].

DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES

Durant ce travail de doctorat, nous avons développé un support nanostructuré à partir d'AuNP capable d'adsorber des thiols. Ce dispositif est utilisé comme prétraitement pour extraire les thiols de leur matrice, à travers une stratégie en deux étapes. La première étape consiste à adsorber les thiols aux nanoparticules par interactions de forte affinité avant de les désorber, dans une seconde étape, par échange de ligand avec du DTT, pouvant ainsi être quantifiés. L'objectif du projet est d'appliquer ce dispositif à différentes matrices contenant des thiols pour montrer son intérêt dans le contexte de la quantification et de l'identification des thiols. Les points principaux développés au cours de ce doctorat ont été : le développement, l'optimisation et la caractérisation du dispositif pour évaluer ses performances avec deux thiols modèles, son application avec différentes matrices biologiques (plasma de rat et modèle cellulaire CaCo-2) mais également dans un contexte agro-alimentaire avec des boissons alcoolisées. La prochaine étape à développer concerne l'application du dispositif à des modèles *in* vivo (souris, rat) afin de monitorer les différentes espèces consécutives à la supplémentation en RSH/RSNO par différentes voies (IV, cutanée, orale…). Enfin, certaines perspectives vont être développées.

Recyclabilité du dispositif

Dans le Chapitre 1 et notamment l'article 1 il a été souligné le caractère à usage unique de la plupart des méthodes utilisant des nanomatériaux pour la quantification de thiol. Cet aspect de réutilisation s'insère dans une aire dites de chimie verte qui consiste à concevoir et de développer des produits et des procédés chimiques permettant de réduire ou d'éliminer l'utilisation et la synthèse de substances dangereuses. Ainsi, pour éviter de produire trop de déchets et d'utiliser trop de produits, nécessaire à la fabrication des dispositifs, l'aspect de recyclage est intéressant. Il est également possible de mettre en avant l'aspect économique de la réutilisation des dispositifs.

Ainsi, la question de réutiliser le filtre seringue, après désorption des thiols, s'est posée afin d'apporter une plus-value. Pour cela, la stratégie mise en place consiste à désorber le DTT présent sur la membrane par le biais de l'ajout d'acide ascorbique, qui grâce à son pouvoir réducteur est susceptible de réduire la liaison AuNP-DTT. Après

ajout d'acide ascorbique et rinçage à l'eau ultra pure, une solution de NAC contenant 25 nmol peut être filtrée afin d'en d'évaluer l'adsorption. Les résultats (Figure 52

) ont montré que la deuxième utilisation ne permet d'adsorber que 15 % des 25 nmol et cette valeur tombe à 0 à la troisième utilisation. Ceci montre qu'il est impossible à l'aide de cette technique de recycler les filtres, probablement par la présence de DTT sur la membrane. L'hypothèse pour lever ce problème serait d'utiliser d'autres réducteurs tel que de l'acide ascorbique afin de réduire plus de fonctions thiols et rendre disponible les AuNP.

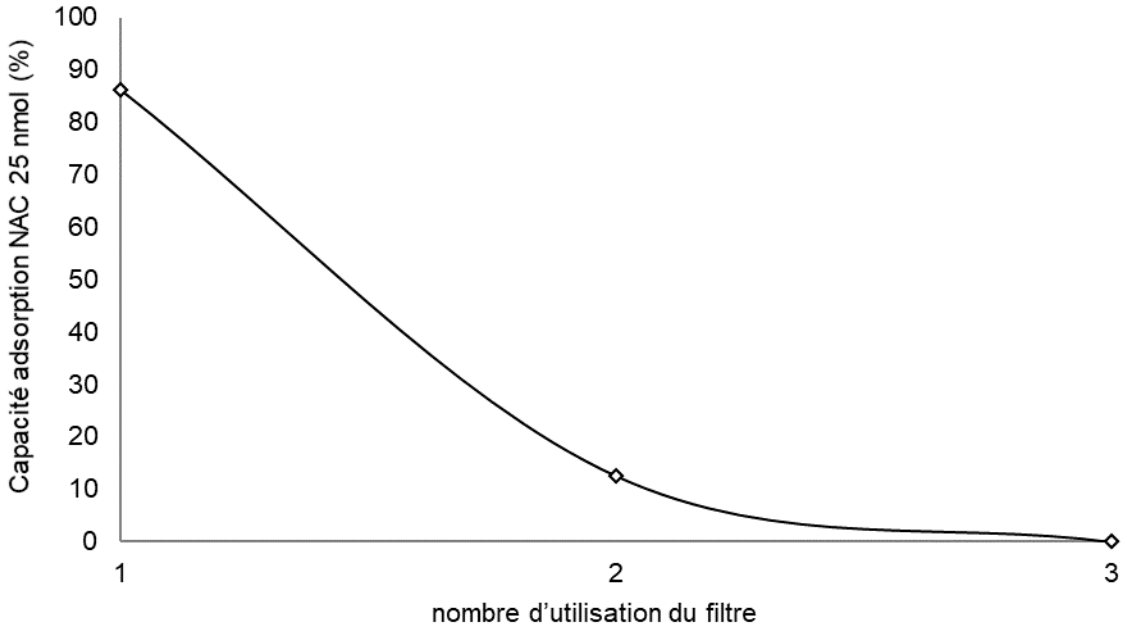


FIGURE 52: EVOLUTION DE LA CAPACITE D'ADSORPTION DU FILTRE NANOSTRUCTURE EN FONCTION DU NOMBRE DE RECYCLAGES.

Atteindre cette recyclabilité permettrait non seulement un dispositif plus éco-responsable mais également d'économiser du temps de production.

Industrialisation du procédé de nanostructuration

D'un point de vue production des filtres, 5 à 6 h sont nécessaires pour produire jusqu'à 16 filtres simultanément. Le dispositif, déjà détaillé au chapitre 2, utilise un système de mise sous vide permettant de faciliter l'écoulement des différentes solutions. Cependant, au fur et à mesure des dépôts d'AuNP, une résistance à l'écoulement

apparait, obligeant à pousser manuellement les seringues pour accélérer la filtration. À cela, s'ajoute le changement de solution (tampon, eau et AuNP) qui nécessite d'être toujours présent.

Pour automatiser ce procédé de nanostructuration et aller vers une industrialisation, il sera possible d'utiliser un pousse-seringues, des robots … Ce dispositif permettrait une filtration automatisée, mais également une accélération de la fabrication puisque la force exercée par le pousse-seringues est supérieur à celle de l'Homme.

Désorption thermique

Parmi les points à développer, la méthode de désorption des thiols est une étape qui peut être bloquante. En effet, la méthode décrite et utilisée dans ce manuscrit repose sur l'échange de ligand avec un composé thiolé de meilleure affinité (DTT). Or, dans certains cas, il est possible que le DTT ne permette pas une désorption suffisante. En effet, il a été montré que l'affinité et l'encombrement stérique des thiols influencent l'efficacité de relargage par le DTT.

Cette désorption peut se faire de deux manières différentes : chimique ou thermique. La première technique utilise un composé chimique qui va venir soit réduire la liaison thiol-AuNP ou par échange de ligand, comme c'est le cas dans ce projet. La seconde option repose sur l'apport d'énergie, par la chaleur, pour casser la liaison et libérer les thiols. Cette technique permettrait un relargage sans utilisation d'autres molécules, favorisant la recyclabilité des filtres si le taux de désorption est suffisant. Les deux points limitant à l'utilisation de cette technique sont la stabilité des thiols et l'intégrité de la membrane vis-à-vis de la température. Concernant les thiols, cette technique serait plus facilement applicable aux thiols présentés dans le chapitre 3, car leur caractère volatil permettrait une désorption thermique couplée à une analyse en GC ou GC-MS. L'intégrité de la membrane à haute température a été testée et a montré une capacité à résister à 300 °C. Des essais sur thiols volatils avec un thermodésorbeur sont en cours avec la start-up TWISTAROMA.

Application à la détection covid

Dans la tendance actuelle de développer des méthodes spécifiques, rapide et utilisant peu de réactifs et de méthodes couteuses, des chercheurs ont mis au point une sonde spécifique du virus SARS-Cov-2. Ces techniques sont basées sur le mécanisme de reconnaissance de la principale protéase du SARS-Cov-2. Ce substrat, qui est une protéine marqueur du virus, est immobilisé sur un support afin de lier la protéase du virus. La reconnaissance se fait par une fonction thiol de la protéase, ce qui va générer la libération d'un électron. Celui-ci va, au contact d'une autre protéase, engendrer la formation d'un groupement sulfhydrile qui permettra la liaison avec la précédente protéase par pont disulfure. Ces réactions en chaîne permettent une amplification du signal et ainsi, une détection électrochimique. Ce mécanisme de liaison peut également être associé à une détection en fluorimétrie en utilisant un fluorophore dont la fluorescence serait quenche après liaison de la protéase [229,230].

Dans le contexte des AuNP et de leur avidité pour le groupement thiol, un dispositif de détection du SARS-Cov-2 est parfaitement envisageable. Il est possible d'imaginer l'immobilisation d'AuNP sur des supports type support transparent de type lame de verre ou plaques 96-puits. Après incubation avec l'échantillon biologique contenant le virus, la liaison AuNP-S-protéase pourrait être observée par modification de la bande plasmon des AuNP en spectrophotométrie UV-Vis. La spécificité de la sonde vis-à-vis d'autres molécules thiolées, pouvant être présentes dans l'échantillon, devra être étudié et notamment avec l'albumine, le GSH et la Cys. De plus, la sensibilité devra atteindre 182 pM, comme l'indique la littérature, ce qui correspond à la concentration en protéase dans un échantillon biologique d'une personne infecté par le virus.

L'utilisation d'un tel dispositif permettrait d'éviter l'utilisation de tests immunologiques, utilisant des réactifs couteux. A la manière d'un capteur SERS, l'utilisation d'AuNP permet d'envisager des LOQ au moins égales ou plus basses que celles des systèmes déjà existants (Roche Elecsys® Anti-SARS-Cov-2 : LOD 23,6 pM), tout en minimisant le nombre d'étape et l'utilisation de réactifs.

CONCLUSION

Nous avons développé un dispositif nanostructuré à base de nanoparticules d'or afin de créer une surface réactive aux molécules thiolées. Ces thiols, une fois adsorbés, voient leurs stabilités augmentées et peuvent être désorbés à l'aide d'une méthode analytique. Ce dispositif d'extraction permet de s'affranchir des matrices, parfois complexes, de ces thiols mais aussi permettre une concentration, permettant d'atteindre de faibles limites de détection. Le challenge de ce projet consiste à mettre en adéquation les thiols et les matrices concernées avec une méthode analytique appropriée. C'est pourquoi deux types de méthodes séparatives ont été utilisées dans ce travail : chromatographie liquide et gazeuse, afin de s'adapter aux mieux aux matrices biologiques et agroalimentaire respectivement. Le matériau utilisé peut également être optimisé afin de répondre au mieux aux différentes applications. Il est possible ainsi d'imaginer une augmentation de la taille de la membrane, plusieurs membranes en série ou encore des dispositifs de SPE. La suite de ce travail consiste à utiliser le dispositif développé à une application *in vivo* pour l'étude de la distribution de différentes espèces RSH et RSNO.

Pour conclure ce projet de thèse, les membranes nanostructurées s'insèrent dans une aire de développement de nouveaux dispositifs spécifiques, utilisant peu de solvants et rapides pour la quantification de différentes molécules.

BIBLIOGRAPHIE

Les publications ci-dessous ne reprennent pas celles citées dans les articles insérés dans ce manuscrit.

[1] W.C. Zeise, Ueber das Mercaptan, Ann. Phys. Chem. (1834) 369–431.

[2] T.B. Aldrich, A CHEMICAL STUDY OF THE SECRETION OF THE ANAL GLANDS OF MEPHITIS MEPHITIGA (COMMON SKUNK), WITH REMARKS ON THE PHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF THIS SECRETION, J Exp Med. 1 (1896) 323–340.

[3] K.K. Andersen, D.T. Bernstien, R.L. Caret, L.J. Romanczyk, Chemical constituents of the defensive secretion of the striped skunk (Mephitis mephitis), Tetrahedron. 38 (1982) 1965–1970. https://doi.org/10.1016/0040-4020(82)80046-X.

[4] R.C. Fahey, Novel thiols of prokaryotes, Annu Rev Microbiol. 55 (2001) 333–356. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.333.

[5] A. Polle, H. Rennenberg, Field Studies on Norway Spruce Trees at High Altitudes: II. Defence Systems Against Oxidative Stress in Needles, The New Phytologist. 121 (1992) 635–642.

[6] M. Satoh, Determination of cellular levels of nonprotein thiols in phytoplankton and their correlations with susceptibility to Mercury, Journal of Phycology. (2002) 983–990.

[7] S. Biswas, A.S. Chida, I. Rahman, Redox modifications of protein–thiols: Emerging roles in cell signaling, Biochemical Pharmacology. 71 (2006) 551–564. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.044.

[8] H. Beinert, M.C. Kennedy, Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor, FASEB J. 7 (1993) 1442–1449. https://doi.org/10.1096/fasebj.7.15.8262329.

[9] Paraquat induces actin assembly in depolymerizing conditions - Milzani - 1997 - The FASEB Journal - Wiley Online Library, (n.d.). https://faseb-onlinelibrary-wiley-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/doi/abs/10.1096/fasebj.11.4.9068615?sid=vendor%3Adatabase (accessed February 16, 2022).

[10] E.A. Konorev, B. Kalyanaraman, N. Hogg, Modification of creatine kinase by S-nitrosothiols: S-nitrosation vs. S-thiolation, Free Radical Biology and Medicine. 28 (2000) 1671–1678. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00281-1.

[11] J. Jiang, K.J. Liu, S.J. Jordan, H.M. Swartz, R.P. Mason, Detection of Free Radical Metabolite Formation Usingin VivoEPR Spectroscopy: Evidence of Rat Hemoglobin Thiyl Radical Formation Following Administration of Phenylhydrazine, Archives of Biochemistry and Biophysics. 330 (1996) 266–270. https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0252.

[12] N.L. Reynaert, K. Ckless, E.F.M. Wouters, A. van der Vliet, Y.M.W. Janssen-Heininger, Nitric oxide and redox signaling in allergic airway inflammation, Antioxid Redox Signal. 7 (2005) 129–143. https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.129.

[13] D.M. Barrett, S.M. Black, H. Todor, R.K. Schmidt-Ullrich, K.S. Dawson, R.B. Mikkelsen, Inhibition of protein-tyrosine phosphatases by mild oxidative stresses is dependent on S-nitrosylation, J Biol Chem. 280 (2005) 14453–14461. https://doi.org/10.1074/jbc.M411523200.

[14] M.E. Anderson, A. Meister, Dynamic state of glutathione in blood plasma., Journal of Biological Chemistry. 255 (1980) 9530–9533. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)43421-7.
[15] Glutathione transferases in bacteria - Allocati - 2009 - The FEBS Journal - Wiley Online Library, (n.d.). https://febs-onlinelibrary-wiley-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/doi/full/10.1111/j.1742-4658.2008.06743.x (accessed February 15, 2022).
[16] Cellular glutathione and thiols metabolism - ScienceDirect, (n.d.). https://www-sciencedirect-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/science/article/pii/S0006295202011723 (accessed February 15, 2022).
[17] ROLE OF REVERSIBLE OXIDATION-REDUCTION OF ENZYME THIOLS-DISULFIDES IN METABOLIC REGULATION | Annual Review of Biochemistry, (n.d.). https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bi.54.070185.001513?journalCode=biochem (accessed February 15, 2022).
[18] Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes* | Biochemistry, (n.d.). https://pubs-acs-org.bases-doc.univ-lorraine.fr/doi/abs/10.1021/bi00906a038 (accessed February 15, 2022).
[19] R.C. Strange, P.W. Jones, A.A. Fryer, Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology, Toxicol Lett. 112–113 (2000) 357–363. https://doi.org/10.1016/s0378-4274(99)00230-1.
[20] Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology - PubMed, (n.d.). https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.bases-doc.univ-lorraine.fr/10416260/ (accessed February 15, 2022).
[21] C.C. Winterbourn, Superoxide as an intracellular radical sink, Free Radic Biol Med. 14 (1993) 85–90. https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90512-s.
[22] S.C. Lu, Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies, The FASEB Journal. 13 (1999) 1169–1183. https://doi.org/10.1096/fasebj.13.10.1169.
[23] J.B. Owen, D.A. Butterfield, Measurement of Oxidized/Reduced Glutathione Ratio, in: P. Bross, N. Gregersen (Eds.), Protein Misfolding and Cellular Stress in Disease and Aging: Concepts and Protocols, Humana Press, Totowa, NJ, 2010: pp. 269–277. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-756-3_18.
[24] I.Y. Iskusnykh, A.A. Zakharova, D. Pathak, Glutathione in Brain Disorders and Aging, Molecules. 27 (2022) 324. https://doi.org/10.3390/molecules27010324.
[25] C. Garcia-Ruiz, J.C. Fernández-Checa, Redox regulation of hepatocyte apoptosis, J Gastroenterol Hepatol. 22 Suppl 1 (2007) S38-42. https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04644.x.
[26] Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration - Huang - 2001 - The FASEB Journal - Wiley Online Library, (n.d.). https://faseb-onlinelibrary-wiley-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/doi/full/10.1096/fj.00-0445fje?sid=vendor%3Adatabase (accessed February 16, 2022).
[27] G. Wu, Y.-Z. Fang, S. Yang, J.R. Lupton, N.D. Turner, Glutathione metabolism and its implications for health, J Nutr. 134 (2004) 489–492. https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489.
[28] Up-regulation of glutathione synthesis in rat kidney by methyl mercury: Relationship to mercury-induced oxidative stress, Biochemical Pharmacology. 50 (1995) 1719–1724. https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)02075-6.

[29] I. Rahman, A. Bel, B. Mulier, M.F. Lawson, D.J. Harrison, W. Macnee, C.A.D. Smith, Transcriptional Regulation of γ-Glutamylcysteine Synthetase-Heavy Subunit by Oxidants in Human Alveolar Epithelial Cells, Biochemical and Biophysical Research Communications. 229 (1996) 832–837. https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1888.

[30] Constitutive and β-Naphthoflavone-induced Expression of the Human γ-Glutamylcysteine Synthetase Heavy Subunit Gene Is Regulated by a Distal Antioxidant Response Element/TRE Sequence - ScienceDirect, (n.d.). https://www-sciencedirect-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/science/article/pii/S0021925818410873?via%3Dihub (accessed February 16, 2022).

[31] D.A. Dickinson, H.J. Forman, Cellular glutathione and thiols metabolism, Biochemical Pharmacology. 64 (2002) 1019–1026. https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01172-3.

[32] γ-Glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance - ScienceDirect, (n.d.). https://www-sciencedirect-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/science/article/pii/S1471489207000902 (accessed February 16, 2022).

[33] S.C. Lu, Regulation of glutathione synthesis, Molecular Aspects of Medicine. 30 (2009) 42–59. https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005.

[34] H. Wang, H. Liu, R.-M. Liu, Gender difference in glutathione metabolism during aging in mice, Experimental Gerontology. 38 (2003) 507–517. https://doi.org/10.1016/S0531-5565(03)00036-6.

[35] Glutathione Metabolism during Aging and in Alzheimer Disease - LIU - 2004 - Annals of the New York Academy of Sciences - Wiley Online Library, (n.d.). https://nyaspubs-onlinelibrary-wiley-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/doi/full/10.1196/annals.1297.059 (accessed February 16, 2022).

[36] G. Bjørklund, A.A. Tinkov, B. Hosnedlová, R. Kizek, O.P. Ajsuvakova, S. Chirumbolo, M.G. Skalnaya, M. Peana, M. Dadar, A. El-Ansary, H. Qasem, J.B. Adams, J. Aaseth, A.V. Skalny, The role of glutathione redox imbalance in autism spectrum disorder: A review, Free Radical Biology and Medicine. 160 (2020) 149–162. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.017.

[37] F. Gu, V. Chauhan, A. Chauhan, Glutathione redox imbalance in brain disorders, Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 18 (2015) 89–95. https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000134.

[38] N.S. Kosower, E.M. Kosower, The glutathione status of cells, Int Rev Cytol. 54 (1978) 109–160. https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)60166-7.

[39] E. Sofic, K.W. Lange, K. Jellinger, P. Riederer, Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease, Neurosci Lett. 142 (1992) 128–130. https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90355-b.

[40] Y.C. Chai, S.S. Ashraf, K. Rokutan, R.B. Johnston, J.A. Thomas, S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide, Arch Biochem Biophys. 310 (1994) 273–281. https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1167.

[41] Transport of cystine in isolated rat hepatocytes in primary culture., Journal of Biological Chemistry. 259 (1984) 2441–2445. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)43372-2.

[42] P. Bin, R. Huang, X. Zhou, Oxidation Resistance of the Sulfur Amino Acids: Methionine and Cysteine, BioMed Research International. 2017 (2017) e9584932. https://doi.org/10.1155/2017/9584932.

[43] I. Papet, D. Rémond, D. Dardevet, L. Mosoni, S. Polakof, M.-A. Peyron, I. Savary-Auzeloux, Sulfur Amino Acids and Skeletal Muscle, in: 2019: pp. 315–343. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810422-4.00020-8.

[44] B. Wang, W. Yang, J. McKittrick, M.A. Meyers, Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration, Progress in Materials Science. 76 (2016) 229–318. https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.06.001.

[45] J.D. Finkelstein, J.J. Martin, Homocysteine, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 32 (2000) 385–389. https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00138-7.

[46] P. Ganguly, S.F. Alam, Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease, Nutrition Journal. 14 (2015) 6. https://doi.org/10.1186/1475-2891-14-6.

[47] M. Barroso, D.E. Handy, R. Castro, The Link Between Hyperhomocysteinemia and Hypomethylation: Implications for Cardiovascular Disease, Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening. 5 (2017) 232640981769899-. https://doi.org/10.1177/2326409817698994.

[48] E. Żurawicz, J. Kałużna-Czaplińska, Analysis of amino acids in autism spectrum disorders, TrAC, Trends in Analytical Chemistry (Regular Ed.). 73 (2015) 91–118. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.029.

[49] V. Mokhtari, P. Afsharian, M. Shahhoseini, S.M. Kalantar, A. Moini, A Review on Various Uses of N-Acetyl Cysteine, Cell J. 19 (2017) 11–17.

[50] P. Eftekhari, S. Hajizadeh, M.R. Raoufy, M.R. Masjedi, M. Yang, N. Hansbro, J.J. Li, P.S. Foster, Preventive effect of N-acetylcysteine in a mouse model of steroid resistant acute exacerbation of asthma, EXCLI Journal. 12 (2013) 184–192.

[51] G. Perry, P.I. Moreira, P.L. Harris, X. Zhu, M.S. Santos, C.R. Oliveira, M.A. Smith, Lipoic Acid and N-Acetyl Cysteine Protect Against Mitochondrial-Related Oxidative Stress in Fibroblasts from Alzheimer Disease Patients, The FASEB Journal. 21 (2007). https://doi.org/10.1096/fasebj.21.5.A73-b.

[52] C. Stey, J. Steurer, S. Bachmann, T.C. Medici, M.R. Tramer, The effect of oral N-acetylcysteine in chronic bronchitis: a quantitative systematic review, The European Respiratory Journal. 16 (2000) 253–262. https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.2000.16b12.x.

[53] D. Jourd'heuil, K. Hallén, M. Feelisch, M.B. Grisham, Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood, Free Radical Biology & Medicine. 28 (2000) 409–417. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00257-9.

[54] E. D. Motley, K. Eguchi, M. M. Patterson, P. D. Palmer, H. Suzuki, S. Eguchi, Mechanism of Endothelial Nitric Oxide Synthase Phosphorylation and Activation by Thrombin, Hypertension. (2007) 577–583.

[55] C.N. Hess, R. Kou, R.P. Johnson, G.K. Li, T. Michel, ADP signaling in vascular endothelial cells: ADP-dependent activation of the endothelial isoform of nitric-oxide synthase requires the expression but not the kinase activity of AMP-activated protein kinase, J Biol Chem. 284 (2009) 32209–32224. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.032656.

[56] F. Kuhr, J. Lowry, Y. Zhang, V. Brovkovych, R.A. Skidgel, Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors, Neuropeptides (Edinburgh). 44 (2009) 145–154. https://doi.org/10.1016/j.npep.2009.12.004.

[57] G. García-Cardeña, R. Fan, V. Shah, R. Sorrentino, G. Cirino, A. Papapetropoulos, W.C. Sessa, Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90, Nature. 392 (1998) 821–824. https://doi.org/10.1038/33934.

[58] V. Rizzo, D.P. McIntosh, P. Oh, J.E. Schnitzer, In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association, J Biol Chem. 273 (1998) 34724–34729. https://doi.org/10.1074/jbc.273.52.34724.

[59] M.E. Davis, I.M. Grumbach, T. Fukai, A. Cutchins, D.G. Harrison, Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding, J Biol Chem. 279 (2004) 163–168. https://doi.org/10.1074/jbc.M307528200.

[60] J. Loscalzo, G. Welch, Nitric oxide and its role in the cardiovascular system, Prog Cardiovasc Dis. 38 (1995) 87–104. https://doi.org/10.1016/s0033-0620(05)80001-5.

[61] M.E. Mendelsohn, S. O'Neill, D. George, J. Loscalzo, Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine., Journal of Biological Chemistry. 265 (1990) 19028–19034. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)30619-1.

[62] P.M. Bath, D.G. Hassall, A.M. Gladwin, R.M. Palmer, J.F. Martin, Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro, Arterioscler Thromb. 11 (1991) 254–260. https://doi.org/10.1161/01.atv.11.2.254.

[63] P. Kubes, M. Suzuki, D.N. Granger, Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion, Proc Natl Acad Sci U S A. 88 (1991) 4651–4655. https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4651.

[64] D.S. Marks, J.A. Vita, J.D. Folts, J.F. Keaney, G.N. Welch, J. Loscalzo, Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide, J Clin Invest. 96 (1995) 2630–2638. https://doi.org/10.1172/JCI118328.

[65] U.C. Garg, A. Hassid, Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells., J Clin Invest. 83 (1989) 1774–1777.

[66] F. Hinder, H.D. Stubbe, H. Van Aken, R. Waurick, M. Booke, J. Meyer, Role of nitric oxide in sepsis-associated pulmonary edema, Am J Respir Crit Care Med. 159 (1999) 252–257. https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.1.9806024.

[67] G.R. May, P. Crook, P.K. Moore, C.P. Page, The role of nitric oxide as an endogenous regulator of platelet and neutrophil activation within the pulmonary circulation of the rabbit, Br J Pharmacol. 102 (1991) 759–763. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1991.tb12246.x.

[68] M. Gilchrist, C. Hesslinger, A.D. Befus, Tetrahydrobiopterin, a Critical Factor in the Production and Role of Nitric Oxide in Mast Cells*, Journal of Biological Chemistry. 278 (2003) 50607–50614. https://doi.org/10.1074/jbc.M307777200.

[69] F. Obermeier, V. Gross, J. Schölmerich, W. Falk, Interleukin-1 production by mouse macrophages is regulated in a feedback fashion by nitric oxide, J Leukoc Biol. 66 (1999) 829–836. https://doi.org/10.1002/jlb.66.5.829.

[70] J.S. Stamler, D.I. Simon, J.A. Osborne, M.E. Mullins, O. Jaraki, T. Michel, D.J. Singel, J. Loscalzo, S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds., Proc Natl Acad Sci U S A. 89 (1992) 444–448.

[71] E. Belcastro, W. Wu, I. Fries-Raeth, A. Corti, A. Pompella, P. Leroy, I. Lartaud, C. Gaucher, Oxidative stress enhances and modulates protein S -nitrosation in smooth muscle cells exposed to S -nitrosoglutathione, Nitric Oxide. 69 (2017) 10–21. https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.07.004.

[72] C. Gaucher, A. Boudier, F. Dahboul, M. Parent, P. Leroy, S-nitrosation/Denitrosation in Cardiovascular Pathologies: Facts and Concepts for the Rational Design of S-nitrosothiols, Current Pharmaceutical Design. 19 (2013) 458. https://doi.org/10.2174/1381612811306030458.

[73] H2S: A "Double face" molecule in health and disease - Masi - 2013 - BioFactors - Wiley Online Library, (n.d.). https://iubmb-onlinelibrary-wiley-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/doi/full/10.1002/biof.1061 (accessed February 16, 2022).

[74] F. Benedetti, S. Curreli, S. Krishnan, S. Davinelli, F. Cocchi, G. Scapagnini, R.C. Gallo, D. Zella, Anti-inflammatory effects of H2S during acute bacterial infection: a review, Journal of Translational Medicine. 15 (2017) 100. https://doi.org/10.1186/s12967-017-1206-8.

[75] E.A. Peter, X. Shen, S.H. Shah, S. Pardue, J.D. Glawe, W.W. Zhang, P. Reddy, N.I. Akkus, J. Varma, C.G. Kevil, Plasma Free H2S Levels are Elevated in Patients With Cardiovascular Disease, J Am Heart Assoc. 2 (2013) e000387. https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000387.

[76] M. Bhatia, Hydrogen sulfide as a vasodilator, IUBMB Life. 57 (2005) 603–606. https://doi.org/10.1080/15216540500217875.

[77] A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells - PubMed, (n.d.). https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.bases-doc.univ-lorraine.fr/23340406/ (accessed February 16, 2022).

[78] J. Yin, W. Ren, G. Yang, J. Duan, X. Huang, R. Fang, C. Li, T. Li, Y. Yin, Y. Hou, S.W. Kim, G. Wu, l-Cysteine metabolism and its nutritional implications, Molecular Nutrition & Food Research. 60 (2016) 134–146. https://doi.org/10.1002/mnfr.201500031.

[79] T.W. Lambert, V.M. Goodwin, D. Stefani, L. Strosher, Hydrogen sulfide (H2S) and sour gas effects on the eye. A historical perspective, Science of The Total Environment. 367 (2006) 1–22. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.01.034.

[80] S.L. Malone Rubright, L.L. Pearce, J. Peterson, Environmental toxicology of hydrogen sulfide, Nitric Oxide. 71 (2017) 1–13. https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.09.011.

[81] R.J. Reiffenstein, W.C. Hulbert, S.H. Roth, Toxicology of Hydrogen Sulfide, Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 32 (1992) 109–134. https://doi.org/10.1146/annurev.pa.32.040192.000545.

[82] D. l. Capone, A. Barker, P. o. Williamson, I. l. Francis, The role of potent thiols in Chardonnay wine aroma, Australian Journal of Grape and Wine Research. 24 (2018) 38–50. https://doi.org/10.1111/ajgw.12294.

[83] Z. Sun, K. Hayat, J. Yu, E. Karangwa, E. Duhoranimana, X. Zhang, S. Xia, Quantification of Free 2-Furfurylthiol in Coffee Brew Using a Prefabricated Coffee Model, Food Anal. Methods. 11 (2018) 654–662. https://doi.org/10.1007/s12161-017-1034-8.

[84] M.N. Lund, M.L. Andersen, Detection of Thiol Groups in Beer and Their Correlation with Oxidative Stability, Journal of the American Society of Brewing Chemists. 69 (2011) 163–169. https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2011-0620-01.

[85] M.L. Andersen, M. Gundermann, B.P. Danielsen, M.N. Lund, Kinetic Models for the Role of Protein Thiols during Oxidation in Beer, J. Agric. Food Chem. 65 (2017) 10820–10828. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05012.

[86] M.J. Wu, F.M. Clarke, P.J. Rogers, P. Young, N. Sales, P.J. O'Doherty, V.J. Higgins, Identification of a Protein with Antioxidant Activity that is Important for the Protection against Beer Ageing, IJMS. 12 (2011) 6089–6103. https://doi.org/10.3390/ijms12096089.

[87] J.J. Baert, J. De Clippeleer, B. Jaskula-Goiris, F. Van Opstaele, G. De Rouck, G. Aerts, L. De Cooman, Further Elucidation of Beer Flavor Instability: The Potential Role of Cysteine-

Bound Aldehydes, Journal of the American Society of Brewing Chemists. 73 (2015) 243–252. https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2015-0531-01.

[88] V. Ferreira, R. Lopez, The Actual and Potential Aroma of Winemaking Grapes, Biomolecules. 9 (2019) 818. https://doi.org/10.3390/biom9120818.

[89] A. Peña-Gallego, P. Hernández-Orte, J. Cacho, V. Ferreira, S-Cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors in grapes. A review, Food Chemistry. 131 (2012) 1–13. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.079.

[90] H. Kobayashi, H. Takase, K. Kaneko, F. Tanzawa, R. Takata, S. Suzuki, T. Konno, Analysis of S-3-(Hexan-1-ol)-Glutathione and S-3-(Hexan-1-ol)-l-Cysteine in Vitis vinifera L. cv. Koshu for Aromatic Wines, Am J Enol Vitic. 61 (2010) 176–185.

[91] T. Dufourcq, R. Schneider, R. Renard, E. Serrano, Incidences du climat, du sol, de la date de récolte sur le potentiel aromatique du cépage Colombard en Gascogne Incidences of the climate, the soil, and the harvest date on Colombard aromatic potential in Gascony, in: 2006.

[92] X. Choné, Contribution à l'étude des terroirs de Bordeaux : étude des déficits hydriques modérés, de l'alimentation en azote et de leurs effets sur le potentiel aromatique des raisins de Vitis vinifera L. cv. Sauvignon blanc, These de doctorat, Bordeaux 2, 2001. http://www.theses.fr/2001BOR20917 (accessed February 10, 2022).

[93] D.W. Jeffery, Spotlight on Varietal Thiols and Precursors in Grapes and Wines, Aust. J. Chem. 69 (2016) 1323. https://doi.org/10.1071/CH16296.

[94] C.P. des Gachons, Recherches sur le potentiel aromatique des raisins de Vitis vinifera L. Cv. Sauvignon blanc, Undefined. (2000). https://www.semanticscholar.org/paper/Recherches-sur-le-potentiel-aromatique-des-raisins-Gachons/2a22e8dc289dd395d257079e35f30dc7ee7923f6 (accessed February 10, 2022).

[95] I. Masneuf-Pomarède, M.-L. Murat, G. Naumov, T. Tominaga, D. Dubourdieu, Hybrids Saccharomyces cerevisiae X Saccharomyces bayanus var. uvarum having a high liberating ability of some sulfur varietal aromas of Vitis vinifera Sauvignon blanc wines, Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin. 36 (2002) 205–212. https://doi.org/10.20870/oeno-one.2002.36.4.965.

[96] N. ANFANG, M. BRAJKOVICH, M. Goddard, Anfang N, Brajkovich M, Goddard MR.. Co-fermentation with Pichia kluyveri increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. Aust J Grape Wine R 15: 1-8, Australian Journal of Grape and Wine Research. 15 (2008) 1–8. https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00031.x.

[97] K. Ngamchue, Rapid Method for the Quantification of Reduced and Oxidized Glutathione in Human Plasma and Saliva | Analytical Chemistry, Analytical Chemistry. 89 (2017) 2901–2908. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04186.

[98] F. Ghasemi, M.R. Hormozi-Nezhad, M. Mahmoudi, A colorimetric sensor array for detection and discrimination of biothiols based on aggregation of gold nanoparticles, Analytica Chimica Acta. 882 (2015) 58–67. https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.011.

[99] L. Wang, Q. Zhou, B. Zhu, L. Yan, Z. Ma, B. Du, X. Zhang, A colorimetric and fluorescent chemodosimeter for discriminative and simultaneous quantification of cysteine and homocysteine, Dyes and Pigments. 95 (2012) 275–279. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2012.05.006.

[100] Y. Chen, X. Qin, C. Yuan, Y. Wang, Switch on fluorescence mode for determination of L-cysteine with carbon quantum dots and Au nanoparticles as a probe, RSC Adv. 10 (2020) 1989–1994. https://doi.org/10.1039/C9RA09019C.

[101] M.A. Raggi, R. Mandrioli, F. Bugamelli, C. Sabbioni, Comparison of analytical methods for quality control of pharmaceutical formulations containing glutathione, Chromatographia. 46 (1997) 17–22. https://doi.org/10.1007/BF02490925.
[102] L. Wei, Y. Song, P. Liu, K. Xuejun, Polystyrene nanofibers capped with copper nanoparticles for selective extraction of glutathione prior to its determination by HPLC, Microchimica Acta. 185 (2018) 321. https://doi.org/10.1007/s00604-018-2845-z.
[103] A. Pallotta, A. Boudier, P. Leroy, I. Clarot, Characterization and stability of gold nanoparticles depending on their surface chemistry: Contribution of capillary zone electrophoresis to a quality control, Journal of Chromatography A. 1461 (2016) 179–184. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.031.
[104] O. Mompó-Roselló, M. Vergara-Barberán, E.F. Simó-Alfonso, J.M. Herrero-Martínez, In syringe hybrid monoliths modified with gold nanoparticles for selective extraction of glutathione in biological fluids prior to its determination by HPLC, Talanta. 209 (2020) 120566. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120566.
[105] A.M. Hafez, B.W. Wenclawiak, Development of a new porous gold SPME fiber for selective and efficient extraction of dodecanethiol followed by GC–MS analysis, Anal Bioanal Chem. 405 (2013) 1753–1758. https://doi.org/10.1007/s00216-012-6580-8.
[106] M.J. Hostetler, A.C. Templeton, R.W. Murray, Dynamics of Place-Exchange Reactions on Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules, Langmuir. 15 (1999) 3782–3789. https://doi.org/10.1021/la981598f.
[107] A.S. Aricò, P. Bruce, B. Scrosati, J.-M. Tarascon, W. van Schalkwijk, Nanostructured materials for advanced energy conversion and storage devices, Nature Mater. 4 (2005) 366–377. https://doi.org/10.1038/nmat1368.
[108] P. Jin, C. Wiraja, J. Zhao, J. Zhang, L. Zheng, C. Xu, Nitric Oxide Nanosensors for Predicting the Development of Osteoarthritis in Rat Model, ACS Appl. Mater. Interfaces. 9 (2017) 25128–25137. https://doi.org/10.1021/acsami.7b06404.
[109] Challenges and potential solutions for nanosensors intended for use with foods | Nature Nanotechnology, (n.d.). https://www.nature.com/articles/s41565-021-00867-7 (accessed February 14, 2022).
[110] Y. Cui, Q. Wei, H. Park, C.M. Lieber, Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species, Science. 293 (2001) 1289–1292. https://doi.org/10.1126/science.1062711.
[111] P. Moriarty, Nanostructured materials, Reports on Progress in Physics. 64 (2001) 297.
[112] H. Gleiter, Nanostructured materials: basic concepts and microstructure, Acta Materialia. 48 (2000) 1–29. https://doi.org/10.1016/S1359-6454(99)00285-2.
[113] Ultrasensitive Electrical Biosensing of Proteins and DNA: Carbon-Nanotube Derived Amplification of the Recognition and Transduction Events | Journal of the American Chemical Society, (n.d.). https://pubs-acs-org.bases-doc.univ-lorraine.fr/doi/abs/10.1021/ja031723w (accessed February 14, 2022).
[114] J.M. Pingarrón, P. Yáñez-Sedeño, A. González-Cortés, Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors, Electrochimica Acta. 53 (2008) 5848–5866. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.03.005.
[115] R. Gupta, A. Kumar, Bioactive materials for biomedical applications using sol–gel technology, Biomed. Mater. 3 (2008) 034005. https://doi.org/10.1088/1748-6041/3/3/034005.

[116] I. Gill, A. Ballesteros, Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol–gel encapsulated biologicals, Trends in Biotechnology. 18 (2000) 282–296. https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01457-8.
[117] M.F. Desimone, S.B. Matiacevich, M. del P. Buera, L.E. Díaz, Effects of relative humidity on enzyme activity immobilized in sol–gel-derived silica nanocomposites, Enzyme and Microbial Technology. 42 (2008) 583–588. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.03.009.
[118] JOSEPH WANG, A.-N. KAWDE, M. MUSAMEH, Carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes for amplified label-free electrochemical detection of DNA hybridization, Analyst (London). 128 (2003) 912–916. https://doi.org/10.1039/b303282e.
[119] H. Quan, S.-U. Park, J. Park, Electrochemical oxidation of glucose on silver nanoparticle-modified composite electrodes, Electrochimica Acta. 55 (2010) 2232–2237. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.11.074.
[120] C. Zhang, Y. Han, L. Lin, N. Deng, B. Chen, Y. Liu, Development of Quantum Dots-Labeled Antibody Fluorescence Immunoassays for the Detection of Morphine, J. Agric. Food Chem. 65 (2017) 1290–1295. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05305.
[121] H. Yoon, J.-H. Kim, N. Lee, B.-G. Kim, J. Jang, A Novel Sensor Platform Based on Aptamer-Conjugated Polypyrrole Nanotubes for Label-Free Electrochemical Protein Detection, ChemBioChem. 9 (2008) 634–641. https://doi.org/10.1002/cbic.200700660.
[122] A. Mikagi, K. Manita, A. Yoyasu, Y. Tsuchido, N. Kanzawa, T. Hashimoto, T. Hayashita, Rapid Bacterial Recognition over a Wide pH Range by Boronic Acid-Based Ditopic Dendrimer Probes for Gram-Positive Bacteria, Molecules. 27 (2022) 256. https://doi.org/10.3390/molecules27010256.
[123] M.C. Talio, M.G. Acosta, M. Alesso, M.O. Luconi, L.P. Fernández, Quantification of caffeine in dietary supplements and energy drinks by solid-surface fluorescence using a pre-concentration step on multi-walled carbon nanotubes and Rhodamine B, Food Additives & Contaminants: Part A. 31 (2014) 1367–1374. https://doi.org/10.1080/19440049.2014.928831.
[124] J. Li, Y. Chun, H. Ju, Simultaneous Electrochemiluminescence Detection of Anisodamine, Atropine, and Scopolamine in Flos daturae by Capillary Electrophoresis Using β-Cyclodextrin as Additive, Electroanalysis (New York, N.Y.). 19 (2007) 1569–1574. https://doi.org/10.1002/elan.200703903.
[125] H. Häkkinen, The gold–sulfur interface at the nanoscale, Nature Chem. 4 (2012) 443–455. https://doi.org/10.1038/nchem.1352.
[126] O. PLUCHERY, M. Carriere, De l'or massif à l'or nanométrique, Techniques de l'Ingénieur. (2011). http://www.techniques.ingenieur.fr/base-documentaire/innovation-th10/nanomateriaux-proprietes-42635210/nanoparticules-d-or-nm900/de-l-or-massif-a-l-or-nanometrique-nm900niv10001.html (accessed February 21, 2022).
[127] L. Nicu, T. Leïchlé, Biosensors and tools for surface functionalization from the macro- to the nanoscale: The way forward, Journal of Applied Physics. 104 (2008) 111101. https://doi.org/10.1063/1.2973147.
[128] S. Azlin-Hasim, M.C. Cruz-Romero, M.A. Morris, E. Cummins, J.P. Kerry, Spray coating application for the development of nanocoated antimicrobial low-density polyethylene films to increase the shelf life of chicken breast fillets, Food Sci Technol Int. 24 (2018) 688–698. https://doi.org/10.1177/1082013218789224.

[129] M. Kachoei, A. Nourian, B. Divband, Z. Kachoei, S. Shirazi, Zinc-oxide nanocoating for improvement of the antibacterial and frictional behavior of nickel-titanium alloy, Nanomedicine. 11 (2016) 2511–2527. https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0171.
[130] D. Peng, X. You-Long, S. Xiao-Fei, Synthesis and Performance of Nano MnO as an Anode Material for Lithium-Ion Batteries, Acta Phys.-Chim. Sin. 29 (2013) 293–297. https://doi.org/10.3866/PKU.WHXB201211142.
[131] L. Zhou, S. Poggesi, G.C. Bariani, R. Mittapalli, P.-M. Adam, M. Manzano, R.E. Ionescu, Robust SERS Platforms Based on Annealed Gold Nanostructures Formed on Ultrafine Glass Substrates for Various (Bio)Applications, Biosensors-Basel. 9 (2019) 53. https://doi.org/10.3390/bios9020053.
[132] J. Hu, Z. Wang, J. Li, Gold Nanoparticles With Special Shapes: Controlled Synthesis, Surface-enhanced Raman Scattering, and The Application in Biodetection, Sensors. 7 (2007) 3299–3311. https://doi.org/10.3390/s7123299.
[133] S.S.R. Dasary, A.K. Singh, D. Senapati, H. Yu, P.C. Ray, Gold Nanoparticle Based Label-Free SERS Probe for Ultrasensitive and Selective Detection of Trinitrotoluene, Journal of the American Chemical Society. 131 (2009) 13806–13812. https://doi.org/10.1021/ja905134d.
[134] Y.C. CAO, RONGCHAO JIN, C.A. MIRKIN, Nanoparticles with Raman Spectroscopic Fingerprints for DNA and RNA Detection, Science (American Association for the Advancement of Science). 297 (2002) 1536–1540. https://doi.org/10.1126/science.297.5586.1536.
[135] J. Ni, R.J. Lipert, G.B. Dawson, M.D. Porter, Immunoassay Readout Method Using Extrinsic Raman Labels Adsorbed on Immunogold Colloids, Analytical Chemistry (Washington). 71 (1999) 4903–4908. https://doi.org/10.1021/ac990616a.
[136] R.P. Van Duyne, J.N. Anker, W.P. Hall, O. Lyandres, N.C. Shah, J. Zhao, Biosensing with plasmonic nanosensors, Nature Materials. 7 (2008) 442–453. https://doi.org/10.1038/nmat2162.
[137] X. Mao, L. Yang, X.-L. Su, Y. Li, A nanoparticle amplification based quartz crystal microbalance DNA sensor for detection of Escherichia coli O157:H7, Biosensors & Bioelectronics. 21 (2006) 1178–1185. https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.04.021.
[138] B. Vimal, A. Ranjan, A. Singh, D. Agarwal, K. Prasad, J. Kezhedath, NANOPARTICLE BASED BIO-BARCODE ASSAY: A NOVEL QUANTITATIVE IMMUNOMAGNETIC REDUCTION ASSAY APPROACH FOR DISEASE DIAGNOSIS, 8 (2018) 35–36.
[139] C.S. Thaxton, H.D. Hill, D.G. Georganopoulou, S.I. Stoeva, C.A. Mirkin, A Bio-Bar-Code Assay Based upon Dithiothreitol-Induced Oligonucleotide Release, Anal. Chem. 77 (2005) 8174–8178. https://doi.org/10.1021/ac0514265.
[140] Y. Zhou, H. Xu, A.B. Dahlin, J. Vallkil, C.A.K. Borrebaeck, C. Wingren, B. Liedberg, F. Höök a, Quantitative interpretation of gold nanoparticle-based bioassays designed for detection of immunocomplex formation, Biointerphases. 2 (2007) 6–15. https://doi.org/10.1116/1.2700235.
[141] D.-H. Tsai, M.P. Shelton, F.W. DelRio, S. Elzey, S. Guha, M.R. Zachariah, V.A. Hackley, Quantifying dithiothreitol displacement of functional ligands from gold nanoparticles, Anal Bioanal Chem. 404 (2012) 3015–3023. https://doi.org/10.1007/s00216-012-6418-4.
[142] A. Bard, R. Rondon, D.T. Marquez, A.E. Lanterna, J.C. Scaiano, How Fast Can Thiols Bind to the Gold Nanoparticle Surface?, Photochemistry and Photobiology. 94 (2018) 1109–1115. https://doi.org/10.1111/php.13010.

[143] E. Pensa, E. Cortés, G. Corthey, P. Carro, C. Vericat, M.H. Fonticelli, G. Benítez, A.A. Rubert, R.C. Salvarezza, The Chemistry of the Sulfur–Gold Interface: In Search of a Unified Model, Accounts of Chemical Research. 45 (2012) 1183–1192. https://doi.org/10.1021/ar200260p.

[144] M. Zayats, A.B. Kharitonov, S.P. Pogorelova, O. Lioubashevski, E. Katz, I. Willner, Probing Photoelectrochemical Processes in Au−CdS Nanoparticle Arrays by Surface Plasmon Resonance: Application for the Detection of Acetylcholine Esterase Inhibitors, Journal of the American Chemical Society. 125 (2003) 16006–16014. https://doi.org/10.1021/ja0379215.

[145] J. Zhou, J. Ralston, R. Sedev, D.A. Beattie, Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability, Journal of Colloid and Interface Science. 331 (2009) 251–262. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.12.002.

[146] N. Toshima, T. Yonezawa, Bimetallic nanoparticles—novel materials for chemical and physical applications, New J. Chem. 22 (1998) 1179–1201. https://doi.org/10.1039/A805753B.

[147] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, Discuss. Faraday Soc. 11 (1951) 55–75. https://doi.org/10.1039/DF9511100055.

[148] J. Tournebize, A. Sapin-Minet, R. Schneider, A. Boudier, P. Maincent, P. Leroy, Simple spectrophotocolorimetric method for quantitative determination of gold in nanoparticles, Talanta. 83 (2011) 1780–1783. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.12.005.

[149] A. Pallotta, M. Parent, I. Clarot, M. Luo, V. Borr, P. Dan, V. Decot, P. Menu, R. Safar, O. Joubert, P. Leroy, A. Boudier, Blood Compatibility of Multilayered Polyelectrolyte Films Containing Immobilized Gold Nanoparticles, Part. Part. Syst. Charact. 34 (2017) 1600184. https://doi.org/10.1002/ppsc.201600184.

[150] A. Pallotta, V. Philippe, A. Boudier, P. Leroy, I. Clarot, Highly sensitive and simple liquid chromatography assay with ion-pairing extraction and visible detection for quantification of gold from nanoparticles, Talanta. 179 (2018) 307–311. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.11.016.

[151] ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology, European Medicines Agency. (1996).

[152] B.J. Privett, J.H. Shin, M.H. Schoenfisch, Tutorial Review: Electrochemical Nitric Oxide Sensors for Physiological Measurements, Chem Soc Rev. 39 (2010) 1925–1935. https://doi.org/10.1039/b701906h.

[153] J. Sun, X. Zhang, M. Broderick, H. Fein, Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay, Sensors. 3 (2003) 276–284. https://doi.org/10.3390/s30800276.

[154] J. Beurton, I. Clarot, J. Stein, B. Creusot, C. Marcic, E. Marchioni, A. Boudier, Long-lasting and controlled antioxidant property of immobilized gold nanoparticles for intelligent packaging, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 176 (2019) 439. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.030.

[155] S. Ge, L. Zhang, Y. Zhang, F. Lan, M. Yan, J. Yu, Nanomaterials-modified cellulose paper as a platform for biosensing applications, Nanoscale. 9 (2017) 4366–4382. https://doi.org/10.1039/c6nr08846e.

[156] D.M. Cate, J.A. Adkins, J. Mettakoonpitak, C.S. Henry, Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices, Anal. Chem. 87 (2015) 19–41. https://doi.org/10.1021/ac503968p.
[157] J.-H. Wu, C.-Y. He, Advances in Cellulose-Based Sorbents for Extraction of Pollutants in Environmental Samples, Chromatographia. 82 (2019) 1151–1169. https://doi.org/10.1007/s10337-019-03708-x.
[158] E. Nunez-Bajo, M.C. Blanco-Lopez, A. Costa-García, M.T. Fernández-Abedul, Gold Nanostructuration in Paper-based Electrodes, Procedia Technology. 27 (2017) 133–134. https://doi.org/10.1016/j.protcy.2017.04.058.
[159] Y. Zhang, L. Ge, M. Li, M. Yan, S. Ge, J. Yu, X. Song, B. Cao, Flexible paper-based ZnO nanorod light-emitting diodes induced multiplexed photoelectrochemical immunoassay, Chem. Commun. 50 (2014) 1417–1419. https://doi.org/10.1039/C3CC48421A.
[160] S. Ge, L. Ge, M. Yan, X. Song, J. Yu, J. Huang, A disposable paper-based electrochemical sensor with an addressable electrode array for cancer screening, Chem. Commun. 48 (2012) 9397–9399. https://doi.org/10.1039/C2CC34887J.
[161] L. Ge, S. Wang, J. Yu, N. Li, S. Ge, M. Yan, Molecularly Imprinted Polymer Grafted Porous Au-Paper Electrode for an Microfluidic Electro-Analytical Origami Device, Advanced Functional Materials. 23 (2013) 3115–3123. https://doi.org/10.1002/adfm.201202785.
[162] J.V. Rie, W. Thielemans, Cellulose–gold nanoparticle hybrid materials, Nanoscale. 9 (2017) 8525–8554. https://doi.org/10.1039/C7NR00400A.
[163] A. Pallotta, I. Clarot, J. Beurton, B. Creusot, T. Chaigneau, A. Tu, P. Lavalle, A. Boudier, Analytical strategy for studying the formation and stability of multilayered films containing gold nanoparticles, (2021).
[164] A. Kapur, Self-Assembled Gold Nanoparticle–Fluorescent Protein Conjugates as Platforms for Sensing Thiolate Compounds via Modulation of Energy Transfer Quenching | Bioconjugate Chemistry, Bioconjugate Chemistry. 28 (2017) 678–687. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00006.
[165] D. Wan, M. Gao, Y. Wang, P. Zhang, X. Zhang, A rapid and simple separation and direct detection of glutathione by gold nanoparticles and graphene-based MALDI–TOF-MS, Journal of Separation Science. 36 (2013) 629–635. https://doi.org/10.1002/jssc.201200766.
[166] M. Berthou, A. Pallotta, J. Beurton, T. Chaigneau, A. Athanassiou, C. Marcic, E. Marchioni, A. Boudier, I. Clarot, Gold nanostructured membranes to concentrate low molecular weight thiols, a proof of concept study, Journal of Chromatography B. 1198 (2022) 123244. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123244.
[167] J.M. Lu, J.M. Wittbrodt, K. Wang, Z. Wen, H.B. Schlegel, P.G. Wang, J.P. Cheng, NO affinities of S-nitrosothiols: A direct experimental and computational investigation of RS-NO bond dissociation energies, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 2903–2904. https://doi.org/10.1021/ja000384t.
[168] A. Faccenda, C.A. Bonham, P.O. Vacratsis, X. Zhang, B. Mutus, Gold Nanoparticle Enrichment Method for Identifying S-Nitrosylation and S-Glutathionylation Sites in Proteins | Journal of the American Chemical Society, J. Am. Chem. Soc. 132 (2010) 11392–11394. https://doi.org/10.1021/ja103591v.
[169] V. Baldim, A. Ismail, P. Taladriz-Blanco, S. Griveau, M.G. de Oliveira, F. Bedioui, Amperometric Quantification of S-Nitrosoglutathione Using Gold Nanoparticles: A Step toward Determination of S-Nitrosothiols in Plasma, Anal. Chem. 88 (2016) 3115–3120. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04035.

[170] M.W. Foster, T.J. McMahon, J.S. Stamler, S-nitrosylation in health and disease, Trends in Molecular Medicine. 9 (2003) 160–168. https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00028-5.

[171] S. Griveau, F. Bedioui, Electroanalytical methodologies for the detection of S-nitrosothiols in biological fluids, Analyst (London). 138 (2013) 5173–5181. https://doi.org/10.1039/c3an00488k.

[172] A.B. Milsom, C.J.H. Jones, J. Goodfellow, M.P. Frenneaux, J.R. Peters, P.E. James, Abnormal metabolic fate of nitric oxide in Type I diabetes mellitus, Diabetologia. 45 (2002) 1515–1522. https://doi.org/10.1007/s00125-002-0956-9.

[173] A.R. Butler, P. Rhodes, Chemistry, Analysis, and Biological Roles of S -Nitrosothiols, Analytical Biochemistry. 249 (1997) 1–9.

[174] Y. Hou, C.-C. Lv, Y.-L. Guo, X.-H. Ma, W. Liu, Y. Jin, B.-X. Li, M. Yang, S.-Y. Yao, Recent Advances and Applications in Paper-Based Devices for Point-of-Care Testing, J. Anal. Test. (2022). https://doi.org/10.1007/s41664-021-00204-w.

[175] G. Sun, P. Wang, S. Ge, L. Ge, J. Yu, M. Yan, Photoelectrochemical sensor for pentachlorophenol on microfluidic paper-based analytical device based on the molecular imprinting technique, Biosens Bioelectron. 56 (2014) 97–103. https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.01.001.

[176] M. Li, Q. Kong, Z. Bian, C. Ma, S. Ge, Y. Zhang, J. Yu, M. Yan, Ultrasensitive detection of lead ion sensor based on gold nanodendrites modified electrode and electrochemiluminescent quenching of quantum dots by electrocatalytic silver/zinc oxide coupled structures, Biosensors and Bioelectronics. 65 (2015) 176–182. https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.022.

[177] A. Sangsuwan, B. Narupai, P. Sae-ung, S. Rodtamai, N. Rodthongkum, V.P. Hoven, Patterned Poly(acrylic acid) Brushes Containing Gold Nanoparticles for Peptide Detection by Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, Anal. Chem. 87 (2015) 10738–10746. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00734.

[178] J. Wang, M. Jie, H. Li, L. Lin, Z. He, S. Wang, J.-M. Lin, Gold nanoparticles modified porous silicon chip for SALDI-MS determination of glutathione in cells, Talanta. 168 (2017) 222–229. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.041.

[179] Y. Zhang, W. Chen, Y. Zhang, Y. Zhang, L. Zhu, P. He, Q. Wang, Sensitive analysis of reduced glutathione in bacteria and HaCaT cells by capillary electrophoresis via online pre-concentration of transient trapping combined with the dynamic pH junction mode, New J. Chem. 41 (2017) 12920–12929. https://doi.org/10.1039/C7NJ02184D.

[180] O. Gould, N. Drabińska, N. Ratcliffe, B. de Lacy Costello, Hyphenated Mass Spectrometry versus Real-Time Mass Spectrometry Techniques for the Detection of Volatile Compounds from the Human Body, Molecules. 26 (2021) 7185. https://doi.org/10.3390/molecules26237185.

[181] H. Song, J. Liu, GC-O-MS technique and its applications in food flavor analysis, Food Res Int. 114 (2018) 187–198. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.037.

[182] P. Bouchilloux, P. Darriet, D. Dubourdieu, Quantitative determination of 4-mercapto-4-methylpentan-2-0ne in Sauvignon wines, OENO One. 30 (1996) 23–29. https://doi.org/10.20870/oeno-one.1996.30.1.1112.

[183] J. Dennenlöhr, S. Thörner, N. Rettberg, Analysis of Hop-Derived Thiols in Beer Using On-Fiber Derivatization in Combination with HS-SPME and GC-MS/MS, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 68 (2020) 15036–15047. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06305.

[184] A. Ott, J.-E. Germond, M. Baumgartner, A. Chaintreau, Aroma Comparisons of Traditional and Mild Yogurts: Headspace Gas Chromatography Quantification of Volatiles and Origin of α-Diketones, J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 2379–2385. https://doi.org/10.1021/jf980650a.

[185] D. Ulrich, E. Hoberg, A. Rapp, S. Kecke, Analysis of strawberry flavour - discrimination of aroma types by quantification of volatile compounds, Z Lebensm. Unters. Forsch. A-Food Res. Technol. 205 (1997) 218–223. https://doi.org/10.1007/s002170050154.

[186] H. Wu, P. Lu, Z. Liu, J. Sharifi-Rad, H.A.R. Suleria, Impact of roasting on the phenolic and volatile compounds in coffee beans, Food Sci. Nutr. (n.d.). https://doi.org/10.1002/fsn3.2849.

[187] L. Galovicova, P. Borotova, V. Valkova, H. Duranova, J. Stefanikova, N.L. Vukovic, M. Vukic, M. Kacaniova, Biological Activity of Pogostemon cablin Essential Oil and Its Potential Use for Food Preservation, Agronomy-Basel. 12 (2022) 387. https://doi.org/10.3390/agronomy12020387.

[188] I.K. Karabagias, HS-SPME/GC-MS metabolomic analysis for the identification of exogenous volatile metabolites of monofloral honey and quality control suggestions, Eur. Food Res. Technol. (n.d.). https://doi.org/10.1007/s00217-022-04007-w.

[189] P. Darriet, T. Tominaga, V. Lavigne, J.-N. Boidron, D. Dubourdieu, Identification of a powerful aromatic component of Vitis vinifera L. var. sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, Flavour and Fragrance Journal. 10 (1995) 385–392. https://doi.org/10.1002/ffj.2730100610.

[190] D.L. Capone, R. Ristic, K.H. Pardon, D.W. Jeffery, Simple Quantitative Determination of Potent Thiols at Ultratrace Levels in Wine by Derivatization and High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) Analysis, Anal. Chem. 87 (2015) 1226–1231. https://doi.org/10.1021/ac503883s.

[191] F. San-Juan, J. Cacho, V. Ferreira, A. Escudero, 3-Methyl-2-butene-1-thiol: Identification, analysis, occurrence and sensory role of an uncommon thiol in wine, Talanta. 99 (2012) 225–231. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.043.

[192] K. Mahattanatawee, R.L. Rouseff, Comparison of aroma active and sulfur volatiles in three fragrant rice cultivars using GC-Olfactometry and GC-PFPD, Food Chem. 154 (2014) 1–6. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.105.

[193] M. Cerreti, P. Ferranti, I. Benucci, K. Liburdi, C. De Simone, M. Esti, Thiol precursors in Grechetto grape juice and aromatic expression in wine, Eur. Food Res. Technol. 243 (2017) 753–760. https://doi.org/10.1007/s00217-016-2789-7.

[194] D. Steyer, P. Tristram, C. Leitao, F. Heitz, B. Laugel, Yeast Strains and Hop Varieties Synergy on Beer Volatile Compounds, BrewingScience. 70 (2017) 131–141. https://doi.org/10.23763/BrSc17-13Steyer.

[195] D. Steyer, C. Leitao, B. Laugel, Characterization of the terpenoids composition of beers made with the French hop varieties: Strisselspalt, Aramis, Triskel and Bouclier, BrewingScience. 66 (2013) 192–197.

[196] M. Sadoudi, R. Tourdot-Maréchal, S. Rousseaux, D. Steyer, J.-J. Gallardo-Chacón, J. Ballester, S. Vichi, R. Guérin-Schneider, J. Caixach, H. Alexandre, Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts, Food Microbiology. 32 (2012) 243–253. https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.006.

[197] Z. Triaux, H. Petitjean, E. Marchioni, D. Steyer, C. Marcic, Optimization by experimental design of headspace sorptive extraction and solid-phase microextraction for the determination of terpenes in spices, Food Anal. Methods. 12 (2019) 2764–2776. https://doi.org/10.1007/s12161-019-01622-4.

[198] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology, Chem. Rev. 105 (2005) 1103–1170. https://doi.org/10.1021/cr0300789.

[199] D.-H. Tsai, F.W. DelRio, A.M. Keene, K.M. Tyner, R.I. MacCuspie, T.J. Cho, M.R. Zachariah, V.A. Hackley, Adsorption and Conformation of Serum Albumin Protein on Gold Nanoparticles Investigated Using Dimensional Measurements and in Situ Spectroscopic Methods, Langmuir. 27 (2011) 2464–2477. https://doi.org/10.1021/la104124d.

[200] E. Campo, J. Cacho, V. Ferreira, The Chemical Characterization of the Aroma of Dessert and Sparkling White Wines (Pedro Ximénez, Fino, Sauternes, and Cava) by Gas Chromatography−Olfactometry and Chemical Quantitative Analysis, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 2477–2484. https://doi.org/10.1021/jf072968l.

[201] C.N. Hall, J. Garthwaite, What is the real physiological NO concentration in vivo?, (2009). https://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/141212 (accessed May 31, 2022).

[202] D.D. Thomas, X. Liu, S.P. Kantrow, J. Lancaster, The Biological Lifetime of Nitric Oxide: Implications for the Perivascular Dynamics of NO and O2, Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS. 98 (2001) 355–360. https://doi.org/10.1073/pnas.011379598.

[203] M.J. Kuchan, J.A. Frangos, Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells, Am J Physiol. 266 (1994) C628-636. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.3.C628.

[204] S. Moncada, R.M. Palmer, E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, Pharmacol Rev. 43 (1991) 109–142.

[205] R.F. Furchgott, P.D. Cherry, J.V. Zawadzki, D. Jothianandan, Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries, J Cardiovasc Pharmacol. 6 Suppl 2 (1984) S336-343. https://doi.org/10.1097/00005344-198406002-00008.

[206] S. Moncada, Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology, Ann N Y Acad Sci. 811 (1997) 60–67; discussion 67-69. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb51989.x.

[207] D.S. Bredt, S.H. Snyder, Nitric oxide: a physiologic messenger molecule, Annu Rev Biochem. 63 (1994) 175–195. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.001135.

[208] D. Jourd'heuil, K.M. Miranda, S.M. Kim, M.G. Espey, Y. Vodovotz, S. Laroux, C.T. Mai, A.M. Miles, M.B. Grisham, D.A. Wink, The oxidative and nitrosative chemistry of the nitric oxide/superoxide reaction in the presence of bicarbonate, Arch Biochem Biophys. 365 (1999) 92–100. https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1143.

[209] E.S.M. Ng, D. Jourd'heuil, J.M. McCord, D. Hernandez, M. Yasui, D. Knight, P. Kubes, Enhanced S-nitroso-albumin formation from inhaled NO during ischemia/reperfusion, Circ Res. 94 (2004) 559–565. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000117771.63140.D6.

[210] D. Tsikas, J. Sandmann, F.M. Gutzki, D.O. Stichtenoth, J.C. Frölich, Measurement of S-nitrosoalbumin by gas chromatography-mass spectrometry. II. Quantitative determination of S-nitrosoalbumin in human plasma using S-[15N]nitrosoalbumin as internal standard, J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 726 (1999) 13–24.

[211] V.A. Tyurin, S.X. Liu, Y.Y. Tyurina, N.B. Sussman, C.A. Hubel, J.M. Roberts, R.N. Taylor, V.E. Kagan, Elevated levels of S-nitrosoalbumin in preeclampsia plasma, Circ Res. 88 (2001) 1210–1215. https://doi.org/10.1161/hh1101.092179.

[212] J.S. Scharfstein, J.F. Keaney, A. Slivka, G.N. Welch, J.A. Vita, J.S. Stamler, J. Loscalzo, In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols, J Clin Invest. 94 (1994) 1432–1439. https://doi.org/10.1172/JCI117480.

[213] D. Tsikas, J. Sandmann, D. Holzberg, P. Pantazis, M. Raida, J.C. Frölich, Determination of S-nitrosoglutathione in human and rat plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection after precolumn derivatization with o-phthalaldehyde, Anal Biochem. 273 (1999) 32–40. https://doi.org/10.1006/abio.1999.4209.

[214] J. Bourgine, I. Billaut-Laden, M. Happillon, J.-M. Lo-Guidice, V. Maunoury, M. Imbenotte, F. Broly, Gene expression profiling of systems involved in the metabolism and the disposition of xenobiotics: comparison between human intestinal biopsy samples and colon cell lines, Drug Metabolism and Disposition. 40 (2012) 694–705. https://doi.org/10.1124/dmd.111.042465.

[215] J. Fogh, W.C. Wright, J.D. Loveless, Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors, J Natl Cancer Inst. 58 (1977) 209–214. https://doi.org/10.1093/jnci/58.2.209.

[216] M.J. Engle, G.S. Goetz, D.H. Alpers, Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes, Journal of Cellular Physiology. 174 (1998) 362–369. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199803)174:3<362::AID-JCP10>3.0.CO;2-B.

[217] J. Bonetti, Y. Zhou, M. Parent, I. Clarot, H. Yu, I. Fries-Raeth, P. Leroy, I. Lartaud, C. Gaucher, Intestinal absorption of S-nitrosothiols: Permeability and transport mechanisms, Biochemical Pharmacology. 155 (2018) 21–31. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.06.018.

[218] J. Kovacs-Nolan, P. Rupa, T. Matsui, M. Tanaka, T. Konishi, Y. Sauchi, K. Sato, S. Ono, Y. Mine, In Vitro and ex Vivo Uptake of Glutathione (GSH) across the Intestinal Epithelium and Fate of Oral GSH after in Vivo Supplementation, J. Agric. Food Chem. 62 (2014) 9499–9506. https://doi.org/10.1021/jf503257w.

[219] A. Meister, M.E. Anderson, Glutathione, Annual Review of Biochemistry. 52 (1983) 711–760. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431.

[220] M.T. Vincenzini, F. Favilli, M. Stio, T. Iantomasi, Intestinal glutathione transport system: a possible detoxication role, Biochim Biophys Acta. 1073 (1991) 571–579. https://doi.org/10.1016/0304-4165(91)90232-6.

[221] N. Ballatori, S.M. Krance, R. Marchan, C.L. Hammond, Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology, Molecular Aspects of Medicine. 30 (2009) 13–28. https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.004.

[222] P. Borst, C. de Wolf, K. van de Wetering, Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5, Pflugers Arch. 453 (2007) 661–673. https://doi.org/10.1007/s00424-006-0054-9.

[223] A.K. Bachhawat, A. Thakur, J. Kaur, M. Zulkifli, Glutathione transporters, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 1830 (2013) 3154–3164. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.018.

[224] C. Gaucher, A. Boudier, J. Bonetti, I. Clarot, P. Leroy, M. Parent, Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies, Antioxidants. 7 (2018) 62. https://doi.org/10.3390/antiox7050062.

[225] D.P. Jones, J.L. Carlson, P.S. Samiec, P. Sternberg, V.C. Mody, R.L. Reed, L.A. Brown, Glutathione measurement in human plasma. Evaluation of sample collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC, Clin Chim Acta. 275 (1998) 175–184. https://doi.org/10.1016/s0009-8981(98)00089-8.

[226] M. Deponte, Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes, Biochim Biophys Acta. 1830 (2013) 3217–3266. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018.

[227] D. Montero, C. Tachibana, J. Rahr Winther, C. Appenzeller-Herzog, Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated, Redox Biol. 1 (2013) 508–513. https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.10.005.

[228] M.C. dos S. Tenório, N.G. Graciliano, F.A. Moura, A.C.M. de Oliveira, M.O.F. Goulart, N-Acetylcysteine (NAC): Impacts on Human Health, Antioxidants. 10 (2021) 967-. https://doi.org/10.3390/antiox10060967.

[229] T. Liu, F. Huo, J. Li, J. Chao, Y. Zhang, C. Yin, A fast response and high sensitivity thiol fluorescent probe in living cells, Sensors and Actuators B: Chemical. 232 (2016) 619–624. https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.04.014.

[230] K. Zhang, Z. Fan, Y. Ding, J. Li, H. Li, Thiol-sensitive probe enables dynamic electrochemical assembly of serum protein for detecting SARS-Cov-2 marker protease in clinical samples, Biosensors and Bioelectronics. 194 (2021) 113579. https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113579.

Résumé

FRANCAIS

Les thiols jouent un rôle majeur dans le domaine biomédical et agroalimentaire. Ils sont impliqués par exemple dans l'homéostasie redox ou dans de nombreuses activités biologiques ainsi que comme donneurs et transporteurs d'oxyde nitrique (formation de S-nitrosothiols). En effet, les S-nitrosothiols (RSNO) augmentent la demi-vie du NO et son transport vers son site d'action. La compréhension de la pharmacodynamique et des rôles des RSH/RSNO reste pour l'instant un véritable défi. En effet, la forte réactivité (oxydation et réduction) des RSH, associée à une faible stabilité, conduit à de nombreuses réactions possibles. Cependant, leur détection et leur quantification restent un défi. Le décodage du rôle des RSH/RSNO nécessite le développement d'une méthodologie de quantification en adéquation avec les propriétés des thiols.

Pour pallier

ces lacunes, des méthodes associées aux nanomatériaux ont été développées en lien avec leurs propriétés optiques et leur forte réactivité vis-à-vis des thiols. Malgré une augmentation de la sensibilité (jusqu'au femtomolaire) et de la sélectivité des thiols, l'utilisation de nanomatériaux a conduit à des problèmes de stabilité. Ainsi, des matériaux nanostructurés devraient être développés pour éviter les inconvénients des nanomatériaux colloïdaux et devraient apporter de nouvelles propriétés aux matériaux traditionnels.

Dans ce but, des membranes cellulosiques ont été nanostructurées avec des nanoparticules d'or immobilisées (AuNP) pour capturer sélectivement les thiols. Le dispositif a été couplé à une méthode HPLC-UV déjà validée, développée pour l'identification et la quantification des thiols, conformément aux instances réglementaires (ICH Q2R1) 1. Ces dispositifs ont d'abord été optimisés et caractérisés en termes de nanostructuration (nombre de AuNP intégrés) et d'adsorption/désorption des thiols avec une stratégie en deux étapes basées sur l'affinité quasi-covalente entre l'or et le thiol (40-50 kcal/mol).

Après une étude de preuve de concept sur deux thiols modèles (N-acétylcystéine (NAC) et glutathion réduit (GSH)) et leurs homologues S-nitrosés, le dispositif a été appliqué pour suivre la perméabilité du RSNO à travers un modèle de barrière intestinale in vitro (cellules Caco-2 dans un système Transwell®). Ceci a conduit à une identification et une quantification globale des espèces impliquées dans les mécanismes de franchissement de la barrière. Le dispositif a également été utilisé pour les thiols volatils dans différentes boissons en utilisant la quantification et l'identification par GC-MS.

Pour la première fois à notre connaissance, un dispositif nanostructuré a été proposé pour la capture, l'identification et la quantification des thiols. Ce dispositif, facile à manipuler, a permis de surmonter les effets de matrice et d'éviter les étapes de prétraitement. De plus, le grand facteur de concentration induit par ce dispositif a permis d'atteindre des LOD compatibles avec des quantifications de traces.

ANGLAIS

Thiols have a pivotal role in the biomedical and agri-food field. They are involved for example in redox homeostasis or many biologicals activities and as nitric oxide donors and carriers (formation of *S*-nitrosothiols). In fact, *S*-nitrosothiols (RSNO) increase NO half-life and transport to its action site. The understanding of RSH/RSNO pharmacodynamics and roles remains a real challenge for now. Indeed, strong reactivity (oxidation and reduction) of RSH, associated to a poor stability, lead to many possible reactions. However, their detection and quantification remain challenging. The decoding of RSH/RSNO role needs the development of a methodology of quantification in adequation with thiol properties.

To overcome these shortcomings, nanomaterials associated methods were developed in connection with their optical properties and high reactivity towards thiols. Despite an increase of sensitivity (down to femtomolar) and thiol selectivity, the use of nanomaterial lead to stability issues. Thus, nanostructurated materials should be developed to avoid drawbacks of colloidal nanomaterials and should provide new properties to traditional materials.

For this purpose, cellulosic membranes were nanostructurated with immobilized gold nanoparticles (AuNP) to selectively capture thiols. The device was coupled with an already validated HPLC-UV method developed for thiol identification and quantification, according to regulatory instances (ICH Q2R1) 1. These devices were first optimized and characterized in term of nanostructuration (number of embedded AuNP) and thiol adsorption/desorption with a two-step strategy based on near-covalent affinity between gold and thiol (40-50 kcal/mol).

After a proof of concept study on two model thiols (N-acetylcysteine (NAC) and reduced glutathione (GSH)) and their S-nitrosated counterparts, the device was applied to follow RSNO permeability through an in vitro intestinal barrier model (Caco-2 cells in a Transwell® system). This led to a global identification and quantification of species involved in crossing barrier mechanisms. The device was also used for volatile thiols in different beverages using GC-MS quantification and identification.

For the first time to our knowledge, a nanostructurated device was proposed for thiol capture, identification and quantification. This device was easy to handle overcame matrix effects and avoided pre-treatment steps. Moreover, the large concentration factor induced by this device allowed reaching LOD compatible with trace quantifications.