



HAL
open science

**Caractérisation physicochimique du S-nitrosoglutathion,
molécule à potentiel thérapeutique cardiovasculaire :
Vers l'établissement d'une monographie**

Marianne Parent

► **To cite this version:**

Marianne Parent. Caractérisation physicochimique du S-nitrosoglutathion, molécule à potentiel thérapeutique cardiovasculaire : Vers l'établissement d'une monographie. Sciences pharmaceutiques. 2012. hal-01732363

HAL Id: hal-01732363

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732363>

Submitted on 14 Mar 2018

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.



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 : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

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>

**UNIVERSITE DE LORRAINE
2012**

FACULTE DE PHARMACIE

**MEMOIRE du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de PHARMACIE SPECIALISEE**

Soutenu devant le Jury Interrégional
Le 26 Septembre 2012

par **Marianne PARENT**

née le 12 Juin 1986

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE**

**CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE DU S-NITROSOGLUTATHION,
MOLECULE A POTENTIEL THERAPEUTIQUE CARDIOVASCULAIRE :
VERS L'ETABLISSEMENT D'UNE MONOGRAPHIE**

Membres du Jury

Président : Pr Philippe MAINCENT, Professeur des Universités, Nancy

Juges : Dr Ariane BOUDIER, Directrice de thèse, Maître de Conférences, Nancy

Dr Laurent HAVARD, Praticien Hospitalier, Paris

Pr Jean-Yves JOUZEAU, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Nancy

Dr Nguyen TRAN, Maître de Conférences, Nancy

Dr Jean-Claude WILLEMIN, Maître de Conférences, Praticien Hospitalier, Reims

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2012-2013

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Jean-Yves JOUZEAU

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du Collège d'Enseignement

Pharmaceutique Hospitalier :

Jean-Michel SIMON

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :

Raphaël DUVAL/Bertrand RIHN

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

Section
CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Yves JOUZEAU	80	Bioanalyse du médicament
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Alain NICOLAS	80	Chimie analytique et Bromatologie
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Raphaël DUVAL ☒	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE ☒	87	Biologie cellulaire, Hématologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Max HENRY	87	Botanique, Mycologie
Pierre LABRUDE	86	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Julien PERRIN ☒	82	Hématologie biologique
Marie SOCHA ☒	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique
Nathalie THILLY	81	Santé publique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Mariette BEAUD	87	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie

ENSEIGNANTS (suite)	Section CNU*	Discipline d'enseignement
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT ☒	87	Biologie générale, Biochimie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Caroline GAUCHER-DI STASIO	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Frédéric JORAND	87	Environnement et Santé
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Blandine MOREAU	86	Pharmacognosie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE ☒	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDICAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

☒ En attente de nomination

**Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



**« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT
ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR
AUTEUR ».**

REMERCIEMENTS

Ariane BOUDIER

C'est un grand honneur pour moi que tu aies accepté d'être ma directrice de thèse, car c'était une première pour moi, mais également pour toi. J'espère que tu ne regrettes pas d'avoir vécu cette aventure avec moi, et qu'on aura autant de plaisir à discuter sur la thèse d'Université à venir. Tous mes remerciements pour ton sourire au quotidien, tes explications patientes et ta ténacité pour m'amener toujours plus loin sur les voies impénétrables de la Recherche.

Philippe MAINCENT

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de l'équipe CITHEFOR EA 3452, et de m'avoir fait profiter tout au long de ce travail de votre expérience et de vos conseils tant personnels que scientifiques.

Jean-Yves JOUZEAU

Merci d'avoir accepté de participer à ce jury, ainsi que pour vos précieux conseils comme responsable de la filière Pharmacie Spécialisée de l'internat dans l'inter-région, dans la tâche pas toujours aisée de concilier internat et recherche.

Nguyen TRAN

Je vous remercie vivement d'avoir accepté de participer à ce jury. J'espère que ce sera l'occasion de fructueuses discussions sur les S-nitrosothiols et leurs propriétés.

Jean-Claude WILLEMIN

Je vous remercie de me faire l'honneur d'avoir accepté de juger ce travail avec un regard extérieur.

Laurent HAVARD

Je garde un excellent souvenir de mon année passée en tant qu'externe à l'Hôpital Européen Georges Pompidou : c'est en grande partie grâce à ton accueil et à la bonne humeur de toute l'équipe (particulièrement Renaud, Hélène et Nicolas). C'était un plaisir pour moi de découvrir tous ces aspects du métier de pharmacien, tant sur le plan humain que professionnel. C'est avec toi que j'ai fourbi mes premières armes chromatographiques, et je suis heureuse que tu puisses aujourd'hui participer à ce jury afin de constater mes progrès.

Pierre LEROY

Merci pour avoir rafraîchi et consolidé mes connaissances en chromatographie liquide avec rigueur scientifique mais toujours bonne humeur, ainsi que pour votre regard pertinent sur tous les aspects de mon travail. Sachez que je m'efforce de répondre à vos questions quotidiennes avec autant de soin que s'il s'agissait d'une soutenance...

Igor CLAROT

Je te remercie pour ta patience à nous familiariser avec les normes réglementaires (Pharmacopée et ICH), ainsi que pour tes conseils sur la validation des méthodes.

Raphaël SCHNEIDER

Merci pour ta disponibilité et ton accueil au sein du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (UPR 3349), ainsi que de ta collaboration pour la synthèse des différents lots de

S-nitrosoglutathion. Tu m'as presque réconciliée avec la chimie organique ! (au moins avec les organiciens).

Tous les membres de l'EA 3452

Merci à toutes et à tous, autant pour les discussions scientifiques que pour la bonne ambiance générale. Une dédicace particulière à Fatima DAHBOUL pour son aide dans les expériences constituant ce travail.

Mes co-internes

Particulièrement Lakshmi, Sandra, Anthony, Mathilde, Charlotte : merci pour toutes ces soirées « orageuses » ou « célestes » passées à refaire le monde, et spécialement celui de la pharmacie. Un immense merci aux différents bureaux de l'AIPHN (Association des Internes en Pharmacie des Hôpitaux de Nancy) pour m'avoir représentée dans les innombrables commissions et avoir défendu mes intérêts avec fougue.

Le club des « M » (Mame, Mélodie, Marielle et Laetitia car il faut toujours une exception qui confirme la règle)

Que serais-je devenue en arrivant à Nancy sans votre joie de vivre ? Merci pour votre pêche dans nos rencontres dansantes hebdomadaires et pour nos longues discussions lors des soirées entre filles.

Jimmy

Merci pour ta patience infinie chaque semaine devant mes minces progrès sur mon piano. Cela a été une grande joie pour moi de m'y remettre après toutes ces années, même si je n'y consacre pas autant de temps que je le souhaiterais.

Ma famille et mes amis parisiens ou exilés

Même si l'on ne s'est pas vu autant que je l'aurais voulu ces dernières années, cela ne m'a pas empêché de penser énormément à vous, et de savourer chaque moment passé ensemble. Une mention spéciale pour tous ceux qui ont accepté de relire le manuscrit en tant qu'innocents cobayes, de façon objective (et impitoyable !). Je vous souhaite à tous le meilleur, tant sur le plan personnel que professionnel !

Nicolas

Je ne peux rien ajouter ici que tu ne saches déjà. Merci pour tout. J'espère simplement que l'avenir se montrera plus clément avec nous.

A tous ceux qui un jour ou l'autre m'ont dit « Mon Dieu, mais les études de pharmacie c'est très long et très difficile, tu ne te rends pas compte ! », je voudrais dire : « Bien sûr, c'est long. Certainement, il existe d'autres formations beaucoup plus courtes et faciles. Mais combien aussi passionnantes, aussi variées, et qui offrent une aussi grande richesse de métiers à la fin ? Personnellement, je ne regrette rien, et si c'était à refaire, je recommencerais (mais en mieux, bien évidemment !)».

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	1
LISTE DES TABLEAUX	3
LISTE DES ABREVIATIONS ET DES ESPECES CHIMIQUES	4
INTRODUCTION	7
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	11
PARTIE I : L'OXYDE NITRIQUE (*NO)	12
1. GENERALITES SUR L'OXYDE NITRIQUE	12
1.1. DECOUVERTE	12
1.2. PRODUCTION PAR LES NO SYNTHASES (NOS)	13
1.3. *NO ET SIGNALISATION	16
1.3.1. Signalisation GMPc-dépendante	17
1.3.2. Signalisation GMPc-indépendante : rôle des ions peroxynitrite	21
1.4. IMPLICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES	22
1.4.1. Au niveau du système vasculaire.....	23
1.4.2. Au niveau du système nerveux central	24
1.4.3. Au niveau du système nerveux périphérique.....	25
1.4.4. Au niveau du processus de cancérogenèse, de l'inflammation et du système immunitaire ...	25
1.4.5. Au niveau du système respiratoire.....	27
1.4.6. Au niveau de l'oeil	27
1.4.7. Au niveau du système endocrinien (diabète).....	28
2. VOIES PHYSIOLOGIQUES DE TRANSPORT DE *NO	29
2.1. S-NITROSTHIOLES (RSNO)	29
2.1.1. Généralités	29
2.1.2. La S-nitrosoalbumine.....	31
2.1.3. La S-nitrosohémoglobine.....	32
2.1.4. Le S-nitrosoglutathion et la S-nitrosocystéine.....	33
2.1.5. La S-nitrosohomocystéine	35
2.2. IONS NITRITE	36
2.3. IONS NITRATE	37

3.	MODULATION DE \cdotNO EN THERAPEUTIQUE CARDIOVASCULAIRE.....	39
3.1.	DONNEURS DE \cdot NO COMMERCIALISES EN FRANCE	39
3.1.1.	Donneurs directs	42
3.1.2.	Donneurs indirects (dépendants du métabolisme)	42
3.2.	PRINCIPAUX DONNEURS D'OXYDE NITRIQUE EN DEVELOPPEMENT	44
3.3.	AUTRES POSSIBILITES : MODULATEURS DES NOS	44
3.3.1.	Substrats.....	44
3.3.2.	Inhibiteurs	45
3.3.3.	Autres stratégies.....	45
3.4.	NITRATES ORGANIQUES : PHENOMENE DE TOLERANCE	46
 PARTIE II : LE S-NITROSOGLUTATHION (GSNO).....		52
1.	GENERALITES SUR LE GSNO	52
1.1.	AVANTAGES.....	52
1.1.1.	De la classe des S-nitrosothiols.....	52
1.1.2.	Du S-nitroso glutathion par rapport aux autres S-nitrosothiols	52
1.2.	VOIES D'OBTENTION DU S-NITROSOGLUTATHION	55
1.2.1.	Par réaction avec le nitrite de sodium.....	55
1.2.2.	Par réaction avec \cdot NO gaz	55
1.2.3.	Par transnitrosation avec un autre nitrosothiol	56
2.	DEGRADATION DU GSNO.....	57
2.1.	PARAMETRES INFLUENÇANT LA RUPTURE HOMOLYTIQUE DE LA LIAISON S-NO	57
2.1.1.	Lumière.....	57
2.1.2.	Température.....	58
2.2.	PARAMETRES INFLUENÇANT LA RUPTURE HETEROLYTIQUE DE LA LIAISON S-NO	58
2.2.1.	Ions métalliques	58
2.2.2.	Réducteurs.....	60
2.3.	AUTRES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES INFLUENÇANT LA DEGRADATION DES RSNO	61
2.3.1.	pH	61
2.3.2.	Dioxygène	62
2.4.	DEGRADATION ENZYMATIQUE DES S-NITROSOTHIOLS	63
2.4.1.	Thiorédoxines	63
2.4.2.	Protéines disulfure isomérasés	65
2.4.3.	γ -glutamyltransférase.....	65
3.	METHODES D'ETUDE DES S-NITROSOTHIOLS	67
3.1.	METHODES DIRECTES DE DOSAGE DES S-NITROSOTHIOLS.....	67
3.1.1.	Spectrophotométrie UV-visible	67

3.1.2.	Biotin switch	67
3.2.	METHODES INDIRECTES DE DOSAGE DES RSNO BASEES SUR LA DETECTION D'IONS NITRITE	68
3.2.1.	Spectrocolorimétrie : Saville-Griess.....	68
3.2.2.	Spectrofluorimétrie	70
3.3.	METHODES INDIRECTES DE DOSAGE DES RSNO BASEES SUR LA DETECTION DE [•] NO	71
3.3.1.	Electrochimie	71
3.3.2.	Résonance paramagnétique électronique	72
3.3.3.	Chimiluminescence.....	73
3.4.	METHODES DE SEPARATION ET D'IDENTIFICATION	74
3.4.1.	Techniques chromatographiques	74
3.4.2.	Electrophorèse capillaire	75
4.	ESSAIS CLINIQUES AVEC LE GSNO.....	78
4.1.	GENERALITES SUR LES ESSAIS CLINIQUES	78
4.1.1.	Définition	78
4.1.2.	Législation.....	78
4.1.3.	Les différentes phases de la recherche clinique	79
4.2.	ESSAIS CLINIQUES AVEC LE GSNO	80
<i>PARTIE III : REFERENTIELS PHARMACEUTIQUES</i>		83
1.	NORMES ISO	83
2.	BONNES PRATIQUES.....	83
3.	PHARMACOPEES	84
4.	CONFERENCE INTERNATIONALE D'HARMONISATION	85
<i>PARTIE EXPERIMENTALE</i>		87
1.	MATERIEL ET METHODES.....	89
1.1.	REACTIFS.....	89
1.2.	SYNTHESE DU GSNO	89
1.3.	INSTRUMENTATION	90
1.4.	SPECTROMETRIE : METHODES DE GRIESS ET SAVILLE-GRIESS	90
1.5.	SYSTEME CLHP.....	91
1.6.	CALCUL DES DIFFERENTS PARAMETRES.....	92
2.	RESULTATS.....	92
2.1.	IDENTIFICATION GLOBALE DE LA STRUCTURE	92
2.2.	CARACTERISATION DE LA LIAISON S-NO	97

3.	DEVELOPPEMENT ET SPECIFICITE DE LA METHODE CLHP	100
4.	DETERMINATION DU CONTENU EN GSNO	102
5.	PROFIL D'IMPURETES	103
6.	ETUDES DE STABILITE : DETERMINATION DES CONDITIONS DE STOCKAGE OPTIMALES....	106
	<i>DISCUSSION</i>	<i>111</i>
	<i>CONCLUSION</i>	<i>115</i>
	<i>ANNEXE</i>	<i>119</i>
	<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	<i>121</i>

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Production d'oxyde nitrique ($\cdot\text{NO}$) par les NO synthases (NOS).....	14
Figure 2 : Signalisation par l'oxyde nitrique	17
Figure 3 : Implications cardiovasculaires de la signalisation GMPc-dépendante	18
Figure 4 : Représentation schématique de l'activation de la guanylate cyclase soluble par l'oxyde nitrique.....	19
Figure 5 : Vasodilatation produite par la signalisation GMPc-dépendante.....	20
Figure 6 : Lien entre la rupture de l'homéostasie de l'oxyde nitrique et des situations pathologiques.....	23
Figure 7 : Equilibre entre les formes de transport de l'oxyde nitrique.....	32
Figure 8 : Structures du S-nitrosoglutathion, de la S-nitrosocystéine et de la S-nitrosocystéinyglycine	34
Figure 9 : Equilibre entre S-nitrosoglutathion, S-nitrosocystéinyglycine et S-nitrosocystéine	35
Figure 10 : Structures de l'homocystéine, de la S-nitrosohomocystéine et de l'homocystéine thiolactone	36
Figure 11 : Structures des donneurs d'oxyde nitrique commercialisés en France	40
Figure 12 : Métabolisme des nitrates organiques et tolérance	49
Figure 13 : Structures de la pénicillamine, de la N-acétylcystéine et des S-nitrosothiols correspondants	53
Figure 14 : Structure du complexe théoriquement formé entre le glutathion oxydé et l'ion cuivre (II).....	59
Figure 15 : Complexe formé entre la N-acétylpénicillamine et le cuivre.....	60
Figure 16 : Formes de résonance et structure chimique des S-nitrosothiols	61
Figure 17 : Mécanisme proposé pour la dégradation des S-nitrosothiols par le dioxygène ...	62
Figure 18 : Schéma de la réaction d'un S-nitrosothiol avec la thiorédoxine	64
Figure 19 : Principe du biotin-switch pour la détection d'une protéine S-nitrosée	68
Figure 20 : Principe de la réaction de Griess.....	69
Figure 21 : Spectrofluorimétrie : structure des sondes DAN et NAT	70
Figure 22 : Spectrofluorimétrie : DAF-2 diacétate	71

Figure 23 : Principe de l'électrophorèse capillaire et mobilité des espèces en fonction de leur charge.....	76
Figure 24 : Spectres de masse du GSNO avec une détection A) en mode positif et B) en mode négatif.....	93
Figure 25 : Spectre ¹ H RMN du GSH.....	95
Figure 26 : Spectre ¹ H RMN du GSNO.....	96
Figure 27 : Spectre UV-visible du GSNO.....	97
Figure 28 : Spectre de dichroïsme circulaire du GSNO.....	98
Figure 29 : Spectres infrarouges du GSH et du GSNO.....	99
Figure 30 : Chromatogrammes représentatifs.....	101
Figure 31 : Etudes de stabilité des solutions de GSNO 10 ⁻² M dans différentes conditions..	108
Figure 32 : Schéma récapitulant les recommandations concernant la synthèse de GSNO...	110

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des différentes isoformes de NOS présentes chez les Mammifères.....	15
Tableau 2 : Concentrations physiologiques chez l'Homme des thiols précurseurs des S-nitrosothiols	30
Tableau 3 : Caractéristiques des formes de transport de l'oxyde nitrique chez l'Homme.....	30
Tableau 4 : Principales caractéristiques des donneurs d'oxyde nitrique commercialisés en France.....	41
Tableau 5 : Caractéristiques des trois isoformes de thiorédoxines chez les Mammifères.....	63
Tableau 6 : Bilan des méthodes de dosage des S-nitrosothiols.....	77
Tableau 7 : Utilisation du S-nitrosoglutathion dans des essais cliniques	81
Tableau 8 : Résultats de l'analyse élémentaire du GSNO synthétisé à façon.....	94
Tableau 9 : Paramètres chromatographiques obtenus lors de l'analyse de GSNO à 220 nm	104
Tableau 10 : Droites d'étalonnage pour les ions nitrite, nitrate et le GSSG	105
Tableau 11 : Formulations galéniques incorporant GSNO.....	117

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES ESPECES CHIMIQUES

AlbSNO : S-nitrosoalbumine

ALDH-2 : Aldéhyde déshydrogénase mitochondriale

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ANR : Agence nationale de la recherche

BH₄ : Tetrahydrobioptérine

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CysGlyNO : S-nitrosocystéinyglycine

CysNO : S-nitrosocystéine

EDRF : *Endothelium-derived relaxing factor*

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

ERA : Espèces réactives de l'azote

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

GCs : Guanylate cyclase soluble

GGT : γ -glutamyltransférase (γ -glutamyltranspeptidase)

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Disulfure de glutathion

GSNO : S-nitrosoglutathion

HbSNO : S-nitrosohémoglobine

HomoCysNO : S-nitrosohomocystéine

ICH : *International Conference on Harmonisation*

ISDN : Dinitrate d'isosorbide

ISMN : 5-mononitrate d'isosorbide (mononitrate d'isosorbide)

ISO : *International Standard Organization*

LOD : Limite de détection (*limit of detection*)

LOQ : Limite de quantification (*limit of quantification*)

Met-Hb : Méthémoglobine

NACNO : *S*-nitroso-*N*-acétylcystéine

NANC : Non adrénérgique non cholinérgique

NAP : *N*-acétylpénicillamine

NOS : *Nitric oxide synthase* (eNOS : endothéliale ; iNOS : inductible ; nNOS : neuronale)

NTG : Nitroglycérine

PDE : Phosphodiésterase

PDI : Protéine disulfure isomérase

PKA/PKG : Protéine kinase AMPc/GMPc dépendante

RSNO : *S*-nitrosothiols

SNAP : *S*-nitroso-*N*-acétylpénicillamine

SNP : Nitroprussiate de sodium

TBAHS/TBA : Hydrogénosulfonate de tétrabutylammonium/tétrabutylammonium

Trx : Thiorédoxine

$\cdot\text{NO}$: Oxyde nitrique (monoxyde d'azote)

NO^+ : Ion nitrosonium

NO^- : Ion nitroxyl

NO_2^- : Ion nitrite

NO_3^- : Ion nitrate

$\text{O}_2^{\cdot-}$: Radical superoxyde

ONOO^- : Anion peroxy nitrite

INTRODUCTION

L'oxyde nitrique (NO) est un messager physiologique lipophile à très courte demi-vie (quelques secondes) qui régule de nombreux processus comme la vasodilatation, la respiration, la migration cellulaire et la réponse immunitaire. Une dérégulation de sa signalisation entraîne des conséquences pathologiques : sa signalisation est par exemple modifiée dans un certain nombre de pathologies cardiovasculaires comme l'angine de poitrine. Il existe actuellement des médicaments à visée symptomatique libérant NO après administration. Néanmoins ils présentent des inconvénients : une faible demi-vie après administration par voie orale, même après amélioration par des formes galéniques appropriées, nécessitant généralement plusieurs prises quotidiennes. Par ailleurs, des effets secondaires (comme une hypotension ou des céphalées) sont très fréquents, surtout en début de traitement. Enfin, administrés de façon continue, ils entraînent le développement d'une tolérance (perte d'efficacité). Celle-ci peut être retardée voire évitée par l'instauration d'une fenêtre thérapeutique, c'est-à-dire une période libre de traitement d'au moins 8 h.

Parmi les molécules à l'étude pour améliorer l'arsenal thérapeutique cardiovasculaire, la classe des *S*-nitrosothiols est particulièrement intéressante. En effet, le mécanisme de libération de NO à partir de ces molécules est différent de celui des médicaments existants, ce qui permettrait de ne pas entraîner de tolérance. La synthèse de ces molécules en milieu aqueux est facile et rapide, mais la réaction peut produire des impuretés en quantité non négligeable, ce qui peut avoir un impact sur les expériences réalisées ensuite. Or un *S*-nitrosothiol, le *S*-nitrosoglutathion (GSNO), a déjà été administré à une centaine de patients dans différentes études cliniques de phase I ou II, sans que le produit administré n'ait été pleinement caractérisé. En tant que pharmaciens, il nous a semblé particulièrement important de remédier à cet état de fait, et de proposer une caractérisation et un contrôle qualité rapide et efficace du *S*-nitrosoglutathion produit à façon.

La partie bibliographique de ce travail reprend ces différents points et présente donc dans une première partie NO ainsi que ses implications physiopathologiques et sa signalisation, puis dans une seconde partie le principe actif d'intérêt, le GSNO, et ses caractéristiques. Enfin, une brève description est faite des principaux référentiels utilisables pour la caractérisation du produit, telle qu'elle peut être envisagée d'un point de vue pharmaceutique.

Par la suite, la partie expérimentale de ce travail présente la caractérisation du GSNO obtenue par fabrication à façon, et la comparaison de ce produit avec le produit actuellement commercialisé (par un fournisseur de produits chimiques). Grâce à différentes méthodes, nous montrons que le GSNO obtenu à façon (nitrosation du glutathion par les ions nitrite en milieu aqueux acide, suivi d'un processus de précipitation et lavage) possède une pureté comparable à celle du produit commercialisé. Les impuretés présentes sont également comparables en nature et en quantité à celles du produit commercial. En revanche, ces impuretés sont présentes en bien plus forte concentration en l'absence de l'étape de précipitation et lavage. Une caractérisation rapide peut être effectuée par spectrophotométrie ou colorimétrie et peut être complétée par une analyse en chromatographie liquide haute performance en phase inverse avec contre-ion. Enfin, des recommandations sont données afin d'optimiser la conservation du S-nitrosoglutathion en poudre ou en solution. L'ensemble de ce travail pourrait représenter la base d'une future monographie pour cette molécule.

Cette étude s'inscrit au sein des travaux de l'équipe d'accueil « CITHEFOR EA 3452 », dans le cadre du projet financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) intitulé NanoSNO « Formulation nanoparticulaire de S-nitrosothiols en vue d'améliorer la biodisponibilité de l'oxyde nitrique. Evaluation toxicologique et pharmacologique ». Ce projet vise en premier lieu à synthétiser des S-nitrosothiols à cœur N-acétylcystéine, modifiés en vue d'augmenter leur stabilité et leur lipophilie, à les caractériser et à étudier leur stabilité et leur réactivité *in vitro* (tâche 2). En second lieu ces molécules seront intégrées dans différentes formulations galéniques (tâche 3). Enfin, les molécules et leurs formulations seront évaluées d'un point de vue toxicologique (tâche 4) et pharmacologique (tâche 5). Des discussions scientifiques animées par les responsables de la tâche 1 permettent de coordonner l'ensemble de ces axes.

En conclusion, ce travail effectué sur le GSNO fournit les bases nécessaires à une caractérisation rapide et efficace des futures molécules obtenues dans la tâche 2.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE I : L'OXYDE NITRIQUE ($\cdot\text{NO}$)

1. GENERALITES SUR L'OXYDE NITRIQUE

1.1. DECOUVERTE

L'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote ($\cdot\text{NO}$) est un gaz de nature radicalaire connu depuis longtemps, notamment comme polluant (gaz d'échappement). Son rôle de messager physiologique a été mis en évidence à la fin des années 80 par la convergence de quatre axes de recherche, démontrant ainsi le rôle ubiquitaire de la molécule.

Le premier axe de recherche concernait l'étude de la carcinogenèse et plus précisément le métabolisme des nitrosamines. Les observations effectuées montraient une production d'ions nitrate (NO_3^-) par le corps (quantité excrétée supérieure à la quantité ingérée), fortement augmentée par l'injection de toxines bactériennes chez l'animal [1] ou par la fièvre chez l'homme [2]. Cette production n'était pas due à des bactéries, mais aux macrophages activés [3], capables d'oxyder le résidu guanidinium de la L-arginine [4] pour générer la L-citrulline et un composé non identifié capable de générer des nitrosamines [5]. Ce composé devait être un oxyde d'azote plus réactif que les ions nitrite (NO_2^-) ou nitrate, considérés comme ses produits de dégradation.

Parallèlement, il a été démontré *in vitro* que la L-arginine était un précurseur nécessaire et suffisant dans le milieu pour déclencher la cytotoxicité médiée par des macrophages activés [6]. Une modification du résidu guanidinium de cette molécule bloquait la cytotoxicité de même que la production des ions nitrite [7]. Les ions nitrite ou nitrate ne déclenchaient pas la cytotoxicité, excepté en milieu acide (condition dans laquelle des ions nitrite peuvent générer $\cdot\text{NO}$ [8]). Par ailleurs, la cytotoxicité observée précédemment pouvait être mimée par l'utilisation de $\cdot\text{NO}$ exogène [9], ou inhibée par la présence de « piègeurs » de $\cdot\text{NO}$ tels que l'ion superoxyde ou la myoglobine [8].

Le troisième axe de recherche portait sur le domaine cardiovasculaire. En 1980 Furchgott et Zawadzki [10] ont montré que l'endothélium était indispensable à l'action vasodilatatrice de l'acétylcholine sur des anneaux d'artères isolés. La stimulation des cellules endothéliales entraînait la libération d'une substance, que les auteurs baptisèrent

endothelium-derived relaxing factor (EDRF). La nature chimique de l'EDRF fut découverte en 1987 quand Furchgott et Ignarro indiquèrent indépendamment que l'EDRF et $\bullet\text{NO}$ ont des propriétés biologiques très similaires [11]. Moncada et coll. démontreront peu après que $\bullet\text{NO}$ est impliqué dans l'action biologique de l'EDRF et que son précurseur est la L-arginine [12]. En parallèle, les travaux de Murad et coll. sur la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) permettront d'élucider le mécanisme par lequel $\bullet\text{NO}$ permet la relaxation des cellules musculaires lisses [13].

Finalement, la liste des types cellulaires capables de produire $\bullet\text{NO}$ a été élargie à certains neurones des systèmes nerveux central et périphérique. En effet, la stimulation par des acides aminés excitateurs de certaines zones du cerveau (cerebellum) [14] ou de neurones non adrénergiques non cholinergiques (NANC) du système nerveux périphérique [15], conduit à la libération d'un médiateur labile avec des propriétés pharmacologiques proches de $\bullet\text{NO}$, dont la sécrétion est bloquée par des analogues de L-arginine modifiés.

Ainsi, en quelques années, des rôles physiologiques majeurs de l'oxyde nitrique ont été mis en évidence dans des domaines aussi variés que l'immunologie, la cardiologie ou la neurologie. Le potentiel de cette petite molécule apparaît donc immense, et a éveillé l'attention de la communauté scientifique. Le magazine Science a notamment déclaré en 1992 $\bullet\text{NO}$ « molécule de l'année » [16] et le prix Nobel de physiologie et médecine a été attribué en 1998 à Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro et Ferid Murad pour leurs travaux relatifs au monoxyde d'azote.

1.2. PRODUCTION PAR LES NO SYNTHASES (NOS)

La production physiologique de $\bullet\text{NO}$ se fait grâce à des enzymes comportant un groupement hémique appartenant à la famille des oxygénases, les *nitric oxide synthases* (NOS), décrites pour la première fois en 1989 [17]. La forme active de ces enzymes nécessite deux monomères associés avec deux calmodulines (protéine liant le calcium Ca^{2+}), ainsi que des cofacteurs : (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobioptérine (BH_4), flavine adénine dinucléotide (FAD), flavine mononucléotide (FMN) et protoporphyrine IX avec un atome de fer (Fe(II)) (hème). En présence de dioxygène (O_2) et de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

réduit (NADPH), les enzymes catalysent l'oxydation de la L-arginine pour former $\cdot\text{NO}$, la L-citrulline et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP). La réaction se fait en deux étapes avec un intermédiaire N^{ω} -hydroxy-L-arginine et la mise en jeu de cinq électrons (Figure 1). En l'absence du cofacteur BH_4 , le transfert des électrons lors de la réaction enzymatique est perturbé et de l'ion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) est produit au lieu de $\cdot\text{NO}$ [18].

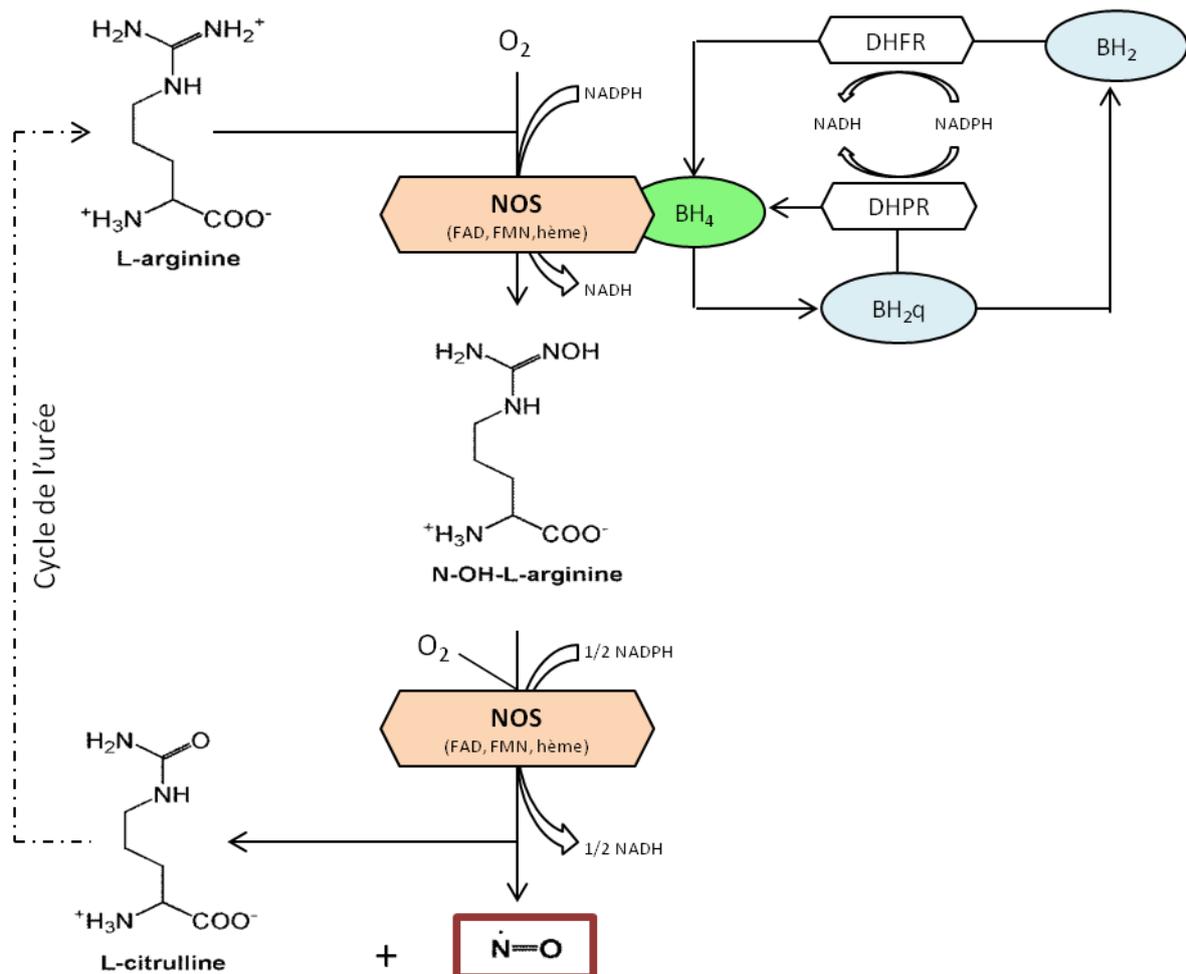


Figure 1 : Production d'oxyde nitrique ($\cdot\text{NO}$) par les NO synthases (NOS). DHFR : dihydrofolate réductase ; DHPR : dihydroptéridine réductase ; BH_2 : dihydrobioptérine ; BH_2q : dihydrobioptérine quinonoïde.

Il existe trois isoformes de NOS, codées par des gènes différents. Elles ont été nommées en fonction du lieu de leur première identification ou de leur principale caractéristique : la NOS neuronale (nNOS ou NOS I), la NOS inducible (iNOS ou NOS-II) et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS-III). Les principales informations les concernant sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques des différentes isoformes de NOS présentes chez les Mammifères

	eNOS	nNOS	iNOS
Localisation cellulaire	Cellules endothéliales Cardiomyocytes Plaquettes Neurones	Neurones Cellules musculaires lisses vasculaires Neutrophiles	Monocytes et macrophages Cellules musculaires lisses vasculaires Hépatocytes, cardiomyocytes Neurones et cellules gliales
Gène	7q35-36	12q24.2-31	17q11.2-12
Localisation subcellulaire	Appareil de Golgi Membrane plasmique Cavéoles	Cytosol Réticulum endoplasmique Réticulum sarcoplasmique Cavéoles Densités post-synaptiques	Phagosomes
Caractéristiques	Calcium-dépendante Constitutionnelle (Inductible)		Calcium-indépendante (régulation transcriptionnelle) Inductible
Quantité et durée de production de *NO	Faible (pmoles) Pendant quelques secondes ou quelques minutes		Forte (nmoles) Pendant quelques heures ou plusieurs jours
Fonctions principales	Homéostasie vasculaire antagonisme aux vasoconstricteurs du système sympathique et du système rénine-angiotensine Inhibition de l'adhésion des leucocytes et des plaquettes aux parois vasculaires	Système nerveux central : Neurotransmetteur Système nerveux périphérique : tractus gastro-intestinal, érection	Réponse immunitaire non spécifique

L'homologie des séquences primaires des NOS humaines est assez faible (51-57 %) [19], néanmoins le site actif est hautement conservé [20–22]. En revanche, les trois isoformes sont régulées de façon différente aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. L'activation des nNOS et des eNOS nécessitent une concentration élevée de calcium intracellulaire : la formation du complexe calcium-calmoduline lève alors leur inhibition par la cavéoline-1. Elles produisent ensuite de faibles quantités de $\bullet\text{NO}$. Leur action s'interrompt dès que le niveau de calcium intracellulaire revient à la normale, c'est-à-dire très rapidement. La eNOS peut également être activée par des médiateurs physiologiques comme la bradykinine ou par des forces physiques comme la contrainte de cisaillement [23,24].

La iNOS est active même en présence de concentrations faibles de calcium intracellulaire. Elle est généralement induite suite à une réaction allergique ou inflammatoire et produit pendant plusieurs heures de plus fortes quantités de $\bullet\text{NO}$. Cette production massive, quand elle est effectuée par les macrophages activés, permet la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et/ou de l'azote (ERA). Grâce à leurs effets cytotoxiques, ceux-ci permettent finalement la destruction de l'éventuel pathogène à l'origine de la réaction.

1.3. $\bullet\text{NO}$ ET SIGNALISATION

Le monoxyde d'azote est un messager physiologique impliqué dans de nombreux processus. Grâce à ses propriétés redox (degré d'oxydation de l'azote +II) et radicalaires, $\bullet\text{NO}$ possède une grande réactivité vis-à-vis de nombreuses molécules. En effet, $\bullet\text{NO}$ peut réagir directement avec d'autres espèces réactives comme l'ion superoxyde ou les métaux de transition (fer, zinc, cuivre) présents dans les protéines : dans ce dernier cas, il s'agit d'une réaction de nitrosylation. La nitrosation, quant à elle, est l'introduction du groupement -NO dans une molécule à la place d'un atome d'hydrogène. L'espèce réactive est en fait le cation nitrosonium NO^+ . Enfin, la nitration est l'insertion d'un groupement nitro- ($-\text{NO}_2$) dans une molécule.

La nitrosylation du fer du groupement hème de l'enzyme guanylate cyclase soluble (GCs) est une voie majeure de signalisation de $\bullet\text{NO}$, dépendante du second messager

guanosine 3',5'-monophosphate cyclique (GMPc). Il existe également tout un volet de signalisation de $\cdot\text{NO}$ indépendant du GMPc : seule la voie impliquant l'ion peroxy-nitrite (ONOO^-) sera évoquée dans ce chapitre (Figure 2).

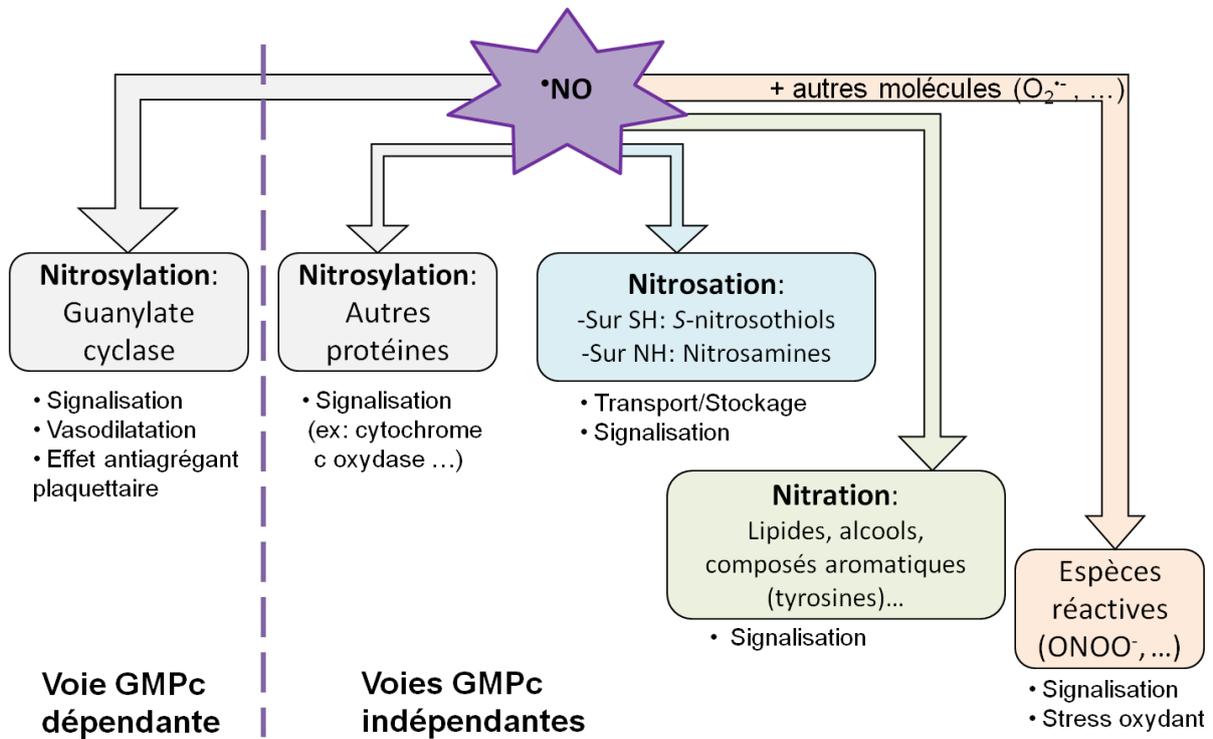


Figure 2 : Signalisation par l'oxyde nitrique

1.3.1. Signalisation GMPc-dépendante

L'oxyde nitrique libéré par l'endothélium diffuse vers les cellules musculaires lisses où il active la guanylate cyclase soluble (GCs), enzyme qui catalyse la transformation du guanosine triphosphate (GTP) en GMPc. Le GMPc est un second messenger intracellulaire régulant de nombreux phénomènes physiologiques notamment au niveau cardiovasculaire, tels que la croissance cellulaire, l'apoptose, la mobilité cellulaire ou la contractibilité des cellules musculaires lisses vasculaires (Figure 3).

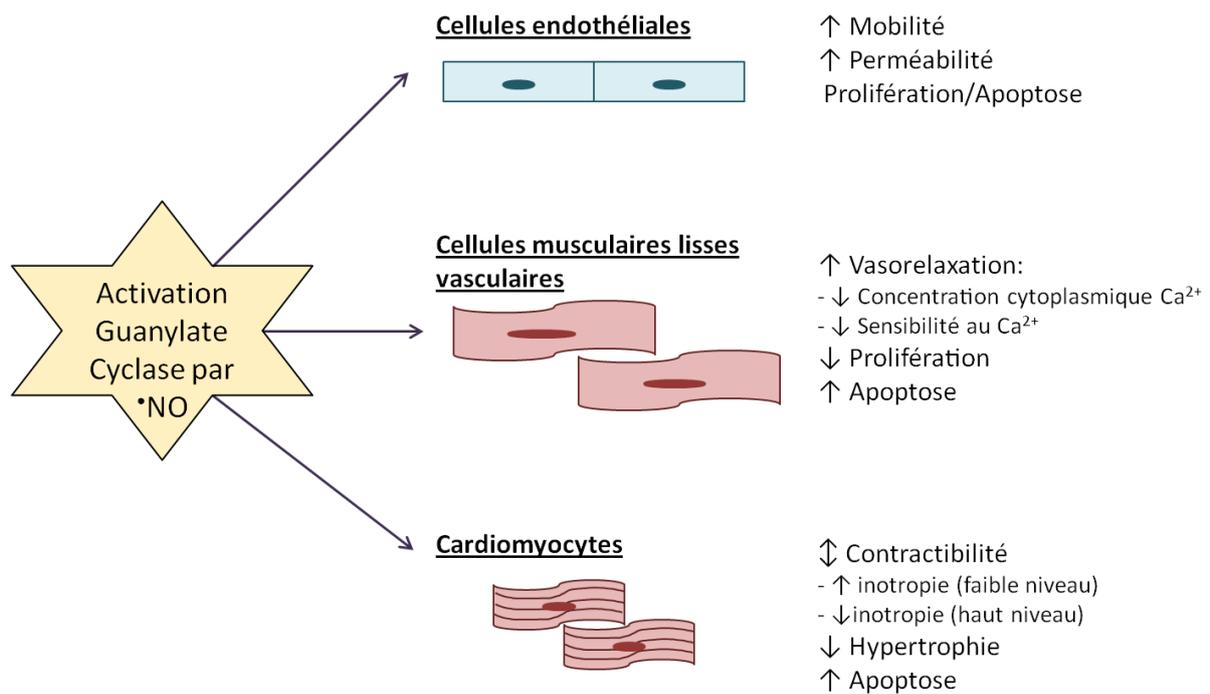


Figure 3 : Implications cardiovasculaires de la signalisation GMPc-dépendante. *Modifié d'après [25].*

Les GCs sont des hétérodimères $\alpha\beta$: il y a deux isoformes possibles pour chaque sous-unité, la combinaison $\alpha1-\beta1$ étant la plus fréquente. Les deux sous-unités sont nécessaires pour l'activité catalytique. Chacune possède un domaine de régulation (*N*-terminal : domaine de liaison à l'hème), un domaine de dimérisation et un domaine catalytique (*C*-terminal). Le groupement prosthétique hème est un groupement cyclique comprenant quatre atomes d'azote qui sont liés à un atome de fer central (sous forme réduite, ferreux, Fe(II) ou sous forme oxydée, ferrique, Fe(III)). Par ailleurs, le fer est également relié par un azote à la sous-unité $\beta1$ au niveau de l'histidine 105 [26] (Figure 4). Une mutation de cette histidine proche du *N*-terminal empêche la liaison du groupement hème et donc la production de GMPc. Par ailleurs, des liaisons avec les cystéines 78 et 124 de la sous-unité $\beta1$ assurent un bon positionnement du groupe hème. La fixation de $\bullet\text{NO}$ (formation d'un complexe nitrosyl-hème) entraîne la rupture d'une liaison entre le ligand imidazole axial et le fer héminique. Ce changement de conformation active l'enzyme car il permet la levée de l'encombrement stérique gênant l'accès au centre catalytique (Figure 4).

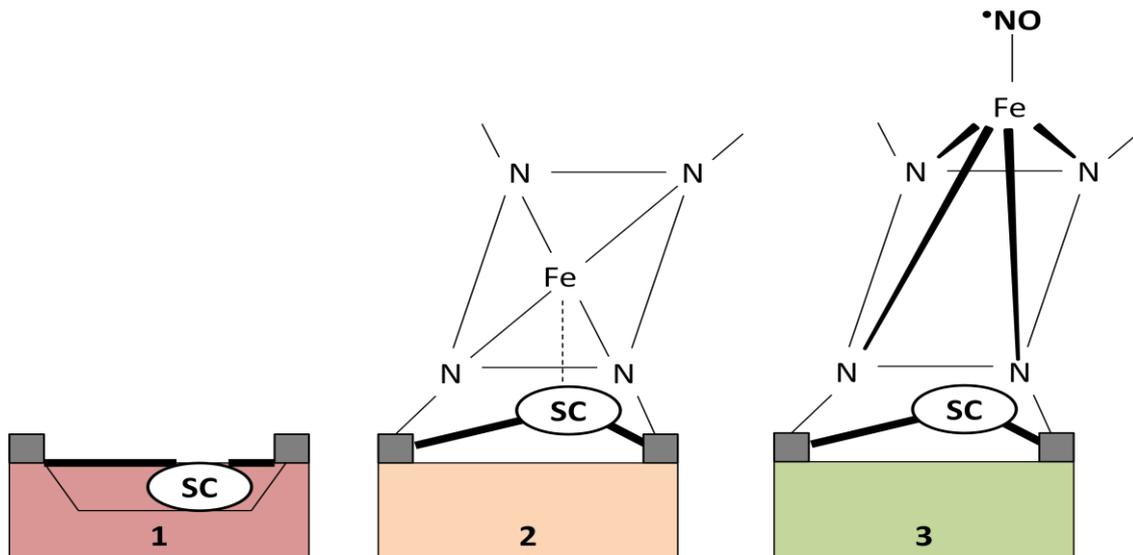


Figure 4 : Représentation schématique de l'activation de la guanylate cyclase soluble par l'oxyde nitrique . Adapté d'après [27]. SC : Site catalytique. 1) L'enzyme est à l'état basal, inactivée : le site catalytique n'est pas accessible. 2) La liaison du groupement prosthétique hème permet de dévoiler le centre catalytique, mais la liaison axiale entre l'atome de fer et le centre catalytique gêne l'accès du substrat. 3) La liaison du $\cdot\text{NO}$ sur le groupement hémique permet la levée de l'encombrement stérique par rupture de la liaison axiale: l'enzyme est alors fortement activée (augmentation de la vitesse maximale de réaction d'un facteur 400).

Il existe également une deuxième forme de guanylate cyclase : liée à la membrane (ρGC pour *particulate guanylate cyclase*). Elles ne sont pas activées par $\cdot\text{NO}$ mais par les peptides natriurétiques, eux-mêmes produits par les oreillettes cardiaques (*atrial natriuretic peptide* : ANP), les ventricules cardiaques (*brain natriuretic peptide* : BNP) ou l'endothélium vasculaire (*C-type natriuretic peptide* : CNP) en réponse à des variations de résistance des parois vasculaires et/ou de la pression artérielle, ou des facteurs humoraux (catécholamines, angiotensine-2, ...).

Les concentrations intracellulaires de GMPc modulent les protéines kinases GMPc-dépendantes (ou protéines kinases G : PKG) ainsi que les canaux à cations régulés par les nucléotides cycliques. Les PKG phosphorylent de nombreuses protéines intracellulaires, assurant ainsi la transmission du signal. Une des conséquences notables est la décontraction des cellules musculaires lisses, suite à une diminution du calcium intracellulaire et à une désensibilisation au calcium de l'appareil contractile (Figure 5). En effet, au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique, la PKG-I phosphoryle la protéine IRAG (*inositol 1,4,5 triphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate*) associée au

récepteur-canal de l'inositol tri-phosphate (IP3), diminuant ainsi l'influx de Ca^{2+} vers le cytosol. Par ailleurs, il existe au niveau de la membrane plasmique d'autres cibles de PKG-I, notamment un canal potassique : son ouverture par phosphorylation produit une hyperpolarisation qui diminue la probabilité d'ouverture des canaux calciques de type L. Enfin, la PKG-I phosphoryle également la phosphatase des chaînes légères de la myosine (PCLM) : cette enzyme déphosphoryle les chaînes légères de la myosine, entraînant ainsi la relaxation des muscles lisses.

Le GMPc est ensuite dégradé par des enzymes du groupe des phosphodiésterases. Elles peuvent être spécifiques (PDE 5, 6 et 9) ou non (PDE 1, 2, 3 et 10).

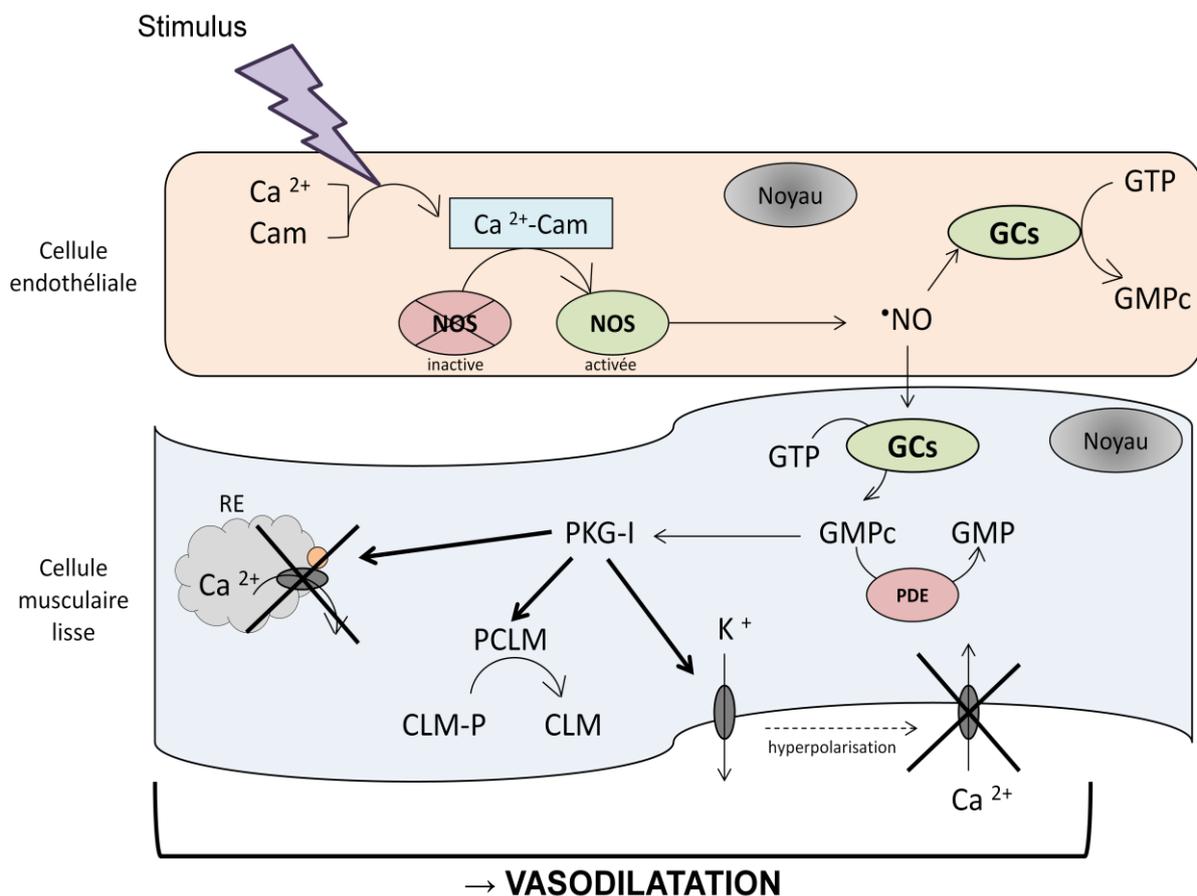
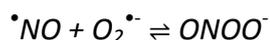


Figure 5 : Vasodilatation produite par la signalisation GMPc-dépendante . Ca^{2+} : ion calcium ; Cam : calmoduline ; NOS : NO synthase ; GCs : guanylate cyclase soluble ; PKG-I : protéine kinase G I ; RE : réticulum endoplasmique ; K^+ : ion potassium ; PCLM : phosphatase des chaînes légères de la myosine ; CLM : chaînes légères de la myosine ; CLM-P : chaînes légères de la myosine phosphorylées ; PDE : phosphodiésterases.

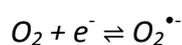
1.3.2. Signalisation GMPc-indépendante : rôle des ions peroxynitrite

La production d'ions peroxynitrite à partir de $\cdot\text{NO}$ est un système de défense non spécifique de première ligne de l'organisme face aux agents pathogènes. Quelques éléments concernant sa production sont donnés ici.

Les ions peroxynitrite sont produits par la réaction entre le monoxyde d'azote et l'ion radicalaire superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$).



Chez les Mammifères, la principale source d'ions superoxyde est la chaîne respiratoire mitochondriale, lors de la «fuite» des électrons au niveau du complexe I ou du complexe III.



Cette production est variable en fonction du tissu, de l'organisme et des conditions, mais néanmoins importante, étant donné les fortes quantités d'oxygène présentes. La seconde source de production d'ions peroxynitrite est située dans les phagosomes constitués par les neutrophiles ou les macrophages activés lors de la phagocytose d'un pathogène : il y a d'abord assemblage et activation de NADPH oxydases qui produisent $\text{O}_2^{\cdot-}$ dans la vacuole. Si la cellule a été préalablement exposée à des cytokines pro-inflammatoires dans les heures précédentes, l'isoforme iNOS est alors induite et produit de fortes quantités de $\cdot\text{NO}$, qui va diffuser dans le phagosome et réagir avec $\text{O}_2^{\cdot-}$ [28].

Par ailleurs, d'autres enzymes sont capables de générer $\text{O}_2^{\cdot-}$, comme les peroxydases, les xanthines oxydases, les NOS (en l'absence de BH_4),... Enfin, certaines molécules (glycéraldéhyde, FMNH_2 , FADH_2 , ...) sont capables de s'auto-oxyder pour former l'anion superoxyde.

L'ion superoxyde peut être transformé en espèces réactives autres que l'ion peroxynitrite, comme le radical hydroperoxyde HOO^\cdot (espèce réactive de l'oxygène, initiateur de peroxydation lipidique). Les superoxydes dismutases permettent d'éviter la formation des différentes espèces hautement réactives en utilisant l'ion superoxyde pour générer du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui peut ensuite être dismuté par les peroxydases en eau et dioxygène.

La formation de l'ion peroxynitrite ($t_{1/2} \sim \mu\text{s}$) par la réaction du monoxyde d'azote avec l'ion superoxyde est tellement rapide qu'elle est limitée par la diffusion des espèces [29]. L'espèce peroxynitrite est un oxydant et un agent nitrosant puissant. Il peut entraîner directement ou après transformation en d'autres espèces réactives :

- des réactions de peroxydation,
- la nitration de résidus tyrosine induisant une modulation des activités enzymatiques ou des facteurs de transcription,
- des réactions d'oxydation impliquant un changement de la structure tertiaire des protéines et une altération de leur fonction.

Ceci permet de comprendre les effets délétères d'une production massive de $\cdot\text{NO}$, *via* la formation d'ion peroxynitrite.

Comme tous les systèmes biologiques, les signalisations activées par l'oxyde nitrique participent au maintien de l'homéostasie, mais peuvent également être impliquées dans le développement de situations pathologiques, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant.

1.4. IMPLICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES

Dans les situations physiologiques, ce sont la plupart du temps les NOS constitutives qui sont mises en jeu, avec production faible et brève de $\cdot\text{NO}$, afin de maintenir l'homéostasie de l'organisme : la signalisation passe principalement par la guanylate cyclase. Dans le cas de la défense contre les pathogènes, les iNOS sont impliquées dans une production massive et continue de $\cdot\text{NO}$, avec production subséquente de nombreuses espèces réactives pour permettre la destruction des germes. Un déséquilibre de ce système (dans le sens d'une diminution ou d'une augmentation de $\cdot\text{NO}$) entraîne donc logiquement des situations pathologiques variées (Figure 6).

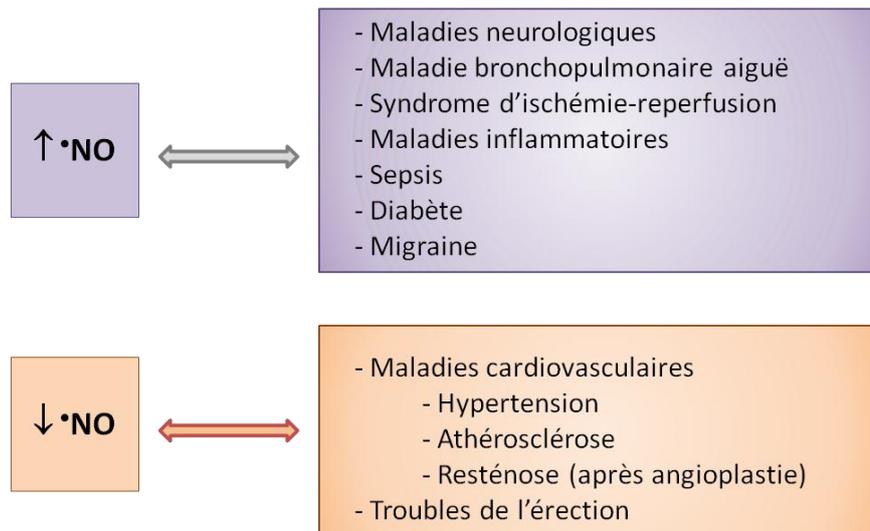


Figure 6 : Lien entre la rupture de l'homéostasie de l'oxyde nitrique et des situations pathologiques

1.4.1. Au niveau du système vasculaire

L'endothélium vasculaire est un système extrêmement dynamique, qui occupe chez l'adulte une surface équivalente à six terrains de tennis avec environ 10^{13} cellules. Il agit comme un système autocrine afin de maintenir les vaisseaux suffisamment dilatés pour assurer le flux sanguin ainsi que limiter l'adhésion des plaquettes et des leucocytes. Cette homéostasie est assurée par l'équilibre entre différents facteurs, comme par exemple •NO, la prostaglandine I₂, l'*endothelium-derived hyperpolarizing factor* (EDHF) (tous trois vasodilatateurs) et le thromboxane A₂ (vasoconstricteur).

Les effets vasculaires de •NO sont la relaxation du muscle lisse vasculaire, l'inhibition de l'adhésion et de l'agrégation des plaquettes [30,31], de l'adhésion des leucocytes [32], de la génération d'endothéline (vasoconstricteur) [33], ainsi que l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses [34]. Par ailleurs, la régulation par •NO de la circulation sanguine au niveau du rein influe sur la libération de rénine et donc sur l'homéostasie du volume intravasculaire et de la pression sanguine [35].

Des défauts de régulation des effets vasculaires de •NO peuvent donc contribuer au développement de diverses pathologies : ils sont notamment observés dans l'hypertension artérielle essentielle, la dysfonction endothéliale causée par l'hypercholestérolémie et l'hypertension pulmonaire artérielle chronique. Par ailleurs, les produits de glycosylation

avancés (*Advanced Glycosylation Endproducts*, AGE) [36] et les lipoprotéines oxydées [37] peuvent également diminuer la biodisponibilité de $\bullet\text{NO}$ et donc contribuer à une vasorégulation défectueuse dans le diabète et l'athérosclérose. Enfin, une production massive de $\bullet\text{NO}$ en réponse à des stimuli inflammatoires (par exemple stimulation des iNOS des cellules endothéliales et musculaires lisses par le lipopolysaccharide ou certaines cytokines) cause une hypotension massive lors du choc septique [38].

1.4.2. Au niveau du système nerveux central

Les NOS du cerveau sont principalement localisées dans les neurones de la couche granuleuse du cerebellum et dans les bulbes olfactifs accessoires (2 % des neurones dans le reste du cerveau) [39]. Leur stimulation par des acides aminés excitateurs conduit à la formation de $\bullet\text{NO}$ qui diffuse ensuite vers les cellules de Purkinje environnantes, riches en guanylate cyclase. Une autre activité enzymatique (non caractérisée à l'heure actuelle) colocalisée avec l'activité NOS peut être mise en évidence par une coloration spécifique (coloration diaphorase). Or les neurones positifs à cette coloration sont spécifiquement épargnés dans les maladies neurodégénératives comme la chorée de Huntington, l'ischémie cérébrale ou dans les lésions cérébrales causées par des toxiques [39]. Cette protection pourrait donc être due soit à la présence de $\bullet\text{NO}$ soit à l'autre activité enzymatique.

Il a été suggéré que $\bullet\text{NO}$ pouvait intervenir également dans la plasticité synaptique et influencer certains phénomènes neurophysiologiques de mémorisation, comme la potentialisation à long terme ou la dépression à long terme [40]. Il pourrait aussi moduler le flux sanguin local, donc l'approvisionnement en oxygène et nutriments des neurones et par conséquent leur activité.

Par ailleurs, $\bullet\text{NO}$ pourrait être un médiateur de la destruction neuronale lors de l'ischémie-reperfusion. En effet, les modèles expérimentaux de neurotoxicité suggèrent une libération massive de glutamate après ischémie-reperfusion entraînant une stimulation intense des récepteurs au *N*-méthyl-*D*-aspartate (NMDA), une augmentation du calcium intracellulaire et une libération prolongée de $\bullet\text{NO}$ [41]. Les seuls neurones survivants sont ceux présentant la coloration diaphorase (donc potentiellement l'activité NOS). L'administration d'antagonistes des récepteurs NMDA ou d'inhibiteurs de NOS réduit la destruction neuronale observée dans ces modèles [42].

1.4.3. Au niveau du système nerveux périphérique

Des nNOS sont présentes dans le système nerveux périphérique au niveau des nerfs non adrénérgiques non cholinérgiques (NANC) des tractus gastro-intestinal et urogénital. Bloquer la formation ou l'action de $\cdot\text{NO}$ au niveau de ces nerfs inhibe les effets de la stimulation nerveuse : le terme transmission « nitreurgique » a d'ailleurs été proposé pour cette transmission NANC [43]. Une transmission $\cdot\text{NO}$ -dépendante a été identifiée dans le plexus myentérique de l'estomac et de l'intestin, et dans les sphincters du bas de l'œsophage, iléon-colon, anus. L'oxyde nitrique serait donc impliqué dans la dilatation adaptative, le péristaltisme, et la compartimentalisation du tractus gastro-intestinal [44].

Par ailleurs, les muscles du corps caverneux du pénis se relaxent en réponse à une stimulation des nerfs NANC et entraînent l'érection. Ce processus est médié par $\cdot\text{NO}$, grâce aux NOS localisées au niveau des neurones du nerf pelvien innervant le corps caverneux et dans les plexus nerveux de l'adventice des artères péniennes [45]. Or l'impuissance est peu courante mais problématique chez l'homme adulte, particulièrement chez les patients diabétiques. Des médicaments comme le sildénafil permettent de maintenir la vasodilatation nécessaire à l'érection, en inhibant l'enzyme responsable de la dégradation du GMPc, la phosphodiésterase-5 (isoforme spécifique retrouvée au niveau du pénis).

1.4.4. Au niveau du processus de cancérogenèse, de l'inflammation et du système immunitaire

Les actions de $\cdot\text{NO}$ dans l'environnement tumoral sont multiples et hétérogènes : il entraîne des modifications post-traductionnelles des protéines. Ces modifications peuvent concerner des facteurs de transcription (NF- κ B, p53, HIF-1 α , c-Jun, ...) et moduler ainsi l'expression génique. Par exemple, l'administration de donneurs de $\cdot\text{NO}$ réduit l'activation de NF- κ B et diminue l'expression des gènes anti-apoptotiques, ce qui présente un intérêt pour sensibiliser les tumeurs aux chimiothérapies [46]. Cependant, le stress oxydant et nitrosant qui suit une production massive de $\cdot\text{NO}$ peut être carcinogène en altérant des cibles et des voies de signalisation cruciales pour l'homéostasie. Ce stress peut toucher directement l'ADN (par déamination des acides nucléiques, alkylation, ...) ou indirectement *via* l'altération des enzymes de réparation de l'ADN (ex : alkyltransférase, ADN ligase) ou la production de nitrosamines [47].

L'inflammation est la réponse non spécifique d'un organisme à un stimulus physique ou chimique nocif ou à une toxine microbienne et est impliquée dans de nombreuses pathologies comme l'arthrite, l'asthme, la sclérose multiple, les maladies inflammatoires intestinales et l'athérosclérose. Elle a pour but d'éliminer la cause par inactivation et/ou destruction du pathogène, d'éliminer les substances irritantes et de préparer le terrain pour la reconstruction tissulaire. Elle est composée de plusieurs étapes dans chacune desquelles $\cdot\text{NO}$ joue un rôle. L'oxyde nitrique aurait un effet complexe, à la fois pro- et anti-inflammatoire en fonction de sa concentration et de l'environnement cellulaire. En effet, $\cdot\text{NO}$ à faibles concentrations inhibe l'expression des molécules d'adhésion, la synthèse des cytokines ainsi que l'adhésion et la migration des leucocytes. Au contraire, lors d'une réaction inflammatoire, $\cdot\text{NO}$ produit en forte quantité a une action pro-inflammatoire et pro-apoptotique [48]. Ceci pourrait permettre le nettoyage de la zone inflammée. Il module en effet la fonction des leucocytes, notamment en stimulant la mobilité du cytoplasme des macrophages ou en induisant leur apoptose, en modulant l'adhésion des neutrophiles et la synthèse des cytokines.

Enfin, $\cdot\text{NO}$ est une arme clé du système de défense non spécifique de l'organisme contre les agents pathogènes (infections bactériennes, virales, fongiques ou parasitaires). Produit par les macrophages activés, il peut :

- nitrosyler des protéines essentielles des pathogènes. Par exemple en se liant au fer de la ferritine, protéine assurant le stockage du fer : ceci provoque une libération massive de fer dans la cellule cible [49]. Ce fer libéré en grandes quantités est toxique, et peut notamment déclencher la peroxydation lipidique [50] ;
- nitroser un thiol : par exemple la S-nitrosation de la ribonucléotide réductase (enzyme limitante de la synthèse d'ADN) d'*Escherichia Coli* permet l'inhibition de la réplication bactérienne [51]. De plus l'inactivation des déshydrogénases bactériennes -SH dépendantes est considérée comme critique dans la préservation des aliments par ajout de nitrites ;
- réagir avec $\text{O}_2^{\cdot-}$ libéré en parallèle par les macrophages pour former l'ion peroxy-nitrite, considéré comme l'oxydant le plus fort des systèmes biologiques permettant la destruction des pathogènes.

1.4.5. Au niveau du système respiratoire

L'oxyde nitrique pourrait être un médiateur physiologique au niveau du poumon (*via* ses interactions avec l'hémoglobine, voir chapitre suivant). Les NOS sont exprimées dans l'épithélium pulmonaire ainsi que dans d'autres types de cellules pulmonaires, et ont été suggérées comme médiateurs potentiels de la bronchodilatation nerveuse-dépendante [52]. Une libération diminuée de $\bullet\text{NO}$ peut être un mécanisme sous-jacent à la vasoconstriction hypoxique pulmonaire. Dans cette pathologie, le sang des poumons est redirigé vers les aires les mieux ventilées pour maximiser son oxygénation lors de son passage dans la circulation pulmonaire. L'oxyde nitrique serait également impliqué dans l'asthme et d'autres pathologies pulmonaires [53].

1.4.6. Au niveau de l'oeil

En plus de son rôle dans la vasodilatation des vaisseaux oculaires [54], $\bullet\text{NO}$ pourrait intervenir dans les mécanismes d'accommodation [55], dans le contrôle de l'épaisseur de la cornée [56] et dans la vasodilatation induite par l'exposition à la lumière [57].

En pathologie, il serait impliqué dans les pathologies inflammatoires (uvéite [58], conjonctivite allergique [59], œdème cornéen [60]). Ces effets pathologiques sont attribués soit à l'ion peroxynitrite (retrouvé dans les modèles d'inflammation [61]), soit à une action indirecte de $\bullet\text{NO}$ *via* la libération de neuropeptides comme la substance P ou le *calcitonin gene-related peptide* [62].

Par ailleurs, lors du syndrome d'ischémie-reperfusion, $\bullet\text{NO}$ protégerait la rétine des dommages ischémiques précoces en maintenant le flux sanguin [63], mais l'induction de la production de $\bullet\text{NO}$ par la iNOS pourrait déclencher, par la suite, des mécanismes neurotoxiques [64]. L'observation de niveaux élevés de $\bullet\text{NO}$ chez des rats diabétiques [65] et la réponse diminuée aux inhibiteurs de NOS chez des humains diabétiques [66] pourrait indiquer une implication de l'oxyde nitrique dans les complications du diabète, notamment une altération de la fonction vasculaire rétinienne et des dommages aux cellules rétiniennes. Enfin, $\bullet\text{NO}$ semble participer au contrôle de la pression intraoculaire : ainsi, il a été montré une relaxation des muscles ciliés isolés de bovins [67] ou de félins [68] après administration de donneurs de $\bullet\text{NO}$, et une diminution de la pression intraoculaire de lapins [69] et de

singes [70] après administration topique de nitrates organiques . Une modification de sa production ou de sa signalisation pourrait donc être impliquée dans le développement du glaucome [71].

1.4.7. Au niveau du système endocrinien (diabète)

Les NOS constitutives sont présentes dans les cellules β du pancréas (productrices de l'insuline) [72]. L'oxyde nitrique pourrait donc être impliqué dans la libération de l'insuline dans des conditions physiologiques. Certains résultats suggèrent que l'induction de la formation de $\cdot\text{NO}$ pourrait jouer un rôle dans la destruction des cellules β du pancréas lors du développement d'un diabète de type I [73] ou de type II [74]. Le traitement par des inhibiteurs de NOS de rats rendus diabétiques par la streptozocine (chez qui les NOS sont induites) diminue l'infiltration macrophagique dans le pancréas et prévient l'hyperglycémie. D'autre part, la vasodilatation endothélium-dépendante est également modifiée chez les patients diabétiques.

En résumé, $\cdot\text{NO}$ est impliqué dans de nombreuses voies physiologiques. Mais en fonction de la quantité et de la durée de production, il peut également entraîner des effets délétères.

2. VOIES PHYSIOLOGIQUES DE TRANSPORT DE $\cdot\text{NO}$

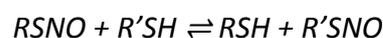
Nous avons vu précédemment que le monoxyde d'azote intervenait dans de nombreux processus physiologiques. Néanmoins, il agit selon un processus paracrine : il n'agit pas sur la cellule qui le produit, mais sur une cellule voisine. Il est soluble à la fois dans l'eau (> 2 mM à 20 °C et 1 atm) et dans les lipides [75] grâce à son caractère plutôt lipophile ($\log P = + 0,74$ [76]) : il peut donc diffuser librement dans l'environnement cellulaire et parcourir jusqu'à 100 μm . Cependant, sa demi-vie est très faible (< 0,1 s [77]). En réalité, il existe des formes dérivées de $\cdot\text{NO}$ qui servent de « réservoirs » et permettent son effet à une distance un peu plus grande de la cellule qui le produit.

2.1. S-NITROSO THIOLS (RSNO)

2.1.1. Généralités

Ignarro et coll. montrent en 1981 que des réactions avec les thiols cellulaires contribuent à l'activité biologique de certains donneurs d'oxyde nitrique [78]. Par la suite, Kowaluk et Fung démontrent que les S-nitrosothiols (adduit de $\cdot\text{NO}$ sur un thiol) exercent des effets biologiques indépendamment de leur dégradation en $\cdot\text{NO}$ et en thiol [79]. Puis l'équipe de Stamler montre que les effets des S-nitrosothiols (RSNO) sont dus à leur propriétés de donneurs d'ion nitrosonium (NO^+) ou nitroxyl (NO^-), qui ont des réactivités chimiques différentes de celle du monoxyde d'azote [80], et qui sont capables de se former dans le sang ou les tissus des mammifères et de se lier aux protéines, modifiant leurs caractéristiques [81,82]. Ainsi, les S-nitrosothiols permettent le transport du monoxyde d'azote (donc son action à distance du site de production) et la prolongation de sa durée de vie dans l'organisme.

On distingue classiquement les S-nitrosothiols endogènes de haute masse molaire (S-nitrosoalbumine, S-nitrosohémoglobine) de ceux de faible masse molaire (S-nitrosoglutathion, S-nitrosohomocystéine, S-nitrosocystéinylglycine et S-nitrosocystéine). Il existe un équilibre dynamique entre ces différentes espèces *via* des réactions de transnitrosation (échange d'un groupement -NO entre un S-nitrosothiol et un thiol libre) :



Le Tableau 2 présente les thiols pouvant servir de précurseurs aux S-nitrosothiols, puis le Tableau 3 donne quelques caractéristiques des différents RSNO et autres formes de transport de $\cdot\text{NO}$: leurs demi-vies *in vivo*, leurs concentrations produisant 50 % de l'effet maximum de vasorelaxation (EC_{50}) déterminées sur anneaux aortiques de rat et leurs concentrations physiologiques chez l'Homme. Il faut préciser que les valeurs physiologiques des RSNO décrites dans la littérature sont très variables, vraisemblablement en raison de problèmes pré-analytiques et analytiques [83].

Tableau 2 : Concentrations physiologiques chez l'Homme des thiols précurseurs des S-nitrosothiols

Thiols	Concentration (mM)	Milieu	Référence
Albumine	0,6	Sérum	[84]
Hémoglobine	9	Sang total	[84]
Glutathion	0,1 à 10	Tissus	[85]
	0,005 à 0,035	Plasma	[86]
Cystéine	0,01	Plasma	[85]
Homocystéine	0,006	Plasma	[87]

Tableau 3 : Caractéristiques des formes de transport de l'oxyde nitrique chez l'Homme

Espèce	Demi-vie	EC_{50} (μM)	Concentration (μM)
$\cdot\text{NO}$	<0,1 s [77]	/	/
AlbSNO	5,5 h [88]	1,17 [89]	0,0006 à 4,2 [83]
HbSNO	/	/	0,06 à 31 [90]
GSNO	120 s [91]	0,29 [92]	1 à 6 [93]
CysGlyNO	/	0,01 [89]	/
CysNO	50 s [91]	0,09 [89]	5 à 20 [93]
HomoCysNO	/	0,11 [89]	0,2 à 19 [93]
NO_2^-	110 s [94]	60,0 [89]	0,15 à 6 [95]
NO_3^-	5 à 8 h [96]	/	20 à 40 [97]

Les S-nitrosothiols permettent l'entrée de $\cdot\text{NO}$ dans les cellules grâce à des phénomènes de transnitrosation entre ces S-nitrosothiols extracellulaires et les thiols membranaires et intracellulaires. Ces phénomènes sont catalysés par la protéine disulfure isomérase (PDI) présente notamment à la surface des cellules endothéliales. Cette protéine chaperonne est normalement présente dans le réticulum endoplasmique, où elle intervient

dans le repliement des protéines par la formation, la réduction ou l'isomérisation de ponts disulfures [98]. Néanmoins, Hotchkiss et coll. [99] ont décrit la sécrétion de cette protéine par les cellules endothéliales et son dépôt à leur surface. Zai et coll. [100] ont démontré peu après que l'entrée de $\bullet\text{NO}$ dans les cellules se fait *via* la nitrosation de thiols membranaires par la protéine disulfure isomérase de surface (PDIs).

2.1.2. La S-nitrosoalbumine

L'albumine est la principale protéine sérique : 38-48 g/L pour 65-80 g/L de protéines totales en condition physiologique. Elle comporte 610 acides aminés (masse molaire 65 000 g/mol) et son rôle principal est le maintien de la pression oncotique nécessaire à l'homéostasie de l'organisme. Elle peut également transporter de nombreuses molécules, dont des médicaments et moduler ainsi leur biodisponibilité. De plus, elle constitue également un des principaux pools antioxydants du plasma, soit directement (propriétés redox du résidu cystéine en position 34, propriétés de captation des métaux), soit indirectement (*via* la fixation de divers composés comme la bilirubine) [101].

En 1992, Stamler et coll. ont montré que $\bullet\text{NO}$ (de source endogène ou exogène) peut réagir avec les groupements thiols des protéines comme l'albumine pour former des S-nitrosothiols de longue demi-vie avec une activité vasodilatatrice [102]. La S-nitrosoalbumine (AlbSNO) est formée par la fixation du groupement -NO sur le résidu cystéine en position 34 de l'albumine et a une demi-vie de quelques heures [88]. Par ailleurs, les niveaux du pool circulant de S-nitrosoalbumine dans le plasma sont liés avec l'activité NO synthase [81]. Quand les NOS sont inhibées, la concentration de S-nitrosoalbumine diminue et celles des S-nitrosothiols de faible masse molaire augmentent. La S-nitrosoalbumine constituerait ainsi le principal réservoir de $\bullet\text{NO}$ au niveau du plasma et serait en équilibre avec d'autres RSNO de plus faible masse molaire qui délivreraient ensuite $\bullet\text{NO}$ aux tissus cibles (Figure 7).

Zones riches en O₂

Zones pauvres en O₂

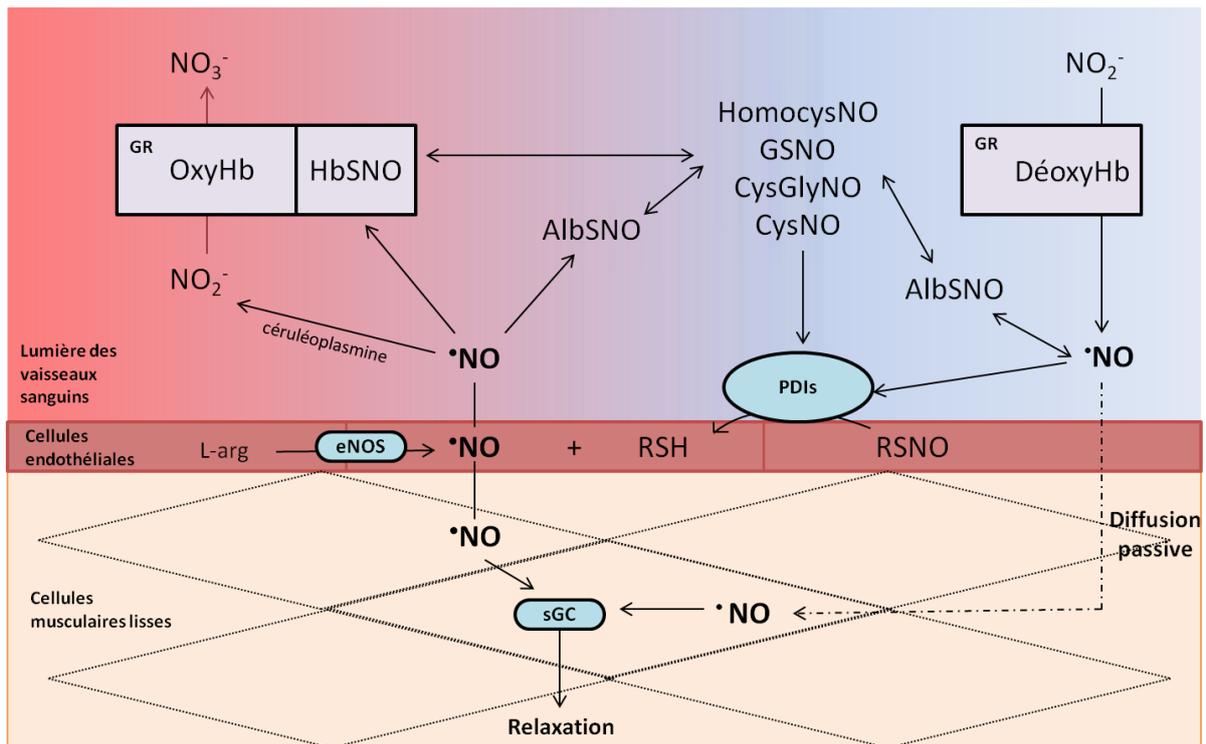


Figure 7 : Equilibre entre les formes de transport de l'oxyde nitrique. GR : globules rouges, L-arg : L-arginine ; PDIs : Protéine Disulfure Isomérase de surface, OxyHb : hémoglobine oxygénée, DéoxyHb : hémoglobine désoxygénée.

2.1.3. La S-nitrosohémoglobine

Le rôle de transporteur de $\cdot\text{NO}$ de l'hémoglobine est révélé par l'équipe de Stamler en 1996 [103]. Il existe en fait deux types de liaisons du $\cdot\text{NO}$ à l'hémoglobine. La première conduit à la formation de nitrosylhémoglobine (HbFeNO) par une réaction de nitrosylation (fixation du groupement $\cdot\text{NO}$ sur l'hème). La deuxième est une réaction de S-nitrosation (fixation de $\cdot\text{NO}$ sur le groupement thiol par une liaison covalente) et aboutit à la S-nitrosohémoglobine (HbSNO). La nitrosylhémoglobine serait formée dans un premier temps par réaction de $\cdot\text{NO}$ avec l'hémoglobine. Dans un deuxième temps, le transfert du groupement nitrosonium (NO^+) sur le groupement thiol de la cystéine 93 de la chaîne β de l'hémoglobine générerait la S-nitrosohémoglobine.

Cette liaison réversible permettrait la libération de $\cdot\text{NO}$ dans le système cardiovasculaire à travers un mécanisme de changement de conformation de l'hémoglobine sous différentes tensions en oxygène. En condition de haute pression en dioxygène

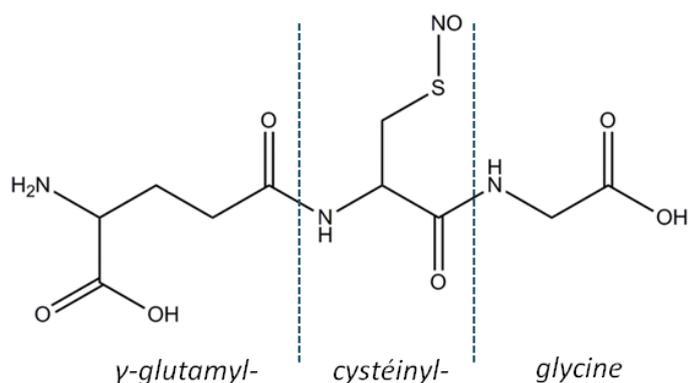
(circulation pulmonaire), la S-nitrosation du résidu cystéine réduit en position 93 de la chaîne β est favorisée [103,104] : grâce à sa liaison avec l'hémoglobine, $\cdot\text{NO}$ est ainsi stocké dans les globules rouges. Dans des zones de moindre pression en dioxygène, la liaison est rompue, permettant ainsi la formation de RSNO de faible masse molaire dans le sang puis dans les tissus vasculaires (Figure 7). La libération de $\cdot\text{NO}$ permet alors la stimulation de la guanylate cyclase et la vasodilatation.

2.1.4. Le S-nitroso glutathion et la S-nitrosocystéine

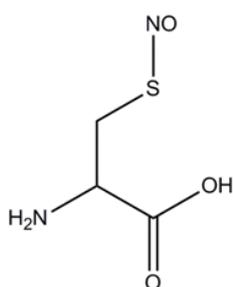
Le S-nitroso glutathion (GSNO) endogène a été décrit pour la première fois dans les voies aériennes humaines, où les concentrations ont depuis été montrées comme étant élevées chez les patients souffrant de pneumonie et diminuées chez les patients asthmatiques [82,105]. Le GSNO a également été identifié dans les érythrocytes [106], les plaquettes [107], les leucocytes [108] et le tissu cérébral [109]. Dans les cellules, la formation de S-nitroso glutathion pourrait être favorisée par rapport aux autres RSNO par sa stabilité et par la forte concentration du substrat endogène, le glutathion réduit (GSH). En effet, le GSH constitue le principal thiol non protéique dans les cellules et est maintenu à 98 % sous sa forme réduite par la glutathion disulfure réductase.

Le S-nitroso glutathion est un tripeptide constitué d'un résidu L- γ -glutamyl, L-cystéinyl et glycine, avec un groupement -NO sur le groupement fonctionnel thiol (-SH) du résidu cystéinyl (Figure 8).

S-nitrosoglutathion



S-nitrosocystéine



S-nitrosocystéinylglycine

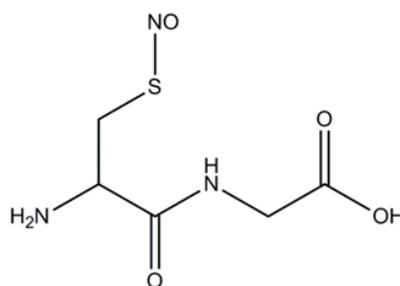


Figure 8 : Structures du S-nitrosoglutathion, de la S-nitrosocystéine et de la S-nitrosocystéinylglycine

Dans le sang, il est dégradé grâce à la γ -glutamyltransférase (GGT) qui permet la coupure du résidu γ -glutamyl et la libération de la S-nitrosocystéinylglycine (CysGlyNO). Puis des dipeptidases présentes à la surface des cellules endothéliales catalyseraient la séparation de la glycine et de la S-nitrosocystéine (CysNO) (Figures 8 et 9), bien que la présence de ces enzymes n'ait jamais été clairement prouvée. La S-nitrosocystéine étant un S-nitrosothiol très labile, elle va rapidement se dissocier en monoxyde d'azote et cystéine. Cystéine, γ -glutamyl et glutamate sont ensuite récupérés par la cellule et sont utilisés pour reconstituer une molécule de glutathion réduit. La S-nitrosocystéine peut également être importée directement dans la cellule grâce au transporteur d'acides aminés de type L (L-AT) [110]. Le S-nitrosoglutathion peut également être dégradé de manière non spécifique

par d'autres enzymes, comme les PDI précédemment mentionnées ou les thioredoxines (Trx).

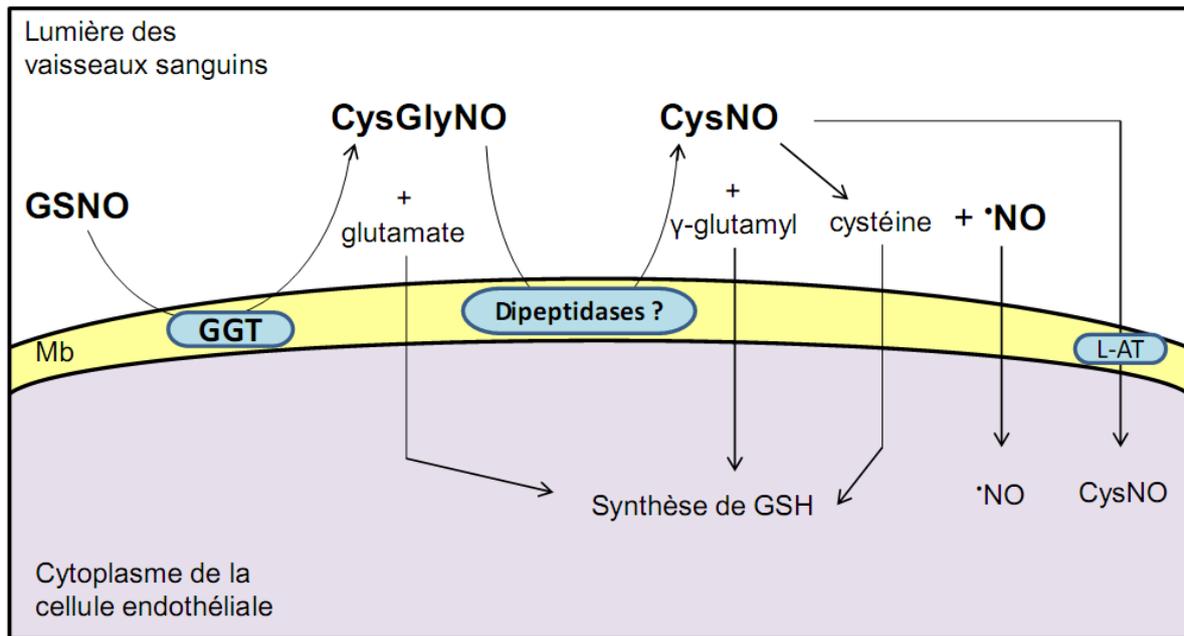
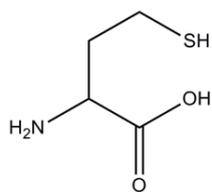


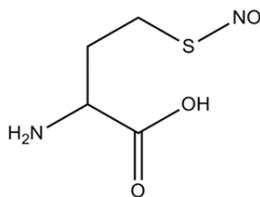
Figure 9 : Equilibre entre S-nitrosogluthation, S-nitrosocystéinylglycine et S-nitrosocystéine. Mb : Membrane.

2.1.5. La S-nitrosohomocystéine

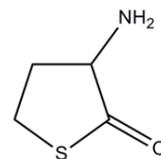
L'homocystéine est un acide aminé soufré intermédiaire du catabolisme de la méthionine en cystéine. Il s'agit d'une substance pro-inflammatoire, dont la concentration plasmatique est augmentée (hyperhomocystéinémie) en cas de carence en vitamine B6, B9 ou B12. L'hyperhomocystéinémie est considérée comme facteur de risque dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires, notamment la maladie artérielle coronaire [111], les infarctus [112], les occlusions artérielles périphériques [113] et la thrombose veineuse [114]. L'homocystéine existe dans le sang sous forme réduite, oxydée, ou liée aux protéines. Elle peut être reméthylée pour reformer la méthionine ou bien transformée en cystéine par des enzymes requérant des vitamines B comme cofacteurs. En cas d'altération de ces voies métaboliques, l'homocystéine peut être transformée en homocystéine thiolactone (Figure 10). Ce composé cyclique est un métabolite hautement réactif capable d'entraîner la N-homocystéinylation de nombreuses protéines avec modification de leur structure et perte de leur activité [87,88].



Homocystéine



S-nitrosohomocystéine



Homocystéine thiolactone

Figure 10 : Structures de l'homocystéine, de la S-nitrosohomocystéine et de l'homocystéine thiolactone

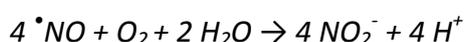
Morakinyo et coll. ont montré que la conversion de l'homocystéine en homocystéine thiolactone pouvait être inhibée par la S-nitrosation du résidu thiol de l'homocystéine. Ils proposent donc la S-nitrosation de l'homocystéine comme un phénomène physiologique de diminution de la toxicité de cette molécule [115]. La S-nitrosohomocystéine peut être importée dans les cellules *via* le transporteur des acides aminés de type L [110].

2.2. IONS NITRITE

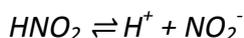
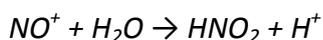
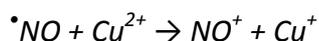
Le nitrite inorganique (NO_2^-) est utilisé depuis plusieurs millénaires pour la conservation des aliments. Il est encore utilisé aujourd'hui pour la conservation de la viande rouge car il permet de retarder la production de toxine botulique, d'améliorer la couleur et la saveur de la viande et de retarder son rancissement. Il permet aussi de préserver les arômes de fumée et d'épices [116].

Les ions nitrite dans le sang et les tissus peuvent provenir du métabolisme du monoxyde d'azote, mais aussi de l'alimentation et de l'eau de boisson, ainsi que de la réduction des ions nitrate dans la salive par les bactéries commensales de la bouche et du tube digestif. La concentration plasmatique de NO_2^- est souvent utilisée comme un marqueur de la production de $\bullet\text{NO}$: en effet, malgré les différentes sources, 70 à 90 % du NO_2^- plasmatique provient de l'activité eNOS chez les humains non à jeun [95]. L'oxydation du monoxyde d'azote en ions nitrite peut se faire :

- soit par autooxydation (réaction lente, dans les tissus) :



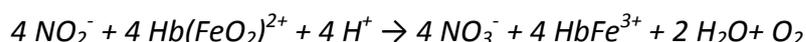
- soit par réaction avec la céruléoplasmine (rapide, dans le sang) :



La réduction des ions nitrite en monoxyde d'azote pourrait être effectuée (dans différentes conditions) par :

- la chaîne mitochondriale de transport des électrons [117],
- une réaction non enzymatique à pH acide au niveau de l'estomac ou de tissus ischémiques ($pK_a(HNO_2/NO_2^-) = 3,34$) [118],
- la déoxyhémoglobine [119],
- ou la xanthine oxydase [120].

Aussi, l'utilisation de nitrite comme agent vasodilatateur est décrite dans la littérature, avec des résultats dans l'ensemble positifs [121–124] malgré quelques exceptions [125]. Néanmoins, ces expériences nécessitent des doses assez fortes d'ions nitrite, étant donné leur faible efficacité vasodilatatrice (EC_{50} *ex vivo* de l'ordre de 60 μ M). Or l'administration de fortes doses d'ions nitrite a souvent été décrite comme vraisemblablement toxique, soit par formation de nitrosamines (R_1NR_2NO) potentiellement carcinogènes, soit par formation de méthémoglobine :

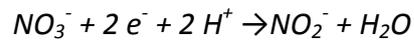


La méthémoglobine est une forme d'hémoglobine où le fer ferreux (+II) a été transformé en fer ferrique (+III) et qui ne peut plus lier l'oxygène.

2.3. IONS NITRATE

Les ions nitrate peuvent provenir de l'alimentation, du métabolisme du monoxyde d'azote ou de la réaction des ions nitrite avec l'hémoglobine. Ils sont métabolisés en ions nitrite principalement grâce aux bactéries commensales présentes dans le tractus digestif et

à la surface de la peau :



Une fois dans l'estomac, les ions nitrites sont convertis en oxydes de l'azote (NOx) par l'acidité ambiante. Ce mécanisme de génération de $\bullet NO$ pourrait être une défense contre les micro-organismes avalés. Enfin les ions nitrate sont éliminés par voie rénale.

En conclusion, le monoxyde d'azote est transporté dans le sang principalement par des S-nitrosothiols de faible et haute masse molaire. Ces formes sont en équilibre entre elles et permettent le stockage ou la libération du radical dans différents compartiments (érythrocytes, plasma, tissus).

3. MODULATION DE \cdot NO EN THERAPEUTIQUE CARDIOVASCULAIRE

Une diminution de concentration de \cdot NO est une des principales causes de la dysfonction endothéliale. L'association entre dysfonction endothéliale et maladies cardiovasculaires (hypertension, angine de poitrine, déficience cardiaque, athérosclérose, infarctus...) est bien connue [25,126,127]. Les mécanismes sous-jacents pourraient être une diminution de la production de \cdot NO, une accélération de sa dégradation et/ou une perte de sensibilité de ses cibles. Etant donné la complexité de la cascade \cdot NO/GMPc *via* ses nombreux acteurs et ses nombreuses régulations, il existe de nombreuses possibilités pour la moduler. La seule actuellement exploitée en thérapeutique est l'apport de \cdot NO, soit directement soit par des prodrogues.

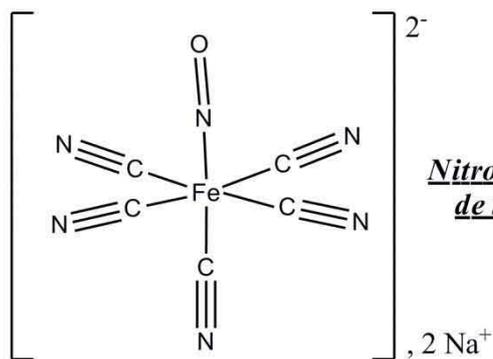
3.1. DONNEURS DE \cdot NO COMMERCIALISES EN FRANCE

Les médicaments actuellement sur le marché sont des médicaments anciens à visée symptomatique : d'après le répertoire de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), les premières autorisations de mise sur le marché datent en effet des années 1980. Il s'agit de composés organiques ou inorganiques qui apportent du monoxyde d'azote de façon directe ou indirecte. Leur réactivité chimique ainsi que la cinétique de libération du monoxyde d'azote diffèrent entre les molécules. Leurs structures sont présentées dans la Figure 11, et leurs caractéristiques principales dans le Tableau 4.

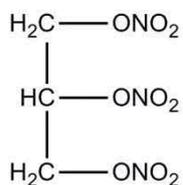
A) Donneurs directs



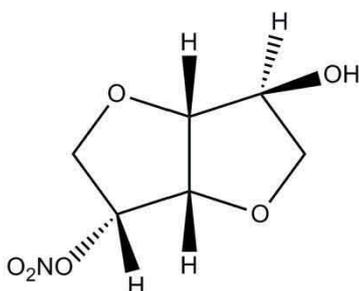
Monoxyde d'azote



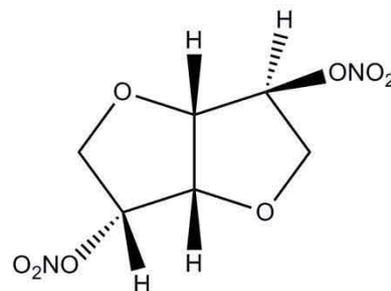
B) Donneurs indirects



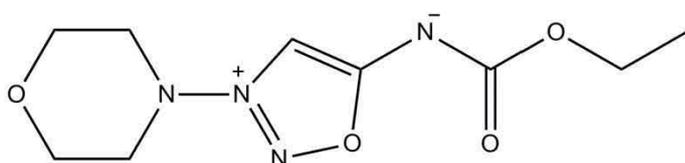
Trinitrine



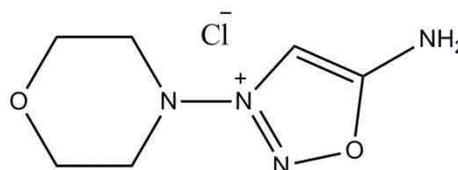
(5-) Mononitrate d'isosorbide



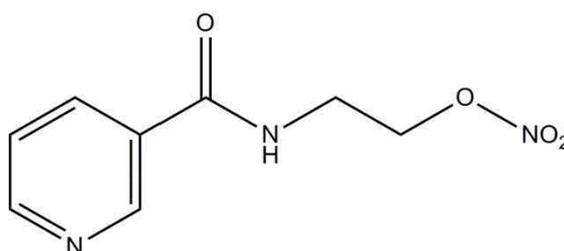
Dinitrate d'isosorbide



Molsidomine



Linsidomine



Nicorandil

Figure 11 : Structures des donneurs d'oxyde nitrique commercialisés en France

Tableau 4 : Principales caractéristiques des donneurs d'oxyde nitrique commercialisés en France

Voies d'administration	Indications	Principes actifs	Délai d'action	Durée d'action	Remarques
Intraveineuse	Traitement d'urgence de la crise hypertensive	Nitroprussiate de sodium	aucun	3-10 min	Réserve hospitalière
	Insuffisance cardiaque Œdème aigu pulmonaire d'origine cardiogénique	Trinitrine Dinitrate d'isosorbide Linsidomine	2 min 30-60 s /	10 min 30-60 min /	
Intracoronaire	Levée de spasme artériel Coronarographie	Dinitrate d'isosorbide Linsidomine	aucun	/	
Sublinguale	Traitement préventif à très court terme ou curatif de la crise d'angor	Trinitrine Dinitrate d'isosorbide	2-3 min	30-60 min 1-2 h	/
Transdermique	Traitement préventif de la crise d'angor	Trinitrine	/	24 h	Nécessité d'un intervalle libre ≥ 8h
Orale	Insuffisance cardiaque (en association)	Mononitrate et dinitrate d'isosorbide Molsidomine	15-60 min 20 min	4-24 h 3 h	Nécessité d'un intervalle libre ≥ 12h
Rectale (pommade)	Fissure anale chronique	Trinitrine	/	/	/

3.1.1. Donneurs directs

Le **monoxyde d'azote** est utilisé en tant que gaz médical en inhalation dans le cadre de l'hypertension artérielle pulmonaire [128]. L'hypertension artérielle pulmonaire est souvent observée dans les syndromes de détresse respiratoire (notamment chez les nouveau-nés), ou après chirurgie lors de pontages cardio-pulmonaires. Les traitements existants ne sont pas sélectifs de la circulation pulmonaire et entraînent une diminution de la pression sanguine avec une diminution de la perfusion des organes vitaux comme le cœur. Le monoxyde d'azote administré par inhalation entre très rapidement dans le sang et peut exercer une action locale, avant d'être capté par l'hémoglobine : il permet ainsi une vasodilatation sélective.

Le **nitroprussiate de sodium** (SNP) est utilisé par voie intraveineuse en situation d'urgence pour résoudre rapidement les crises hypertensives. Il est également fréquemment utilisé *in vitro* [129], *ex vivo* [130] ou *in vivo* [131] comme modèle de donneur de $\cdot\text{NO}$ direct et rapide : son action est indépendante de l'endothélium. Ses inconvénients sont : l'administration par voie intraveineuse exclusive, sa faible fenêtre thérapeutique et le risque associé d'hypotension majeure, ainsi que sa toxicité (par libération d'ions cyanure).

3.1.2. Donneurs indirects (dépendants du métabolisme)

Il s'agit de composés qui nécessitent l'action d'enzymes pour permettre la libération du monoxyde d'azote. Cette catégorie comprend les nitrates organiques (trinitrine, 5-mononitrate et dinitrate d'isosorbide), les sydnonimines (molsidomine et linsidomine) et le nicorandil.

La nitroglycérine a de prime abord été utilisée pour ses propriétés explosives. Rebaptisée « **trinitrine** », c'est le médicament dérivé nitré le plus ancien et le mieux étudié. Les formes sublinguales en particulier sont souvent prescrites, de par leur rapidité d'action, pour soulager les crises d'angor ou les décompensations cardiaques aiguës.

Le **5-mononitrate d'isosorbide** (ou mononitrate d'isosorbide, ISMN) et le **dinitrate d'isosorbide** (ISDN) sont des composés à délai et durée d'action plus longs : ils sont donc administrés pour le traitement des patients avec un angor chronique stable, ou dans la

décompensation cardiaque chronique. Ils permettent de diminuer la dyspnée pendant la nuit ainsi que d'augmenter la tolérance à l'exercice [132].

Les nitrates organiques sont des médicaments très prescrits pour leurs effets vasorelaxants. Ils permettent également de diminuer l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombi [133]. Ils ont néanmoins quelques inconvénients comme leur faible demi-vie, qui implique plusieurs prises quotidiennes sauf pour les formulations à libération prolongée. Par ailleurs, les patients traités par ces molécules développent fréquemment une « tolérance » (cf. paragraphe dédié) : l'administration prolongée entraîne une perte d'efficacité. La mise en place d'une « fenêtre thérapeutique », c'est-à-dire une période quotidienne sans traitement, permet de limiter l'apparition de ce phénomène.

La classe des sydnonimines comporte deux représentants : la **molsidomine** et la **linsidomine**. Il s'agit en réalité de prodrogues : la molsidomine est métabolisée par les estérases hépatiques en linsidomine (3-morpholinosydnonimine ou SIN-A). Ce produit se décompose à son tour en amide de *N*-(cyanométhyl)-*N*-morpholin-4-ylnitreux (SIN-1A), qui est le réel donneur de $\cdot\text{NO}$. Ces molécules ne sont pas commercialisées aux Etats-Unis. En Europe et au Japon, elles sont réservées aux patients intolérants ou résistants aux autres thérapeutiques. En revanche, elles développeraient moins de tolérance que les autres dérivés nitrés. Malgré cela, leur décomposition produit simultanément monoxyde d'azote et ion superoxyde, ce qui pourrait provoquer une toxicité *via* la formation d'ions peroxydite.

Enfin, le nicorandil est un principe actif hybride (non commercialisé aux Etats-Unis) possédant un groupement nitrate et un résidu nicotinamide. Son action est donc due à la fois à l'activation de la signalisation GMPc par le monoxyde d'azote et à l'ouverture des canaux potassiques causée par la partie nicotinamide.

Les principaux effets secondaires rencontrés avec les donneurs de $\cdot\text{NO}$ sont une hypotension et les symptômes correspondants, notamment des céphalées, surtout lors de la mise en route du traitement.

3.2. PRINCIPAUX DONNEURS D'OXYDE NITRIQUE EN DEVELOPPEMENT

D'autres principes actifs hybrides sont en cours d'étude. Certains associent $\bullet\text{NO}$ par une liaison ester à des médicaments bien connus comme des anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que le célécoxib [134], l'aspirine [135], le naproxène [136] ou la mésalamine [137]. L'apport de monoxyde d'azote permettrait notamment de diminuer la toxicité gastrique classiquement décrite avec cette classe de composés. D'autres hybrides comprenant des antagonistes des récepteurs à l'angiotensine de type 2 (telmisartan [138]) ont été créés. Finalement, des hybrides de type *S*-nitrosothiols (greffage du $\bullet\text{NO}$ sur un thiol de la molécule) ont été réalisés à partir de la pénicillamine [139], de la *N*-acétylcystéine [140], du glutathion [141] ou même d'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine comme le captopril [142].

Enfin, les NONOates ou diazeniumdiolates sont des complexes de $\bullet\text{NO}$ et d'un nucléophile, avec plus de 40 % (m/m) d'oxyde nitrique par molécule [143]. Ils sont connus depuis deux siècles et sont classés en fonction de l'atome (C, N, O ou S) sur lequel ils sont attachés : par exemple le sel d'Angeli (liaison avec O), la diéthylamine-NONOate ou la spermine-NONOate (liaison avec N). Ces composés sont des donneurs directs de $\bullet\text{NO}$, qu'ils peuvent libérer spontanément à pH physiologique [144]. Leur inconvénient majeur est la formation possible de nitrosamines carcinogènes. Les développements actuels de NONOates portent sur leur vectorisation vers des tissus spécifiques (thérapie anticancéreuse par exemple) grâce à des ligands spécifiques, et leur utilisation dans des stents ou greffons artificiels en cardiologie, pour limiter la thrombogénicité de ces systèmes après intervention [143,145,146].

3.3. AUTRES POSSIBILITES : MODULATEURS DES NOS

3.3.1. Substrats

Peu de substrats possibles ont été identifiés : la plupart sont des dérivés du substrat naturel L-arginine (guanidines) ou de l'intermédiaire NOHA (*N*-hydroxyguanidines). Parmi les nombreuses guanidines testées, seuls deux composés (homo-NOHA et 3,3,3-trifluorobutylguanidine) ont été décrits comme substrats des NOS (le 2^{ème} seulement pour la iNOS), suggérant une grande sélectivité de l'étape initiale d'oxydation. De plus, ces

composés se dégradent facilement et ne permettent pas d'atteindre les niveaux de production de $\bullet\text{NO}$ des substrats naturels. L'intermédiaire NOHA (ou ses prodrogues) semble particulièrement intéressant : en effet, il libère $\bullet\text{NO}$ au site d'action de la NOS, c'est un inhibiteur des arginases, et il a été détecté dans le plasma humain (il pourrait donc être une des formes de transport de $\bullet\text{NO}$).

Des inducteurs de la NOS endothéliale sont également à l'étude (Aventis[®], composés AVE9488 et AVE3085). Il faut cependant souligner que pour être efficaces, substrats comme inducteurs nécessitent une enzyme pleinement fonctionnelle, c'est-à-dire correctement exprimée et disposant de ses cofacteurs et éventuellement de son substrat.

3.3.2. Inhibiteurs

L'utilisation des inhibiteurs des NOS présente un intérêt dans les pathologies neurodégénératives ou inflammatoires mais également dans le domaine cardiovasculaire pour le traitement du choc cardiogénique. Le choc cardiogénique fait généralement suite à une infection cardiaque et se manifeste par une diminution de la fréquence cardiaque, une diminution de la perfusion des tissus et une hypotonie qui conduisent à la défaillance multiviscérale généralisée et à la mort dans 50 % des cas. Une réponse inflammatoire aiguë accompagne la diminution de la fonction systolique ventriculaire gauche : une activation inappropriée de iNOS produit de forts niveaux de $\bullet\text{NO}$, qui provoque une vasodilatation systémique et une hypoperfusion progressive, suivie par la dépression du myocarde. Des inhibiteurs comme la tilarginine (NMMA : N^6 -monométhyl-L-arginine) ou l'ester méthylique de N^5 -nitro-L-arginine (L-NAME) sont à l'étude. L'aminoguanidine est en cours de développement clinique comme inhibiteur faible mais sélectif de iNOS [147]. Ces inhibiteurs sont des analogues du substrat naturel, la L-arginine, mais d'autres solutions sont envisageables, comme par exemple des ligands de la calmoduline, des ligands des flavoprotéines ou de l'hème, ou des dépléteurs de BH_4 . La difficulté est de parvenir à des molécules sélectives des NOS, et plus particulièrement de la iNOS.

3.3.3. Autres stratégies

Pour augmenter la production de $\bullet\text{NO}$, l'apport de cofacteurs peut permettre de restaurer la fonction des NOS (notamment la eNOS) : par exemple en administrant de la

L-Arginine ou son précurseur la L-citrulline, ou encore BH₄. Cependant, il existe un risque de « déséquilibrer » l'enzyme et d'entraîner une production d'ion superoxyde plutôt que •NO.

Par ailleurs, il est possible de bloquer la dégradation de la L-arginine afin d'augmenter de façon artificielle les quantités de substrat disponibles pour les NOS. En effet, la L-arginine est également le substrat des arginases, qui la dégradent en L-ornithine et en urée. Il existe deux types d'arginases qui participent au cycle de l'urée et à la synthèse de polyamines, proline et glutamate. De plus, l'activité des arginases est augmentée avec l'âge par des modifications post-traductionnelles : il y a alors à la fois diminution de la production de •NO et augmentation de la synthèse de polyamines. Ces dernières contribuent à la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et à l'épaississement de l'intima et donc à l'athérosclérose et à la dysfonction endothéliale. Les inhibiteurs actuels des arginases sont des analogues de l'acide boronique (même famille que le bortézomib) ou des analogues de la N-hydroxy-L-arginine. Un risque d'effet secondaire important est la dérégulation du cycle de détoxification de l'ammonium.

Enfin, la méthylation physiologique des résidus arginines de diverses protéines (histones, protéines ribosomales, ...) par les protéines arginine méthyltransférases (PRMTs) permet la régulation des liaisons à l'ADN, celle de la transcription, ainsi que la réparation de l'ADN. Une fois les protéines hydrolysées, les méthylarginines libres apparaissent dans le cytosol et certaines (N^ω-monoéthyl-L-arginine NMMA et *asymmetric dimethyl-L-arginine* ADMA) peuvent inhiber les trois isoformes de NOS [148].

3.4. NITRATES ORGANIQUES : PHENOMENE DE TOLERANCE

La tolérance clinique a été décrite dès le début de l'utilisation des nitrates organiques en thérapeutique à la fin du 19^{ème} siècle [149]. Elle est caractérisée par un échappement thérapeutique, c'est-à-dire une diminution progressive de l'effet du médicament lors d'une administration prolongée. Il s'agit d'un phénomène multifactoriel d'étiologie encore indéterminée. Le terme tolérance regroupe en fait plusieurs concepts : pseudotolérance et tolérance vasculaire.

La pseudotolérance est une réaction de rétrocontrôle neurohormonale, non spécifique aux nitrates, en réponse immédiate à une diminution de la pression artérielle. Elle met par

exemple en jeu la libération de cathécholamines et l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone. Elle est vraisemblablement la cause des maux de tête transitoires fréquemment décrits en début de traitement.

La tolérance vasculaire se caractérise par une désensibilisation de l'endothélium aux donneurs de NO (résistance aux nitrates) et/ou aux vasodilatateurs endogènes endothélium-dépendants, c'est-à-dire une dysfonction endothéliale (*cross-tolerance*). De multiples causes ont été évoquées : une diminution de la biodisponibilité du NO , une bioactivation défailante, une désensibilisation de la GCs, l'inactivation des kinases GMPc dépendantes, la stimulation des phosphodiésterases ou encore une augmentation de la réponse aux vasoconstricteurs.

L'hypothèse mécanistique la plus ancienne est celle de la déplétion du pool de thiols de l'organisme. En 1973, Needleman et coll. observent *ex vivo* que la tolérance induite *in vivo* par la trinitrine s'accompagne d'une diminution du niveau de thiols dans les artères isolées de lapin [150]. Par conséquent, des espèces contenant des groupements thiols semblent essentielles pour la biotransformation de la trinitrine et l'oxydation de ces espèces causerait la tolérance (Figure 12). Cette théorie a été confortée par des travaux montrant que l'administration de dithiothréitol [150] ou d'autres thiols [151] avec la nitroglycérine pouvait supprimer au moins en partie une tolérance établie. Par la suite, Kojda et coll. observent une diminution de la concentration de thiols libres dans les muscles lisses d'artères coronaires de porc rendues tolérantes [152]. Haj-jehia et coll. [153], quant à eux, n'observent pas de déplétion du pool de thiols libres dans le plasma ou les tissus vasculaires sous perfusion de nitroglycérine, malgré l'apparition d'une tolérance. Par contre, ils observent une diminution de la production de GMPc après administration de nitroprussiate de sodium ou de nitroglycérine quand l'animal a été prétraité avec un agent capable d'alkyler les résidus thiols des protéines. Par conséquent, ce serait plutôt le pool de résidus thiols liés aux protéines qui serait « déplété », et non celui des thiols libres comme le glutathion ou la cystéine. Les auteurs émettent l'hypothèse que le métabolisme des nitrates organiques conduirait à l'oxydation de la guanylate cyclase soluble, la rendant ainsi insensible.

Depuis son apparition, l'hypothèse de déplétion des stocks de thiols a été beaucoup remise en question et la principale théorie actuellement retenue est l'induction d'un stress oxydant, avec une cascade de réactions subsidiaires, aboutissant notamment à une diminution de la bioactivation des composés. Ainsi, l'ALDH-2 métabolise au niveau de la mitochondrie la nitroglycérine en 1,2-dinitrate de glycérol et en ion nitrite [154]. Cette réaction dépend de thiols réduits au site actif de l'enzyme et de la présence de dithiols (par exemple l'acide dihydrolipoïque) comme donneurs d'électrons. Lors du métabolisme de la nitroglycérine, ou en présence d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou de l'azote (ERA), les résidus thiols de l'ALDH-2 sont oxydés et l'enzyme perd sa fonction [155]. L'ALDH-2 métabolise la nitroglycérine, le pentaérythryl tétranitrate (dérivé nitré non commercialisé en France) et son métabolite le pentaérythryl trinitrate, mais pas le mononitrate ni le dinitrate d'isosorbide, qui sont métabolisés par les cytochromes P450 [156]. Ceci pourrait expliquer les différences entre les principes actifs. Les observations *in vitro* de Daiber et coll. indiquent une corrélation entre puissance de la molécule, formation d'ERO mitochondriales et inhibition de l'ALDH-2 dans l'ordre : nitroglycérine >> pentaérythryl tétranitrate > pentaérythryl trinitrate > dinitrate d'isosorbide > mononitrate d'isosorbide [157].

Par ailleurs, Sayed et coll. [158] montrent que la S-nitrosylation de la guanylate cyclase soluble par la nitroglycérine entraîne sa désensibilisation et pourrait donc faire partie des mécanismes impliqués dans le développement de la tolérance.

En résumé, l'hypothèse du stress oxydant proposée par Münzel et coll. [159] consiste en l'augmentation de production d'ions superoxyde en réponse au traitement par les dérivés nitrés, suivie de la formation d'ions peroxy-nitrite, du découplage de la eNOS (par déplétion du cofacteur BH₄) et de la diminution de la signalisation GMPc. En outre, l'oxydation de la prostacycline synthase [160] et de l'ALDH-2 [157] entraîne leur inactivation, ce qui pourrait participer à l'instauration de la tolérance (Figure 12).

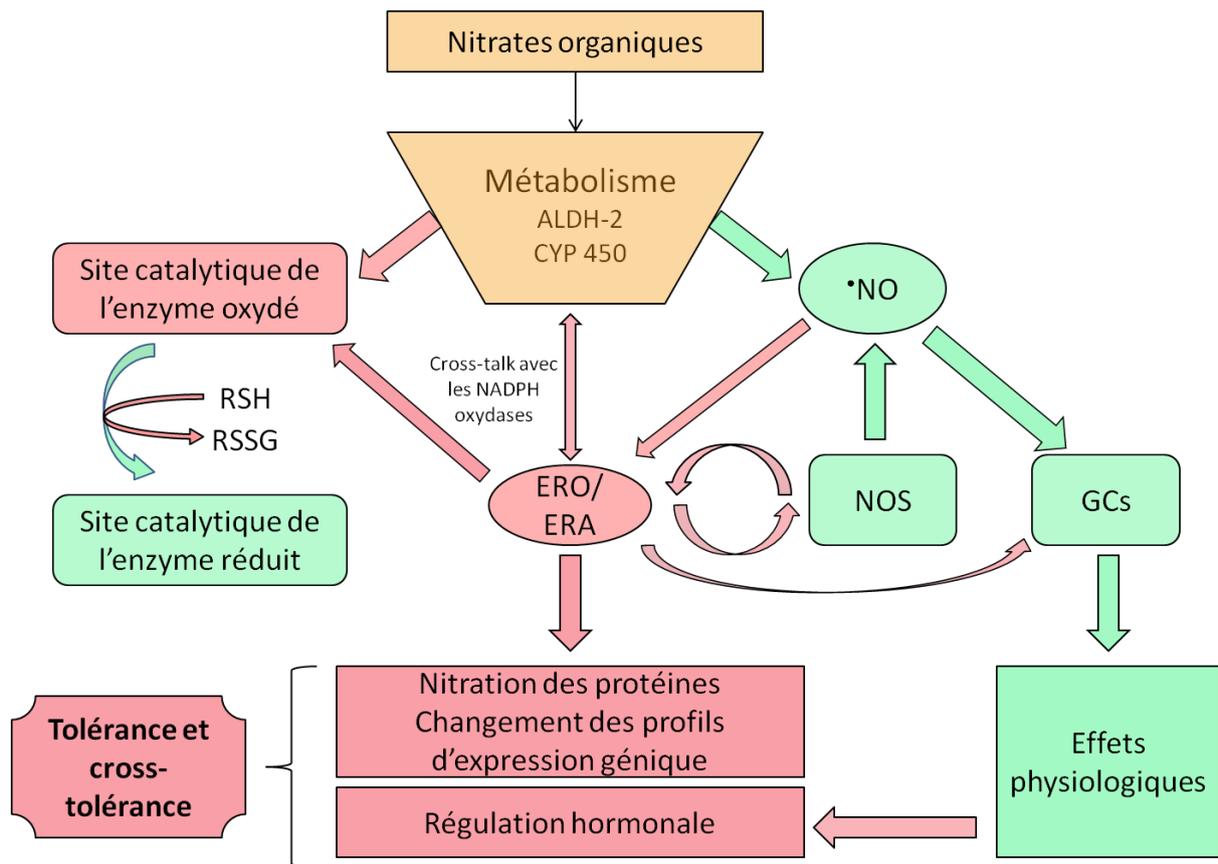


Figure 12 : Métabolisme des nitrates organiques et tolérance. ALDH-2 : Aldéhyde déshydrogénase mitochondriale ; RSH : pool de thiols réduits ; RSSG : pool de thiols oxydés (pont disulfure).

Certains auteurs utilisent le terme « tachyphylaxie » pour décrire la tolérance clinique observée avec les dérivés nitrés. D'après l'encyclopédie Larousse, la tachyphylaxie est un « phénomène de tolérance rapide de l'organisme vis-à-vis d'un médicament dont l'efficacité décroît au fur et à mesure des prises, obligeant à en augmenter les doses. L'augmentation des doses n'est pas toujours efficace, ni même possible en raison du seuil de toxicité rapidement atteint. Toutefois, la tachyphylaxie finit par disparaître après un certain délai, dont il faut tenir compte dans le rythme d'administration : deux applications de corticostéroïdes cutanés doivent ainsi être séparées par un intervalle de 12 heures ou, mieux, de 24 heures ». En effet, l'instauration d'une fenêtre thérapeutique (un intervalle de temps sans traitement) est classiquement utilisée dans les traitements par dérivés nitrés pour ralentir ou éviter la perte d'efficacité (Vidal®). Cette fenêtre thérapeutique pourrait être néfaste pour les patients, avec notamment un effet rebond d'ischémie et d'hypersensibilité aux vasoconstricteurs pendant les heures où ils ne reçoivent pas de traitement par dérivés nitrés. Freedman et coll. [161] ont montré notamment une augmentation du nombre et de

la durée des épisodes ischémiques silencieux chez les patients angineux traités par nitrates organiques par rapport au groupe placebo. Par conséquent, une thérapie par un autre anti-ischémique (bétabloquant ou inhibiteur calcique) est instaurée afin d'éviter l'effet rebond.

De plus, l'usage à long terme des nitrates organiques augmenterait les risques cardiaques [162,163]. Ce pourrait être un effet secondaire de l'inhibition de l'ALDH-2, car il a été montré que son activation protège le cœur en cas d'ischémie et que son inactivation au contraire contribue aux problèmes cardiaques [164].

Dans la pratique clinique, la nitroglycérine [165], le 5-mononitrate [166] et le dinitrate d'isosorbide [167] induisent des phénomènes de tolérance, mais pas le pentaérythrityl tétranitrate [165]. Ceci serait dû à son effet activateur au niveau génomique de voies antioxydantes (hème-oxygénase 1 et ferritine [168]) et cardioprotectrices (Apex1 et NFAT5 [169]). Il induit également l'expression de la superoxyde dismutase extracellulaire [170] et de la glutathion peroxydase [171], deux protéines à fort pouvoir antioxydant. Des essais cliniques associant aux nitrates organiques la prise d'antioxydants comme la vitamine C à forte dose en intra-artériel [166] ou l'hydralazine par voie orale [172] ont été réalisés avec succès. Néanmoins, ces résultats sont controversés, notamment en ce qui concerne la vitamine C qui, après administration par voie orale, n'a pas eu d'impact sur la tolérance dans l'étude de Milone et coll. [173]. De plus, il a été montré que l'administration intraveineuse d'une dose unique de *N*-acétylcystéine est efficace contre la tolérance induite par la trinitrine [174] mais pas contre celle induite par le dinitrate d'isosorbide [175]. Cependant, d'après d'autres auteurs, une perfusion à haute dose de *N*-acétylcystéine concomitante à l'administration de dinitrate d'isosorbide aurait un effet sur les paramètres cardiaques, sans changer pour autant l'endurance des patients à l'exercice : elle préviendrait donc partiellement la tolérance [176].

Actuellement, l'arsenal thérapeutique agissant sur la signalisation de l'oxyde nitrique est assez limité. Les médicaments disponibles présentent des inconvénients majeurs comme des demi-vies courtes ou l'apparition rapide d'un phénomène de tolérance, nécessitant

l'instauration d'une fenêtre thérapeutique qui peut s'avérer délétère pour les patients. Une rupture de l'homéostasie redox de l'organisme par augmentation des espèces réactives de l'oxygène/de l'azote et/ou diminution de leur détoxification est vraisemblablement l'une des causes principales de ce phénomène. Les mécanismes étant à l'heure actuelle encore peu explorés et connus de façon incomplète, il semble difficile d'améliorer l'utilisation de ces médicaments.

PARTIE II : LE S-NITROSOGLUTATHION (GSNO)

1. GENERALITES SUR LE GSNO

1.1. AVANTAGES

1.1.1. De la classe des S-nitrosothiols

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit le phénomène de tolérance induit par les nitrates organiques. L'hypothèse la plus ancienne, bien que controversée, implique une déplétion des réserves de thiols de l'organisme. Même si leur pool n'apparaît pas systématiquement diminué, les thiols libres tissulaires sont vraisemblablement impliqués dans le métabolisme des nitrates organiques. Ils pourraient intervenir pour « régénérer » le site catalytique des enzymes (Figure 12) : par exemple, dans la réduction du pont disulfure formé au niveau du site catalytique de l'ALDH mitochondriale lors du métabolisme des nitrates. Par ailleurs, d'après Li et coll. [177], la transformation des dérivés nitrés de type isosorbide mettrait également en jeu des thiols grâce à des réactions de transnitrosation, pour « détoxifier » les espèces réactives produites.

L'autre hypothèse majeure est l'induction d'un stress oxydant et nitrosant, dont la cause est multifactorielle et vraisemblablement liée à la transformation enzymatique des nitrates organiques. Les S-nitrosothiols quant à eux n'induisent pas de stress oxydant ou nitrosant, ni de tolérance, et restent efficaces même après développement d'une tolérance à la nitroglycérine, que ce soit *ex vivo* [79,178] ou *in vivo* chez le rat [179] ou le lapin [180]. Les deux explications possibles seraient soit qu'ils activent la guanylate cyclase par un autre mécanisme, soit qu'ils se lient également à un de ses résidus cystéines, mais la liaison formée serait plus facile à attaquer par des réducteurs.

Aussi, d'un point de vue thérapeutique, l'utilisation de S-nitrosothiols semble être d'un grand intérêt, puisque ces molécules apportent à la fois un résidu NO et un thiol.

1.1.2. Du S-nitroso glutathion par rapport aux autres S-nitrosothiols

Les études préalablement citées concernent principalement des S-nitrosothiols construits chimiquement par le greffage du groupement fonctionnel chimique nitroso- sur la

N-acétylpénicillamine (NAP) : *S*-nitroso-*N*-acétyl-*D,L*-pénicilline (SNAP) (Figure 13) et ses dérivés plus lipophiles. La pénicillamine est un métabolite de la pénicilline, antibiotique bien connu. La pénicillamine ne possède pas de propriétés antibiotiques, mais est utilisée comme immunosuppresseur dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde [181] ou comme chélateur du cuivre dans la maladie de Wilson [182] et de la cystéine dans la cystinurie [183].

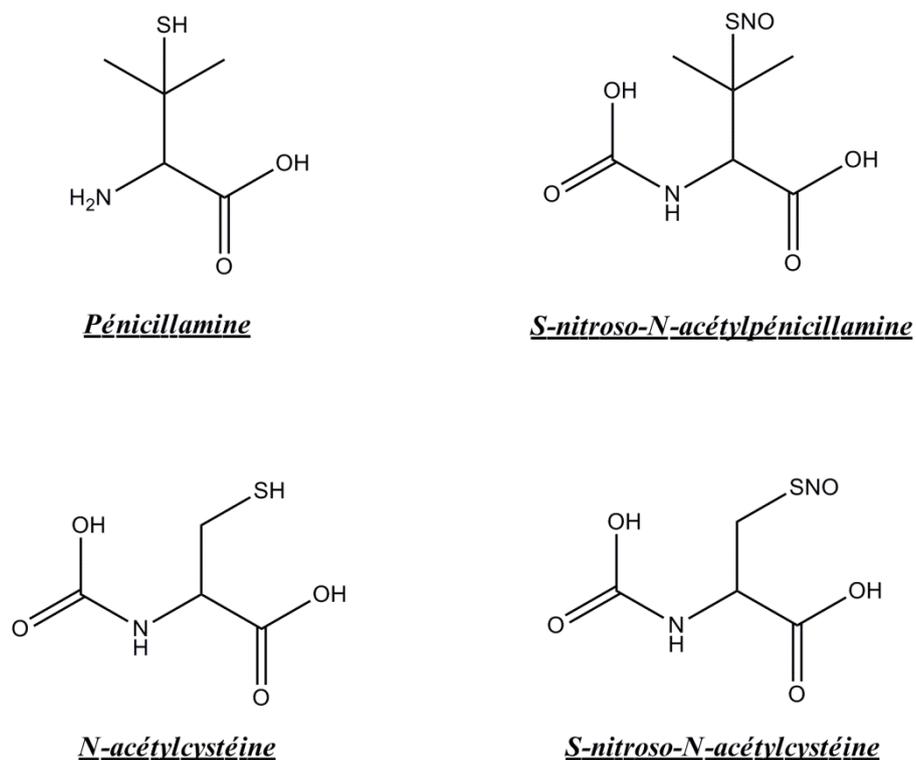


Figure 13 : Structures de la pénicillamine, de la *N*-acétylcystéine et des *S*-nitrosothiols correspondants

Toutefois, de nombreux cas de réactions auto-immunes ont été rapportés, avec notamment des pemphigus (apparition de bulles sur les muqueuses puis érosion par décollement) [184], des glomérulopathies avec protéinurie [185] et des myasthénies graves [186]. Li et coll. expliquent ces pathologies auto-immunes par une liaison irréversible entre le groupement fonctionnel carbonyle de la pénicillamine et des groupements amines présents à la surface des macrophages [187]. Cette liaison ressemblerait à la liaison (réversible) entre les lymphocytes T et les macrophages qui permet l'activation de ces derniers : ainsi, en présence de pénicillamine, le système immunitaire serait activé de façon continue.

Parmi les autres RSNO étudiés dans la littérature, la *S*-nitroso-*N*-acétylcystéine (NACNO) a également montré *in vitro* ou chez l'animal des propriétés hypotensives [140], d'antiagrégant plaquettaire [188], d'antiparasitaire [189], de protection contre le syndrome d'ischémie-reperfusion [190] ou contre la peroxydation lipidique [191]. La *S*-nitroso-*N*-acétylcystéine peut être obtenue en nitrosant la *N*-acétylcystéine (Figure 13). La *N*-acétylcystéine est un médicament dérivé de la cystéine administré par voie intraveineuse dans les intoxications au paracétamol : elle permet de régénérer le pool de glutathion et ainsi d'empêcher l'accumulation d'un métabolite extrêmement toxique pour le foie [192]. Elle peut également être administrée par voie orale comme agent mucolytique : elle réduit les ponts disulfures des mucoprotéines, permettant ainsi de fluidifier le mucus. Par voie orale [193] ou intraveineuse [194], elle est quelquefois utilisée hors autorisation de mise sur le marché (AMM) comme protecteur rénal pour prévenir les néphropathies induites par les agents de contraste, mais la littérature est controversée à ce sujet. Il semblerait qu'elle puisse protéger le rein contre les effets secondaires de certains médicaments, au moins chez l'animal : amphotéricine [195], ciclosporine [196], cisplatine [197]. Cependant, la *N*-acétylcystéine par voie orale ou parentérale présente des effets secondaires parfois sévères chez 3 à 6 % des patients : par exemple hypotension, angiodème, éruption cutanée, réaction allergique sévère avec bronchospasme [198].

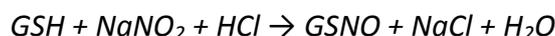
Nous avons vu précédemment que les *S*-nitrosothiols étaient des molécules très intéressantes par rapport aux thérapeutiques actuelles. Pourtant les deux exemples ci-dessus montrent que des *S*-nitrosothiols « exogènes » ne sont pas idéaux dans la mesure où le squelette sur lequel est greffée la liaison –SNO n'est pas exempt de toxicité. De là vient l'idée d'administrer de préférence un *S*-nitrosothiol qui existe déjà de façon physiologique. AlBSNO et HbSNO ne sont pas d'excellents candidats de par leur nature protéique, pouvant entraîner des réactions immunitaires. Parmi les autres *S*-nitrosothiols endogènes, GSNO semble plus intéressant que d'autres (CysNO, CysGlyNO) : sa synthèse et sa précipitation sont assez facilement réalisables. De plus, il existe déjà une littérature abondante autour de cette molécule.

1.2. VOIES D'OBTENTION DU S-NITROSOGLUTATHION

La molécule peut être achetée sous forme de poudre directement auprès de différents fournisseurs de produits chimiques (non pharmaceutiques). Néanmoins, elle peut également être synthétisée relativement facilement en milieu liquide et à moindre coût en suivant l'un des protocoles suivants.

1.2.1. Par réaction avec le nitrite de sodium

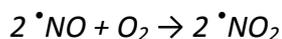
C'est la réaction la plus souvent utilisée [92,199]. Il s'agit de faire réagir en condition acide le glutathion réduit avec le nitrite de sodium de façon équimolaire :



Selon les auteurs, le temps de contact nécessaire à l'atteinte du plateau de la réaction varie mais est de l'ordre de 30 minutes à 1 heure.

1.2.2. Par réaction avec $\cdot NO$ gaz

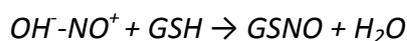
Une autre méthode a été utilisée pour la synthèse de NACNO [140] ou de GSNO en solutions aqueuses mais aussi dans une matrice de poly(éthylène glycol) (PEG) et d'eau [141]. Brièvement, un mélange gazeux d'oxyde nitrique et de dioxygène est introduit dans une solution aqueuse de glutathion contenue dans un récipient thermostaté. Le plateau de réaction est atteint en quelques minutes, une fois que le gaz a diffusé dans le milieu. La nitrosation du glutathion est réellement effectuée par le trioxyde d'azote N_2O_3 (produit par l'auto-oxydation du $\cdot NO$) selon les réactions suivantes :



Les ions nitrite formés peuvent ensuite créer l'équilibre suivant :



Et la S-nitrosation du GSH peut alors être obtenue par l'attaque du nitrosonium NO^+ sur l'atome de soufre, selon la réaction suivante :



Le bilan de la réaction peut donc s'écrire :



1.2.3. Par transnitrosation avec un autre nitrosothiol

Des études ont été réalisées afin d'obtenir des S-nitrosothiols par une réaction de transnitrosation avec un autre nitrosothiol (de type S-nitrosothiol [200] ou N-nitrosothiol [201]) :



Ces études n'étaient pas destinées à proposer une nouvelle voie de synthèse de S-nitrosothiols, mais plutôt à étudier des mécanismes de transnitrosation qui peuvent se produire *in vivo*.

Les différentes méthodes décrites précédemment permettent d'obtenir des solutions de GSNO. La stabilité de ces dernières est de l'ordre de quelques jours. Pour pouvoir conserver dans les meilleures conditions possibles le produit, il est préférable de le précipiter. Par ailleurs, travailler avec un produit purifié plutôt qu'une solution peut être une nécessité pour la formulation galénique de la molécule ou pour l'administration d'un produit selon les critères pharmaceutiques.

2. DEGRADATION DU GSNO

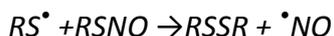
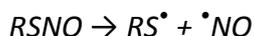
Trois types de dégradation ont été décrits pour les S-nitrosothiols. En premier lieu, un clivage homolytique de la liaison S-NO, générant le radical $\cdot\text{NO}$ et un radical thiyl ($\text{RS}\cdot$). Cependant, à température ambiante et sans l'action de la lumière, cette réaction est très lente [202,203]. En second lieu, un clivage hétérolytique a également été décrit, pouvant être catalysé par des ions métalliques. En présence de thiols (thiolates RS^- , exactement), cette réaction permet la transnitrosation [204–208] : cette réaction semble prédominer dans les milieux biologiques [209]. Enfin, différentes enzymes sont susceptibles de dégrader les S-nitrosothiols.

Ce chapitre présente les différents paramètres pouvant influencer la dégradation de ces molécules. L'importance respective de ces différents mécanismes *in vitro* et *in vivo* dans la dégradation des RSNO et donc dans la libération du $\cdot\text{NO}$ est encore discutée.

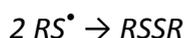
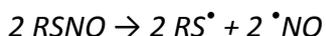
2.1. PARAMETRES INFLUENÇANT LA RUPTURE HOMOLYTIQUE DE LA LIAISON S-NO

2.1.1. Lumière

Deux mécanismes possibles de dégradation photochimique des RSNO sont décrits après irradiation. Pour Singh et coll. [210], un rayonnement lumineux à 550 nm sur les RSNO suffit pour briser la liaison S-NO en formant $\cdot\text{NO}$ et un radical alkyl thiyl $\text{RS}\cdot$. Le radical thiyl peut alors se combiner à un autre S-nitrosothiol, pour former le disulfure correspondant et libérer une autre molécule de $\cdot\text{NO}$.



L'équipe de Miller prône un autre mécanisme où la première étape serait la même, mais où, par la suite, la combinaison de deux radicaux thiyl génèrerait uniquement le disulfure correspondant [211] :



2.1.2. Température

Le mécanisme de décomposition en fonction de la température semble similaire à celui de la dégradation photochimique : libération de $\cdot\text{NO}$ et d'un radical thiyl, qui peut ensuite soit attaquer un autre RSNO soit se recombinaison avec un autre thiyl [210]. Cette rupture homolytique de la liaison S-NO serait indépendante de la structure du RSNO [212].

2.2. PARAMETRES INFLUENÇANT LA RUPTURE HETEROLYTIQUE DE LA LIAISON S-NO

2.2.1. Ions métalliques

Les métaux de transition sous leur forme ionique sont connus comme étant des catalyseurs de la dégradation des RSNO *in vitro*, notamment Cu^+ , Cu^{2+} (comme précurseur de Cu^+) ou Fe^{2+} [213–215]. D'autres ions métalliques (Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}) ont été testés mais ne semblent pas intervenir dans la dégradation des RSNO [213]. Ag^+ et Hg^{2+} réagissent avec les S-nitrosothiols selon un mécanisme différent, par hydrolyse stœchiométrique [216] : cette réaction est d'ailleurs à la base du dosage des RSNO par la méthode de Saville-Griess décrite plus loin. De plus, l'utilisation de chélateurs de métaux comme l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) ou l'acide diéthylène triamine penta-acétique (DTPA) dans des expériences permet d'augmenter la durée de vie des RSNO. C'est le cas par exemple pour le GSNO dans l'expérience de Tullet et coll. [217], où la demi-vie du GSNO est multipliée par 3 en présence de chélateur. On peut également noter que certains métaux à l'état d'oxydoréduction 0 peuvent interagir avec les RSNO, comme par exemple l'or organisé en nanoparticules [218].

Ces réactions impliquent de prendre des précautions lors des préparations de solutions de S-nitrosothiols. En effet, des ions métalliques non désirés peuvent être introduits lors de la préparation des solutions par l'utilisation de réactifs de mauvaise qualité (sels du tampon, eau, ...). Une excellente illustration de l'importance de cette contamination de la solution par les impuretés des réactifs est apportée par les expériences de Gu et coll. [219]. La dégradation de CysNO est fortement ralentie dans un tampon de haute qualité ou par l'ajout d'un chélateur à un tampon de mauvaise qualité. L'ajout de cations métalliques dans le tampon de haute qualité ramène la demi-vie de CysNO aux valeurs obtenues dans le tampon de mauvaise qualité.

Noble et coll. [220,221] ont montré que la décomposition du GSNO en présence d'ions métalliques était dépendante de la concentration initiale de la solution en GSNO. Selon le mécanisme qu'ils proposent, les disulfures (GSSG) produits par la décomposition de GSNO peuvent complexer Cu^{2+} , limitant ainsi la formation de Cu^+ et stabilisant par conséquent le RSNO. Le glutathion oxydé se comporterait ainsi comme un chélateur, grâce à ses résidus glutamate. Ils proposent la structure suivante pour le complexe formé (Figure 14) :

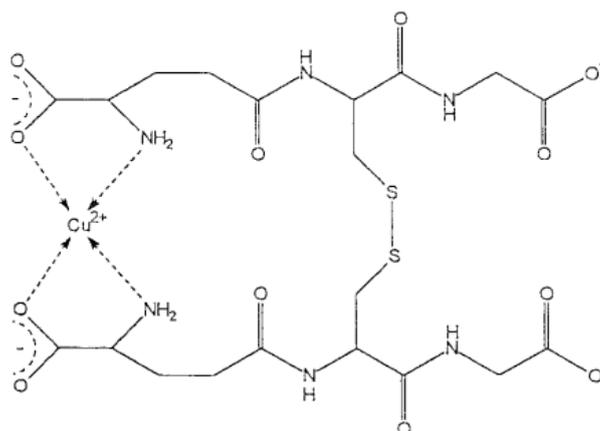


Figure 14 : Structure du complexe théoriquement formé entre le glutathion oxydé et l'ion cuivre (II). D'après [220,221].

Dans leurs expériences, des solutions de GSNO à des concentrations millimolaires sont stables, car elles contiennent suffisamment de GSSG pour chélater le cuivre (Cu^{2+} 10 μM). En revanche, pour des concentrations plus faibles, la stabilité de GSNO est réduite. Ceci pourrait expliquer pourquoi des composés « stables » *in vitro* à des concentrations millimolaires comme le GSNO peuvent être très efficaces (c'est-à-dire libérer facilement le $\cdot\text{NO}$) à des concentrations nanomolaires *ex vivo* et *in vivo* [220,221].

In vivo, le rôle exact du cuivre dans la décomposition des RSNO n'est pas déterminé. Néanmoins, les concentrations physiologiques de cuivre libre sont très faibles, bien plus que les concentrations utilisées dans les études de dégradation *in vitro*. En effet, la concentration des ions cuivre dans les systèmes biologiques est estimée entre 10^{-6} et 10^{-12} M. Cependant, certains auteurs indiquent que le cuivre (Cu^{2+}) lié aux peptides et protéines pourrait également générer du cuivre (I) (Cu^+) [222], ce qui serait un argument potentiel en faveur d'une implication de cette réaction dans la dégradation des RSNO *in vivo*.

2.2.2. Réducteurs

L'utilisation d'agents réducteurs comme la vitamine C ou les thiols peut accélérer la dégradation des RSNO.

La vitamine C (acide ascorbique) joue un rôle physiologique important comme antioxydant [223], notamment comme protecteur contre la peroxydation lipidique. Elle est présente en assez forte concentration dans différents organes [224]. L'acide ascorbique peut réduire les RSNO : cette réaction est fortement dépendante du pH [225,226].

De plus, dans l'expérience de Tullet et coll. [217], l'addition de cystéine dans le milieu diminue la stabilité de GSNO, de manière concentration dépendante. A de faibles concentrations en cystéine, GSNO est fortement déstabilisé, alors que cet effet diminue quand la concentration en cystéine augmente. D'après Dicks et coll. [208], en fonction de leur structure et de leur concentration, les thiols libres pourraient augmenter ou diminuer la stabilité des RSNO, car ils pourraient se comporter soit comme des agents réducteurs (généralisant Cu^+), soit comme des chélateurs de Cu^{2+} (le rendant ainsi moins susceptible à la réduction).

Un autre exemple du rôle potentiel de chélateur des thiols réduits est donné par Williams [227]. En effet, la dégradation de SNAP est freinée par des concentrations de NAP supérieures à 10^{-4} M. Il attribue cette observation à la formation d'un complexe pénicillamine-cuivre (utilisation de NAP comme chélateur dans la maladie de Wilson) (Figure 15).

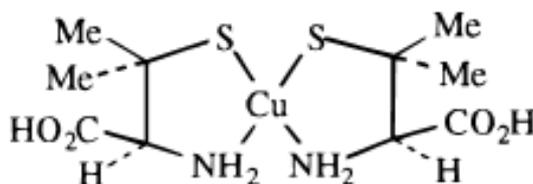


Figure 15 : Complexe formé entre la N-acétylpénicillamine et le cuivre. D'après [227].

2.3. AUTRES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES INFLUENÇANT LA DEGRADATION DES RSNO

2.3.1. pH

La structure électronique des RSNO est en fait une combinaison de trois structures de résonance. On distingue la forme conventionnelle (S), la forme zwitterionique (D) et la forme ionique (I); les structures de résonance et leurs importances relatives sont données ci-dessous (Figure 16a) [228].

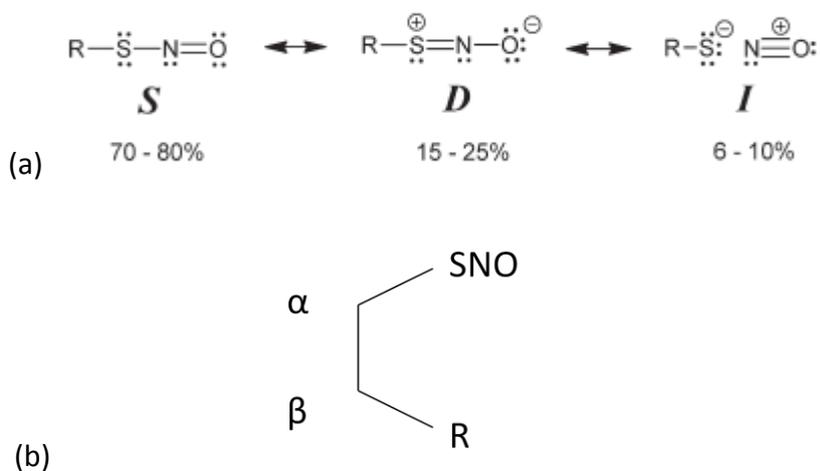


Figure 16 : Formes de résonance (a) et structure chimique (b) des S-nitrosothiols

L'existence de la forme I permet d'expliquer la faible énergie de dissociation de la liaison S-NO (estimée à 30 kcal/mol [229]). La structure D confère des propriétés de double liaison à la liaison S-N, limitant ainsi la dégradation par clivage homolytique. En fonction des structures des RSNO, et notamment des substituants présents sur les carbones en α et β du soufre (Figure 16b), la structure D peut être plus ou moins favorisée, modulant ainsi la labilité de la liaison S-NO [228].

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'influence du pH sur la dégradation des RSNO [219,226] en présence d'ions métalliques, d'ascorbate ou de thiols libres. La dégradation de la S-nitrosocystéine en présence de cystéine (en fort excès) est maximale à pH 8, et diminue quand le pH s'éloigne de cette valeur dans un sens ou l'autre [230]. Les auteurs indiquent que la cystéine peut exister sous quatre formes (trois fonctions acido-basiques) en fonction du pH, qui sont susceptibles d'intervenir comme catalyseurs de

transfert du groupement -NO. D'autre part, la dégradation du GSNO en présence d'ascorbate augmente entre pH = 5 et pH = 8, en favorisant la forme la plus réactive de l'ascorbate [226]. Enfin, Gu et coll. [219] montrent que dans un tampon de faible qualité, la dégradation de la S-nitrosocystéine est grandement accélérée quand on augmente le pH de 5,9 à 8,0. Ils expliquent ces résultats par la présence de contaminants métalliques dans les tampons, dont les formes les plus réactives avec les RSNO seraient favorisées par des pH proches du pH physiologique.

2.3.2. Dioxygène

L'oxygénation du milieu provoque la décomposition des S-nitrosothiols, bien que le mécanisme exact ne soit pas encore clairement défini [78]. Grossi et coll. [231] proposent un mécanisme impliquant le trioxyde d'azote (N_2O_3) (Figure 17).

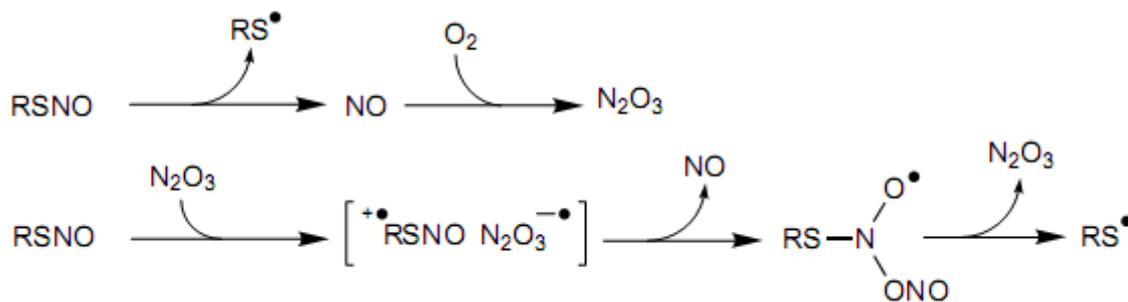


Figure 17 : Mécanisme proposé pour la dégradation des S-nitrosothiols par le dioxygène

Dans cette réaction, l'oxyde nitrique libéré par la décomposition du S-nitrosothiol est susceptible de réagir rapidement avec le dioxygène de l'air pour former N_2O_3 . Par la suite, un transfert d'électrons entre N_2O_3 et un RSNO conduirait à la formation d'une paire d'ions radicalaires, qui se décomposerait ensuite en un intermédiaire radicalaire, avec libération de NO qui peut de nouveau réagir avec le dioxygène (initiation de la chaîne). Quant à l'intermédiaire, il peut à son tour subir une rupture homolytique de la liaison S-NO avec formation de radical thiyl et de N_2O_3 (propagation de la réaction en chaîne).

En résumé, la notion de stabilité chimique est surtout liée aux conditions expérimentales. Dans le cas des RSNO, de nombreuses études ont été effectuées, mais les

stabilités obtenues sont difficilement comparables de par la diversité des conditions utilisées. A l'heure actuelle, il existe cependant un certain consensus sur le rôle de tous ces facteurs physico-chimiques, notamment en ce qui concerne le pH : les RSNO seraient stables à pH acide (par exemple le pH de fin de synthèse = 0,3), mais pas à pH neutre. L'utilisation d'un pH acide ne gêne pas la conservation, mais pose un réel problème pour l'utilisation de ces solutions dans des expériences *ex vivo* ou *in vivo*. Le pH physiologique étant entre 7,35 et 7,45 (sauf compartiments particuliers), il semble nécessaire d'ajuster le pH de ces solutions avant utilisation.

2.4. DEGRADATION ENZYMATIQUE DES S-NITROSOTHIOLS

Les principales enzymes ayant été décrites comme permettant la libération de $\cdot\text{NO}$ à partir des RSNO sont les thiorédoxines (Trx) et les protéines disulfure isomérases (PDI) [228]. D'autres enzymes ont cependant été décrites comme susceptibles de dégrader les RSNO, comme par exemple la xanthine oxydase [232], la superoxyde dismutase [233], ou l'alcool déshydrogénase de type III [234]. Par ailleurs, la GGT déjà citée précédemment dans ce travail sera décrite de façon plus complète, pour son action spécifique du GSNO.

2.4.1. Thiorédoxines

Les thiorédoxines sont des enzymes ubiquitaires essentielles pour l'homéostasie redox de l'organisme. Elles sont notamment impliquées dans la réduction des ponts disulfures des protéines ou la dénitrosation des protéines nitrosées [235]. On retrouve ces petites protéines (12 000 g/mol) très conservées chez tous les organismes (mammifères, végétaux, levures), en quantité variable. Chez les mammifères, on distingue trois isoformes de Trx (Tableau 5).

Tableau 5 : Caractéristiques des trois isoformes de thiorédoxines chez les Mammifères

Isoformes	Localisation Tissulaire	Localisation intracellulaire
Trx-1	ubiquitaire	cytosol
Trx-2	ubiquitaire	mitochondrie
P32TrxL (thioredoxin-like cytosolic protein)	Estomac, testicules, moelle osseuse	cytosol

Le centre catalytique de l'enzyme contient le motif invariant [Tryptophane-Cystéine₁-Glycine-Proline-Cystéine₂] : c'est la différence de réactivité entre les deux cystéines qui conditionne le mécanisme catalytique des Trx [236]. La cystéine *N*-terminale du motif CXXC agit comme un nucléophile qui attaque le pont disulfure des substrats comme le GSNO. Il y a alors formation d'un pont disulfure entre l'enzyme et le substrat, avec libération de [•]NO ou HNO. Lors du changement de conformation induit par cette réaction, la seconde cystéine, préalablement enfouie au cœur de la protéine, se retrouve exposée au milieu externe et rapprochée de la première cystéine [237]. La seconde cystéine, sous forme thiolate (R-S⁻), peut alors réagir avec le pont disulfure intermoléculaire préalablement formé, avec réduction du substrat et formation d'un pont disulfure intramoléculaire au sein de l'enzyme (Figure 18).

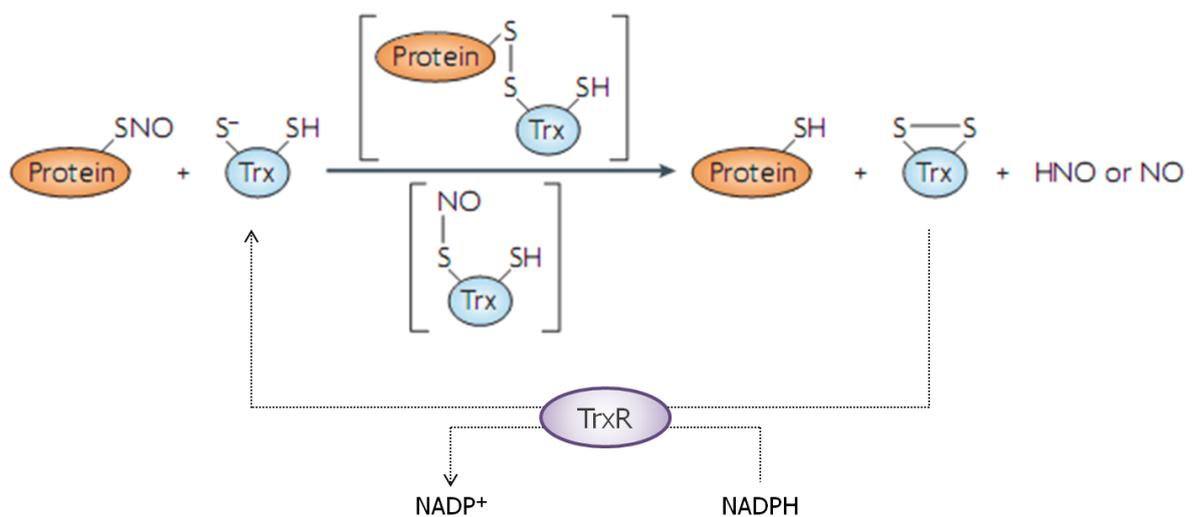


Figure 18 : Schéma de la réaction d'un S-nitrosothiol avec la thioredoxine, exemple d'un S-nitrosothiol protéique. Modifié d'après [238].

L'enzyme oxydée est ensuite régénérée par la thioredoxine réductase (TrxR) en présence de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH).

2.4.2. Protéines disulfure isomérase (PDI)

Depuis leur découverte [239], 17 protéines disulfure isomérase ont été identifiées chez l'homme, avec des architectures et des sites actifs variés [240]. Leur site actif comporte également deux résidus cystéine [241]. Ces enzymes peuvent catalyser la formation, la réduction ou l'isomérisation de ponts disulfures, en fonction du substrat et de l'environnement redox. Leur localisation est principalement le réticulum endoplasmique, mais ces enzymes peuvent également être sécrétées par certaines cellules comme les cellules endothéliales, à la surface desquelles elles restent associées par des interactions électrostatiques [100]. Elles peuvent alors participer au métabolisme des RSNO ; il a en effet été montré qu'elles pouvaient dénitrifier GSNO [242], permettant la libération de $\cdot\text{NO}$ et son passage dans la cellule par diffusion à travers la membrane cytoplasmique.

2.4.3. γ -glutamyltransférase

La γ -glutamyltransférase (GGT) est une glycoprotéine hétérodimérique transmembranaire majoritairement exprimée dans les cellules épithéliales de nombreux tissus, érythrocytes exceptés [243]. Elle est utilisée en clinique comme indice de dysfonctionnement hépatobiliaire [244].

Bien que son rôle physiologique ne soit qu'imparfaitement connu, elle joue un rôle essentiel dans le recyclage du glutathion. En effet, c'est la seule enzyme clivant le glutathion et ses sulfo-conjugués en quantités importantes [245]. La GGT catalyse la coupure de molécules contenant un groupement γ -glutamyl- (ex: GSH) par hydrolyse ou transpeptidation. Il y a transfert du groupement γ -glutamyl- d'un donneur à un accepteur avec libération dans le cas du GSH d'un dipeptide cystéinylglycine. Comme le glutathion sérique est incapable de pénétrer dans la cellule sous forme de tripeptide, le clivage par la GGT permet à la cellule de capter les acides aminés nécessaires à une synthèse intracellulaire de glutathion.

Par ailleurs, la conjugaison avec le glutathion étant une des principales voies de métabolisation des xénobiotiques, la GGT est également impliquée dans la détoxification des molécules exogènes (médicaments anti-mitotiques, hydrocarbures aromatiques, aflatoxines) [246].

En ce qui concerne les RSNO, l'action de la GGT ne permet pas à elle seule de libérer $\cdot\text{NO}$ à partir du GSNO. En effet, elle clive le GSNO de la même façon que le GSH : en présence d'un accepteur, il y a libération de *S*-nitroso-cystéinyglycine (CysGlyNO), qui libèrera $\cdot\text{NO}$ selon le schéma proposé dans la Figure 9.

En conclusion, la dégradation des RSNO est complexe, et fortement dépendante de leur structure. Il existe une littérature importante sur le sujet. Néanmoins, les études sont souvent effectuées dans le but de corrélérer l'activité pharmacologique des RSNO *in vivo* à leur stabilité *in vitro*. Celle-ci est rarement étudiée dans des conditions correspondant aux conditions physiologiques, ce qui peut expliquer le manque de corrélation globalement observé. Par ailleurs, les résultats entre différentes équipes sont difficilement comparables : en effet, l'eau, les réactifs utilisés pour la synthèse ne sont pas toujours de même qualité et le suivi des solutions est effectué généralement par spectrophotométrie UV-visible, méthode qui peut manquer de spécificité. Pour conclure, la synthèse chimique de nouveaux *S*-nitrosothiols doit tenir compte de l'importance de la structure sur leur stabilité, et être réalisée avec des réactifs de haute qualité.

3. METHODES D'ETUDE DES S-NITROSOTHIOLS

Lors de l'étude de S-nitrosothiols, on peut s'intéresser à leur activité biologique (que l'on peut tester par des modèles *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*), à des concentrations physiologiques ou pathologiques, ou encore à leurs propriétés chimiques. Dans tous les cas, il faut disposer de méthodes permettant dans l'idéal d'identifier et de quantifier les RSNO, si possible avec une grande sensibilité et une grande spécificité.

A l'heure actuelle, il existe très peu de méthodes directes d'étude des RSNO. Les méthodes indirectes exploitent la labilité de la liaison S-N- et détectent en général $\cdot\text{NO}$ ou *in fine* les ions nitrite libérés. Le chlorure de mercure est souvent employé pour obtenir le clivage hétérolytique de la liaison S-NO : l'ion nitrosonium libéré (NO^+) est un agent nitrosant puissant, qui est rapidement transformé en ion nitrite à pH neutre, ou complexé à une molécule lui conférant des propriétés spectrales intéressantes (absorbance, fluorescence...). Des méthodes séparatives sont souvent employées en parallèle pour isoler les RSNO avant de les détecter et éventuellement les identifier.

3.1. METHODES DIRECTES DE DOSAGE DES S-NITROSOTHIOLS

3.1.1. Spectrophotométrie UV-visible

La liaison S-NO est caractérisée par deux maxima d'absorption : l'un entre 330 et 340 nm (avec une absorbance molaire, ϵ , comprise entre 500 et 1000 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), l'autre vers 545 nm (ϵ entre 10 et 20 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Pour les solutions de GSNO, les maxima sont à 334 nm ($\epsilon = 922 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et 545 nm ($\epsilon = 15,9 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) [247].

La spectrophotométrie UV-visible est une méthode simple et rapide pour déterminer la concentration d'une solution de RSNO. Néanmoins, elle manque de spécificité car toute autre substance absorbant à 334 nm peut interférer avec la mesure, notamment les dérivés avec des ponts disulfures.

3.1.2. Biotin switch

Il s'agit d'une méthode développée en 2001 par Jaffrey et Snyder [248] qualitative (éventuellement semi-quantitative) permettant de visualiser et d'identifier des protéines

nitrosées *ex vivo*, dans des cellules ou des tissus. Elle comporte trois étapes successives avant la détection : blocage des groupements –SH libres, réduction des groupements –SNO, biotinylation des groupements thiols ainsi formés (Figure 19).

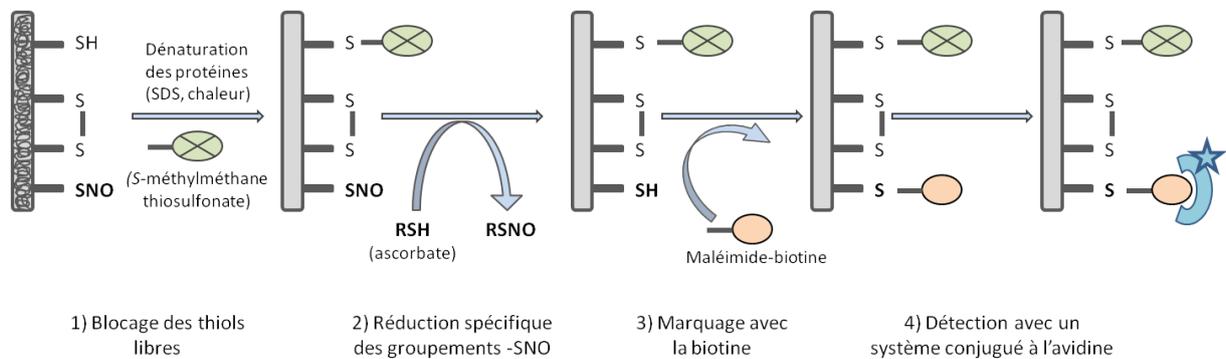


Figure 19 : Principe du biotin-switch pour la détection d'une protéine S-nitrosée

Pour pouvoir identifier les protéines nitrosées détectées, cette technique est souvent couplée avec des techniques séparatives de chromatographie [249] ou de migrations sur gel [250] puis à la spectrométrie de masse pour l'identification.

3.2. METHODES INDIRECTES DE DOSAGE DES RSNO BASEES SUR LA DETECTION D'IONS NITRITE

3.2.1. Spectrocolorimétrie : Saville-Griess

La réaction de Griess décrite pour la première fois en 1879 est une réaction de diazotation en deux étapes en milieu acide, permettant le dosage des ions nitrite. L'espèce NO^+ , générée par l'acidification de NO_2^- , réagit avec le sulfanilamide pour produire un ion diazonium. Après couplage avec la N-(1-naphtyl) éthylènediamine, un chromophore azoïque stable est formé, qui absorbe fortement à 540 nm (couleur rose) (Figure 20).

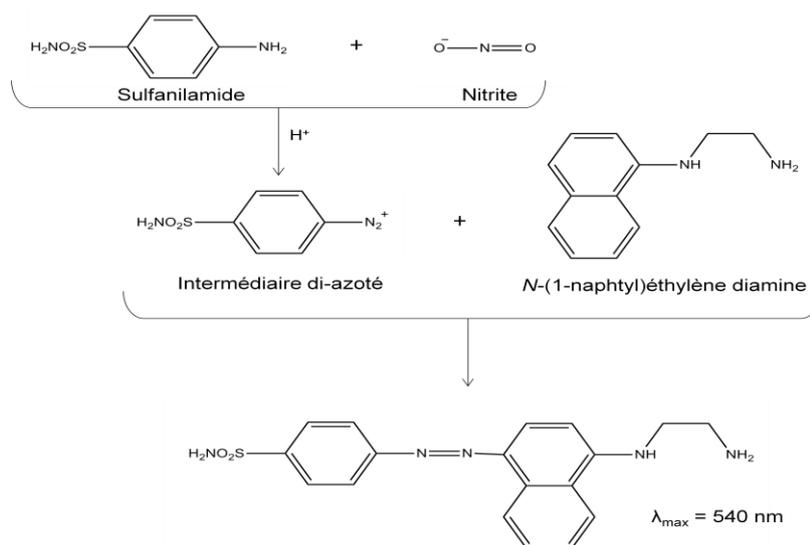
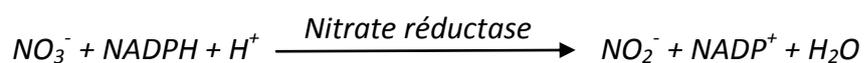


Figure 20 : Principe de la réaction de Griess

Il est possible de quantifier un RSNO en couplant la réaction de Saville [251] à celle de Griess : un clivage hétérolytique de la liaison S-N est obtenu par un excès de sels de mercure (HgCl₂) en milieu acide et NO⁺ libéré peut alors être détecté par la réaction de Griess.

Même s'il s'agit d'une méthode indirecte, la colorimétrie présente plusieurs avantages sur la méthode spectrophotométrique (détection à 334 nm) décrite précédemment. En premier lieu, elle peut être utilisée pour des solutions moins concentrées. En second lieu, elle permet de déterminer à la fois la concentration en RSNO et en ions nitrite des solutions (soit présents en tant que tels, soit issus de la dégradation des RSNO).

Il est également possible de déterminer la concentration en ions nitrate d'une solution grâce à la méthode de Griess après réduction. Cette réaction était historiquement obtenue chimiquement avec du cadmium [252], mais elle est maintenant le plus souvent effectuée enzymatiquement grâce à une nitrate réductase [253] selon l'équation suivante :



La réduction enzymatique permet de travailler sur de plus petits volumes, avec une réduction totale des nitrates et sans problème de toxicité liée au cadmium.

Il peut cependant y avoir en plus une étape d'oxydation de NADPH (par la lactate déshydrogénase et l'acide pyruvique) car le système NADPH/NADP⁺ peut interférer avec la réaction de Griess [254].

Enfin, divers constituants sont connus pour interférer avec la réaction de Griess, comme les protéines [255], les anticoagulants [256], l'azide de sodium, l'acide ascorbique ou les composés contenant des thiols [257].

La spectrophotométrie est très souvent utilisée dans un cadre *in vitro*, du fait de sa grande simplicité et de son faible coût. Elle peut difficilement être employée pour déterminer des concentrations physiologiques de RSNO, du fait de sa faible sensibilité (10^{-6} – $5 \cdot 10^{-7}$ M). Néanmoins, Akaike et coll. [258] ont développé une méthode couplant la chromatographie liquide haute performance avec Griess/Saville-Griess permettant d'augmenter la sensibilité jusque $3 \cdot 10^{-9}$ M.

3.2.2. Spectrofluorimétrie

Le 2,3-diaminonaphtalène (DAN) et la 4,5-diaminofluorescéine (DAF-2) sont des sondes spécifiques des ions nitrite. La réaction du composé aromatique non fluorescent DAN avec des dérivés nitrosés générés par l'acidification des ions nitrite forme un produit hautement fluorescent à pH alcalin, le 2,3-naphtotriazole (NAT) ($\lambda_{exc} = 375$ nm/ $\lambda_{em} = 415$ nm) (Figure 21). De même qu'avec la réaction de Griess, la réaction de Saville peut être réalisée en parallèle pour cliver la liaison S-NO et doser des RSNO.

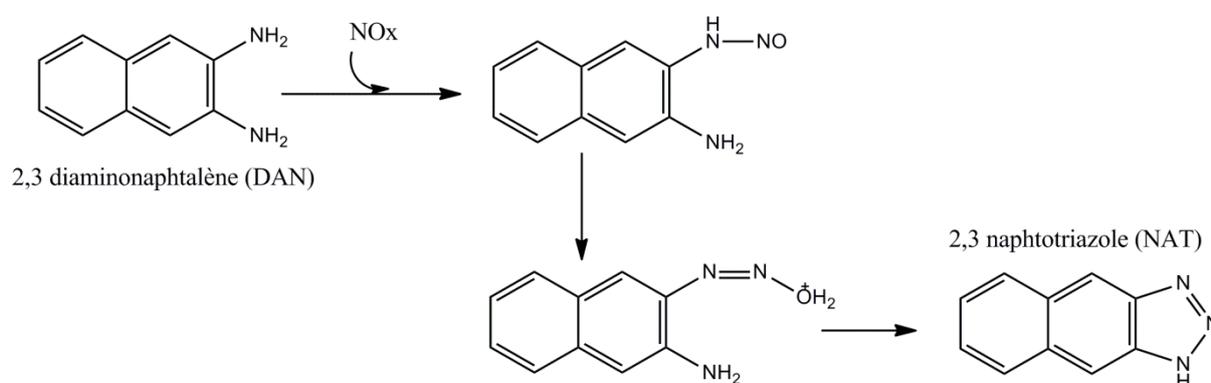


Figure 21 : Spectrofluorimétrie : structure des sondes DAN et NAT. NO_x : espèces réactives dérivées de ^{*}NO.

Le DAF-2 produit également après réaction avec les nitrites en pH acide un composé fluorescent, la triazolofluorescéine (DAF-2T), qui a l'avantage d'être excitable en lumière visible ($\lambda_{exc} = 485 \text{ nm}/\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$), ce qui supprime des signaux provenant de l'autofluorescence des tissus. En revanche il ne peut pas être couplé avec la réaction de Saville-Griess, car le chlorure de mercure génère des modifications spectrales pouvant fausser le résultat. Il est toutefois possible de doser le GSNO avec cette sonde fluorescente grâce au protocole de Bramanti et coll. [259] : GSNO est hydrolysé par la GGT, et la S-nitrosocystéinyglycine ainsi obtenue est décomposée par des ions cuivres (I) en cystéinyglycine et $\bullet\text{NO}$, qui réagit ensuite avec la sonde fluorescente.

Il est également possible de visualiser les dérivés de $\bullet\text{NO}$ *ex vivo in situ* en utilisant un précurseur de DAF-2, le dérivé DAF-2 diacétate, qui est capable de pénétrer à l'intérieur des cellules, où les estérases hydrolysent le résidu diacétate. Le DAF-2 libéré ne peut pas ressortir de la cellule et réagit avec les espèces nitrosantes dérivées de $\bullet\text{NO}$ pour former DAF-2T (Figure 22).

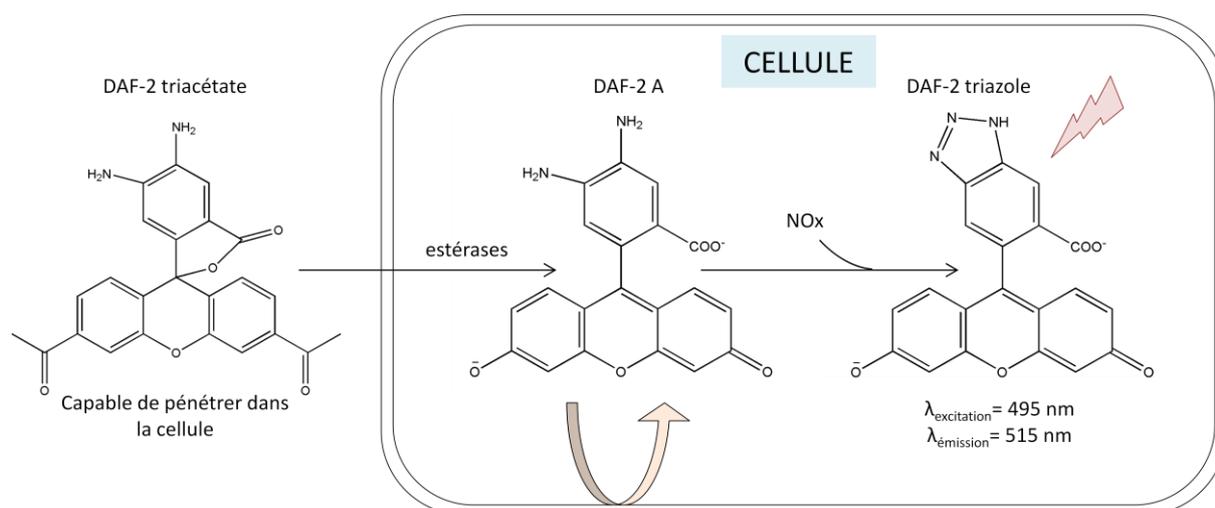


Figure 22 : Spectrofluorimétrie : DAF-2 diacétate. Adapté d'après [260].

3.3. METHODES INDIRECTES DE DOSAGE DES RSNO BASEES SUR LA DETECTION DE $\bullet\text{NO}$

3.3.1. Electrochimie

Les méthodes électrochimiques sont très sélectives pour $\bullet\text{NO}$ et aussi très sensibles (gamme de l'ordre du nanomolaire) : elles permettent d'étudier la concentration de $\bullet\text{NO}$

in vivo et en temps réel. La première électrode pour $\bullet\text{NO}$ a été décrite en 1990 [261], et est disponible commercialement depuis 1992. Il existe dorénavant de multiples électrodes à $\bullet\text{NO}$, mais les plus utilisées sont les ampérométriques (électrode de type Clark). Une tension fixée est appliquée à une électrode de travail (*versus* une électrode de référence) en contact avec le milieu à étudier. $\bullet\text{NO}$ diffuse à travers une membrane perméable aux gaz et le fin film d'électrolyte de l'électrode de travail, entraînant son oxydation. Cette oxydation crée un courant proportionnel à la concentration de $\bullet\text{NO}$ à l'extérieur de la membrane. Le temps de réponse est assez long (2-3 secondes), ce qui peut être un problème si l'on souhaite mesurer des changements transitoires de $\bullet\text{NO}$ dans un fluide ou étudier des réactions rapides de $\bullet\text{NO}$ avec d'autres molécules [262].

De multiples électrodes existent dorénavant pour le dosage de $\bullet\text{NO}$, et certaines ont été adaptées pour détecter les RSNO après dégradation de ceux-ci [263].

3.3.2. Résonance paramagnétique électronique

La résonance paramagnétique électronique est une technique spectroscopique découverte en 1945 par Zavoisky. Elle consiste à soumettre un système contenant des électrons non appariés à des champs magnétiques et à étudier les transitions (effet Zeeman) qui en découlent. En effet, l'électron possède un mouvement de rotation sur lui-même caractérisé par un nombre quantique de spin. Il peut prendre deux orientations dans un champ magnétique, soit parallèle (spin - $\frac{1}{2}$, faible énergie), soit antiparallèle (spin + $\frac{1}{2}$, haute énergie). A ces deux orientations correspondent deux niveaux d'énergie différents, entre lesquels des transitions peuvent être induites. Cette technique permet de détecter et d'identifier des électrons célibataires et est très sensible à leur environnement. Elle est utilisée dans de nombreux domaines scientifiques (archéologie, chimie, physique, médecine, ...).

Elle a également été utilisée pour suivre $\bullet\text{NO}$ généré à partir de S-nitrosothiols. Néanmoins, pour éviter que $\bullet\text{NO}$ libéré réagisse avec des thiols présents dans le milieu pour régénérer un S-nitrosothiol, la technique de *spin-trapping* est souvent utilisée. Un composé capable de « piéger » $\bullet\text{NO}$ est ajouté au milieu, pour éviter cette réaction de recyclage. Par exemple Rocks et coll. [264] utilisent un complexe du Fe(II) et du chélateur N-méthyl-D-glucamine dithiocarbamate à pH basique qui est capable à la fois de déclencher

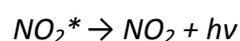
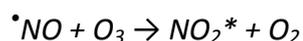
la décomposition des RSNO et de capter $\cdot\text{NO}$ libéré. Le pH alcalin permet d'éviter une éventuelle acidification des ions nitrites contenus dans les milieux biologiques en l'espèce NO^+ , détectable avec cette technique. Cette méthode a été utilisée pour mesurer des S-nitrosothiols dans le sang et les fluides synoviaux, avec une limite de détection de 50 nM. Il n'y a pas d'interférence avec les espèces nitrite et nitrate, mais seulement 71 % du GSNO étaient retrouvés dans le liquide synovial et également 71 % d'AlbSNO dans du sang total [265], avec un coefficient de variation de 4,7 %.

En revanche, il existe une interférence avec les N-nitrosamines (RNNO) : elles réagissent dix fois moins que les RSNO, mais leurs concentrations biologiques peuvent être élevées (ex : 32 nM de RNNO pour 7 nM de RSNO dans le plasma humain sain [266]). Une utilisation de mercure pourrait permettre d'élucider cette interférence, mais nécessite de réaliser plusieurs mesures, en séparant les signaux sensibles au mercure (RSNO) de ceux insensibles au mercure (RNNO).

3.3.3. Chimiluminescence

Une molécule dans un état excitée est produite à l'issue d'une réaction chimique et revient à son état fondamental en émettant de la lumière : c'est le phénomène de chimiluminescence. La réaction de chimiluminescence la plus connue du grand public est celle utilisée par la police scientifique pour détecter les traces de sang (réaction d'oxydo-réduction du luminol avec l'eau oxygénée, catalysée par le fer contenu dans le sang).

La détection de monoxyde d'azote se fait également par chimiluminescence, par exemple lors de sa recherche en tant que polluant atmosphérique ou pour l'identification de produits explosifs. La méthode la plus souvent employée est sa réaction rapide en phase gazeuse avec un excès d'ozone, selon les équations suivantes :



L'émission de lumière obtenue ($h\nu$) est détectée et amplifiée avec un photomultiplicateur pour générer un signal électrique. Elle est proportionnelle à la quantité de $\cdot\text{NO}$ dans le milieu.

Cette méthode de dosage détecte $\cdot\text{NO}$, mais peut être utilisée pour détecter de nombreux métabolites de $\cdot\text{NO}$ notamment les S-nitrosothiols après photolyse [204] ou réduction chimique (CuCl et cystéine [267]). L'intérêt de ces méthodes est d'avoir des limites de quantification beaucoup plus faibles que les méthodes colorimétriques et fluorimétriques (de l'ordre du nM).

3.4. METHODES DE SEPARATION ET D'IDENTIFICATION

3.4.1. Techniques chromatographiques

Le terme « chromatographie » regroupe un grand nombre de techniques séparatives, toutes basées sur la migration différentielle des analytes qui se répartissent entre une phase stationnaire et une phase mobile. Les deux types de chromatographies utilisées pour la détection des RSNO sont la chromatographie liquide haute performance (CLHP) et la chromatographie en phase gazeuse. Les deux sont des chromatographies sur colonne, la première avec une phase mobile liquide, la seconde avec une phase mobile gazeuse. Différents types de détection ont été employés avec la chromatographie liquide : UV-visible simple [268,269], UV-visible après réaction et détection en colorimétrie [258], fluorimétrie [93,259], électrochimie [270] ou spectrométrie de masse [271]. La chromatographie gazeuse est généralement couplée avec la spectrométrie de masse [272–274]. La spectrométrie de masse est en effet une technique de caractérisation basée sur la détermination du rapport masse/charge (m/z) des ions obtenus après ionisation de l'échantillon. Ces ions sont susceptibles de se fragmenter, selon des règles définies : l'analyse du spectre de fragmentation renseigne donc sur la molécule initiale [275].

Les techniques chromatographiques non couplées permettent d'identifier une espèce, à condition que le milieu ne soit pas trop complexe, et de disposer d'étalons valides permettant de connaître avec certitude le temps de rétention de l'espèce dans le système étudié. Sinon, la seule possibilité d'identifier les molécules est le couplage avec une autre technique comme par exemple la spectrométrie de masse.

Le développement et la caractérisation d'une méthode CLHP pour le dosage de GSNO ainsi que ses impuretés seront développés dans la partie expérimentale.

3.4.2. Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique séparative basée sur la migration différentielle à l'intérieur de tubes capillaires de solutés chargés, sous l'influence d'un champ électrique. Les mouvements du soluté sont la somme de deux phénomènes : l'électrophorèse et l'électro-osmose.

Une espèce chargée mise en solution et soumise à un champ électrique E se déplace vers l'électrode de signe opposée avec une vitesse linéaire appelée vitesse électrophorétique (μ_{ep}).

$$\mu_{ep} = q/(6\pi\eta r)$$

avec q = charge de l'ion, r = rayon de l'ion, η = viscosité de la solution

La mobilité est nulle pour une espèce sans charge nette.

Le second paramètre qui contrôle le mouvement des solutés est l'électro-osmose. En effet, la paroi interne du capillaire est tapissée de groupements silanol qui s'ionisent à partir de pH 3 pour former une paroi intérieure chargée négativement [275]. Afin d'assurer l'électro-neutralité, les cations du milieu tampon viennent recouvrir la paroi ce qui donne lieu à la formation d'une double couche. Sous l'influence du champ électrique, les cations de cette double couche se mettent en mouvement et migrent en direction de la cathode. Ce faisant, ils entraînent la solution tampon et créent ainsi un flux appelé écoulement électro-osmotique. Cet écoulement peut être contrôlé en modifiant la tension, le pH ou la nature du capillaire, ou en introduisant des additifs. De cette façon, les molécules neutres ainsi que les anions sont entraînés vers le détecteur, généralement situé du côté cathodique. Leur mobilité électro-osmotique (μ_{eo}) est définie par :

$$\mu_{eo} = \varepsilon\zeta/4\pi\eta$$

avec ε = constante diélectrique et ζ = potentiel zêta.

La mobilité apparente des espèces (vitesse réelle de migration des molécules au sein du capillaire) correspond donc à la somme de la mobilité électrophorétique et de la mobilité électro-osmotique (Figure 23).

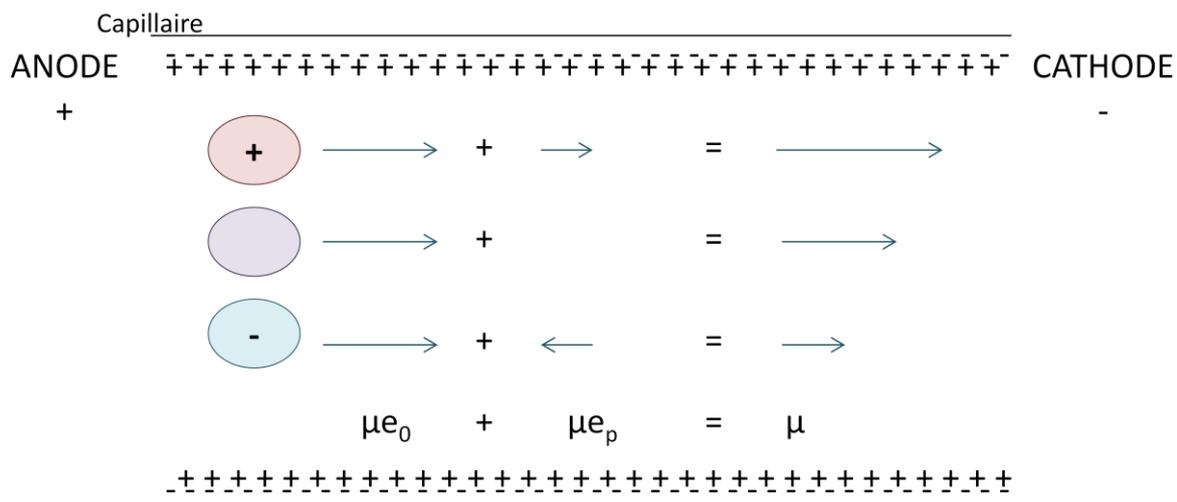


Figure 23 : Principe de l'électrophorèse capillaire et mobilité des espèces en fonction de leur charge

Un des intérêts majeurs de l'électrophorèse capillaire est le faible volume d'échantillon qu'elle nécessite (quelques nanolitres). L'électrophorèse capillaire a été utilisée pour doser des RSNO [276–278], avec des limites de détection de l'ordre du μM . Comme pour la chromatographie, il faut disposer d'étalons pour pouvoir identifier les pics obtenus après migration.

En conclusion, il existe de nombreuses méthodes de dosage des RSNO, mais la plupart sont indirectes (Tableau 6).

Tableau 6 : Bilan des méthodes de dosage des S-nitrosothiols

	Espèce dosée	Sensibilité	Utilisation <i>in vivo/ex vivo</i>	Identification spécifique des RSNO
Spectrophotométrie	RSNO	10 ⁻⁴ M	Non	Non
Spectrocolorimétrie	NO ₂ ⁻ /NO ⁺	10 ⁻⁶ M	+/-	Non
Spectrofluorimétrie	NO ₂ ⁻ /NO ⁺	10 ⁻⁸ M	Oui	Non
Résonance paramagnétique électronique	•NO	10 ⁻⁸ M	Oui	Non
Electrochimie	•NO	10 ⁻⁹ M	Oui	Non
Chimiluminescence	•NO	10 ⁻⁹ M	Oui	Non
Electrophorèse capillaire	En fonction du mode de détection	10 ⁻⁶ M	+/-	Oui si standards existants
Chromatographie	En fonction du mode de détection		Oui si standards existants ou couplage avec la spectrométrie de masse	Oui
Biotin-switch	Protéines nitrosées	Semi-quantitatif	Oui	Oui si couplage avec techniques séparatives + identification

Par ailleurs, le choix de la méthode dépend évidemment des moyens financiers disponibles. Enfin, quelle que soit la méthode retenue, il faut faire attention à d'éventuelles contaminations, notamment en nitrite ou nitrate par l'eau ou la verrerie.

4. ESSAIS CLINIQUES AVEC LE GSNO

4.1. GENERALITES SUR LES ESSAIS CLINIQUES

4.1.1. Définition

D'après le code de la Santé Publique (Article L1121-1), les recherches biomédicales sont définies comme « les recherches organisées et pratiquées sur l'être humain en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales ».

Le passage à l'homme est décidé après avoir vérifié par des études précliniques (toxicologie, pharmacocinétique, pharmacologie) chez l'animal, l'effet thérapeutique et la sécurité d'emploi de la molécule.

4.1.2. Législation

En droit français, les recherches biomédicales sont encadrées depuis 1988 (loi du 20 décembre 1988 n° 88-1138, dite Huriot-Sérusclat). Les principaux points de cette loi sont : la protection des personnes, l'appréciation du rapport bénéfice/risque de la recherche, la nécessité de l'information et du consentement libre et éclairé des participants. Ceci a notamment conduit à la mise en place de « Comités Consultatifs de Protection des Personnes qui se prêtent à la Recherche Biomédicale » (CCPPRB) dans chaque région pour vérifier le bon respect de ces points fondamentaux.

En 2004, la directive européenne n°2001/20/CE a été transposée dans la réglementation française (loi de santé publique du 9 août 2004 et décret d'application du 26 avril 2006) : elle concerne le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des états membres relatives à l'application des bonnes pratiques cliniques dans la conduite d'essais cliniques de médicaments à usage humain. Tout essai clinique doit dorénavant recevoir une autorisation préalable de l'autorité compétente (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé, ANSM) et un avis du Comité de Protection des Personnes (CPP).

4.1.3. Les différentes phases de la recherche clinique

Une fois les expérimentations chez l'animal effectuées sans encombre, la recherche chez l'homme se déroule classiquement en quatre phases :

La phase I est destinée à évaluer l'innocuité ou la tolérance du médicament. Il s'agit de déterminer la posologie entraînant les premiers effets indésirables et celle entraînant les premiers effets pharmacodynamiques souhaités. Ces études sont réalisées sous surveillance étroite, le plus souvent chez des volontaires sains, sauf pour des médicaments dont la toxicité est connue et fait partie du mode d'action, comme les anticancéreux par exemple, qui sont administrés directement chez des malades.

La phase II étudie l'efficacité pharmacologique. Elle comporte généralement des études de pharmacologie humaine, de pharmacocinétique humaine et des études du mécanisme générant l'effet. Elle permet de confirmer sur un petit nombre de patients les résultats obtenus chez l'animal. Elle a lieu généralement sur une courte durée, chez des volontaires sains ou malades selon les cas, et doit permettre de déterminer la dose à utiliser par la suite ainsi que de préciser la voie d'administration et la formulation galénique optimales.

La phase III consiste à confirmer l'efficacité thérapeutique du médicament dans les indications revendiquées et à évaluer sa tolérance sur des effectifs plus larges de patients. Elle est constituée de plusieurs essais avec un nombre important de patients, qui dans le cas le plus simple sont répartis en deux groupes, l'un recevant le médicament à tester et l'autre le médicament de référence (s'il existe) ou un placebo.

Enfin, la phase IV survient après la mise sur le marché du médicament : elle permet de détecter d'éventuels effets indésirables rares non apparus précédemment (pharmacovigilance), ainsi que d'améliorer les connaissances sur le médicament, notamment sur son utilisation dans des groupes à risques (personnes âgées, insuffisants rénaux ou hépatiques, ...).

4.2. ESSAIS CLINIQUES AVEC LE GSNO

Le GSNO a d'ores et déjà été administré chez l'homme dans plusieurs essais de phase I ou II (Tableau 7), généralement pour ses propriétés de vasodilatateur et d'antiagrégant plaquettaire. Quand sa provenance est indiquée, il a été dans la plupart des cas préparé par les expérimentateurs eux-mêmes, par la réaction du nitrite de sodium avec le glutathion en milieu acide. Une seule des études fait mention d'un contrôle du produit obtenu [279]. Les auteurs préparent une solution de GSNO à 10 mM par nitrosation du glutathion, et ramènent le pH à 7 avec un tampon phosphate 10 mM. Ils réalisent une filtration stérilisante et un contrôle de stérilité. L'absence d'impuretés est vérifiée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse et par spectrophotométrie. D'après eux, la seule impureté présente dans les solutions obtenues était le GSH, correspondant à moins de 10 % du réactif initial et sans incidence sur le paramètre pharmacologique mesuré. Dans cette étude les solutions ont été administrées *versus* placebo à des patients atteints de mucoviscidose. Cette étude est la seule à avoir proposé un contrôle du produit administré.

Tableau 7 : Utilisation du S-nitrosoglutathion dans des essais cliniques

Provenance du GSNO	Formulation utilisée	Voie d'administration	Nombre de patients	But de l'étude/Application	Essai de phase	Référence
Non renseignée	Solution (NaCl 0,9 %)	Perfusion intraveineuse à doses croissantes	10 (sains)	Etude des effets systémiques et détection d'éventuels effets indésirables	I	[280]
Non renseignée	Non renseignée	Perfusion intra-artérielle de GSNO	5 (sains)	Confirmation des résultats obtenus chez l'animal : effet vasodilatateur/antiagrégant plaquettaire	II	[281]
Non renseignée	Solution (solvant non spécifié)	Perfusion intraveineuse	10 (malades)	Pré éclampsie sévère : diminution pression artérielle de la mère et agrégation plaquettaire, dilatation artère utérine	II	[282]
Non renseignée	Solution (solvant non spécifié)	Administration <i>via</i> le cathéter utilisé pour la procédure chirurgicale	13 (malades)	Réduction de l'activation plaquettaire induite par l'angioplastie coronaire	II	[283]
Non renseignée	Non renseignée	Administration parentérale	12 (malades)	Diminution des saignements après chirurgie cardiaque (plaquettes)	II	[284]
Non renseignée	Solution (solvant non spécifié)	Administration parentérale	24 (malades)	Diminution de l'embolisation post endartériectomie cérébrale	II	[285]
Synthèse à façon + contrôle (spectrométrie de masse)	Solution (PBS stérile, pH 7)	Inhalation (tampon ou aérosol)	20 (malades)	Amélioration des paramètres respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose	II	[279]
Synthèse à façon : précision eau ultrapure	Hydrogels de Pluronic	Application locale (avant-bras)	8 (sains)	Augmentation du flux sanguin local (lutte contre une ischémie locale, pansements)	II	[141]
Synthèse à façon + précipitation	Films de PVA	Application locale (avant-bras)	7 (sains)	Augmentation du flux sanguin local (lutte contre une ischémie locale, pansements)	II	[286]
Non renseignée	Gel	Application locale sur le clitoris	40 (saines)	Augmentation du flux sanguin local (dysfonction sexuelle féminine)	II	[287]

Le GSNO possède des propriétés intéressantes sur le plan vasculaire et a déjà été administré à une centaine de patients. Il peut donc être considéré comme un candidat « médicament » car d'après le Code de la Santé Publique (Art. L5111-1) « on entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard de maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques ».

Dans le cadre des Bonnes Pratiques, il est important de contrôler la pureté de ce qui est administré et de déterminer les impuretés éventuellement présentes, provenant de la synthèse (réactifs, réactions annexes) ou de la dégradation du produit. Ceci n'a pas été fait dans la plupart des études précédemment citées, le GSNO provenant soit d'un fournisseur de produits chimiques, soit d'une synthèse « à façon ». Or, le GSNO est assez sensible aux conditions expérimentales (lumière, température, présence d'impuretés métalliques dans les réactifs, ...), comme il a été mentionné précédemment. Des ions nitrite et nitrate sont donc susceptibles de se former dans la solution utilisée pour l'étude. Or, plusieurs études ont montré que ces ions pouvaient exercer des effets vasculaires similaires à ceux des RSNO [288,289]. En conséquence, il est nécessaire de vérifier l'absence ou la faible présence de ces impuretés avant d'utiliser ces solutions dans un cadre expérimental, sous peine de biaiser les résultats. Dans le cas où le GSNO serait amené à devenir un médicament, ces contrôles se positionneraient sous la responsabilité du pharmacien.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de monographie à la Pharmacopée pour le GSNO. Aussi, il n'y a aucun cadre précisant ce qu'il convient de faire pour contrôler une synthèse extemporanée de GSNO avant utilisation. Nous proposons dans ce travail une caractérisation physico-chimique de la molécule, centrée sur une méthode chromatographique simple et peu coûteuse. Par ailleurs, la comparaison des caractéristiques de GSNO obtenu par la synthèse « à façon » (suivie ou non d'étapes de purification) à celles du produit commercial est réalisée.

PARTIE III : REFERENTIELS PHARMACEUTIQUES

Le développement de produits pharmaceutiques doit être conduit en gardant toujours l'intérêt et la sécurité du patient comme objectifs essentiels. Cela implique une maîtrise des risques à toutes les étapes de la chaîne du médicament, depuis la production des substances à usage pharmaceutique jusqu'aux contrôles du produit fini et aux essais cliniques. Pour garantir la sécurité, la qualité et l'efficacité d'un médicament, il existe différents dispositifs réglementaires. Les principaux sont décrits dans ce chapitre.

1. NORMES ISO (INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION)

Une norme désigne un ensemble de spécification décrivant un objet, un être ou une manière d'opérer. Elles ne sont pas obligatoires, sauf si elles ont été intégrées dans un texte réglementaire. Les normes peuvent être françaises (NF), reproduisant une norme européenne (NF/EN) ou reproduisant une norme internationale (NF/ISO). L'organisation internationale de normalisation (ISO), créée en 1947, a pour mission de promouvoir le développement de la normalisation : ceci afin de développer la coopération internationale dans les domaines intellectuels, scientifiques ou économiques. Ce sont donc des normes générales s'adaptant à toutes les activités. Par exemple, la famille des normes ISO 9000, qui concernent les bonnes pratiques de management de la qualité, ou encore la norme ISO 1000 intitulée « Unités du système international et recommandations pour l'emploi de leurs multiples et de certaines autres unités ». Des organismes agréés peuvent accorder une certification, c'est-à-dire une attestation de conformité aux exigences ISO pour un produit, un procédé ou un service.

2. BONNES PRATIQUES

Les bonnes pratiques pharmaceutiques sont des recommandations destinées à assurer et améliorer l'exercice de la profession de Pharmacien. Elles sont élaborées par des associations de pharmaciens et sont déclinées selon plusieurs items, couvrant tous les aspects du métier: Bonnes Pratiques de Laboratoire, Bonnes Pratiques Cliniques, Bonnes Pratiques de Fabrication, Bonnes Pratiques de Distribution, Bonnes Pratiques de Préparation Officinale, Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalière, Guide de Bonne Exécution des

Analyses... En plus de présenter les « bonnes façons de faire », elles expliquent également les buts et les objectifs professionnels sous-jacents à mettre en œuvre quotidiennement. Elles peuvent devenir obligatoires quand elles sont incluses dans les textes en vigueur. Elles sont alors publiées dans le Bulletin Officiel.

L'article L.5121-5 du Code de la Santé Publique indique que la préparation de médicaments doit être réalisée en conformité avec des bonnes pratiques. Ces bonnes pratiques de préparation s'appliquent aussi aux préparations rendues nécessaires par les recherches biomédicales, y compris la préparation des médicaments expérimentaux.

La définition du médicament expérimental est, d'après l'article L.5121-1-1 du Code de la Santé Publique : « tout principe actif sous une forme pharmaceutique ou placebo expérimenté ou utilisé comme référence dans une recherche biomédicale, y compris les médicaments bénéficiant déjà d'une autorisation de mise sur le marché, mais utilisés ou présentés ou conditionnés différemment de la spécialité autorisée, ou utilisés pour une indication non autorisée ou en vue d'obtenir de plus amples indications sur la forme de la spécialité autorisée ».

Les Bonnes Pratiques de Fabrication permettent d'assurer la qualité du médicament, notamment en ce qui concerne les points clés suivants : l'identité du principe actif, la régularité des doses unitaires, la libération du principe actif, la conformité d'aspect, la présentation, la pureté et la stabilité. Elles décrivent les objectifs minimum à atteindre en termes d'organisation, de personnel, de matériel, de locaux, de matières premières, de méthodes et de contrôles (des matières premières, en cours de fabrication et des produits finis).

3. PHARMACOPEES

Historiquement, les Pharmacopées (du grec « l'art de préparer les médicaments ») étaient des recueils recensant les substances traditionnelles d'origine végétale, animale ou minérale à usage thérapeutique. Elles sont devenues des recueils de référence nationaux ou internationaux, intégrant également les substances d'origine chimique. Actuellement, il existe trois grandes Pharmacopées : américaine, japonaise et européenne.

La Pharmacopée Européenne (site internet : www.edqm.eu) a été mise en place suite à une convention du conseil de l'Europe de 1964. Son but est de fournir des normes officielles communes avec une base juridique et scientifique. Ces normes sont ensuite transcrites dans la législation nationale et font autorité pour toute substance figurant dans la Pharmacopée, sous forme de monographie. Elles décrivent la composition qualitative et quantitative et les essais à effectuer sur les médicaments, sur les matières premières utilisées dans leur production et leurs intermédiaires de synthèse, ainsi que sur les formes finales (gélules, comprimés...). Elles mentionnent également les médicaments biologiques, les dérivés du sang et du plasma, les vaccins et les préparations radio pharmaceutiques.

La Pharmacopée Européenne est divisée en plusieurs sections :

- d'une part les chapitres généraux décrivant notamment les différentes méthodes analytiques utilisables pour l'identification des substances, les essais limites des impuretés et les méthodes de dosage ;
- d'autre part les monographies générales, concernant par exemple les formes pharmaceutiques ou les substances pour usage pharmaceutique ;
- enfin les monographies spécifiques pour chaque substance, qu'il s'agisse de gaz (oxygène), de solvants (acétone), de réactifs (nitrite de sodium), de substances actives (warfarine) ou d'excipients (polysorbate 80).

Elle met également à disposition des étalons de référence pour les substances possédant une monographie.

4. CONFERENCE INTERNATIONALE D'HARMONISATION

« *L'International Conference on Harmonisation* » (ICH) est un programme trilatéral développé depuis 1990 ayant pour but d'harmoniser le contrôle des médicaments entre l'Union Européenne, le Japon et les Etats-Unis. Il fonctionne sous forme de conférences, organisées deux fois par an, alternativement en Europe, au Japon et aux Etats-Unis. Il met en relation les instances réglementaires et les industries pharmaceutiques afin de définir les exigences requises pour le développement de nouveaux médicaments. Les objectifs sont la réduction du coût global de la recherche pharmaceutique (en évitant des doublons) et

l'accélération de la mise à disposition de médicaments innovants. Le tout afin d'assurer un bénéfice pour les patients et pour la santé publique.

Les objectifs des ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use*) sont divisés en quatre catégories:

- Q : objectifs « qualité » concernant l'assurance qualité chimique et pharmaceutique
- S : objectifs « sécurité » concernant les études pré-cliniques *in vitro* et *in vivo*
- E : objectifs « efficacité » concernant les études cliniques sur le sujet humain
- M : objectifs « multidisciplinaires », c'est-à-dire ceux qui ne peuvent pas être classés dans une seule des catégories précédentes

Les textes sont identifiés par un code indiquant à quelle catégorie ils correspondent. Par exemple, les textes Q3A-Q3D se rapportent aux impuretés. D'après Wadekar et coll. [290], une impureté peut être considérée comme tout produit pouvant affecter la pureté d'une matière première ou d'un produit fini. Les textes ICH distinguent trois types d'impuretés : organiques, inorganiques et solvants résiduels. Elles peuvent provenir de nombreuses sources, notamment les réactifs, les catalyseurs, les intermédiaires de réaction par réarrangement ou réactions *in situ*, les produits secondaires de réaction ou des produits de dégradation.

La méthode chromatographique présentée dans ce travail permet le contrôle du GSNO en tant que matière première ainsi que son suivi (libération/dégradation) lors de son intégration dans des formes galéniques. Elle a été validée suivant les recommandations ICH et permet ainsi l'amélioration des pratiques, en attendant l'établissement d'une monographie.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les expériences réalisées au sein de l'équipe dans le cadre de l'ANR NanoSNO nécessitent une grande quantité de GSNO sous forme de poudre. Etant donné le coût de celle-ci lorsqu'elle est achetée auprès des fournisseurs chimiques (> 150 € les 25 mg chez Sigma-Aldrich®), nous avons réalisé une fabrication à façon, avec précipitation et purification. Dans une démarche pharmaceutique, nous avons voulu valider cette fabrication en vérifiant la nature du produit obtenu (structure globale, présence de la liaison SNO), puis en déterminant la pureté du produit et en identifiant (et quantifiant si nécessaire) les impuretés présentes. Comme il n'existe pas de monographie pour le GSNO, il n'existe pas non plus de GSNO pouvant servir de référence. Nous avons donc comparé notre produit avec celui que nous nous sommes procuré chez Sigma-Aldrich®. Il s'agit d'un fournisseur de produit chimique et non d'un fournisseur pharmaceutique : le GSNO obtenu dispose donc d'un certificat d'analyse, mais très simple. En effet, seule une analyse élémentaire est effectuée avant la libération du lot.

De plus, nous avons développé et validé une technique de chromatographie liquide haute performance en phase inverse avec contre-ion et détection UV permettant la détermination de la pureté du produit (avec une détection à 334 nm) mais aussi des impuretés présentes (à 220 nm). Cette méthode est plus spécifique et plus informative que la méthode spectrophotométrique traditionnellement utilisée car elle permet de détecter et doser l'ensemble des impuretés potentiellement présentes. Néanmoins, en ce qui concerne les deux espèces dosées par les deux méthodes (GSNO et les ions nitrite), celles-ci donnent des résultats cohérents, ce qui permet dans nos conditions expérimentales de valider la méthode spectrophotométrique pour une caractérisation rapide des lots.

Les expériences réalisées montrent que le GSNO obtenu à façon (nitrosation du glutathion par les ions nitrite en milieu aqueux acide, suivi d'un processus de précipitation et lavage) possède une pureté comparable à celle du produit commercialisé. De plus, cette pureté est compatible avec les limites autorisées par les autorités pharmaceutiques pour les substances à usage pharmaceutique. Les impuretés présentes sont également comparables en nature et en quantités à celles du produit commercial. En revanche, ces impuretés sont présentes en bien plus forte concentration en l'absence de l'étape de précipitation et lavage.

Finalement, quelques recommandations sont données afin d'optimiser la manipulation et la conservation du S-nitrosoglutathion synthétisé purifié ou en solution.

Ce travail a permis la rédaction d'une publication, acceptée par le journal « Current Pharmaceutical Analysis » (Annexe).

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. REACTIFS

Tous les solvants et les produits chimiques utilisés étaient de qualité analytique et ont été utilisés tels que reçus. Le sulfate d'hydrogène de tétrabutylammonium (TBAHS) et le GSNO isolé, utilisé comme référence, proviennent de Sigma-Aldrich® (France). Toutes les solutions ont été préparées avec de l'eau ultrapure déionisée (> 18,2 MΩ.cm).

1.2. SYNTHÈSE DU GSNO

Deux qualités de GSNO ont été synthétisées : soit i) non isolé (en solution), soit ii) isolé et purifié (solide), respectivement selon les protocoles suivants :

- i) Soixante deux mg de glutathion (GSH) ont été pesés dans une fiole jaugée de 10,0 mL, et dissous avec environ 7 mL d'une solution d'HCl à 0,5 M préalablement déoxygénée. Ensuite, 1,0 mL d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) 10^{-2} M est ajouté, puis le volume est complété à 10,0 mL avec la solution d'HCl. Le mélange est placé 1 h à 4 °C et à l'abri de la lumière. Le pH acide de la réaction est neutralisé par l'ajout de 0,45 mL de NaOH 40 % (m/v), puis la solution est diluée avec un tampon phosphate (pH 7,4 ; 0,5 M) jusqu'à un volume final de 20,0 mL. La solution de GSNO obtenue (10^{-2} M) est conservée à 4 °C à l'abri de la lumière pendant 7 jours maximum.
- ii) $3,1 \cdot 10^{-3}$ mol (960 mg) de GSH sont dissous dans 5,0 mL d'HCl 0,626 M refroidi à 4 °C sous flux d'azote. Puis $3,1 \cdot 10^{-3}$ mol (215 mg) de NaNO_2 sont ajoutés et la solution est agitée magnétiquement pendant 40 min à 4 °C à l'abri de la lumière. Cinq mL d'acétone sont ajoutés pour précipiter le GSNO obtenu. Une étape de purification est réalisée par filtration : la poudre rose est successivement lavée avec un mélange acétone-eau (80/20, v/v, 10 mL), de l'acétone (2 x 10 mL) puis du diéthylether

(3 x 10 mL). Le produit est finalement séché sous vide (15 mm Hg) pendant 30 min à température ambiante (22 ± 2 °C) puis immédiatement placé à -20 °C sous atmosphère inerte (argon). Le rendement de nitrosation est d'environ 70 %.

1.3. INSTRUMENTATION

Les spectres UV-visible ont été enregistrés sur un spectrophotomètre à double faisceau (UV 1700, Shimadzu, France). Le spectre de dichroïsme circulaire (solution de GSNO à 10^{-2} M dans de l'eau) a été obtenu sur un dichrographe CD6 équipé du logiciel CDMax (Jobin Yvon, Longjumeau, France). Les rotations optiques spécifiques ont été déterminées sur un polarimètre PolAAR 20 (Particular Sciences, Irlande). Les angles de rotation α de GSH ($9,5 \cdot 10^{-3}$ M dans de l'eau) et de GSNO ($9,5 \cdot 10^{-3}$ M dans un tampon phosphate 0,5 M pH 7,4) ont été mesurées à 20 °C avec un tube de polarimètre de 1,9009 dm de longueur. L'analyse infrarouge a été réalisée avec un spectrophotomètre à transformée de Fourier (Vector 22, Bruker, Allemagne) équipé avec un système ATR (Attenuated Total Reflectance, MIRacle Single Reflection Horizontal ATR, Pike Technologies, France) ; le spectre de masse par ionisation électrospray (Waters Platform, Canada) ; et le spectre ^1H RMN en utilisant l'eau deutérée (D_2O) comme solvant, sur un spectromètre Avance 300 (Bruker, Allemagne). L'analyse élémentaire a été effectuée sur un appareil Thermo Finnigan EA 1112 (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis). Les analyses de calorimétrie différentielle à balayage/thermogravimétrie couplées à la spectrométrie de masse ont été conduites avec un appareil STA 409C (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Allemagne). Le contenu en eau du GSNO purifié (25 mg) a été déterminé avec un coulomètre de Karl-Fischer (coulomètre 756 KF Metrohm, France). Une électrode de Clark et le logiciel Atelier Scientifique (Jeulin, France) ont été utilisés pour évaluer le contenu en dioxygène des solutions.

1.4. SPECTROMETRIE : METHODES DE GRIESS ET SAVILLE-GRIESS

Les méthodes de Griess et de Saville-Griess ont été utilisées pour déterminer les concentrations d'une part d'ions nitrite (NO_2^-) et d'autre part de GSNO [260]. Brièvement, les échantillons sont dilués avec un tampon acéto-acétique (pH 2,5 ; 1,75 M) jusqu'à obtenir un volume de 1,0 mL. Des droites d'étalonnage entre 10^{-6} et 10^{-5} M ont été réalisées, en utilisant soit NaNO_2 (Griess), soit GSNO (Saville-Griess) comme références. Pour la méthode

de Griess, 200 μL d'une solution de sulfanilamide (0,6 % m/v préparée dans HCl 0,4 M) sont ajoutés à l'échantillon dilué. Après 3 min d'incubation à l'abri de la lumière à température ambiante (22 ± 2 °C), 50 μL de solution de N-1-(naphtyl) éthylène diamine (0,6 % m/v préparée dans HCl 0,4 M) sont ajoutés. Après 5 min d'incubation, l'absorbance est lue à 540 nm. La méthode de Savielle-Griess suit le même protocole, sauf que la solution de sulfanilamide contient HgCl_2 (0,2 % m/v).

1.5. SYSTEME CLHP

Le système CLHP se compose d'une pompe isocratique (modèle L-600, Hitachi-Merck, Allemagne), d'une valve d'injection équipée d'une boucle de 20 μL (modèle 7725i, Rheodyne, IDEX, USA), d'un four (Croco-Cil, CLuzeau, France), d'un détecteur UV (LKB Bromma, Suède) et d'un logiciel d'analyse des données (Azur[®], Datalys, France). Les colonnes (250 mm de longueur, 4 mm de diamètre interne) utilisées avaient deux types de phases stationnaires (5 μm) : LiChrospher[®] RP-18^e (Merck ; Allemagne) ou Nucleosil[®] 100 C18 HD (Macherey Nagel, Allemagne). La phase mobile était constituée d'un mélange de méthanol et de tampon phosphate (10/90, v/v) ; le tampon phosphate était préparé ainsi : 10^{-3} M de TBAHS et 10^{-4} M d'EDTA étaient ajoutés à 10^{-2} M de KH_2PO_4 , puis le pH ajusté à 6,8. La colonne était maintenue à 40 °C et le débit à 0,8 L/min (la pression résultante étant aux alentours de 120 bars). La détection UV était opérée à 220 ou à 334 nm.

Les solutions de GSNO destinées à l'analyse CLHP étaient préparées de la façon suivante : pour le GSNO de référence et le produit synthétisé à façon, une solution mère 10^{-2} M était obtenue en dissolvant la poudre dans un tampon phosphate (pH 7,2 ; 10^{-2} M KH_2PO_4 ; 10^{-4} M EDTA). Pour le GSNO non isolé, les solutions obtenues après synthèse (environ 10^{-2} M) étaient considérées comme solutions mères. Des dilutions appropriées ont été réalisées avant injection dans le système CLHP. Toutes les solutions étaient protégées de la lumière, conservées à 4 °C et utilisées dans les 12 h pour leur contrôle.

1.6. CALCUL DES DIFFERENTS PARAMETRES

L'angle de rotation spécifique a été déterminé conformément à la Pharmacopée Européenne [291]. Il en a été de même pour les paramètres CLHP, calculés avec les formules suivantes :

- Temps de rétention relatif, $RRT = \frac{t_R}{t_{GSNO}}$ où t_R et t_{GSNO} sont les temps de rétention de l'espèce R ou de GSNO ;
- Résolution, $R_S = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$ où t_{R1} et t_{R2} (avec $t_{R2} > t_{R1}$) sont les temps de rétention des espèces R1 et R2, et w_{h1} et w_{h2} sont les largeurs des pics à mi-hauteur ;
- Nombre de plateaux théoriques, $N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$ où t_R est le temps de rétention de l'espèce et w_h la largeur à mi-hauteur du pic correspondant ;
- Facteur de rétention (non ajusté), $k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$ où t_0 est le temps de rétention du volume mort (mesuré selon la méthode de la perturbation de la ligne de base).

L'ellipticité molaire $[\theta]$ a été calculée à partir de la différence d'absorbance (ΔA) donnée par le logiciel avec $[\theta] = 3300 \Delta A/lc$ où c est la concentration de la solution (M) et l la longueur de la cuvette (cm) ; $[\theta]$ est donnée en $^\circ \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$.

La limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) ont été calculées conformément aux normes ICH [292], en utilisant les pentes et les points d'intersection des droites d'étalonnage avec l'axe des abscisses.

2. RESULTATS

2.1. IDENTIFICATION GLOBALE DE LA STRUCTURE

La structure globale de la molécule obtenue par la synthèse à façon a été vérifiée par spectrométrie de masse, puis par analyse élémentaire et par spectre de résonance magnétique nucléaire du proton (^1H RMN).

Les spectres de masse obtenus après ionisation par électrospray (Figure 24, détection A) en mode positif; B) en mode négatif) ont montré deux pics majoritaires : $m/z = 337,03$ ou $334,94$ (correspondant au GSNO protoné ou déprotoné), et $m/z = 306,99$ ou $304,96$ (correspondant au GSNO protoné ou déprotoné ayant perdu le groupement NO). La masse molaire attendue du GSNO ($M_r = 336,07$ g/mol) est donc bien retrouvée. En mode positif, le pic GSNO protoné n'est pas le plus important, vraisemblablement à cause de la fragilité de la liaison -SNO et donc d'une fragmentation augmentée.

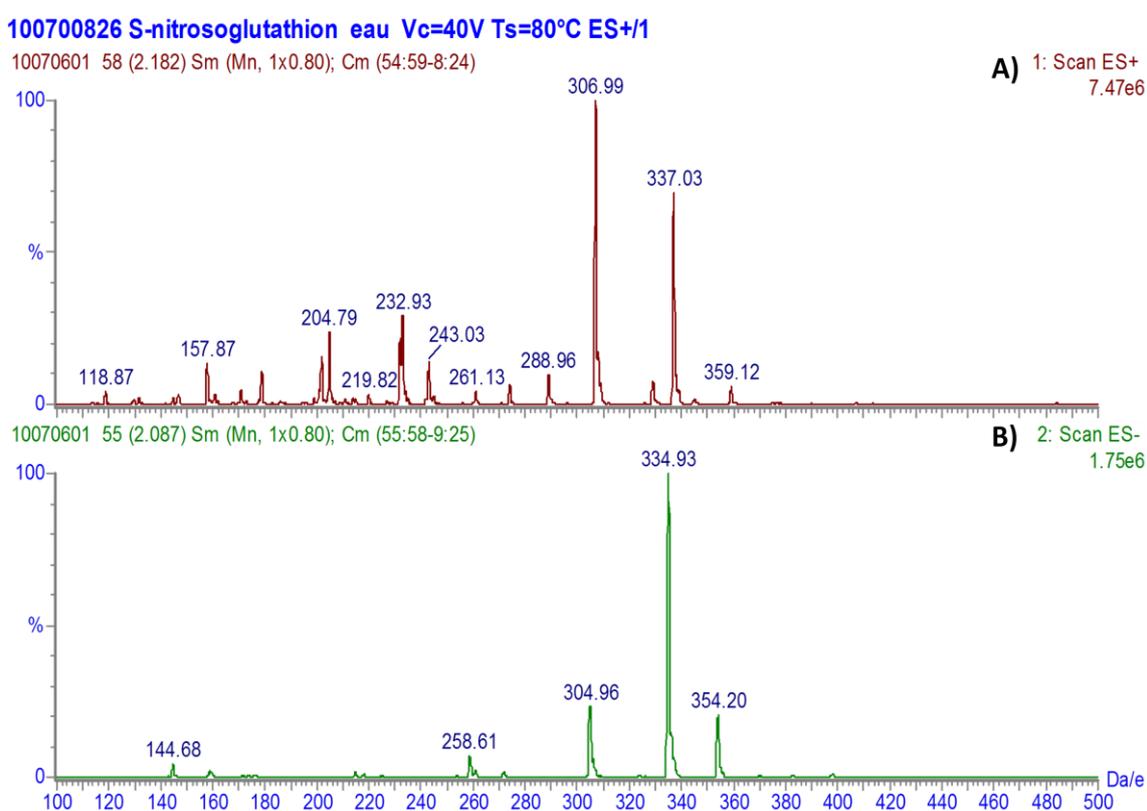


Figure 24 : Spectres de masse du GSNO avec une détection A) en mode positif et B) en mode négatif

L'analyse élémentaire permet de déterminer la formule globale d'un composé organique par les pourcentages en masse de chaque élément présent dans la molécule. La combustion de l'échantillon dans le système génère des gaz qui sont ensuite analysés par chromatographie gazeuse. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 8 et correspondent à la structure de GSNO.

Tableau 8 : Résultats de l'analyse élémentaire du GSNO synthétisé à façon.

Les % théoriques ont été obtenus avec le logiciel Chemdraw® ; écart-type sur les analyses < 0,1 %.

	% expérimentaux (moyenne obtenue avec 2 lots indépendants)	% théoriques (GSNO)
Carbone	34,9	35,7
Hydrogène	4,8	4,8
Azote	15,8	16,7
Soufre	9,6	9,5
Oxygène	32,4	33,3

Les signaux observés dans le spectre ^1H RMN de GSNO mettent en évidence la structure globale de la molécule. Par ailleurs, le signal du groupe méthyl en α du groupement fonctionnel thiol est déplacé de 3,01-2,90 ppm (GSH) à 4,09 ppm après nitrosation (Figures 25 et 26) : il y a donc bien formation d'une liaison S-NO.

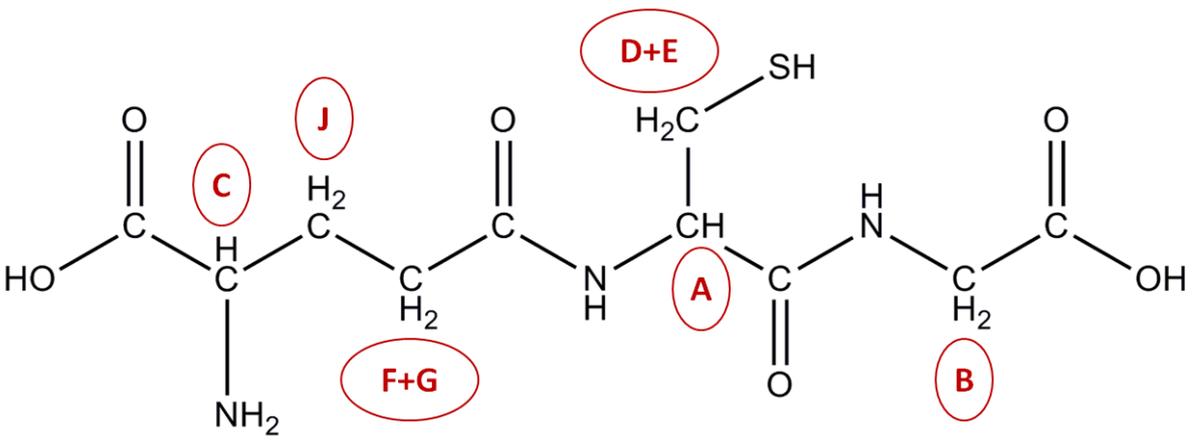
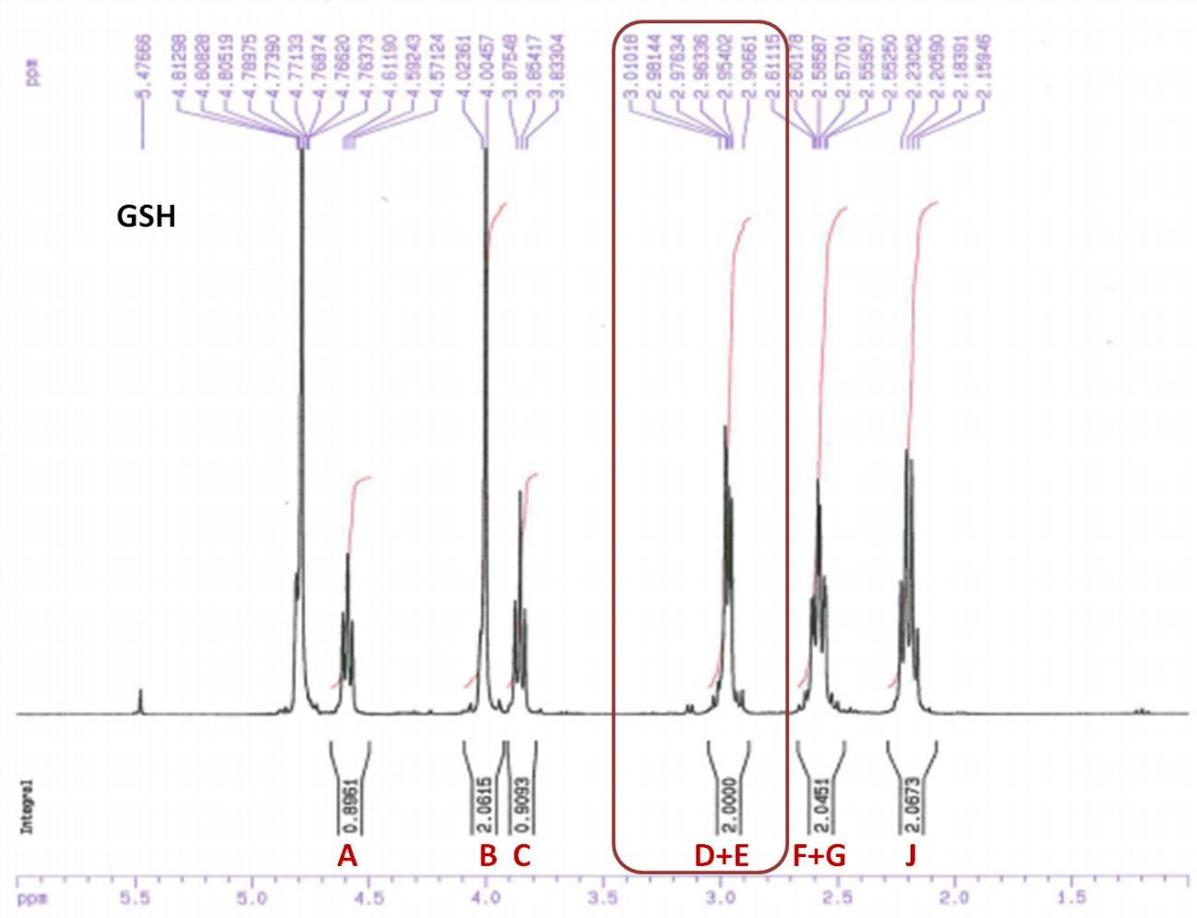


Figure 25 : Spectre ¹H RMN du GSH

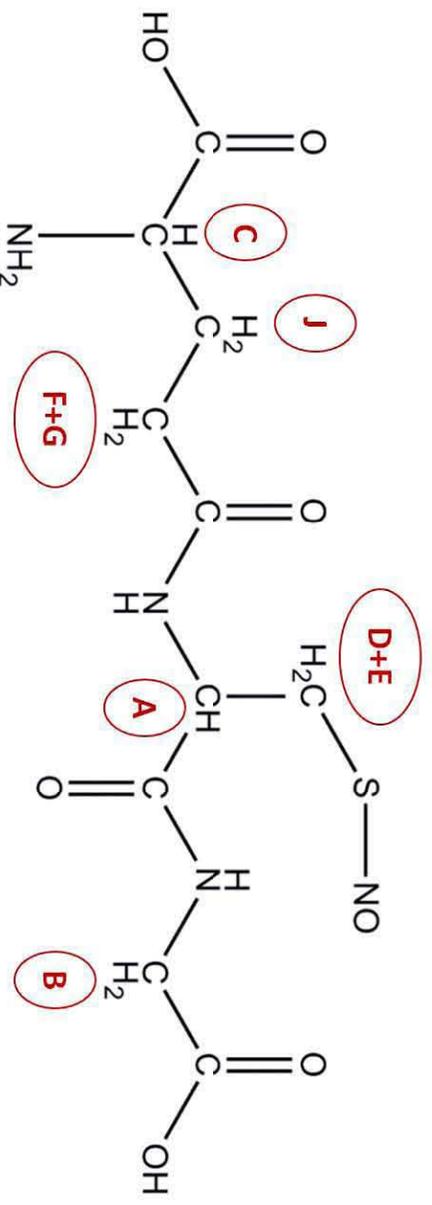
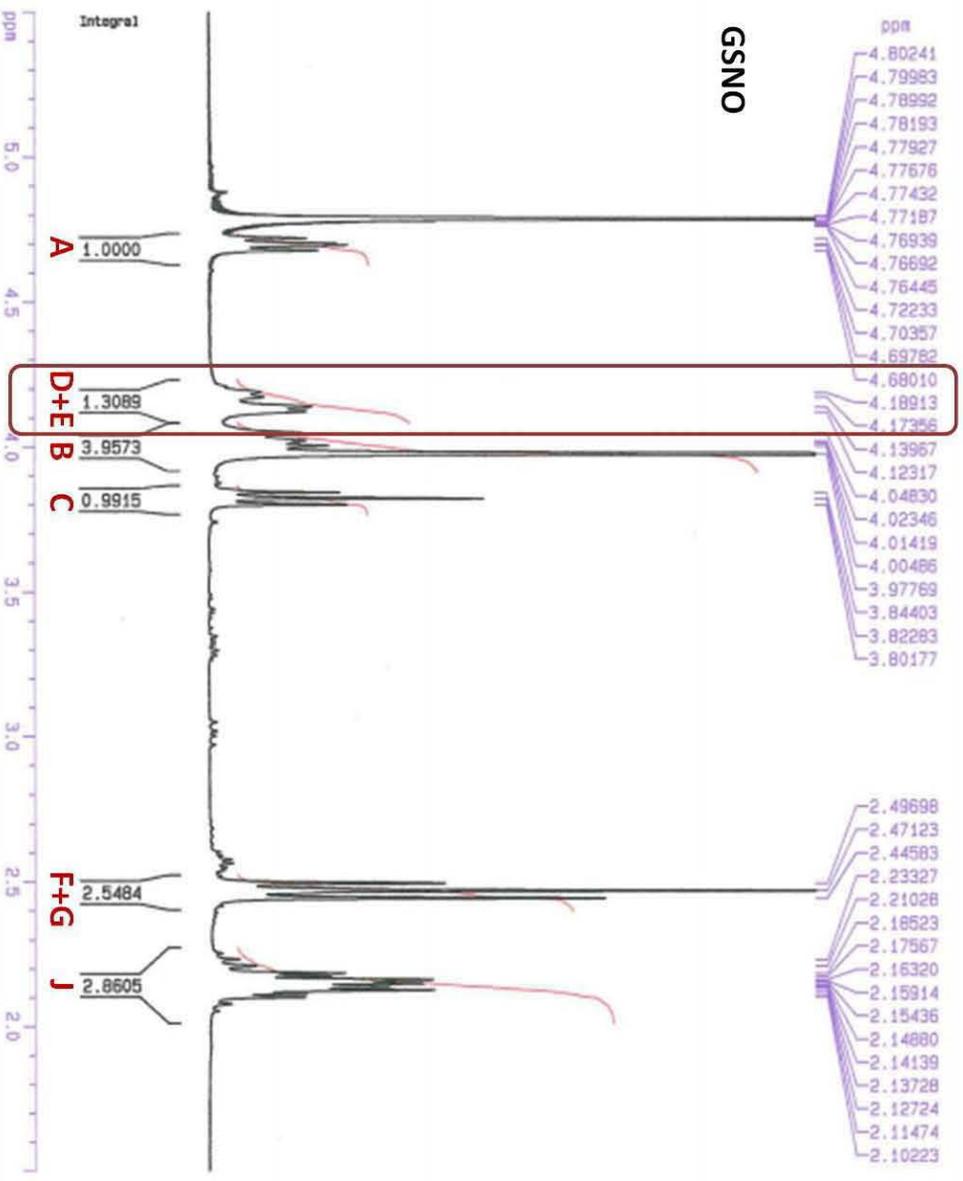


Figure 26 : Spectre ¹H RMN du GSNO

2.2. CARACTERISATION DE LA LIAISON S-NO

La présence de la liaison S-NO a été par la suite vérifiée en spectrométrie UV-visible, par dichroïsme circulaire et par spectroscopie à transformation de Fourier, ainsi que par analyse thermique.

Le spectre UV-visible montre des maxima à 334 et 545 nm, respectivement dus à des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ et $n_N \rightarrow \pi^*$: ils sont cohérents avec la S-nitrosation du glutathion [247] (Figure 27).

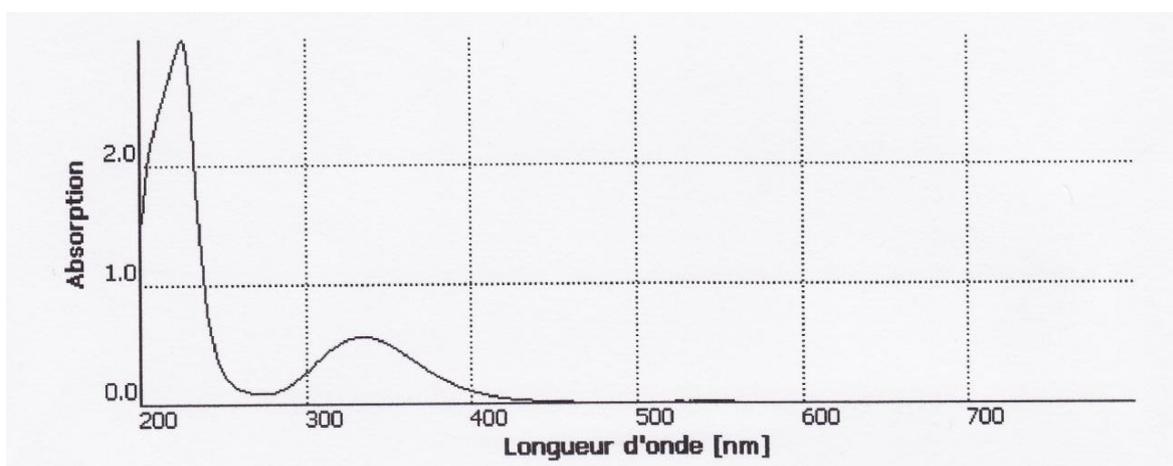


Figure 27 : Spectre UV-visible du GSNO

Par ailleurs, ces résultats sont en accord avec le dichroïsme circulaire (Figure 28) où deux maxima apparaissent : l'un négatif à 334 nm avec une ellipticité molaire $[\theta] = -935 \text{ }^\circ \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ et l'autre positif à 545 nm avec $[\theta] = 915 \text{ }^\circ \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$. De même, la rotation optique ($63 \text{ }^\circ \cdot \text{mL} \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ à 589,3 nm) suggère une molécule différente du GSH ($15 \text{ }^\circ \cdot \text{mL} \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$).

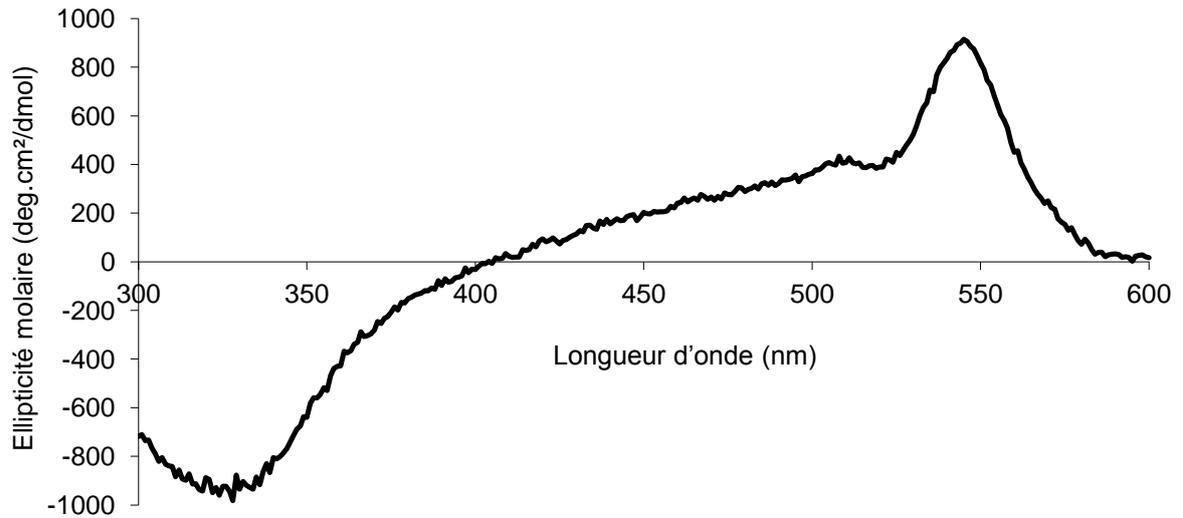
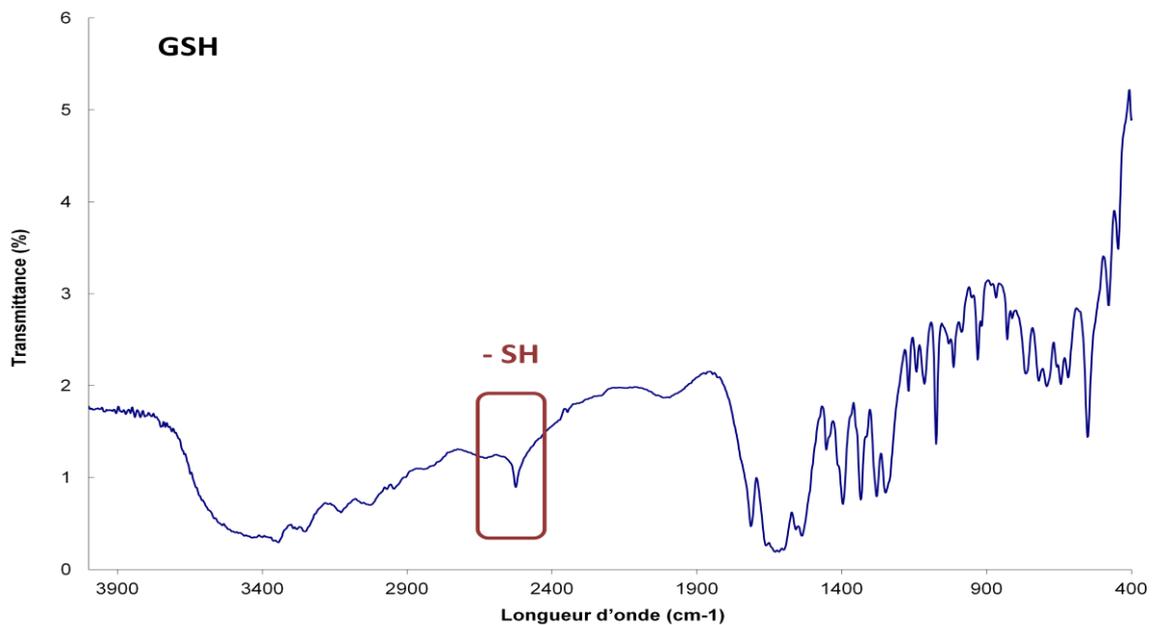


Figure 28 : Spectre de dichroïsme circulaire du GSNO

De surcroît, l'analyse infrarouge a montré d'une part la disparition de la vibration d'étirement du thiol (à 2525 cm⁻¹) et d'autre part l'apparition d'une vibration azote-oxygène à 1520 cm⁻¹ (Figure 29).



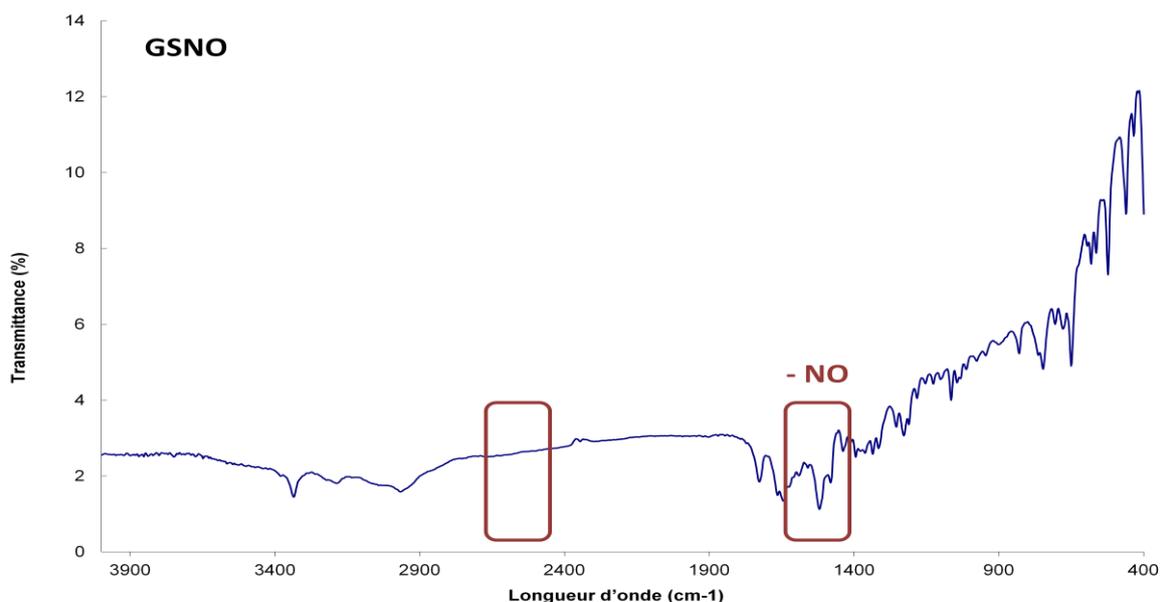


Figure 29 : Spectres infrarouges du GSH et du GSNO

Enfin, des analyses thermiques ont été effectuées par calorimétrie différentielle à balayage et thermogravimétrie couplée à la spectrométrie de masse. Les résultats confirment l'ajout d'un groupement *S*-nitroso- sur GSH. En effet, le premier événement endothermique à 150,3 °C est simultané à une perte de masse de 8,85 %, ce qui correspond à la masse molaire de NO ($m/z = 30$). Le point de fusion de GSH, correspondant au deuxième événement endothermique de l'analyse de GSNO, a été retrouvé à sa valeur attendue soit 195 °C. Toutes ces analyses indiquent la présence de GSNO comme principal produit après la synthèse.

3. DEVELOPPEMENT ET SPECIFICITE DE LA METHODE CLHP

Plusieurs méthodes de chromatographie liquide dédiées à l'analyse des RSNO ont déjà été décrites dans la littérature [93,269,293–295]. La plupart sont basées sur des colonnes pour chromatographie en phase inverse éluées avec des phases mobiles acide ou neutre. Elles sont majoritairement destinées à séparer différents RSNO, tout particulièrement les différents métabolites du GSNO [294]. Seule l'une de ces méthodes nous a permis d'obtenir une séparation suffisante entre les impuretés très polaires produites lors de la synthèse et la dégradation de GSNO, particulièrement les espèces inorganiques telles que les ions chlorure, nitrite et nitrate. Il s'agit d'une méthode en phase inverse avec contre-ion : le détergent cationique TBAHS [269]. Néanmoins, comme nous nous attendions à trouver ces anions, nous avons tenté d'utiliser des techniques de chromatographie ionique, mais la forte alcalinité de la phase mobile nécessaire avec ces systèmes a conduit à la précipitation de GSNO. En conséquence, nous avons utilisé une méthode inspirée de celle décrite par Tsikas et coll. [269] avec les modifications suivantes :

- l'utilisation de méthanol plutôt que d'acétonitrile afin de diminuer le coût ;
- des concentrations 10 fois plus faibles de TBAHS pour diminuer l'usure de la colonne ;
- une phase mobile légèrement acide (pH 6,8) pour préserver l'intégrité de la phase stationnaire (silice) et de l'analyte.

Bien que ce système soit assez long à équilibrer pour obtenir des temps de rétention stables et reproductibles (environ 3 heures, correspondant à l'adsorption maximale de TBA sur la phase stationnaire), il représente un bon compromis pour déterminer à la fois le contenu en GSNO et le profil d'impuretés en une seule analyse (par exemple en utilisant un détecteur à barrette de diodes).

Des points de vue pratique et financier, il est en effet intéressant d'utiliser un seul et unique système pour déterminer en simultanément la pureté du produit et son profil d'impuretés. Deux colonnes C18 ont été testées avec des résultats très similaires en ce qui concerne les paramètres chromatographiques des analytes considérés. La détection a été réalisée d'une part à 334 nm pour évaluer le contenu en GSNO et d'autre part à 220 nm pour

détecter les impuretés. En effet, comme mentionné précédemment, la longueur d'onde 334 nm correspond à une bande d'absorption spécifique attribuable à la liaison S-NO. Des chromatogrammes représentatifs sont présentés Figure 30.

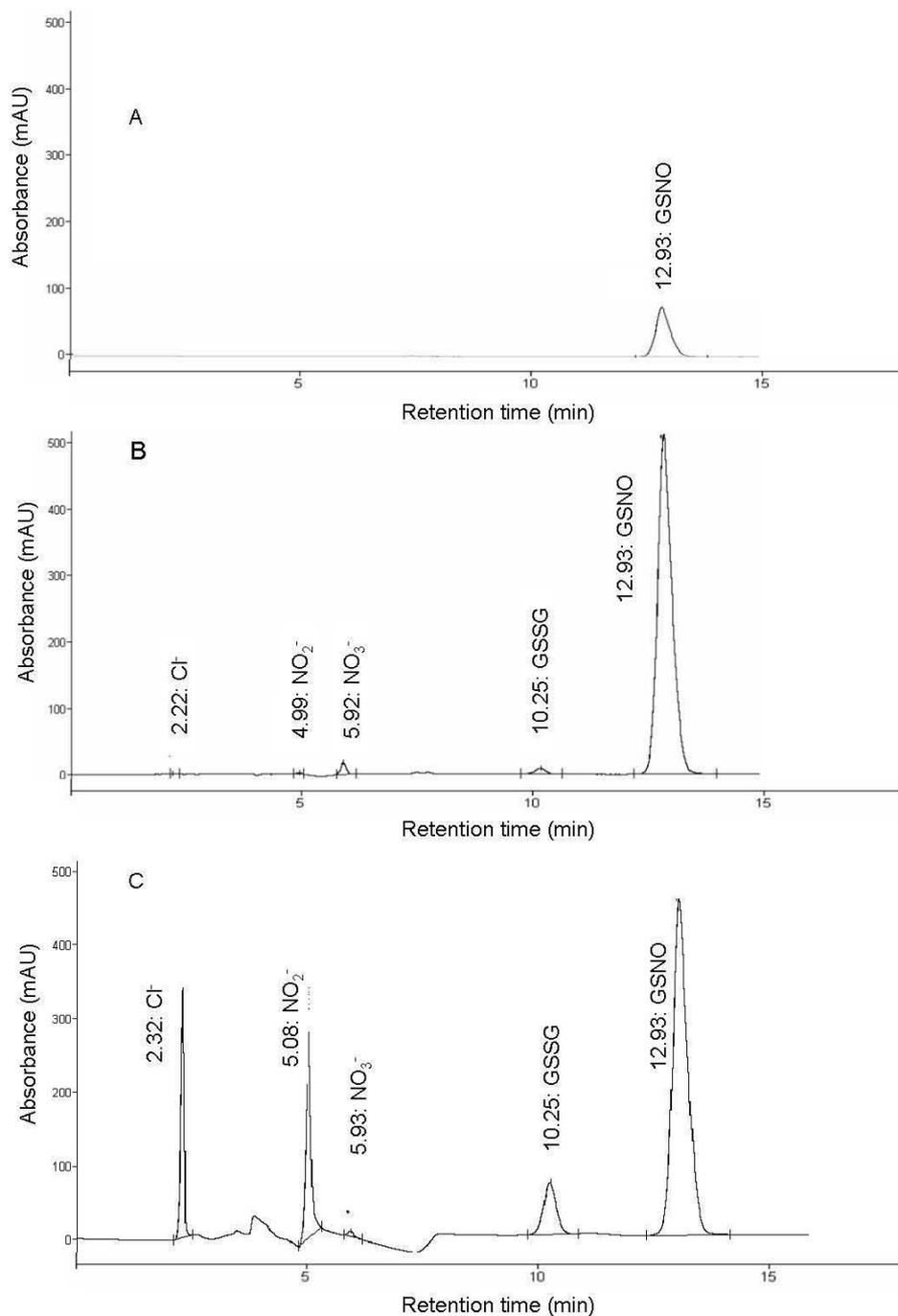


Figure 30 : Chromatogrammes représentatifs correspondants au GSNO synthétisé, isolé et purifié avec une détection à 334 nm (A) ou à 220 nm (B), ou au GSNO obtenu après synthèse seule avec une détection à 220 nm (C). Chaque produit a été injecté à une concentration de 10^{-3} M.

La conformité de la méthode a été évaluée selon trois paramètres :

- le temps de rétention de GSNO et l'efficacité de la colonne (exprimée en nombre de plateaux théoriques N calculés pour le pic GSNO) ;
- le facteur de résolution (Rs) entre les impuretés ayant les temps de rétention les plus proches ;
- le coefficient de variation de l'aire du pic GSNO calculé sur trois injections successives.

Il est connu que l'usage d'agents tensioactifs comme des contre-ions dans la phase mobile entraîne une diminution du revêtement hydrophobe de la phase stationnaire, et donc une diminution de la rétention des composés. Nous avons d'ailleurs observé ce phénomène avec deux phases stationnaires différentes (sur une période de 150 h) : il est donc devenu rapidement évident que les performances du système devaient être vérifiées quotidiennement. Le cahier des charges retenu pour tester la conformité du système était le suivant :

- temps de rétention de GSNO supérieur à 9,5 min (avec le facteur de rétention $k > 2,6$ et $N > 7000$) ;
- résolution entre les pics des ions nitrite et nitrate supérieure à 2,8 (en injectant une solution mélangeant les deux ions à une concentration de 10^{-4} M chacun et en détectant à 220 nm) ;
- coefficient de variation pour l'aire du pic GSNO inférieur à 1,2 % sur 3 injections successives (en injectant une solution de GSNO à 10^{-3} M et en détectant à 334 nm).

4. DETERMINATION DU CONTENU EN GSNO

L'étude propose la détermination du contenu en GSNO à l'aide d'une méthode CLHP avec détection UV à 334 nm. L'étalonnage a été réalisé avec le GSNO de référence (contenu en eau = 1,4 % d'après le fournisseur). La méthode de Saville – Griess a été utilisée comme méthode de référence.

Premièrement, la linéarité de la méthode CLHP a été étudiée entre 0,50 et 5,00. 10^{-3} M, l'équation de la droite de régression linéaire étant: A (aire du pic GSNO, 334 nm) =

1 279 000 x [GSNO] (\pm 9 000)- 2,2 (\pm 18,7) ; coefficient de détermination $r^2= 0,999$ (6 points, $n = 5$). Les limites de détection et de quantification ont été calculées et sont de 0,05 et $0,15 \cdot 10^{-3}$ M respectivement. Enfin, la répétabilité, la précision intermédiaire et l'exactitude de la méthode ont été évaluées. Les coefficients de variation étaient de 1,8 % pour la répétabilité (6 mesures à 100 % de la concentration testée, soit $1 \cdot 10^{-3}$ M) et 2,6 % pour la précision intermédiaire (déterminée sur 3 injections de la solution test sur 2 jours). L'exactitude a été évaluée à $100,34 \pm 1,26$ % (5 points, $n = 5$).

Deuxièmement, la linéarité de la méthode colorimétrique de Savelle-Griess a été testée entre 1,0 et $10,0 \cdot 10^{-6}$ M, avec pour équation de la droite de régression linéaire : $A_{540 \text{ nm}} = 41\,400 \times [\text{GSNO}] (\pm 700) - 0,002 (\pm 0,002)$, $r^2= 0,998$ (6 points, $n=5$). Les limites de détection et de quantification étaient de 0,2 et $0,5 \cdot 10^{-6}$ M, respectivement.

Deux lots de synthèse de GSNO isolé et purifié ont été étudiés : le contenu moyen évalué par CLHP était de 102,5 %, exprimé en substance sèche (contenu en eau 1,5 % m/m). Le contrôle des mêmes lots par la méthode de Savelle-Griess a donné un résultat moyen de 97,0 %. Ces résultats sont compatibles avec les exigences habituelles des autorités de santé.

5. PROFIL D'IMPURETES

En utilisant la même méthode CLHP mais avec une détection dans le bas UV (220 nm), nous avons pu détecter de façon qualitative et quantitative les impuretés présentes dans le GSNO, pouvant provenir soit de la synthèse soit des conditions de conservation. Il est important de noter que la présence d'impuretés potentielles est de plus en plus discutée dans la littérature, car ces dernières pourraient fausser les résultats biologiques ou pharmacologiques [279,288,289,296,297]. Nous nous sommes basés sur les recommandations de l'ICH [298] pour l'enregistrement de composés pharmaceutiques à usage humain ainsi que sur l'hypothèse d'une dose maximum de GSNO < 2 g/j (ce qui est cohérent avec les essais cliniques déjà réalisés, voir partie bibliographique) : les impuretés ont été indiquées (0,05 %), identifiées (0,10 %) ou quantifiées (0,15 %) selon les pourcentages retrouvés. Des chromatogrammes typiques ont déjà été présentés (Figure 30). Les impuretés ont été identifiées en surchargeant la solution de GSNO avec les références correspondantes. Les résultats prouvent la présence d'ions chlorure, nitrite, nitrate ainsi que

de glutathion sous forme oxydée (GSSG) (Tableau 9). Ces produits secondaires étaient attendus car ils peuvent être apportés soit par les matériaux utilisés pour la synthèse soit par une possible dégradation de GSNO pendant le processus [299,300]. De plus, aucune trace de GSH n'a été détectée ni aucun pic tardif (30 min de détection). Enfin, nous avons vérifié la présence de traces résiduelles des solvants organiques utilisés pour précipiter et purifier GSNO (acétone et éther diéthylique), tous deux solvants de classe 3 [291,299]. Dans le cas de l'éther, le solvant a été mélangé avec la phase mobile jusqu'à saturation avant injection. Les temps de rétention relatifs par rapport à GSNO étaient de 0,56 pour l'acétone et de 1,93 pour l'éther diéthylique, sans qu'il y ait d'interférence avec les autres impuretés. Dans les lots purifiés, aucun des deux solvants n'a été détecté à un niveau supérieur à 0,15 % : cette valeur est inférieure au seuil autorisé (0,5 % [291]).

Tableau 9 : Paramètres chromatographiques obtenus lors de l'analyse de GSNO à 220 nm.
Les résultats (temps de rétention relatif (RRT), facteur de rétention (k), résolution entre pics voisins (Rs) et pourcentage de l'aire par rapport à la somme des aires des différents pics) sont les moyennes obtenues pour deux analyses de deux lots différents de GSNO.

	RRT	k	R _s	Aire (%)	
				GSNO référence	GSNO purifié
Chlorure	0,18	0	-	0,04	0,02
Nitrite	0,39	0,88	17,09	0,47	0,39
Nitrate	0,46	1,22	4,06	1,44	0,38
GSSG	0,79	2,82	5,52	0,69	0,56
GSNO	-	3,86	5,23	96,94	98,51

Les impuretés présentes au-delà de 0,15 % ont été quantifiées. C'était le cas pour les ions nitrite, nitrate et pour GSSG. Les ions chlorure étaient présents en large quantité après la synthèse mais étaient éliminés lors des étapes d'isolement et de purification, avec une quantité résiduelle très faible (< 0,15 %). Par conséquent, les ions chlorure n'ont pas été quantifiés. Au contraire, les quantités d'ions nitrite, nitrate et de GSSG ont été déterminées

par la méthode CLHP grâce à des courbes d'étalonnage appropriées (Tableau 10). De plus, la quantité d'ions nitrite a également été déterminée grâce à la méthode colorimétrique de Griess.

Tableau 10 : Droites d'étalonnage pour les ions nitrite, nitrate et le GSSG en utilisant les méthodes CLHP et Griess (ion nitrite). Les données sont exprimées sous la forme moyenne \pm écart-type pour 5 droites d'étalonnage.

Impureté	Domaine de concentration (M)	Pente	Intersection	r ²	LOD (M)	LOQ (M)
Nitrite (Griess)	10 ⁻⁶ à 10 ⁻⁵	39 000 \pm 1 000	0,003 \pm 0,002	0,9990	0,17.10 ⁻⁶	0,51.10 ⁻⁶
Nitrite (CLHP)	10 ⁻⁶ à 10 ⁻⁴	4 600 000 \pm 200 000	-0,527 \pm 1,277	0,9999	0,92.10 ⁻⁶	2,78.10 ⁻⁶
Nitrate (CLHP)	10 ⁻⁶ à 10 ⁻⁴	4 200 000 \pm 350 000	-0,815 \pm 3,460	0,9982	2,72.10 ⁻⁶	8,24.10 ⁻⁶
GSSG (CLHP)	10 ⁻⁶ à 10 ⁻⁴	4 300 000 \pm 300 000	-0,875 \pm 6,300	0,9997	4,84.10 ⁻⁶	14,5.10 ⁻⁶

Les contenus m/m en ions nitrite (déterminé par CLHP ou par Griess) étaient les suivants : d'une part 0,18 % et 0,19 % pour le GSNO de référence et d'autre part 0,21 % et 0,15 % pour le GSNO préparé à façon. Par ailleurs, les quantités d'ions nitrate et de GSSG étaient de 0,69 % et 2,36 % pour la référence et de 0,18 % et 1,83 % pour le produit isolé purifié. L'étape de purification est particulièrement efficace puisqu'elle permet de réduire les quantités d'impuretés initialement présentes dans le milieu de réaction d'un facteur \sim 4 pour les ions nitrite et le GSSG et 1,6 pour les ions nitrate (soit pour le produit non purifié : 0,57 %, 8,13 % et 0,29 %, respectivement). Etant donné que les ions nitrite et nitrate peuvent avoir certains effets vasculaires [288,289,296,297], l'importance du procédé de purification afin d'éviter toute interférence pharmacologique doit donc être signalée.

6. ETUDES DE STABILITE : DETERMINATION DES CONDITIONS DE STOCKAGE OPTIMALES

En premier lieu, le GSNO sous forme de poudre doit être conservé sous atmosphère inerte (argon ou azote), à -20 °C et à l'abri de la lumière. Ces précautions nous ont permis de préserver l'intégrité du produit pendant plus de 6 mois.

En second lieu, il est courant lors du développement de nouvelles molécules médicamenteuses d'utiliser des conditions drastiques (acides et bases forts, chaleur intense, lumière, ...) pour analyser le produit dégradé. Dans le cas de GSNO, de telles conditions amènent à la dégradation totale de la molécule, de par son extrême sensibilité aux conditions environnementales. En effet, la décomposition *in vitro* des RSNO a été largement étudiée dans la littérature [92,219,221] et la lumière, la température, le pH et les ions métalliques ont été signalés comme les principaux paramètres influençant leur stabilité. Cependant ces études ont été réalisées sur de courtes périodes (maximum 48 h, plus souvent quelques heures) de stockage à température ambiante. Ces conditions fortes étaient destinées à identifier les facteurs de dégradation et non pas les conditions idéales de conservation. Nous avons donc réalisé des expériences additionnelles en étudiant leur influence sur de plus longues périodes de conservation (jusque 14 jours à $+4\text{ °C}$). Enfin, l'influence de la pression partielle en oxygène a également été étudiée.

La stabilité de la solution à 10^{-2} M de GSNO en tampon phosphate (pH 7,4 ; 0,5 M) à l'abri de la lumière a été suivie en fonction du temps, à différentes températures de conservation. Le stockage à -80 °C n'indique aucune dégradation ($0,6 \pm 1,2\%$ de perte de GSNO) comparativement à celui à -20 °C ($45,4 \pm 3,2\%$ de perte de GSNO) au bout d'une semaine. A 4 °C , la dégradation de GSNO est très lente (moins de 4 % perdus en 4 jours) et atteint environ 10 % au bout d'une semaine. A température ambiante ($25 \pm 2\text{ °C}$), une perte de $43,1 \pm 4,8\%$ est observée en une semaine. Ce résultat corrobore ceux de la littérature [233]. Par conséquent, une conservation des solutions de GSNO à 4 °C a été retenue pour les expériences suivantes.

En outre, l'effet du pH a été évalué (Figure 31) : une synthèse de GSNO a été effectuée de manière extemporanée (10^{-2} M) et la solution a été stockée à 4 °C , soit en laissant son pH à 0,3 qui est le pH à la fin de la réaction de nitrosation, soit en le ramenant aux valeurs

physiologiques. Les résultats indiquent que l'impact du pH n'apparaît pas avant le 5^{ème} jour, mais qu'ensuite la concentration de GSNO diminue fortement dans le milieu acide. De ce fait le milieu acide nécessaire à la réaction de nitrosation doit ensuite être neutralisé à 7,4 pour assurer la conservation de la solution. D'autre part, cette très faible valeur de pH (< 1) n'est pas compatible avec des expériences cellulaires ou animales. Il a été précédemment décrit différentes formes possibles de résonances entre RS-N=O (forme S), RS⁺=N-O⁻ (forme D) et R-S⁻ N≡O⁺ (forme I). La forme D est décrite comme celle la plus stabilisante de la liaison S-N et comme étant la plus abondante aux faibles pH [301,302]. Dans cette étude, nous avons observé qu'un milieu acide ne permet pas la conservation d'une solution de GSNO sur une longue période (plus de 5 jours). Bien que de nombreux auteurs considèrent le GSNO comme stable en conditions acides, ils réalisent leurs études de stabilité à température ambiante ($\geq 22 \pm 2$ °C) et la plupart du temps avec des réactifs de faible pureté ou en présence d'ions métalliques. Une étude antérieure a notamment montré que l'effet du pH sur la stabilité de la S-nitrosocystéine est lié à la présence d'ions métalliques, sous forme de traces dans les tampons de faible pureté ou dans les réactifs, ou intentionnellement ajoutés à des tampons de haute qualité [219]. Cet effet du pH était annihilé par l'utilisation de tampon de haute qualité. En conséquence, nous avons étudié l'effet de 1.10^{-5} M de cuivre (+II) ajoutés à la solution de GSNO (10^{-2} M en tampon phosphate pH 7,4 à 4 °C) (Figure 31). Dans cette expérience nous avons observé une vitesse de dégradation initiale très rapide pendant le 1^{er} jour (25 % de perte), suivi par une dégradation plus lente. Celle-ci peut être expliquée par la formation d'un complexe avec Cu²⁺ (ou Cu⁺ qui a été suggéré comme réel agent effecteur [226]) et le résidu glutamate du GSSG issu de la dégradation du GSNO [226], comme il avait été précédemment expliqué. L'ajout d'un agent chélateur comme l'EDTA (10^{-4} M) inhibe la dégradation catalysée par le cuivre (Figure 31). Néanmoins, la solution de GSNO seul à pH 7,4 a été aussi stable que les solutions de GSNO/EDTA ou de GSNO/Cu²⁺/EDTA (Figure 31), vraisemblablement grâce à la haute qualité de nos réactifs et de l'eau utilisée, démontrant ainsi qu'il est possible de ne pas utiliser d'EDTA pour conserver des solutions de RSNO. Ceci est d'importance car la présence d'agents chélateurs peut avoir des effets secondaires en biologie cellulaire et dans les études pharmacologiques (par exemple au niveau des flux calciques nécessaires pour le maintien du tonus vasculaire des artères).

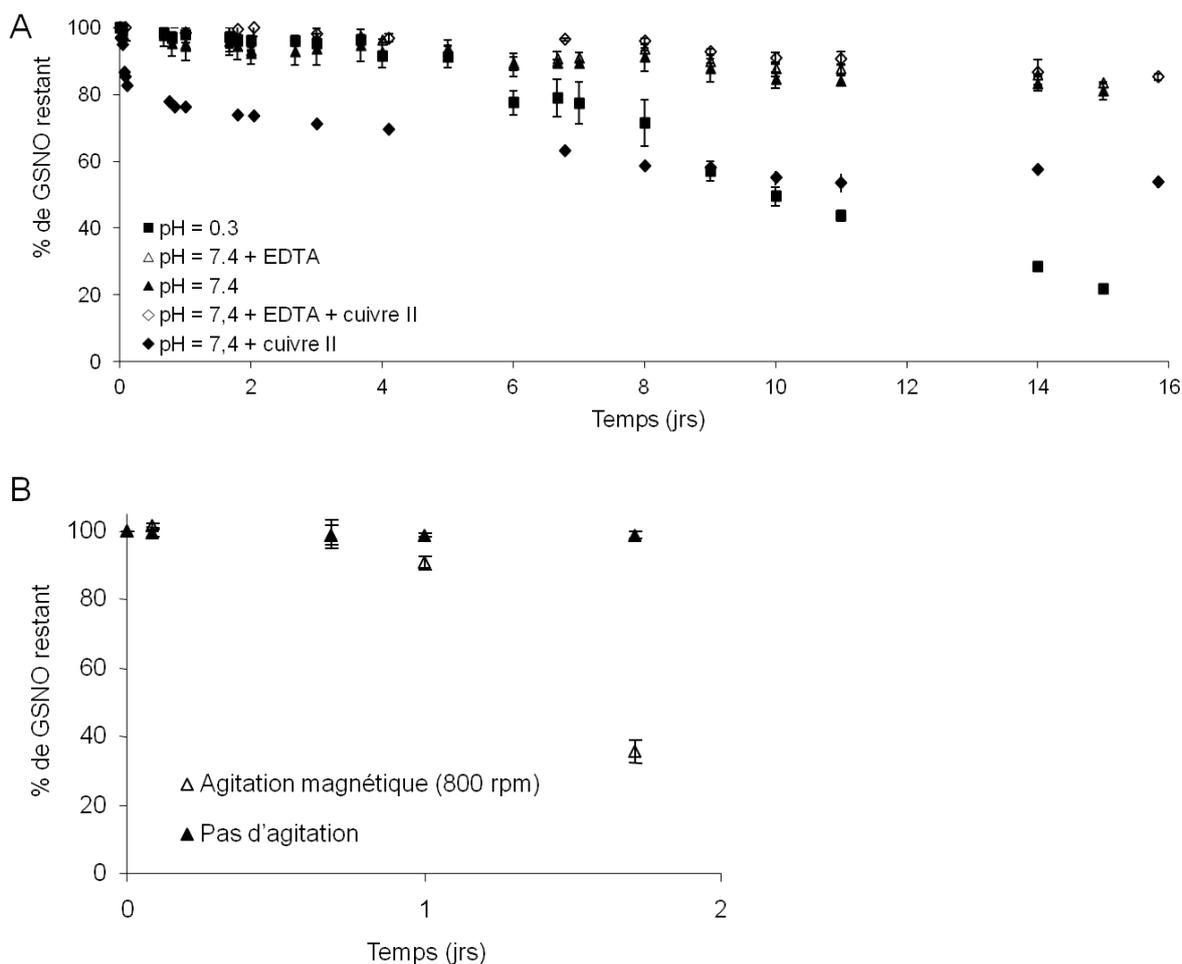


Figure 31 : Etudes de stabilité des solutions de GSNO 10^{-2} M dans différentes conditions : A) à différentes valeurs de pH (pH 0,3 correspond au milieu en fin de synthèse et pH 7,4 à ce même milieu après neutralisation avec NaOH et ajout de tampon phosphate pH 7,4) avec ou sans EDTA ou ions cuivre ($10 \cdot 10^{-6}$ M) à 4°C ; B) à pH 7,4 et à 4°C avec ou sans agitation. Les résultats sont donnés en pourcentage de GSNO restant et évalués par spectrophotométrie à 334 nm (n=2).

Pour finir, l'effet de l'agitation magnétique sur la stabilité d'une solution de GSNO à pH 7,4 stockée à 4°C a été évalué (Figure 31). Une agitation forte (800 rpm) permet d'une part l'oxygénation du milieu (la différence de P_{O_2} mesurée entre les solutions agitée et non agitée était de + 37 mm Hg) et d'autre part une diffusion facilitée des espèces. La synergie de ces effets dégrade fortement le GSNO, et ce dès le deuxième jour de conservation. La réaction entre les RSNO et le dioxygène a déjà été décrite [212]. En outre, De Oliveira et coll. [303] ont montré que leur décomposition, favorisée par une augmentation du mouvement brownien, est influencée par la concentration initiale en RSNO, bien que cet effet soit plus marqué pour la *S*-nitroso-*N*-acetylcystéine et la *S*-nitrosocystéine que pour le

GSNO. En résumé, lors de la conservation des solutions de GSNO, tout doit être fait pour éviter les manipulations susceptibles d'augmenter le mouvement brownien ou d'introduire de l'oxygène dans le milieu.

Après avoir étudié les paramètres influençant la stabilité de GSNO, nous avons examiné les produits de dégradation obtenus. L'analyse CLHP d'une solution de GSNO (tampon phosphate pH 7,4) stockée pendant 10 jours à 4 °C révèle la présence de nitrite et de GSSG en quantités importantes (2,9 % et 25,2 % m/m, respectivement) et une faible quantité de nitrate (0,4 % m/m). Etant donné les impuretés retrouvées, soit GSSG (dimère thermodynamiquement stable [303]) et ions nitrite, une décomposition homolytique de la liaison S-NO est proposée, suivie par la dimérisation du radical thiyl pour former GSSG, selon l'équation bilan suivante :



Pour conclure, les conditions de conservation de GSNO sont fondamentales pour éviter la présence d'impuretés en trop grande concentration. D'après nos résultats, les solutions de GSNO à pH 7,4 préparées avec des réactifs et de l'eau de haute qualité, manipulées avec précaution, peuvent être conservées à 4 °C à l'abri de la lumière pendant 7 jours. Un résumé des points critiques de la synthèse avec ou sans isolement et purification, des analyses et des recommandations de conservation est proposé dans la Figure 32.

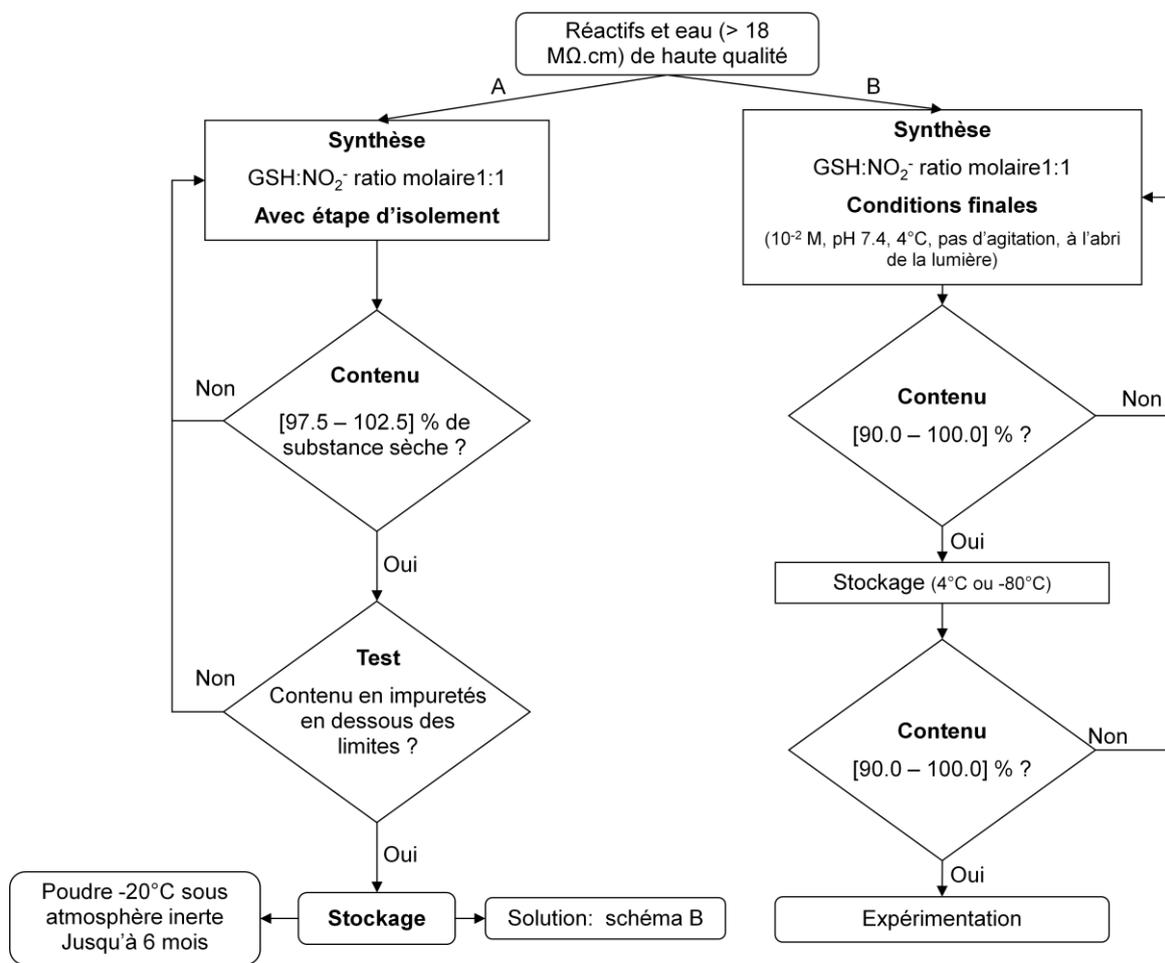


Figure 32 : Schéma récapitulant les recommandations concernant la synthèse de GSNO (avec (A) ou sans (B) étape d'isolement/purification), les tests à effectuer et les conditions de conservation.

DISCUSSION

Le S-nitrosoglutathion (*N*-(*N*-*L*- γ -glutamyl-S-nitroso-*L*-cysteinyl)-glycine, n° CAS 57564-91-7) est un donneur de \bullet NO endogène, présent dans le plasma à des concentrations de l'ordre de $90 \text{ à } 270 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ [93]. La libération de \bullet NO étant accompagnée de celle de glutathion, l'antioxydant majeur présent dans la cellule, ce composé est considéré comme très sûr, et donc comme un leader en terme de potentiel thérapeutique ou comme outil pour étudier des mécanismes biochimiques ou pharmacologiques. De fait, GSNO est actuellement le RSNO le plus étudié, sur différents modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* [293,294,304,305]. Il a d'ailleurs été administré dans plusieurs essais cliniques (voir partie bibliographique) par des voies parentérales ou topiques. A l'heure actuelle, une centaine de patients ont été inclus dans ces essais, et une bonne tolérance de la molécule a été notée : seulement quelques effets secondaires chez quelques patients ont été rapportés, généralement des céphalées, des palpitations ou une hypotension. Ces arguments conduisent à la conclusion que le GSNO pourrait être un principe actif en devenir. Généralement, le GSNO utilisé a été obtenu par les investigateurs par la nitrosation du glutathion par les ions nitrite en solution acide. Rares sont les essais précisant que des contrôles aient été effectués sur les produits utilisés.

Le travail présenté revient sur différentes voies de synthèse et sur les propriétés chimiques du GSNO, en vue de permettre son usage en toute sécurité dans les études *in vitro/ex vivo* ou *in vivo* à venir. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une méthode CLHP est développée et validée pour évaluer le contenu du GSNO isolé/purifié, ainsi que pour identifier et quantifier ses impuretés selon les exigences pharmaceutiques. Comme il a été démontré, la synthèse utilisant un ratio molaire stœchiométrique 1/1 entre NO_2^- et GSH, suivie d'étapes de précipitation et de purification, permet d'obtenir un contenu en GSNO et un très faible niveau d'impuretés parfaitement adaptés aux explorations biologiques et en accord avec les demandes des autorités pharmaceutiques compétentes.

La méthode CLHP utilisée est plus spécifique mais moins sensible que la méthode colorimétrique précédemment utilisée (présentée comme référence dans l'étude). D'autres méthodes CLHP ont été utilisées pour les RSNO mais la plupart du temps avec des phases mobiles de pH acide et des détections par spectrométrie de masse [272], dérivatisation [93],... Finalement, la méthode CLHP proposée est une méthode directe de dosage de GSNO assez simple comparée aux méthodes d'analyse des RSNO déjà existantes. Pour un contrôle de matière première, cette simplicité de la méthode CLHP-UV représente

un avantage. En revanche, elle ne serait vraisemblablement pas adaptée pour l'identification et la quantification de GSNO en concentrations physiologiques (donc beaucoup plus faibles) dans des matrices biologiques, infiniment plus complexes. En effet, la faible absorption du groupement S-NO dans l'UV ne permet de détecter que des concentrations de l'ordre de $50 \cdot 10^{-6}$ M.

En résumé, de nombreuses techniques ont été proposées dans ce travail pour caractériser le GSNO synthétisé. Il n'est pas nécessaire de toutes les appliquer pour contrôler efficacement la molécule : nous proposons par exemple l'association spectrophotométrie UV/analyse infrarouge pour l'identification, puis l'analyse par chromatographie liquide selon la méthode proposée, qui permet de réaliser à la fois l'essai de la matière première et la détermination des impuretés présentes.

Depuis la validation de ce processus de synthèse/isolément/purification du GSNO sur deux lots pilotes, grâce au partenariat avec l'UPR 3349 (Laboratoire Génie des Réactions et Procédés) dans le cadre du projet NanoSNO, quatorze lots de GSNO isolé/purifié ont été préparés au total. Les analyses ont conduit au rejet de trois d'entre eux : généralement à cause d'un défaut dans le séchage du produit ou un défaut de pureté. En moyenne, les lots acceptés avaient une pureté de l'ordre de $99,8 \pm 2,1$ %. Au final, plus de 7 800 mg de GSNO ont été mis à disposition de l'équipe, ce qui représenterait un budget de plus de 55 000 € pour un approvisionnement auprès d'un fournisseur commercial.

Pour conclure en se rappelant le potentiel thérapeutique que peut représenter GSNO, un article récent d'Eaton [306] rappelle la difficulté de transposer un projet universitaire dans l'environnement industriel. L'auteur propose de considérer une trentaine de points pour évaluer l'intérêt d'un projet, dont notamment ceux-ci :

- 1) Le principe actif doit être défini ;
- 2) Il existe une hypothèse solide pour son utilisation, étayée par des données précliniques ;
- 3) Le profil thérapeutique probable est connu, au moins en partie ;
- 4) Il existe un marché de taille suffisante ou un bénéfice pour la société ;
- 5) Le principe actif est synthétisable selon les Bonnes Pratiques de Fabrication ;
- 6) La synthèse est reproductible ;
- 7) Le métabolisme et la pharmacocinétique du principe actif doivent être connus ;

- 8) Aucun composant ne s'accumule dans aucun organe ;
- 9) Aucun composant n'a d'effet toxique (sauf pour les anticancéreux) ;
- 10) La demi-vie est acceptable (< 14 jours chez l'homme) ;
- 11) Le procédé de fabrication est simple, en peu d'étape, peu coûteux ;
- 12) Une analyse de routine est possible, en suivant les recommandations des Bonnes Pratiques ;
- 13) Le principe actif est non immunogène ;
- 14) Le composé est stable pendant un an, tant sur le plan physique que chimique ;
- 15) Pas d'agrégat formé lors du stockage (< 1%).

Les autres items concernent des aspects stratégiques et économiques plutôt que pharmaceutiques au sens strict.

A la lumière de ce document, le GSNO semble réellement avoir un fort potentiel comme future substance médicamenteuse : d'une part, puisqu'il remplit de base un certain nombre des critères ci-dessus, de par son existence endogène ; d'autre part, le travail exposé dans la partie expérimentale permet de vérifier le respect des points concernant sa synthèse et sa physico-chimie.

CONCLUSION

L'oxyde nitrique ($\cdot\text{NO}$) joue un rôle dans de nombreux processus physiologiques, particulièrement dans l'homéostasie du tonus vasculaire. Une diminution de sa concentration peut produire de nombreux événements pathologiques et il est donc intéressant de trouver et caractériser des donneurs de $\cdot\text{NO}$ qui pourraient par la suite être utilisés comme antihypertenseurs, antiagrégants plaquettaires ou anti-ischémiques.

L'oxyde nitrique a une demi-vie extrêmement courte (moins de 1 s dans le sang [77]) et doit donc être administré sous forme de prodrogue comme les nitrates organiques (par exemple nitroglycérine, mononitrate et dinitrate d'isosorbide). Ces principes actifs sont décrits comme relargant rapidement $\cdot\text{NO}$ en induisant un stress oxydant et fréquemment un phénomène de tolérance. Pour limiter ces effets secondaires, d'autres prodrogues sont activement recherchées, et la famille des S-nitrosothiols constitue un exemple de ces nouveaux donneurs potentiellement utilisables en thérapeutique.

Le GSNO apparaît comme le chef de file des RSNO. En effet, cette molécule endogène et peu toxique est également facile à synthétiser, à isoler et à contrôler selon des critères pharmaceutiques, ainsi que nous l'avons montré tout au long de ce travail. Son inconvénient est sa faible stabilité, ce qui explique peut-être l'absence d'essai clinique de phase III malgré le fort potentiel thérapeutique de ce composé.

Nous avons vu que la stabilité des RSNO était déterminée par de nombreux paramètres, y compris la structure du composé lui-même. Des modulations chimiques des groupements permettant d'améliorer la stabilité de ces composés sont actuellement à l'essai, notamment en jouant sur les substitutions des carbones proches du thiol [228]. Dans le même temps, l'hydrophobie des composés peut être augmentée : ceci permettrait à la fois une incorporation plus facile dans les systèmes galéniques (la majorité d'entre eux ont en effet été développés pour retenir des principes actifs affins pour les matrices hydrophobes) et éventuellement une libération plus prolongée. Une revue abordant cette perspective de « drug design » des RSNO a été acceptée par le journal « Current Pharmaceutical Design » [228] (Annexe).

Une autre façon de protéger les RSNO est de les intégrer à des formulations permettant de protéger la liaison S-NO vis-à-vis des conditions expérimentales, ainsi que de servir de réservoir à la molécule. Il existe déjà quelques exemples de formulations avec GSNO dans la littérature (Tableau 11).

Tableau 11 : Formulations galéniques incorporant GSNO

Type de formulation	Caractéristiques	Résultats	Référence
Particules préparées par gélation ionique avec de l'alginate/chitosan	Diamètre > 300 nm	Diminution de la vitesse de décomposition de GSNO incorporé dans ces particules, particulièrement dans les 1 ^{ères} heures	[307]
Films à base d'alcool polyvinylique	450 à 840 µmol de GSNO/g de film	Augmentation du flux sanguin local chez les volontaires auxquels a été appliqué un film chargé en GSNO	[286]
Films polymériques	Chargement en GSNO = 20,4 % (m/m)	Libération de *NO et GSNO à partir des films avec une demi-vie de 35,5 min	[308]
Films polymériques à base d'alcool polyvinylique et de pyrrolidone polyvinylique	Chargement en GSNO = 5 à 30 % (m/m)	Augmentation du flux sanguin vaginal chez le rat pendant 210 minutes avec le GSNO intégré aux films contre 20 minutes pour le GSNO libre	[309]
Matrice en polyéthylèneglycol (PEG)	GSNO produit par nitrosation de GSH <i>in situ</i> dans la matrice	Diminution de la vitesse de décomposition de GSNO incorporé dans la matrice	[141]
Hydrogel avec du Pluronic F127	13,8 mmol de GSNO/g d'hydrogel	Diminution de la vitesse de décomposition de GSNO incorporé dans la matrice	[310]

Cependant, ces quelques formulations ne permettent d'augmenter que modestement la demi-vie du GSNO. En conséquence, des problèmes d'observance pourraient survenir si elles devaient faire l'objet d'un développement clinique. L'équipe CITHEFOR EA 3452 travaille également sur le développement de formes galéniques avec les RSNO, notamment le GSNO : ceci correspond d'ailleurs à mon travail de thèse d'Université. La méthode CLHP décrite précédemment a non seulement été utilisée pour le contrôle des lots de GSNO synthétisés, mais encore pour le dosage du GSNO libéré à partir des formulations étudiées.

Ce travail a donc permis la levée d'un verrou majeur au sein de nos travaux de recherche, c'est-à-dire l'approvisionnement en matière première de qualité. Le procédé de synthèse, précipitation et lavage a d'ailleurs été adapté par la suite à un autre RSNO, la *S*-nitroso-*N*-acétylpénicillamine (SNAP).

De plus, nous avons développé et validé une méthode chromatographique unique, simple à utiliser, qui permet un contrôle qualité du GSNO synthétisé satisfaisant d'un point de vue pharmaceutique (en termes de pureté du produit obtenu, d'impuretés et de solvants résiduels). L'inconvénient majeur de cette méthode est le temps d'équilibre nécessaire avant toute analyse. Les résultats sont comparables avec ceux de la méthode colorimétrique utilisée comme référence. Au final, l'investissement consenti en temps et en matériel (colonnes CLHP) pour l'analyse du produit est largement contrebalancé par la garantie d'utiliser dans les expériences un produit de qualité, parfaitement caractérisé.

ANNEXE

Cette publication comprend l'ensemble des résultats expérimentaux décrits précédemment et a été acceptée en Octobre 2012 dans « Current Pharmaceutical Analysis » (IF = 1,155).

A Complete Physicochemical Identity Card of S-nitrosoglutathione

Running title: Physicochemical Characterisation of S-nitrosoglutathione

Marianne Parent^a, Fatima Dahboul^a, Raphaël Schneider^b, Igor Clarot^c, Philippe Maincent^a, Pierre Leroy^a, Ariane Boudier^{a,*}

^a Université de Lorraine, CITHÉFOR, EA 3452, Faculty of Pharmacy, BP 80403, F-54001 Nancy Cedex, France

^b Université de Lorraine, CNRS, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UPR 3349, BP 20451, F-54001 Nancy Cedex, France

^c Université de Lorraine, CNRS, Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes, UMR 7565, Faculty of Pharmacy, BP 80403, F-54001 Nancy Cedex, France

* Corresponding author

e-mail: ariane.boudier@univ-lorraine.fr; Phone: +33 3 83 68 23 76 ; Fax: +33 3 83 68 23 01

Key-words: Content, ICH Guidelines, Impurities, Ion-Pairing Reversed Phase HPLC, S-Nitrosoglutathione Synthesis; Stability, Structural Identification.

Abstract

S-nitrosoglutathione (GSNO) is one low molecular weight S-nitrosothiol encountered in humans. Nowadays, it is widely used as a nitric oxide donor for *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* experiments as well as in clinical trials, related to the investigation of its pathophysiological role or its potential therapeutic use. Despite numerous reports on this physiological molecule, its quality control does not match the criteria required by pharmaceutical competent authorities. For the first time, an extensive physicochemical characterisation of synthesised and purified GSNO is hereby described. Indeed, structural identification including spectrometric, thermal and elemental analyses was consistent with GSNO structure. An ion-pairing reversed phase HPLC system was developed to assess (i) GSNO content with UV detection at 334 nm, and (ii) fingerprint of its impurities at 220 nm. The as-synthesised product showed a content of 102.5 %, expressed in comparison with a commercially available standard. Identified impurities, *i.e.* chloride, nitrite, nitrate, reduced glutathione and glutathione disulfide, were also quantified based on pharmaceutical requirements. Main products released during various storage conditions (pH, temperature, dioxygen, ...) were disulfide glutathione and nitrite ion. Recommendations are given to use GSNO safely during biological and pharmacological experiments.

Cette publication est une revue portant sur l'importance des phénomènes de S-nitrosation et dénitrosation en pathologie cardiovasculaire : différentes enzymes impliquées sont décrites, ainsi que les stratégies de développement de S-nitrosothiols à fort potentiel thérapeutique. Ce travail a été soumis à « Current Pharmaceutical Design » (IF = 3,870), et accepté en Avril 2012 : il paraîtra dès que possible.

S-nitrosation/denitrosation in cardiovascular pathologies: facts and concepts for the rational design of S-nitrosothiols

Running title: S-nitrosothiol, interaction with enzymes and design

C. Gaucher, A. Boudier, F. Dahboul, M. Parent, and P. Leroy*

CITHÉFOR – EA 3452, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France

*Corresponding author

CITHÉFOR – EA 3452, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France ; Phone number: +33 (0) 3.83.68.23.77 ; Fax: +33 (0) 3.83.68.23.01 ; e-mail: pierre.leroy@pharma.uhp-nancy.fr

Key words: Thioredoxin, Protein disulfide isomerase, Nitric oxide, Nitrosation, S-nitrosothiol, •NO donors, Innovative formulation

Abstract

Nitric oxide (•NO) is a physiological mediator of vasorelaxation constitutively synthesized by endothelial nitric oxide synthase. Because •NO has a short half-life, it is stored by proteins through S-nitrosation reaction. S-nitrosation was recently defined as a post-translational modification of proteins for cellular signaling, as important as glycosylation and phosphorylation. Disulfide forming/isomerizing enzymes like thioredoxin (Trx), protein disulfide isomerase (PDI), which are chaperone proteins, are implicated into transnitrosation reactions, which are the transfer of •NO from one cysteine residue to another one. Furthermore, Trx have also been shown to denitrosate S-nitrosoproteins depending on their redox status. S-nitrosation of Trx on Cys residues apart from active site, under nitrosative or oxidative stresses, enhances its activity, thereby reducing intracellular reactive oxygen species. Trx and PDI have therefore an essential role for cell signaling control which leads, among other actions, to cardio and vasculo-protection. The diminution of either •NO synthesis or bioavailability is implicated into a large number of cardiovascular pathologies associated to hypoxia or vasoconstriction like, endothelial dysfunction, arterial hypertension and atherosclerosis. In order to mimic the physiological storage of •NO as S-nitrosothiols, the development of •NO donors should be based on the covalent S-NO bond. The chemical stabilization of the S-NO bond and protection against enzymatically active proteins such as PDI//Trx are major points for the design of stable compounds. Entrapment of S-nitrosothiols in innovative formulations (films, gels, microparticles, nanoparticles) is an emerging field in order to stabilize and protect them, and to deliver •NO under a sustained release at the targeted site.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wagner DA, Young VR, Tannenbaum SR. Mammalian nitrate biosynthesis: incorporation of $^{15}\text{NH}_3$ into nitrate is enhanced by endotoxin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983 ; 80 : 4518–4521.
2. Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, *et al.* Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981 ; 78 : 7764–7768.
3. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1985 ; 82 : 7738–7742.
4. Iyengar R, Stuehr DJ, Marletta MA. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987 ; 84 : 6369–6373.
5. Miwa M, Stuehr DJ, Marletta MA, *et al.* Nitrosation of amines by stimulated macrophages. *Carcinogenesis* 1987 ; 8 : 955–958.
6. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin V, *et al.* Synthesis of nitric oxide from a guanidino nitrogen of L-arginine: a molecular mechanism that targets intracellular iron. *Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system*. Amsterdam : Elsevier, 1990 : 189–223.
7. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987 ; 235 : 473–476.
8. Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* 1989 ; 169 : 1543–1555.
9. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, *et al.* Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988 ; 157 : 87–94.
10. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980 ; 288 : 373–376.
11. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, *et al.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987 ; 84 : 9265–9269.
12. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987 ; 327 : 524–526.
13. Murad F. Some highlights of a 47 year career in research. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005 ; 62 : 1–3.

14. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 1988 ; 336 : 385–388.
15. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 1991 ; 14 : 60–67.
16. Koshland DE Jr. The molecule of the year. *Science* 1992 ; 258 : 1861.
17. White KA, Marletta MA. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* 1992 ; 31 : 6627–6631.
18. Guzik TJ, West NE, Black E, *et al.* Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ. Res.* 2000 ; 86 : E85–90.
19. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 1994 ; 298 (Pt 2) : 249–258.
20. Crane BR, Arvai AS, Gachhui R, *et al.* The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science* 1997 ; 278 : 425–431.
21. Fischmann TO, Hruza A, Niu XD, *et al.* Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat. Struct. Biol.* 1999 ; 6 : 233–242.
22. Li H, Raman CS, Glaser CB, *et al.* Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1999 ; 274 : 21276–21284.
23. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992 ; 6 : 3051–3064.
24. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991 ; 43 : 109–142.
25. Tsai EJ, Kass DA. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacol Ther* 2009 ; 122 : 216–38.
26. Stone JR, Marletta MA. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 1994 ; 33 : 5636–5640.
27. Ignarro LJ. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep* 1999 ; 19 : 51–71.
28. Ferrer-Sueta G, Radi R. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem. Biol.* 2009 ; 4 : 161–177.
29. Haddad IY, Crow JP, Hu P, *et al.* Concurrent generation of nitric oxide and superoxide damages surfactant protein A. *Am. J. Physiol.* 1994 ; 267 : L242–249.

30. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1990 ; 30 : 535–560.
31. Moncada S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci* 1997 ; 811 : 60–67; discussion 67–69.
32. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991 ; 88 : 4651–4655.
33. Boulanger C, Lüscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J. Clin. Invest.* 1990 ; 85 : 587–590.
34. Nakaki T, Nakayama M, Kato R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1990 ; 189 : 347–353.
35. Kone BC. Nitric oxide synthesis in the kidney: isoforms, biosynthesis, and functions in health. *Semin. Nephrol.* 2004 ; 24 : 299–315.
36. Ziemann SJ, Kass DA. Advanced glycation endproduct crosslinking in the cardiovascular system: potential therapeutic target for cardiovascular disease. *Drugs* 2004 ; 64 : 459–470.
37. Schmid W, Lee A, Son J, *et al.* Hypochlorite-oxidized low density lipoproteins reduce production and bioavailability of nitric oxide in RAW 264.7 macrophages by distinct mechanisms. *Life Sci.* 2008 ; 83 : 50–58.
38. Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N. Engl. J. Med.* 2001 ; 345 : 588–595.
39. Snyder SH. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science* 1992 ; 257 : 494–496.
40. Zorumski CF, Izumi Y. Nitric oxide and hippocampal synaptic plasticity. *Biochem. Pharmacol.* 1993 ; 46 : 777–785.
41. Dawson VL. Nitric oxide: role in neurotoxicity. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1995 ; 22 : 305–308.
42. Dawson VL, Dawson TM, London ED, *et al.* Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991 ; 88 : 6368–6371.
43. Rand MJ. Nitroergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1992 ; 19 : 147–169.
44. Anggård E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994 ; 343 : 1199–1206.

45. Burnett AL, Lowenstein CJ, Brecht DS, *et al.* Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science* 1992 ; 257 : 401–403.
46. Bonavida B, Baritaki S, Huerta-Yepez S, *et al.* Novel therapeutic applications of nitric oxide donors in cancer: roles in chemo- and immunosensitization to apoptosis and inhibition of metastases. *Nitric Oxide* 2008 ; 19 : 152–157.
47. Muntané J, Mata MD la. Nitric oxide and cancer. *World J Hepatol* 2010 ; 2 : 337–344.
48. Guzik TJ, Korbout R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 2003 ; 54 : 469–487.
49. Reif DW, Simmons RD. Nitric oxide mediates iron release from ferritin. *Arch. Biochem. Biophys.* 1990 ; 283 : 537–541.
50. Minotti G, Aust SD. The role of iron in oxygen radical mediated lipid peroxidation. *Chem. Biol. Interact.* 1989 ; 71 : 1–19.
51. Roy B, Lepoivre M, Henry Y, *et al.* Inhibition of ribonucleotide reductase by nitric oxide derived from thionitrites: reversible modifications of both subunits. *Biochemistry* 1995 ; 34 : 5411–5418.
52. Barnes PJ. Nitric oxide and airways. *Eur. Respir. J.* 1993 ; 6 : 163–165.
53. Ghosh S, Erzurum SC. Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta* 2011 ; 1810 : 1008–1016.
54. Koss MC. Functional role of nitric oxide in regulation of ocular blood flow. *Eur. J. Pharmacol.* 1999 ; 374 : 161–174.
55. Tamm ER, Flügel-Koch C, Mayer B, *et al.* Nerve cells in the human ciliary muscle: ultrastructural and immunocytochemical characterization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995 ; 36 : 414–426.
56. Yanagiya N, Akiba J, Kado M, *et al.* Transient corneal edema induced by nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide* 1997 ; 1 : 397–403.
57. Dorner GT, Garhofer G, Kiss B, *et al.* Nitric oxide regulates retinal vascular tone in humans. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003 ; 285 : H631–636.
58. Goureau O, Bellot J, Thillaye B, *et al.* Increased nitric oxide production in endotoxin-induced uveitis. Reduction of uveitis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Immunol.* 1995 ; 154 : 6518–6523.
59. Meijer F, Delft JL Van, Garrelds IM, *et al.* Nitric oxide plays a role as a mediator of conjunctival edema in experimental allergic conjunctivitis. *Exp. Eye Res.* 1996 ; 62 : 359–365.

60. Behar-Cohen FF, Savoldelli M, Parel JM, *et al.* Reduction of corneal edema in endotoxin-induced uveitis after application of L-NAME as nitric oxide synthase inhibitor in rats by iontophoresis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998 ; 39 : 897–904.
61. Wu GS, Zhang J, Rao NA. Peroxynitrite and oxidative damage in experimental autoimmune uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1997 ; 38 : 1333–1339.
62. Wang ZY, Waldeck K, Grundemar L, *et al.* Ocular inflammation induced by electroconvulsive treatment: contribution of nitric oxide and neuropeptides mobilized from C-fibres. *Br. J. Pharmacol.* 1997 ; 120 : 1491–1496.
63. Hangai M, Yoshimura N, Hiroi K, *et al.* Role of nitric oxide during the initial phase of reperfusion after retinal ischemia in the rat. *Ophthalmic Res.* 1999 ; 31 : 16–23.
64. Hangai M, Yoshimura N, Hiroi K, *et al.* Inducible nitric oxide synthase in retinal ischemia-reperfusion injury. *Exp. Eye Res.* 1996 ; 63 : 501–509.
65. Carmo A do, Lopes C, Santos M, *et al.* Nitric oxide synthase activity and L-arginine metabolism in the retinas from streptozotocin-induced diabetic rats. *Gen. Pharmacol.* 1998 ; 30 : 319–324.
66. Schmetterer L, Findl O, Fasching P, *et al.* Nitric oxide and ocular blood flow in patients with IDDM. *Diabetes* 1997 ; 46 : 653–658.
67. Kamikawatoko S, Tokoro T, Ishida A, *et al.* Nitric oxide relaxes bovine ciliary muscle contracted by carbachol through elevation of cyclic GMP. *Exp. Eye Res.* 1998 ; 66 : 1–7.
68. Goh Y, Hotehama Y, Mishima HK. Characterization of ciliary muscle relaxation induced by various agents in cats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995 ; 36 : 1188–1192.
69. Nathanson JA. Nitrovasodilators as a new class of ocular hypotensive agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992 ; 260 : 956–965.
70. Schuman JS, Erickson K, Nathanson JA. Nitrovasodilator effects on intraocular pressure and outflow facility in monkeys. *Exp. Eye Res.* 1994 ; 58 : 99–105.
71. Nathanson JA, McKee M. Alterations of ocular nitric oxide synthase in human glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995 ; 36 : 1774–1784.
72. Schmidt HH, Warner TD, Ishii K, *et al.* Insulin secretion from pancreatic B cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxides. *Science* 1992 ; 255 : 721–723.
73. Corbett JA, Mikhael A, Shimizu J, *et al.* Nitric oxide production in islets from nonobese diabetic mice: aminoguanidine-sensitive and -resistant stages in the immunological diabetic process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993 ; 90 : 8992–8995.
74. Muhammed SJ, Lundquist I, Salehi A. Pancreatic β -cell dysfunction, expression of iNOS and the effect of phosphodiesterase inhibitors in human pancreatic islets of type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism* 2012. In press: doi: 10.1111/j.1463-1326.2012.01632

75. Henry Y, Lepoivre M, Drapier JC, *et al.* EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J.* 1993 ; 7 : 1124–1134.
76. Abraham MH, Gola JMR, Cometto-Muniz JE, *et al.* The solvation properties of nitric oxide. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 2000 ; 2067–2070.
77. Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ. Res.* 1990 ; 66 : 1561–1575.
78. Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, *et al.* Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1981 ; 218 : 739–749.
79. Kowaluk EA, Poliszczuk R, Fung HL. Tolerance to relaxation in rat aorta: comparison of an S-nitrosothiol with nitroglycerin. *Eur. J. Pharmacol.* 1987 ; 144 : 379–383.
80. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992 ; 258 : 1898–1902.
81. Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, *et al.* Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 ; 89 : 7674–7677.
82. Gaston B, Reilly J, Drazen JM, *et al.* Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993 ; 90 : 10957–10961.
83. Giustarini D, Milzani A, Dalle-Donne I, *et al.* Detection of S-nitrosothiols in biological fluids: a comparison among the most widely applied methodologies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007 ; 851 : 124–139.
84. Concours National de l'Internat en Pharmacie. Valeurs biologiques usuelles. 2009.
85. Pastore A, Federici G, Bertini E, *et al.* Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta* 2003 ; 333 : 19–39.
86. Stamler JS, Slivka A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutr. Rev.* 1996 ; 54 : 1–30.
87. Zhloba AA, Blashko EL. Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2004 ; 800 : 275–280.
88. Tsikas D, Sandmann J, Rossa S, *et al.* Measurement of S-nitrosoalbumin by gas chromatography-mass spectrometry. I. Preparation, purification, isolation, characterization and metabolism of S-[15N]nitrosoalbumin in human blood in vitro. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1999 ; 726 : 1–12.
89. Giustarini D, Tsikas D, Rossi R. Study of the effect of thiols on the vasodilatory potency of S-nitrosothiols by using a modified aortic ring assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2011 ; 256 : 95–102.

90. MacArthur PH, Shiva S, Gladwin MT. Measurement of circulating nitrite and S-nitrosothiols by reductive chemiluminescence. *J. Chromatogr. B* 2007 ; 851 : 93–105.
91. Jourd'heuil D, Hallén K, Feelisch M, *et al.* Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood. *Free Radical Biology and Medicine* 2000 ; 28 : 409–417.
92. Heikal L, Aaronson PI, Ferro A, *et al.* S-nitrosophytochelators: investigation of the bioactivity of an oligopeptide nitric oxide delivery system. *Biomacromolecules* 2011 ; 12 : 2103–2113.
93. Bramanti E, Angeli V, Mester Z, *et al.* Determination of S-nitrosoglutathione in plasma: comparison of two methods. *Talanta* 2010 ; 81 : 1295–1299.
94. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim. Biophys. Acta* 1999 ; 1411 : 273–289.
95. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, *et al.* Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic. Biol. Med.* 2003 ; 35 : 790–796.
96. Gilchrist M, Shore AC, Benjamin N. Inorganic nitrate and nitrite and control of blood pressure. *Cardiovasc. Res.* 2011 ; 89 : 492–498.
97. Lundberg JO, Govoni M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 2004 ; 37 : 395–400.
98. Gilbert HF. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1990 ; 63 : 69–172.
99. Hotchkiss KA, Matthias LJ, Hogg PJ. Exposure of the cryptic Arg-Gly-Asp sequence in thrombospondin-1 by protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* 1998 ; 1388 : 478–488.
100. Zai A, Rudd MA, Scribner AW, *et al.* Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide. *J. Clin. Invest.* 1999 ; 103 : 393–399.
101. Colombo G, Clerici M, Giustarini D, *et al.* Redox Albuminomics: Oxidized Albumin in Human Diseases. *Antioxidants & redox signaling* 2012. In press; doi: 10.1089/ars.2012.4702
102. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, *et al.* S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992 ; 89 : 444–448.
103. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, *et al.* S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 1996 ; 380 : 221–226.
104. Gow AJ, Buerk DG, Ischiropoulos H. A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 1997 ; 272 : 2841–2845.

105. Gaston B, Sears S, Woods J, *et al.* Bronchodilator S-nitrosothiol deficiency in asthmatic respiratory failure. *Lancet* 1998 ; 351 : 1317–1319.
106. Sandmann J, Schwedhelm KS, Tsikas D. Specific transport of S-nitrosocysteine in human red blood cells: Implications for formation of S-nitrosothiols and transport of NO bioactivity within the vasculature. *FEBS Lett.* 2005 ; 579 : 4119–4124.
107. Hirayama A, Noronha-Dutra AA, Gordge MP, *et al.* S-nitrosothiols are stored by platelets and released during platelet-neutrophil interactions. *Nitric Oxide* 1999 ; 3 : 95–104.
108. Clancy RM, Levartovsky D, Leszczynska-Piziak J, *et al.* Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994 ; 91 : 3680–3684.
109. Do KQ, Benz B, Grima G, *et al.* Nitric oxide precursor arginine and S-nitrosoglutathione in synaptic and glial function. *Neurochem. Int.* 1996 ; 29 : 213–224.
110. Li S, Whorton AR. Identification of stereoselective transporters for S-nitroso-L-cysteine: role of LAT1 and LAT2 in biological activity of S-nitrosothiols. *J. Biol. Chem.* 2005 ; 280 : 20102–20110.
111. Anderson JL, Muhlestein JB, Horne BD, *et al.* Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and C-reactive protein in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Circulation* 2000 ; 102 : 1227–1232.
112. Yoo JH, Lee SC. Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis* 2001 ; 158 : 425–430.
113. Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu. Rev. Nutr.* 1992 ; 12 : 279–298.
114. Unlü Y, Keleş S, Becit N, *et al.* Hyperhomocysteinaemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005 ; 30 : 315–318.
115. Morakinyo MK, Strongin RM, Simoyi RH. Modulation of homocysteine toxicity by S-nitrosothiol formation: a mechanistic approach. *J Phys Chem B* 2010 ; 114 : 9894–9904.
116. Binkerd EF, Kolari OE. The history and use of nitrate and nitrite in the curing of meat. *Food Cosmet Toxicol* 1975 ; 13 : 655–661.
117. Castello PR, David PS, McClure T, *et al.* Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab.* 2006 ; 3 : 277–287.
118. Zweier JL, Wang P, Samouilov A, *et al.* Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat. Med.* 1995 ; 1 : 804–809.

119. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, *et al.* Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat. Med.* 2003 ; 9 : 1498–1505.
120. Li H, Samouilov A, Liu X, *et al.* Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation. *J. Biol. Chem.* 2004 ; 279 : 16939–16946.
121. Furchgott RF, Bhadrakom S. Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1953 ; 108 : 129–143.
122. Webb A, Bond R, McLean P, *et al.* Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004 ; 101 : 13683–13688.
123. Duranski MR, Greer JJM, Dejam A, *et al.* Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J. Clin. Invest.* 2005 ; 115 : 1232–1240.
124. Dejam A, Hunter CJ, Tremonti C, *et al.* Nitrite infusion in humans and nonhuman primates: endocrine effects, pharmacokinetics, and tolerance formation. *Circulation* 2007 ; 116 : 1821–31.
125. Lauer T, Preik M, Rassaf T, *et al.* Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 ; 98 : 12814–12819.
126. Chirkov YY, Horowitz JD. Impaired tissue responsiveness to organic nitrates and nitric oxide: a new therapeutic frontier? *Pharmacol. Ther.* 2007 ; 116 : 287–305.
127. Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000 ; 101 : 1899–1906.
128. Griffiths MJD, Evans TW. Inhaled nitric oxide therapy in adults. *N. Engl. J. Med.* 2005 ; 353 : 2683–2695.
129. William M, Vien J, Hamilton E, *et al.* The nitric oxide donor sodium nitroprusside stimulates the Na⁺-K⁺ pump in isolated rabbit cardiac myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 2005 ; 565 : 815–825.
130. Castro PFS, Pereira A de C, Rogrigues GJ, *et al.* A new nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor presents higher efficacy than sodium nitroprusside on relaxation of airway smooth muscle. *Eur J Pharm Sci* 2011 ; 43 : 370–377.
131. Tanahashi M, Sekizawa T, Yoshida M, *et al.* Effects of sodium nitroprusside on renal functions and NO-cGMP production in anesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999 ; 33 : 401–408.
132. Elkayam U, Johnson JV, Shotan A, *et al.* Double-blind, placebo-controlled study to evaluate the effect of organic nitrates in patients with chronic heart failure treated with angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation* 1999 ; 99 : 2652–2657.

133. Gerzer R, Karrenbrock B, Siess W, *et al.* Direct comparison of the effects of nitroprusside, SIN 1, and various nitrates on platelet aggregation and soluble guanylate cyclase activity. *Thromb. Res.* 1988 ; 52 : 11–21.
134. Abdellatif KRA, Chowdhury MA, Velázquez CA, *et al.* Celecoxib prodrugs possessing a diazen-1-ium-1,2-diolate nitric oxide donor moiety: synthesis, biological evaluation and nitric oxide release studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010 ; 20 : 4544–4549.
135. Lazzarato L, Chegaev K, Marini E, *et al.* New nitric oxide or hydrogen sulfide releasing aspirins. *J. Med. Chem.* 2011 ; 54 : 5478–5484.
136. Rossoni G, Manfredi B, Soldato P Del, *et al.* The nitric oxide-releasing naproxen derivative displays cardioprotection in perfused rabbit heart submitted to ischemia-reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004 ; 310 : 555–562.
137. Wallace JL. Nitric oxide-releasing mesalamine: potential utility for treatment of inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2003 ; 35 Suppl 2 : S35–40.
138. Li Y-Q, Ji H, Zhang Y-H, *et al.* WB1106, a novel nitric oxide-releasing derivative of telmisartan, inhibits hypertension and improves glucose metabolism in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2007 ; 577 : 100–108.
139. Symington PA, Ma XL, Lefer AM. Protective actions of S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) in a rat model of hemorrhagic shock. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1992 ; 14 : 789–797.
140. Ricardo KFS, Shishido SM, Oliveira MG de, *et al.* Characterization of the hypotensive effect of S-nitroso-N-acetylcysteine in normotensive and hypertensive conscious rats. *Nitric Oxide* 2002 ; 7 : 57–66.
141. Seabra AB, Souza GFP de, Rocha LL da, *et al.* S-nitrosoglutathione incorporated in poly(ethylene glycol) matrix: potential use for topical nitric oxide delivery. *Nitric Oxide* 2004 ; 11 : 263–272.
142. Jia L, Wong H. In vitro and in vivo assessment of cellular permeability and pharmacodynamics of S-nitrosylated captopril, a nitric oxide donor. *Br. J. Pharmacol.* 2001 ; 134 : 1697–1704.
143. Keefer LK. Nitric oxide (NO)- and nitroxyl (HNO)-generating diazeniumdiolates (NONOates): emerging commercial opportunities. *Curr Top Med Chem* 2005 ; 5 : 625–636.
144. Fitzhugh AL, Keefer LK. Diazeniumdiolates: pro- and antioxidant applications of the “NONOates.” *Free Radic. Biol. Med.* 2000 ; 28 : 1463–1469.
145. Miller MR, Megson IL. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br. J. Pharmacol.* 2007 ; 151 : 305–321.

146. Chakrapani H, Wilde TC, Citro ML, *et al.* Synthesis, nitric oxide release, and anti-leukemic activity of glutathione-activated nitric oxide prodrugs: Structural analogues of PABA/NO, an anti-cancer lead compound. *Bioorg. Med. Chem.* 2008 ; 16 : 2657–2664.
147. Misko TP, Moore WM, Kasten TP, *et al.* Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur. J. Pharmacol.* 1993 ; 233 : 119–125.
148. Knipp M. How to control NO production in cells: N(omega),N(omega)-dimethyl-L-arginine dimethylaminohydrolase as a novel drug target. *Chembiochem* 2006 ; 7 : 879–889.
149. Stewart DD. Tolerance to nitroglycerin. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 1905 ; XLIV : 1678–1679.
150. Needleman P, Johnson EM Jr. Mechanism of tolerance development to organic nitrates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1973 ; 184 : 709–715.
151. Chong S, Fung HL. Biochemical and pharmacological interactions between nitroglycerin and thiols. Effects of thiol structure on nitric oxide generation and tolerance reversal. *Biochem. Pharmacol.* 1991 ; 42 : 1433–1439.
152. Kojda G, Meyer W, Noack E. Influence of endothelium and nitrovasodilators on free thiols and disulfides in porcine coronary smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 1993 ; 250 : 385–394.
153. Haj-Yehia AI, Benet LZ. In vivo depletion of free thiols does not account for nitroglycerin-induced tolerance: a thiol-nitrate interaction hypothesis as an alternative explanation for nitroglycerin activity and tolerance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996 ; 278 : 1296–1305.
154. Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002 ; 99 : 8306–8311.
155. Wenzel P, Hink U, Oelze M, *et al.* Role of reduced lipoic acid in the redox regulation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) activity. Implications for mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance. *J. Biol. Chem.* 2007 ; 282 : 792–799.
156. Minamiyama Y, Takemura S, Akiyama T, *et al.* Isoforms of cytochrome P450 on organic nitrate-derived nitric oxide release in human heart vessels. *FEBS Lett.* 1999 ; 452 : 165–169.
157. Daiber A, Oelze M, Coldewey M, *et al.* Oxidative stress and mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: a comparison of pentaerythritol tetranitrate with other organic nitrates. *Mol. Pharmacol.* 2004 ; 66 : 1372–1382.
158. Sayed N, Kim DD, Fioramonti X, *et al.* Nitroglycerin-induced S-nitrosylation and desensitization of soluble guanylyl cyclase contribute to nitrate tolerance. *Circ Res* 2008 ; 103 : 606–614.

159. Münzel T, Sayegh H, Freeman BA, *et al.* Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J. Clin. Invest.* 1995 ; 95 : 187–194.
160. Hink U, Oelze M, Kolb P, *et al.* Role for peroxynitrite in the inhibition of prostacyclin synthase in nitrate tolerance. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003 ; 42 : 1826–1834.
161. Freedman SB, Daxini BV, Noyce D, *et al.* Intermittent transdermal nitrates do not improve ischemia in patients taking beta-blockers or calcium antagonists: potential role of rebound ischemia during the nitrate-free period. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1995 ; 25 : 349–355.
162. Ishikawa K, Kanamasa K, Ogawa I, *et al.* Long-term nitrate treatment increases cardiac events in patients with healed myocardial infarction. Secondary Prevention Group. *Jpn. Circ. J.* 1996 ; 60 : 779–788.
163. Nakamura Y, Moss AJ, Brown MW, *et al.* Long-term nitrate use may be deleterious in ischemic heart disease: A study using the databases from two large-scale postinfarction studies. Multicenter Myocardial Ischemia Research Group. *Am. Heart J.* 1999 ; 138 : 577–585.
164. Chen C-H, Budas GR, Churchill EN, *et al.* Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* 2008 ; 321 : 1493–1495.
165. Gori T, Al-Hesayen A, Jolliffe C, *et al.* Comparison of the effects of pentaerythritol tetranitrate and nitroglycerin on endothelium-dependent vasorelaxation in male volunteers. *Am. J. Cardiol.* 2003 ; 91 : 1392–1394.
166. Thomas GR, DiFabio JM, Gori T, *et al.* Once daily therapy with isosorbide-5-mononitrate causes endothelial dysfunction in humans: evidence of a free-radical-mediated mechanism. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007 ; 49 : 1289–1295.
167. Ahlner J, Andersson RG, Torfgård K, *et al.* Organic nitrate esters: clinical use and mechanisms of actions. *Pharmacol. Rev.* 1991 ; 43 : 351–423.
168. Oberle S, Abate A, Grosser N, *et al.* Endothelial protection by pentaerithrityl trinitrate: bilirubin and carbon monoxide as possible mediators. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 2003 ; 228 : 529–534.
169. Pautz A, Rauschkolb P, Schmidt N, *et al.* Effects of nitroglycerin or pentaerithrityl tetranitrate treatment on the gene expression in rat hearts: evidence for cardiotoxic and cardioprotective effects. *Physiol. Genomics* 2009 ; 38 : 176–185.
170. Oppermann M, Balz V, Adams V, *et al.* Pharmacological induction of vascular extracellular superoxide dismutase expression in vivo. *J. Cell. Mol. Med.* 2009 ; 13 : 1271–1278.
171. Dovinová I, Cacányiová S, Fáberová V, *et al.* The effect of an NO donor, pentaerythrityl tetranitrate, on biochemical, functional, and morphological attributes of

- cardiovascular system of spontaneously hypertensive rats. *Gen. Physiol. Biophys.* 2009 ; 28 : 86–93.
172. Münzel T, Kurz S, Rajagopalan S, *et al.* Hydralazine prevents nitroglycerin tolerance by inhibiting activation of a membrane-bound NADH oxidase. A new action for an old drug. *J. Clin. Invest.* 1996 ; 98 : 1465–1470.
173. Milone SD, Pace-Asciak CR, Reynaud D, *et al.* Biochemical, hemodynamic, and vascular evidence concerning the free radical hypothesis of nitrate tolerance. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999 ; 33 : 685–690.
174. May DC, Popma JJ, Black WH, *et al.* In vivo induction and reversal of nitroglycerin tolerance in human coronary arteries. *N. Engl. J. Med.* 1987 ; 317 : 805–809.
175. Parker JO, Farrell B, Lahey KA, *et al.* Nitrate tolerance: the lack of effect of N-acetylcysteine. *Circulation* 1987 ; 76 : 572–576.
176. Boesgaard S, Aldershvile J, Poulsen HE. Preventive administration of intravenous N-acetylcysteine and development of tolerance to isosorbide dinitrate in patients with angina pectoris. *Circulation* 1992 ; 85 : 143–149.
177. Li H, Liu X, Cui H, *et al.* Characterization of the mechanism of cytochrome P450 reductase-cytochrome P450-mediated nitric oxide and nitrosothiol generation from organic nitrates. *J. Biol. Chem.* 2006 ; 281 : 12546–12554.
178. Miller MR, Roseberry MJ, Mazzei FA, *et al.* Novel S-nitrosothiols do not engender vascular tolerance and remain effective in glyceryltrinitrate-tolerant rat femoral arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 2000 ; 408 : 335–343.
179. Bauer JA, Fung HL. Differential hemodynamic effects and tolerance properties of nitroglycerin and an S-nitrosothiol in experimental heart failure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991 ; 256 : 249–254.
180. Shaffer JE, Han BJ, Chern WH, *et al.* Lack of tolerance to a 24-hour infusion of S-nitroso N-acetylpenicillamine (SNAP) in conscious rabbits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992 ; 260 : 286–293.
181. Jaffe IA. The effect of penicillamine on the laboratory parameters in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1965 ; 8 : 1064–1079.
182. Walshe JM. Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease. *Am. J. Med.* 1956 ; 21 : 487–495.
183. Crawhall JC, Thompson CJ. Cystinuria: effect of D-penicillamine on plasma and urinary cystine concentrations. *Science* 1965 ; 147 : 1459–1460.
184. Degos R, Touraine R, Belaïch S, *et al.* [Pemphigus in a patient treated with penicillamine for Wilson's disease]. *Bull Soc Fr Dermatol Syphiligr* 1969 ; 76 : 751–753.

185. Adams DA, Goldman R, Maxwell MH, *et al.* Nephrotic syndrome associated with penicillamine therapy of Wilson's disease. *Am. J. Med.* 1964 ; 36 : 330–336.
186. Bucknall RC, Dixon A St J, Glick EN, *et al.* Myasthenia gravis associated with penicillamine treatment for rheumatoid arthritis. *Br Med J* 1975 ; 1 : 600–602.
187. Li J, Uetrecht JP. D-penicillamine-induced autoimmunity: relationship to macrophage activation. *Chem. Res. Toxicol.* 2009 ; 22 : 1526–1533.
188. Mendelsohn ME, O'Neill S, George D, *et al.* Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. *J. Biol. Chem.* 1990 ; 265 : 19028–19034.
189. Cariello AJ, Souza GFP de, Foronda AS, *et al.* In vitro amoebicidal activity of S-nitrosoglutathione and S-nitroso-N-acetylcysteine against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010 ; 65 : 588–591.
190. Scherer de Fraga R, Camacho VRR, Souza GF, *et al.* S-nitroso-N-acetylcysteine: a promising drug for early ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Transplant. Proc.* 2010 ; 42 : 4491–4495.
191. Vercelino R, Crespo I, Souza GFP de, *et al.* S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in cirrhotic rats. *J. Mol. Med.* 2010 ; 88 : 401–411.
192. Prescott LF, Illingworth RN, Critchley JA, *et al.* Intravenous N-acetylcysteine: the treatment of choice for paracetamol poisoning. *Br Med J* 1979 ; 2 : 1097–1100.
193. Sadat U, Walsh SR, Norden AG, *et al.* Does oral N-acetylcysteine reduce contrast-induced renal injury in patients with peripheral arterial disease undergoing peripheral angiography? A randomized-controlled study. *Angiology* 2011 ; 62 : 225–230.
194. Koc F, Ozdemir K, Kaya MG, *et al.* Intravenous N-acetylcysteine plus high-dose hydration versus high-dose hydration and standard hydration for the prevention of contrast-induced nephropathy: CASIS-A multicenter prospective controlled trial. *Int. J. Cardiol.* 2012 ; 155 : 418–423.
195. Feldman L, Efrati S, Dishy V, *et al.* N-acetylcysteine ameliorates amphotericin-induced nephropathy in rats. *Nephron Physiol* 2005 ; 99 : 23–27.
196. Duru M, Nacar A, Yönden Z, *et al.* Protective effects of N-acetylcysteine on cyclosporine-A-induced nephrotoxicity. *Ren Fail* 2008 ; 30 : 453–459.
197. Dickey DT, Wu YJ, Muldoon LL, *et al.* Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular, and in vivo levels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005 ; 314 : 1052–1058.
198. Sandilands EA, Bateman DN. Adverse reactions associated with acetylcysteine. *Clin Toxicol (Phila)* 2009 ; 47 : 81–88.
199. Tsikas D, Sandmann J, Rossa S, *et al.* Investigations of S-transnitrosylation reactions between low- and high-molecular-weight S-nitroso compounds and their thiols by high-

- performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1999 ; 270 : 231–241.
200. Wang K, Wen Z, Zhang W, *et al.* Equilibrium and kinetics studies of transnitrosation between S-nitrosothiols and thiols. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001 ; 11 : 433–436.
201. Sonnenschein K, Groot H de, Kirsch M. Formation of S-nitrosothiols from regiospecific reaction of thiols with N-nitrosotryptophan derivatives. *J. Biol. Chem.* 2004 ; 279 : 45433–45440.
202. McAninly J, Williams DLH, Askew SC, *et al.* Metal ion catalysis in nitrosothiol (RSNO) decomposition. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1993 ; 1758–1759.
203. Gorren AC, Schrammel Astrid, Schmidt K, *et al.* Decomposition of S-nitrosoglutathione in the presence of copper ions and glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996 ; 330 : 219–228.
204. Arnelle DR, Stamler JS. NO⁺, NO, and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995 ; 318 : 279–285.
205. Barnett DJ, McAninly J, Williams DLH. Transnitrosation between nitrosothiols and thiols. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* 1994 ; 1131.
206. Liu Z, Rudd MA, Freedman JE, *et al.* S-Transnitrosation reactions are involved in the metabolic fate and biological actions of nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998 ; 284 : 526–534.
207. Park JW, Billman GE, Means GE. Transnitrosation as a predominant mechanism in the hypotensive effect of S-nitrosoglutathione. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1993 ; 30 : 885–891.
208. Dicks A, Beloso P, Williams D. Decomposition of S-nitrosothiols: The effects of added thiols. *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 2* 1997 ; 1429–1434.
209. Vanin AF, Muller B, Alencar JL, *et al.* Evidence that intrinsic iron but not intrinsic copper determines S-nitrosocysteine decomposition in buffer solution. *Nitric Oxide* 2002 ; 7 : 194–209.
210. Singh RJ, Hogg N, Joseph J, *et al.* Photosensitized decomposition of S-nitrosothiols and 2-methyl-2-nitrosopropane. Possible use for site-directed nitric oxide production. *FEBS Lett.* 1995 ; 360 : 47–51.
211. Veleeparampil MM, Aravind UK, Aravindakumar CT. Decomposition of S-Nitrosothiols Induced by UV and Sunlight. *Advances in Physical Chemistry* 2009 ; 2009 : 1–5.
212. Stamler JS, Toone EJ. The decomposition of thionitrites. *Curr Opin Chem Biol* 2002 ; 6 : 779–785.
213. Askew S, Barnett D, McAninly J, *et al.* Catalysis by Cu²⁺ of nitric oxide release from S-nitrosothiols (RSNO). *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 2* 1995 ; 741–745.

214. Dicks A, Swift H, Williams D, *et al.* Identification of Cu⁺ as the effective reagent in nitric oxide formation from S-nitrosothiols (RSNO). *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 2* 1996 ; 481–487.
215. Vanin AF, Papina AA, Serezhenkov VA, *et al.* The mechanisms of S-nitrosothiol decomposition catalyzed by iron. *Nitric Oxide* 2004 ; 10 : 60–73.
216. Swift H, Williams D. Decomposition of S-nitrosothiols by mercury(II) and silver salts. *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 2* 1997 ; 1933–1935.
217. Tullett JM, Rees DD, Shuker DE, *et al.* Lack of correlation between the observed stability and pharmacological properties of S-nitroso derivatives of glutathione and cysteine-related peptides. *Biochem. Pharmacol.* 2001 ; 62 : 1239–1247.
218. Jia HY, Liu Y, Zhang XJ, *et al.* Potential oxidative stress of gold nanoparticles by induced-NO releasing in serum. *J. Am. Chem. Soc.* 2009 ; 131 : 40–41.
219. Gu J, Lewis RS. Effect of pH and metal ions on the decomposition rate of S-nitrosocysteine. *Ann Biomed Eng* 2007 ; 35 : 1554–1560.
220. Noble DR, Swift HR, Williams DLH. Nitric oxide release from S-nitrosoglutathione (GSNO). *Chem. Commun.* 1999 ; 2317–2318.
221. Noble D, Williams D. Structure-reactivity studies of the Cu²⁺-catalyzed decomposition of four S-nitrosothiols based around the S-nitrosocysteine/S-nitrosoglutathione structures. *Nitric Oxide-Biol. Chem.* 2000 ; 4 : 392–398.
222. Dicks AP, Williams DL. Generation of nitric oxide from S-nitrosothiols using protein-bound Cu²⁺ sources. *Chem. Biol.* 1996 ; 3 : 655–659.
223. Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989 ; 86 : 6377–6381.
224. Hornig D. Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1975 ; 258 : 103–118.
225. Aquart DV, Dasgupta TP. Dynamics of interaction of vitamin C with some potent nitrovasodilators, S-nitroso-N-acetyl-d,l-penicillamine (SNAP) and S-nitrosocaptopril (SNOCap), in aqueous solution. *Biophys. Chem.* 2004 ; 107 : 117–131.
226. Smith JN, Dasgupta TP. Kinetics and mechanism of the decomposition of S-nitrosoglutathione by l-ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide. *Nitric Oxide* 2000 ; 4 : 57–66.
227. Williams DLH. The Chemistry of S-Nitrosothiols. *Acc. Chem. Res.* 1999 ; 32 : 869–876.
228. Gaucher C, Boudier A, Dahboul F, *et al.* S-nitrosation/denitrosation in cardiovascular pathologies: facts and concepts for the rational design of S-nitrosothiols. *Current Pharmaceutical Design* 2012 ; Accepté, parution dès que possible .

229. Bartberger MD, Houk KN, Powell SC, *et al.* Theory, Spectroscopy, and Crystallographic Analysis of S-Nitrosothiols: Conformational Distribution Dictates Spectroscopic Behavior. *J. Am. Chem. Soc.* 2000 ; 122 : 5889–5890.
230. Adam C, Garcia-Rio L, Leis J, *et al.* Nitroso group transfer in S-nitrosocysteine: Evidence of a new decomposition pathway for nitrosothiols. *J. Org. Chem.* 2005 ; 70 : 6353–6361.
231. Grossi L, Montevecchi PC. A kinetic study of S-nitrosothiol decomposition. *Chemistry* 2002 ; 8 : 380–387.
232. Trujillo M, Alvarez MN, Peluffo G, *et al.* Xanthine oxidase-mediated decomposition of S-nitrosothiols. *J. Biol. Chem.* 1998 ; 273 : 7828–7834.
233. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Putative denitrosylase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase. *Free Radic. Biol. Med.* 2007 ; 43 : 830–836.
234. Jensen D, Belka G, Bois G Du. S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochem. J.* 1998 ; 331 : 659–668.
235. Sengupta R, Holmgren A. The role of thioredoxin in the regulation of cellular processes by S-nitrosylation. *Biochim. Biophys. Acta* 2011 ; 1820 :689-700.
236. Zhong L, Holmgren A. Mammalian thioredoxin reductases as hydroperoxide reductases. *Meth. Enzymol.* 2002 ; 347 : 236–243.
237. Chivers PT, Raines RT. General acid/base catalysis in the active site of Escherichia coli thioredoxin. *Biochemistry* 1997 ; 36 : 15810–15816.
238. Benhar M, Forrester MT, Stamler JS. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009 ; 10 : 721–732.
239. Goldberger RF, Epstein CJ, Anfinsen CB. Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J. Biol. Chem.* 1963 ; 238 : 628–635.
240. Ellgaard L, Ruddock LW. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep.* 2005 ; 6 : 28–32.
241. Kortemme T, Darby NJ, Creighton TE. Electrostatic interactions in the active site of the N-terminal thioredoxin-like domain of protein disulfide isomerase. *Biochemistry* 1996 ; 35 : 14503–14511.
242. Sliskovic I, Raturi A, Mutus B. Characterization of the S-denitrosation activity of protein disulfide isomerase. *J. Biol. Chem.* 2005 ; 280 : 8733–8741.
243. Matsuda Y, Tsuchishima M, Ueshima Y, *et al.* The relationship between the development of alcoholic liver and pancreatic diseases and the induction of gamma glutamyl transferase. *Alcohol Alcohol Suppl* 1993 ; 1B : 27–33.

244. Pompella A, Tata V De, Paolicchi A, *et al.* Expression of gamma-glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *Biochem. Pharmacol.* 2006 ; 71 : 231–238.
245. Lieberman MW, Barrios R, Carter BZ, *et al.* gamma-Glutamyl transpeptidase. What does the organization and expression of a multipromoter gene tell us about its functions? *Am. J. Pathol.* 1995 ; 147 : 1175–1185.
246. Ishikawa T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem. Sci.* 1992 ; 17 : 463–468.
247. Hart TW. Some observations concerning the S-nitroso and S-phenylsulphonyl derivatives of L-cysteine and glutathione. *Tetrahedron Letters* 1985 ; 26 : 2013–2016.
248. Jaffrey SR, Snyder SH. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci. STKE* 2001 ; 2001 : p11.
249. Han P, Chen C. Detergent-free biotin switch combined with liquid chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of S-nitrosylated proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008 ; 22 : 1137–1145.
250. Chen Y-Y, Huang Y-F, Khoo K-H, *et al.* Mass spectrometry-based analyses for identifying and characterizing S-nitrosylation of protein tyrosine phosphatases. *Methods* 2007 ; 42 : 243–249.
251. Saville B. A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *The Analyst* 1958 ; 83 : 670.
252. Dzedzic B, Mazanowska-Gajdowicz J, Walczewska A, *et al.* Comparison of cadmium and enzyme-catalyzed nitrate reduction for determination of $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ in breath condensate. *Clin. Chim. Acta* 2003 ; 335 : 65–74.
253. Giustarini D, Rossi R, Milzani A, *et al.* Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. *Methods Enzymol* 2008 ; 440 : 361–380.
254. Verdon CP, Burton BA, Prior RL. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP^+ when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Anal. Biochem.* 1995 ; 224 : 502–508.
255. Romitelli F, Santini SA, Chierici E, *et al.* Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007 ; 851 : 257–267.
256. Ricart-Jane D, Llobera M, Lopez-Tejero MD. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide* 2002 ; 6 : 178–185.

257. Tsikas D, Gutzki FM, Rossa S, *et al.* Measurement of nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry and by the Griess assay: problems with the Griess assay-solutions by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1997 ; 244 : 208–220.
258. Akaike T, Inoue K, Okamoto T, *et al.* Nanomolar quantification and identification of various nitrosothiols by high performance liquid chromatography coupled with flow reactors of metals and Griess reagent. *J. Biochem.* 1997 ; 122 : 459–466.
259. Bramanti E, Angeli V, Franzini M, *et al.* Exogenous vs. endogenous gamma-glutamyltransferase activity: Implications for the specific determination of S-nitrosoglutathione in biological samples. *Arch. Biochem. Biophys.* 2009 ; 487 : 146–152.
260. Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.* 2007 ; 43 : 645–657.
261. Catalogue World Precision Instruments 2005.
262. Michael ACAC, Borland LMLM eds. *Electrochemical Methods for Neuroscience*. Boca Raton (FL) : CRC Press, 2007 :
263. Cha W, Meyerhoff ME. S-nitrosothiol detection via amperometric nitric oxide sensor with surface modified hydrogel layer containing immobilized organoselenium catalyst. *Langmuir* 2006 ; 22 : 10830–10836.
264. Rocks S, Davies C, Hicks S, *et al.* Measurement of S-nitrosothiols in extracellular fluids from healthy human volunteers and rheumatoid arthritis patients, using electron paramagnetic resonance spectrometry RID A-3965-2010. *Free Radic. Biol. Med.* 2005 ; 39 : 937–948.
265. Winyard PG, Knight IA, Shaw FL, *et al.* Determination of S-nitrosothiols in biological and clinical samples using electron paramagnetic resonance spectrometry with spin trapping. *Meth. Enzymol.* 2008 ; 441 : 151–160.
266. Rassaf T, Bryan NS, Kelm M, *et al.* Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med* 2002 ; 33 : 1590–1596.
267. Fang K, Ragsdale NV, Carey RM, *et al.* Reductive assays for S-nitrosothiols: implications for measurements in biological systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998 ; 252 : 535–540.
268. Steffen M, Sarkela TM, Gybina AA, *et al.* Metabolism of S-nitrosoglutathione in intact mitochondria. *Biochem J* 2001 ; 356 : 395–402.
269. Tsikas D, Denker K, Frölich JC. Artifacts-free analysis of S-nitrosoglutathione and S-nitroglutathione by neutral-pH, anion-pairing, high-performance liquid chromatography. Study on peroxynitrite-mediated S-nitration of glutathione to S-nitroglutathione under physiological conditions. *J Chromatogr A* 2001 ; 915 : 107–116.

270. Yap L-P, Sancheti H, Ybanez MD, *et al.* Determination of GSH, GSSG, and GSNO using HPLC with electrochemical detection. *Meth. Enzymol.* 2010 ; 473 : 137–147.
271. Kluge I, Gutteck-Amsler U, Zollinger M, *et al.* S-nitrosoglutathione in rat cerebellum: identification and quantification by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Neurochem.* 1997 ; 69 : 2599–2607.
272. Tsikas D, Sandmann J, Rossa S, *et al.* Gas chromatographic-mass spectrometric detection of S-nitroso-cysteine and S-nitroso-glutathione. *Anal. Biochem.* 1999 ; 272 : 117–122.
273. Tsikas D, Sandmann J, Frölich JC. Measurement of S-nitrosoalbumin by gas chromatography--mass spectrometry. III. Quantitative determination in human plasma after specific conversion of the S-nitroso group to nitrite by cysteine and Cu(2+) via intermediate formation of S-nitrosocysteine and nitric oxide. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002 ; 772 : 335–346.
274. Tsikas D, Dehnert S, Urban K, *et al.* GC-MS analysis of S-nitrosothiols after conversion to S-nitroso-N-acetyl cysteine ethyl ester and in-injector nitrosation of ethyl acetate. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009 ; 877 : 3442–3455.
275. Rouessac F, Rouessac A. *Analyse chimique: Methodes et techniques instrumentales.* 7ème ed. Paris : Dunod, 2009.
276. Stamler JS, Loscalzo J. Capillary zone electrophoretic detection of biological thiols and their S-nitrosated derivatives. *Anal. Chem.* 1992 ; 64 : 779–785.
277. Messana I, Rossetti DV, Misiti F, *et al.* Determination of S-nitrosoglutathione in erythrocytes by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 2000 ; 21 : 1606–1610.
278. Wang S, Circu ML, Zhou H, *et al.* Highly sensitive detection of S-nitrosylated proteins by capillary gel electrophoresis with laser induced fluorescence. *J Chromatogr A* 2011 ; 1218 : 6756–6762.
279. Snyder AH, McPherson ME, Hunt JF, *et al.* Acute effects of aerosolized S-nitrosoglutathione in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002 ; 165 : 922–926.
280. Ramsay B, Radomski M, Belder A De, *et al.* Systemic effects of S-nitroso-glutathione in the human following intravenous infusion. *Br J Clin Pharmacol* 1995 ; 40 : 101–102.
281. Belder AJ de, MacAllister R, Radomski MW, *et al.* Effects of S-nitroso-glutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation. *Cardiovasc. Res.* 1994 ; 28 : 691–694.
282. Lees C, Langford E, Brown AS, *et al.* The effects of S-nitrosoglutathione on platelet activation, hypertension, and uterine and fetal Doppler in severe preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1996 ; 88 : 14–19.
283. Langford EJ, Brown AS, Wainwright RJ, *et al.* Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet* 1994 ; 344 : 1458–1460.

284. Langford EJ, Parfitt A, Belder AJ de, *et al.* A study of platelet activation during human cardiopulmonary bypass and the effect of S-nitrosoglutathione. *Thromb. Haemost.* 1997 ; 78 : 1516–1519.
285. Molloy J, Martin JF, Baskerville PA, *et al.* S-nitrosoglutathione reduces the rate of embolization in humans. *Circulation* 1998 ; 98 : 1372–1375.
286. Simões MM de SG, Oliveira MG de. Poly(vinyl alcohol) films for topical delivery of S-nitrosoglutathione: effect of freezing-thawing on the diffusion properties. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2010 ; 93 : 416–424.
287. Souto S, Palma P, Fregonesi A, *et al.* Vascular modifications of the clitoris induced by topic nitric oxide donor gel-preliminary study. *J Sex Med* 2011 ; 8 : 484–488.
288. Pinder AG, Pittaway E, Morris K, *et al.* Nitrite directly vasodilates hypoxic vasculature via nitric oxide-dependent and-independent pathways. *Br. J. Pharmacol.* 2009 ; 157 : 1523–1530.
289. Murillo D, Kamga C, Mo L, *et al.* Nitrite as a mediator of ischemic preconditioning and cytoprotection. *Nitric Oxide* 2011 ; 25 : 70–80.
290. Wadekar KR, Bhalme M, Rao SS, *et al.* Evaluating Impurities in Drugs (Part I of III). *Pharmaceutical Technology* 2012 ;.36 : 46-51.
291. European Pharmacopoeia 7th Edition 2011.
292. International Conference on Harmonisation Guideline on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1) 1995.
293. Nikitovic D, Holmgren A. S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 19180–19185.
294. Angeli V, Tacito A, Paolicchi A, *et al.* A kinetic study of gamma-glutamyltransferase (GGT)-mediated S-nitrosoglutathione catabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 2009 ; 481 : 191–196.
295. Stoyanovsky DA, Tyurina YY, Tyurin VA, *et al.* Thioredoxin and lipoic acid catalyze the denitrosation of low molecular weight and protein S-nitrosothiols. *J. Am. Chem. Soc.* 2005 ; 127 : 15815–15823.
296. Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, *et al.* Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO: experimental and clinical study on the fate of NO in human blood. *Circ Res* 2002 ; 91 : 470–477.
297. Kapil V, Milsom AB, Okorie M, *et al.* Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO. *Hypertension* 2010 ; 56 : 274–281.
298. International Conference on Harmonisation Guideline on Impurities in new drug substances, Q3A(R2) 2006.

299. Nagpal S, Karan, Upadhyay A, *et al.* A review on need and importance of impurity profiling. *Current Pharmaceutical Analysis* 2011 ; 7 : 62–70.
300. Al-Sa'doni H, Ferro A. S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. *Clin Sci (Lond)* 2000 ; 98 : 507–520.
301. Timerghazin QK, Peslherbe GH, English AM. Resonance description of S-nitrosothiols: insights into reactivity. *Org. Lett.* 2007 ; 9 : 3049–3052.
302. Roy B, Moulinet d'Hardemare A du, Fontecave M. New Thionitrites: Synthesis, Stability, and Nitric Oxide Generation. *J. Org. Chem.* 1994 ; 59 : 7019–7026.
303. Oliveira MG de, Shishido SM, Seabra AB, *et al.* Thermal Stability of Primary S-Nitrosothiols: Roles of Autocatalysis and Structural Effects on the Rate of Nitric Oxide Release. *J. Phys. Chem. A* 2002 ; 106 : 8963–8970.
304. Alencar JL, Lobysheva I, Chalupsky K, *et al.* S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003 ; 307 : 152–159.
305. Khan M, Im Y-B, Shunmugavel A, *et al.* Administration of S-nitrosoglutathione after traumatic brain injury protects the neurovascular unit and reduces secondary injury in a rat model of controlled cortical impact. *J Neuroinflammation* 2009 ; 6 : 32.
306. Eaton MAW. Improving the translation in Europe of nanomedicines (a.k.a. drug delivery) from academia to industry. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 2012. In press; doi: 10.1016/j.jconrel.2012.06.016.
307. Marcato PD, Adami LF, Melo PS, *et al.* Glutathione and S-nitrosoglutathione in alginate/chitosan nanoparticles: Cytotoxicity. *Journal of Physics: Conference Series* 2011 ; 304 : 012045: 1-5.
308. Seabra AB, Rocha LL da, Eberlin MN, *et al.* Solid films of blended poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl pyrrolidone) for topical S-nitrosoglutathione and nitric oxide release. *J Pharm Sci* 2005 ; 94 : 994–1003.
309. Yoo J-W, Acharya G, Lee CH. In vivo evaluation of vaginal films for mucosal delivery of nitric oxide. *Biomaterials* 2009 ; 30 : 3978–3985.
310. Shishido SM, Seabra AB, Loh W, *et al.* Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in Pluronic F127 gel: potential uses for local and controlled nitric oxide release. *Biomaterials* 2003 ; 24 : 3543–3553.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : Mercredi 26 Septembre 2012

<p align="center">DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : Marianne PARENT</p> <p><u>Sujet</u> : Caractérisation physicochimique du S-nitrosoglutathion, molécule à potentiel thérapeutique cardiovasculaire : vers l'établissement d'une monographie</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : Philippe MAINCENT, Professeur des Universités (Université de Lorraine) Directeur : Ariane BOUDIER, Maître de Conférences (Université de Lorraine) Juges : Laurent HAVARD, Praticien Hospitalier (APHP) Jean-Yves JOUZEAU, Professeur des Universités (Université de Lorraine), Praticien Hospitalier Nguyen TRAN, Maître de Conférences (Université de Lorraine) Jean-Claude WILLEMIN, Maître de Conférences (Reims), Praticien Hospitalier</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 23/08/2012</p> <p align="center">Le Président du Jury Directeur de Thèse</p> <p align="center">   </p>
<p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 4.09.2012</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">  Francine PAULUS  </p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 17 SEP. 2012</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">  Pierre MUTZENHARDT </p> <p align="center">N° d'enregistrement : 4080</p>

